

**Untersuchungen zur Energiegewinnung des
hyperthermophilen, schwefelreduzierenden
Archaeons *Ignicoccus hospitalis***



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Ulf Küper
aus München

im Jahr 2010

Promotionsgesuch eingereicht am: 7.12.2010

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Rachel

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. G. Hauska
	1. Gutachter:	Prof. Dr. R. Rachel
	2. Gutachter:	Prof. Dr. V. Müller
	3. Prüfer:	Prof. Dr. R. Wirth

Unterschrift:

**Meiner Familie,
in Liebe und Dankbarkeit**

*Ein Mangel an Phantasie bedeutet
den Tod der Wissenschaft.*

(Johannes Kepler)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
II. Material und Methoden	10
1. Bezugsquellen von Substanzen	10
1.1. Chemikalien, Biochemikalien und Lösungsmittel	10
1.2. Molekularmassenstandards	11
1.3. Reaktionskits, Membranen und Filtereinheiten.....	11
1.4. Antikörper.....	12
1.4.1. Polyklonale Primärantikörper (1° AK)	12
1.4.2. Sekundärantikörper (2° AK).....	12
1.5. Indikatoren für physiologische und zellbiologische Untersuchungen.....	13
2. Kulturmedien	13
2.1. ½ SME- <i>Ignicoccus</i> -Medium (Paper <i>et al.</i> , 2007)	13
2.1.1. Zusammensetzung	13
2.1.2. Herstellung und Sterilisation	13
2.1.3. Herstellung und Sterilisation für Großanzuchten im Fermenter	14
2.2. MM-I-Medium	14
2.2.1. Zusammensetzung	14
2.2.2. Herstellung und Sterilisation	15
2.3. HD-Medium	15
2.3.1. Zusammensetzung	15
2.3.2. Herstellung und Sterilisation.....	15
3. Verwendete Organismen und Kultivierung	15
3.1. <i>Ignicoccus</i> Reinkulturen bzw. Cokultur aus <i>I. hospitalis</i> und <i>N. equitans</i>	15
3.1.1. Verwendete Stämme und Kultivierungsbedingungen	15
3.1.2. Kultivierung in Serumflaschen.....	15
3.1.3. Kultivierung im Fermenter	16
3.1.4. Zellernte nach Kultivierung im Fermenter	16
3.1.5. Anreicherung von <i>N. equitans</i> Zellen mittels differentieller Zentrifugation.....	17
3.2. <i>Thermotoga maritima</i>	17

3.2.1. Verwendete Stämme und Kultivierungsbedingungen	17
3.2.2. Kultivierung in Serumflaschen	17
3.3. <i>Micrococcus luteus</i>	17
3.3.1. Verwendete Stämme und Kultivierungsbedingungen	17
3.3.2. Kultivierung in Reagenzröhrchen	18
4. Mikroskopie	18
4.1. Phasenkontrast und Epifluoreszenzmikroskopie	18
4.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	18
4.3. Elektronenmikroskopie	19
4.3.1. Einzelpartikel Analysen	19
4.3.2. Immunmarkierung von Ultradünnschnitten	19
5. Zellaufschlussverfahren	19
5.1. French Press	19
5.2. FastPrep®-24 Zelmühle	20
5.3. Mikro-Dismembrator Schwingmühle	20
5.4. Zellaufschluss mittels Aluminiumoxid (Alcoa A-305)	20
5.5. Ultraschallbehandlung	20
5.6. Zellaufschluss durch Detergenzien	21
6. Präparation der Membranen	21
6.1. Gewinnung von Membranen durch differentielle Zentrifugation	21
6.2. Gewinnung von Membranen durch Dichtegradienten-Zentrifugation	21
6.2.1. Herstellung der Auftragsuspension	21
6.2.2. Saccharose-Dichtegradient	22
6.2.3. Percoll-Dichtegradient	22
7. Chromatographische Trennverfahren	22
7.1. Ionenaustausch-Chromatographie (IEX)	22
7.1.1. Anionenaustausch-Chromatographie (AEX)	23
7.1.2. Kationenaustausch-Chromatographie (CEX)	23
7.2. Gelfiltrations-Chromatographie (SEC)	24
8. Reinigung des A ₁ -Subkomplexes der A ₁ A ₀ ATP-Synthase/ATPase von <i>I. hospitalis</i>	25
8.1. Solubilisierung	25
8.2. Anionenaustausch-Chromatographie 1: HiTrap Q HP	25
8.3. Gelfiltration 1: Superose 6 10/300 GL	26
8.4. Anionenaustausch-Chromatographie 2: Mono Q 5/50 GL	26
8.5. Gelfiltration 2: Superdex 200 10/300 GL	27

9. Analyse von Enzymaktivitäten	27
9.1. Photometrische Bestimmung der ATP Hydrolyseaktivität	27
9.1.1. ‚Longtest‘: absolute Aktivitätsbestimmung von Proteinlösungen (Pisa, 2008, modifiziert)	28
9.1.2. ‚Quicktest‘: relative Aktivitätsbestimmung von Proteinlösungen (Pisa, 2008, modifiziert)	28
9.1.3. Hemmstoffexperimente der ATPase-Aktivität	28
9.2. Aktivitätsfärbungen	28
9.2.1. ATPase-Aktivitätsfärbung („ATPase-In-Gel-Assay“).....	28
9.2.1. Hydrogenase Aktivitätsfärbung („Hydrogenase-In-Gel-Assay“)(Küper <i>et al.</i> , 2010).....	29
10. Proteinbiochemische Methoden	29
10.1. Proteinkonzentrationsbestimmung.....	29
10.2. Konzentrierung und Dialyse von Proteinlösungen	30
10.3. Gelelektrophoretische Verfahren.....	30
10.3.1. SDS-PAGE.....	30
10.3.2. <i>Native</i> -PAGE	32
10.3.3. 2D- <i>Native</i> /SDS-PAGE (Burré <i>et al.</i> , 2009).....	34
10.4. Färbung von Proteingelen	34
10.4.1. Coomassiefärbung.....	34
10.4.2. Silberfärbung	34
11. Immunologische Verfahren	35
11.1. Gewinnung spezifischer Antiseren und Antikörper.....	35
11.2. Western-Blot	35
11.2.1. Elektrotransfer nativer Proteine	35
11.2.2. Elektrotransfer denaturierter Proteine	36
11.2.3. Immundetektion.....	36
11.3. Dot Blot.....	37
11.4. Immunfluoreszenz	37
12. Zellbiologische und physiologische Verfahren.....	38
12.1. Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren	38
12.1.1. Membranimpermeable Farbstoffe.....	38
12.1.2. Membranpermeable Farbstoffe.....	38
12.2. Fluoreszenzmarkierung von Membranen	38
12.3. Bestimmung der Überlebensfähigkeit von Zellen (lebend / tot).....	39
12.4. Nachweis eines Membranpotentials.....	39

13. Spektroskopische Verfahren.....	40
13.1. MALDI-TOF MS/MS	40
13.2. LILBID MS.....	40
14. Bioinformatische Analysen	41
15. Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse.....	42
III. Ergebnisse	43
1. Methodische Vorarbeiten.....	43
1.1. Autotrophe Kultivierung von <i>I. hospitalis</i> im Großmaßstab	43
1.1.1. Beimpfen des Mediums mittels frischer Vorkultur.....	43
1.1.2. Beimpfen des Mediums mittels gefrorener Zellen	44
1.2. Optimierung des Testsystems für die ATP-Hydrolysemessung.....	45
1.3. Untersuchungen zur ATP-Synthesefähigkeit der A_1A_0 ATP-Synthase.....	45
2. Untersuchungen der A_1A_0 ATP-Synthase / ATPase	47
2.1. Interpretation der Genomdaten	47
2.2. Solubilisierung	49
2.3. Reinigung und Untersuchungen des A_1 ATPase-Subkomplexes	50
2.3.1. Reinigung des A_1 ATPase-Subkomplexes	50
2.2.2. Untereinhenitzusammensetzung des gereinigten A_1 -Teils der ATP-Synthase	55
2.2.3. LILBID Massenspektrometrie	56
2.2.4. Elektronenmikroskopische Analysen	57
2.2.5. Versuche zur Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des A_1 -Subkomplexes	58
2.3. Untersuchungen des A_1A_0 ATP-Synthase Gesamtkomplexes	59
2.3.1. Versuche zur Reinigung.....	59
3. Subzelluläre Lokalisation der ATP-Synthase und H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase von <i>I. hospitalis</i>	63
3.1. Verwendete Antikörper	64
3.1.1. Herkunft und Generierung der Antkörper	64
3.1.2. Spezifität der Antikörper gegen die ATP-Synthase	64
3.1.3. Spezifität des Antikörpers gegen die H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase	65
3.2. Lokalisation der ATP-Synthase	67
3.2.1. Immunfluoreszenzstudien	67
3.2.2. EM-Immunlokalisation an Ultradünnschnitten.....	70
3.3. Lokalisation der H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase	72
4. Lokalisation der ATP-Synthase weiterer Mikroorganismen	73

4.1. Genus <i>Ignicoccus</i>	73
4.2. Genus <i>Thermotoga</i>	75
5. Zellbiologische Untersuchungen von <i>I. hospitalis</i>	76
5.1. Versuche zum direkten Nachweis eines Membranpotentials.....	76
4.2. Lokalisation von DNA, RNA und Ribosomen.....	78
IV. Diskussion.....	79
1. Vorläufige Charakterisierung der ATP-Synthase.....	79
2. Lokalisation von ATP-Synthase und H ₂ :Schwefel-Oxidoreduktase	82
3. Energetisierte äußere Membran und zellbiologische Konsequenzen	86
3.1. Konsequenzen für <i>I. hospitalis</i>	86
3.2. Konsequenzen für die Cokultur aus <i>I. hospitalis</i> und <i>N. equitans</i>	93
4. Lage der ATP-Synthase von <i>I. hospitalis</i> : Ein einzigartiges Phänomen?	94
5. Ausblick	95
V. Zusammenfassung	97
VI. Literaturverzeichnis.....	98
VII. Anhang	113
1. Abkürzungsverzeichnis.....	113
2. Begleit-CD.....	115
3. Publikationen	115
4. Lebenslauf	116
5. Danksagung.....	117
6. Eidesstattliche Erklärung.....	119

I. Einleitung

„Was ist Leben?“- Die Frage nach der wahren Beschaffenheit des Lebendigen begleitet die Menschheit bereits seit der Antike. Doch gibt es bis heute keine zufriedenstellende, sowie allgemeingültige Definition, die Leben in seiner Vielfältigkeit und Komplexität exakt beschreiben kann (Kolb, 2007). In seinem Buch „Genesis: The Scientific Quest for Life's Origin“ kommt Robert Hazen sogar zu dem Schluss, dass selbst unter den vielen Definitionen, die im Umlauf sind, kaum welche übereinstimmen (Hazen, 2005). Trotzdem zeigt sich eine Tendenz, die zwei Charakteristika des Lebens besonders in den Fokus einer möglichen Definition stellt (Schulze-Makuch & Irwin, 2008). Neben der Fähigkeit eines Lebewesens, sich selbst vermehren und fortpflanzen zu können, wird der Verbrauch von Energie als eine essentielle Eigenschaft von Leben vorausgesetzt. In der Biologie kann metabolische Energie zum einen direkt durch Substratkettenphosphorylierung (SKP) oder indirekt durch Elektronentransportphosphorylierung (ETP) konserviert werden (Herrmann *et al.*, 2008). Für letzteren Prozess sind die Organismen auf chemiosmotische Membransysteme angewiesen, deren grundlegende bioenergetische Eigenschaften für alle drei Domänen des Lebens (Archaea, Bacteria und Eukarya) gültig sind (Berry, 2002). So besitzt jede energietransduzierende Membran zwei unterschiedliche Arten von Protonenpumpen: primäre und sekundäre. Die Natur der primären Protonenpumpen hängt dabei von der genutzten Energiequelle ab, die entweder Licht oder Redoxenergie (chemische Energie) sein kann (Nicholls & Ferguson, 2002). Im Lauf der Evolution hat sich eine Vielfalt primärer Protonenpumpen entwickelt, um die unterschiedlichen Substrate der verschiedenen Lebensräume optimal nutzen zu können. Funktionell koppeln primäre Protonenpumpen einen Transport von Elektronen mit einer gleichzeitigen Translokation von Protonen über eine Membran (Nicholls & Ferguson, 2002). Die Kraft, die während der Translokation auf die Protonen ausgeübt wird, bezeichnet man als protonenmotorische Kraft (pmf = proton motive force). Sie setzt sich zusammen aus der Konzentrationsdifferenz der Protonen über der Membran (ΔpH = Protonengradient) und aus der elektrischen Potentialdifferenz zwischen zwei wässrigen Phasen, die durch eine Membran voneinander getrennt werden ($\Delta\psi$ = Membranpotential). Daraus folgt für die protonenmotorische Kraft:

$$pmf = \Delta\psi - 2,3 (RT/F) \Delta pH(mV)$$

In der Gleichung ist R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur (K) und F die Faraday-Konstante. Der Effekt der Differenz einer pH-Einheit (ΔpH 1) entspricht dabei $2,3 (RT/F)$, was 59 mV bei 25° C und 70 mV bei 80° C gleichkommt (Mitchell, 1972). In nur wenigen Fällen (z.B. bei Chloroplasten) wird die pmf hauptsächlich aus dem Protonengradienten ΔpH aufgebaut (Gräber & Witt, 1976; Junesch & Gräber, 1991). Im Regelfall jedoch sind beide Größen, $\Delta\psi$ und ΔpH , am Aufbau der protonenmotorische Kraft beteiligt (Nicholls & Ferguson, 2002). Neben der

Energiekonservierung dient die *pmf* zusätzlich dem Membrantransport von Substraten, der Rotation von Flagellen und der Aufrechterhaltung des intrazellulären pH (Albers *et al.*, 2001). Anstelle des beschriebenen Protonengradienten nutzen manche Organismen für diese Prozesse einen transmembranen Na^+ -Ionengradienten (Müller *et al.*, 1990; Pisa *et al.*, 2007; Biegel & Müller, 2010). Die Triebkraft wird durch Translokation von Na^+ -Ionen über spezifische Na^+ -Pumpen aufgebaut und als *smf* (sodium motive force) bezeichnet (Speelmans *et al.*, 1995; Mulkidjanian *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zur Vielfalt primärer Protonenpumpen ist die sekundäre Protonenpumpe in der Regel ein hochkonserviertes Enzym vom Typ einer membrangebundenen ATP-Synthase/ATPase (Nicholls & Ferguson, 2002). Unter physiologischen Bedingungen nutzen diese ATP-Synthasen die Energie des elektrochemischen Ionengradienten für die Synthese von ATP. Die Energiekonservierung mittels Elektronentransportphosphorylierung wird somit, entsprechend der chemiosmotischen Theorie (Mitchell, 1961), über einen transmembranen Ionengradienten angetrieben, der mittels einer primären Protonenpumpe erzeugt und durch die ATP-Synthase zur Synthese von ATP aus ADP und P_i genutzt wird.

Insgesamt werden ATP-Synthasen/ATPasen als Schlüsselenzyme der Bioenergetik angesehen und derzeit in drei verschiedene Klassen eingeteilt: F-Typ, V-Typ, A-Typ. Sie sind alle gleichen Ursprungs (Nelson & Nelson, 1989; Gogarten & Taiz, 1992; Mulkidjanian *et al.*, 2007) und verfügen über einen ähnlichen Aufbau (Abb. 1) haben sich aber im Laufe der Evolution strukturell und funktionell differenziert (Cross & Müller, 2004). So sind alle F-, V- oder A-Typ ATP-Synthasen/ATPasen membranständige Enzymkomplexe, die aus zwei Domänen aufgebaut, und durch mindestens zwei Stiele miteinander verbunden sind (Abrahams *et al.*, 1994; Boekema *et al.*, 1999; Coskun *et al.*, 2004). Die hydrophile Stator-Domäne (F_1 , V_1 , A_1) reicht in das Cytoplasma und katalysiert ATP-Synthese bzw ATP-Hydrolyse (Stock *et al.*, 2000; Nishi & Forgac, 2002). Die hydrophobe Rotor-Domäne (F_0 , V_0 , A_0) verankert das Enzym in der Membran und transloziert Ionen entgegen dem elektrochemischen Gradienten durch die Membran (Grüber *et al.*, 2001b; Nakanishi-Matsui *et al.*, 2010). Dabei wird der c-Ring (Proteolipid) der hydrophoben Domäne in Rotation versetzt, und überträgt die Drehung wiederum auf den zentralen Stiel (Aksimentiev *et al.*, 2004). Dieser fungiert nun wie eine Antriebswelle und koppelt dadurch den hydrophoben und hydrophilen Subkomplex der ATP-Synthase/ATPase funktionell. Zusätzlich werden die beiden Teile durch mindestens einen peripheren Stiel verbunden, der dem Enzym als Widerlager dient. Letztendlich bewirkt die Drehung der Welle eine Konformationsänderung der katalytischen Untereinheiten in der hydrophilen Domäne, die zur Synthese von ATP aus ADP und P_i führt (Boyer, 1997; Yokoyama & Imamura, 2005). In umgekehrter Richtung führt die Hydrolyse von ATP zur Konformationsänderung der katalytischen Untereinheiten, und damit zur Drehung des zentralen Stiels und des c-Rings, die in einer Ionentranslokation von innen nach außen resultiert. Unter ATP-Verbrauch fungiert das Enzym somit als ionenpumpende ATPase. Welche Reaktionsrichtung bevorzugt wird, hängt vom elektrochemischen Potential und dem ADP/ATP-Verhältnis der Zelle ab (von Ballmoos *et al.*, 2008). Im Falle einer Elektronentransportphosphorylierung liegt das Gleichgewicht der Reaktion seitens der ATP-Synthese. Wird Energie allerdings ausschließlich durch Substratkettenphosphorylierung

gewonnen, bleibt die ATPase-Funktion des Enzyms die einzige Möglichkeit zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten. Dementsprechend kann man ATP-Synthasen/ATPasen auch als gekoppelte Motoren bezeichnen (Müller & Grüber, 2003), da ein chemisch getriebener Motor mit einem Ionen-getriebenen Motor verbunden ist. Darüber hinaus werden ATP-Synthasen/ATPasen auch als biologische Nanomotoren (Hoffmann *et al.*, 2010) oder molekulare Rotationsmaschinen (Yoshida *et al.*, 2001) bezeichnet.

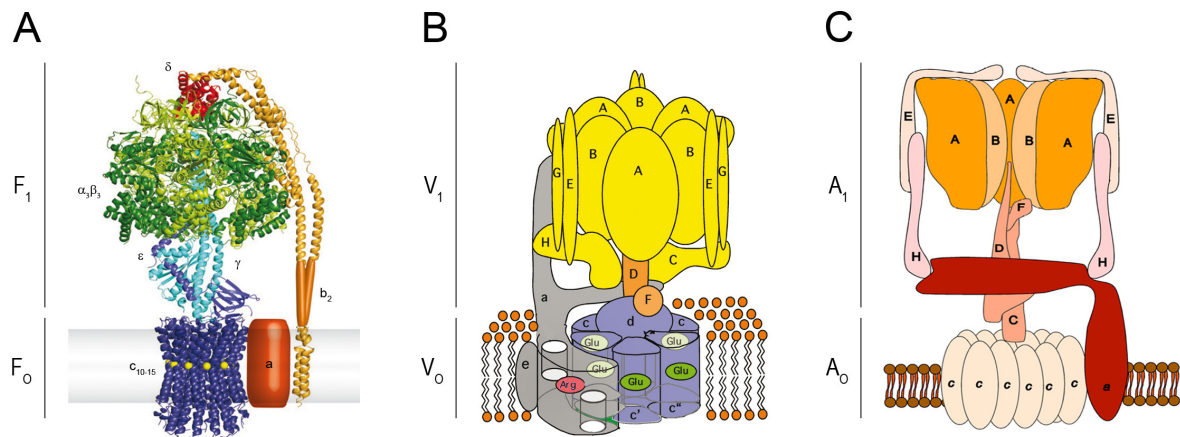


Abb. 1: Modelle der Untereinheitenzusammensetzung unterschiedlicher ATP-Synthase/ATPase Klassen. (A) F-Typ ATP-Synthase (von Ballmoos *et al.*, 2009); (B) V-Typ ATPase (Toei *et al.*, 2010); (C) A-Typ ATP-Synthase (Pisa, 2008);

Detailliert wurde das entsprechende Rotationsverhalten von der Arbeitsgruppe um Yoshida untersucht, indem der Kopfteil der Enzyme auf einer Glasplatte fixiert und der zentrale Stiel mit einem fluoreszenzmarkierten Aktinfilament gekoppelt wurde. Mittels fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurde nach Zugabe von ATP eine entsprechende Rotation des Filaments entgegen dem Uhrzeigersinn beobachtet (Noji *et al.*, 1997). Eine volle Drehung um 360° erfolgt dabei in drei Schritten zu je 120° (Yasuda *et al.*, 1998), resultierend aus der dreifachen Anordnung der katalytischen Untereinheiten. Dabei zeichnen sich die drei Untereinheiten-Paare durch unterschiedliche Nukleotidaffinitäten aus und nehmen verschiedene Konformationen ein: offen, geschlossen mit ATP und halboffen mit ADP und P_i (Boyer, 1993). Hochauflösende Strukturanalysen ($2,8 \text{ \AA}$) von $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Komplexen aus Rinderherzmitochondrien (Abrahams *et al.*, 1994) belegten zudem, dass der asymmetrische zentrale Stiel stets nur mit einem der $\alpha\beta$ -Paare in Kontakt steht. Die Rotation des zentralen Stiels steht dabei in direktem Zusammenhang zu den beschriebenen Konformationsänderungen. Ähnlich dem oben beschriebenen Experiment wurde auch die Drehung des c-Rings gegen die Untereinheit a bewiesen (Sambongi *et al.*, 1999).

Die am besten untersuchte der drei ATP-Synthase/ATPase Klassen ist die der F_1F_0 ATP-Synthasen, die in der inneren Membran von Mitochondrien, der Thylakoidmembran von Chloroplasten und der Cytoplasmamembran von Bakterien vorkommen (Fillingame, 1997; Boyer, 1997; von Ballmoos *et al.*, 2009). In Bakterien liegt das Enzym in seiner einfachsten Form vor. Es ist aus acht, nicht identischen Untereinheiten in unterschiedlicher Kopienzahl mit der Stöchiometrie $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_x$ aufgebaut (Futai & Kanazawa, 1983; Futai *et al.*, 1989). Dagegen ist das Enzym der Mitochondrien bereits wesentlich komplexer aufgebaut und besteht aus 16 verschiedenen Untereinheiten (Buchanan & Walker, 1996). In den meisten F_1F_0 ATP-Synthasen fungieren

Protonen als Kopplungssionen. In manchen anaeroben Bakterien wie beispielsweise *Propionigenium modestum* (Laubinger & Dimroth, 1988), *Ilyobacter tartaricus* (Neumann *et al.*, 1998) und *Acetobacterium woodii* (Aufurth *et al.*, 2000; Fritz & Müller, 2007) wird das Enzym jedoch an Natriumionen gekoppelt.

V₁V₀ ATPasen sind nach einem ähnlichen Grundprinzip aufgebaut und kommen als Enzymkomplexe aus mindestens 13 verschiedenen Untereinheiten A₃B₃CDEFG_γH₂adcc'c'' in eukaryontischen Endo- und Plasmamembranen vor (Beyenbach & Wieczorek, 2006). Allerdings synthetisieren V-Typ ATPasen kein ATP, sondern wirken unter physiologischen Bedingungen ausschließlich als ATP-abhängige Protonenpumpen. Durch die artifizielle Erhöhung des Membranpotentials von -180 mV auf -400 mV konnte jedoch gezeigt werden, dass unter nicht-physiologischen Bedingungen eine ATP-Synthese durch V-Typ ATPasen möglich ist (Futai *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 2000). Je nach subzellulärer Lage des Enzyms werden Protonen durch V-ATPasen aktiv aus dem Cytoplasma in das Lumen der intrazellulären Kompartimente oder über die Plasmamembran aus der Zelle transportiert (Nishi & Forgac, 2002; Jefferies *et al.*, 2008). Die Hauptaufgabe der intrazellulären V-ATPasen besteht darin, die intrazellulären Kompartimente anzusäuern oder einen Protonengradienten über Membranen aufzubauen, der im Folgenden für verschiedenste Transportprozesse genutzt werden kann. Bei den V-ATPasen der Plasmamembran kann die physiologische Funktion sehr unterschiedlich sein und ist abhängig vom Zelltyp (Toei *et al.*, 2010). Während wir bis heute davon ausgehen, dass F₁F₀ und A₁A₀ ATP-Synthasen einen stabilen Komplex ausbilden, konnte gezeigt werden, dass die V₁V₀-ATPase in der Lage ist, den V₁-Teil vom V₀-Teil reversibel zu dissoziieren. Liegt der V₁-Teil dissoziiert vor, ist dieser nicht mehr fähig, ATP zu hydrolysieren. Die Zelle nutzt dies als *in vivo* Regulationsmechanismus für einen kontrollierten Einsatz der ATPase-Aktivität. Die Funktionalität des Enzyms kann durch die Assemblierung von V₁ und V₀ wieder hergestellt werden, wodurch die Zelle gleichzeitig die Notwendigkeit einer erneuten Synthese der benötigten Proteine umgeht (Qi *et al.*, 2007; Jefferies & Forgac, 2008). Das Kopplungssion der meisten V-Typ ATPasen ist das Proton. Allerdings nutzen einige bakterielle V-Typ ähnliche ATP-Synthasen/ATPasen Na⁺ als Kopplungssion, wie die als V-Typ klassifizierten ATP-Synthasen von *Clostridium fervidus* oder *Enterococcus hirae* (Speelmans *et al.*, 1994; Kakinuma & Igarashi, 1994). Derzeit ist die Klassifikation dieser ungewöhnlichen V-Typ ATP-Synthasen/ATPasen sehr umstritten. Strukturell ähneln sie zwar V-Typ ATPasen, doch nutzen die Organismen das Enzym für die Synthese von ATP. So zeigten phylogenetische Analysen des als V-Typ klassifizierten Enzyms von *Thermus thermophilus*, dass es sich eigentlich um eine A-Typ ATP-Synthase handelt, die wahrscheinlich über lateralen Gentransfer in das Bakterium gelangte (Yokoyama *et al.*, 2000). A₁A₀ ATP-Synthasen werden grundsätzlich als chimäre Enzyme aus F-Typ und V-Typ ATP-Synthasen/ATPasen angesehen (Schäfer & Meyering-Vos, 1992). Der strukturelle Aufbau ähnelt dem der V-Typ ATPasen, wohingegen die physiologische Funktion vermutlich primär auf die Synthese von ATP ausgelegt ist und damit der Funktion von F-Typ ATP-Synthasen gleichkommt (Cross & Müller, 2004). Eine allgemeine Stöchiometrie für archaeele ATP-Synthasen zu benennen ist bisher nur bedingt möglich, da bezüglich Struktur und Funktion dieser Enzyme weit weniger bekannt ist, als über die der beiden vorher beschriebenen Enzymklassen. Allerdings haben Genomanalysen gezeigt, dass bei euryarchaeellen Vertretern die ATP-Synthase in einem Operon

vorliegt, das aus etwa 9 Genen besteht, die für unterschiedliche Untereinheiten kodieren (Wilms *et al.*, 1996; Lewalter & Müller, 2006). Dadurch kann eine vorläufige Aussage über die grundsätzlich am Aufbau beteiligten Untereinheiten getroffen werden: $A_3B_3CDE_yFH_xac_x$, mit A, B, C, D, E, F und H als hydrophilen sowie a und c als hydrophoben Untereinheiten. A und B bilden alternierend den pseudo-hexagonalen Kopfteil des Enzyms (Lemker *et al.*, 2001) und sind jeweils in dreifacher Kopienzahl vorhanden, wobei A die katalytische Untereinheit des Enzyms darstellt. Das Monomer der Untereinheit c ähnelt in den meisten Fällen dem der F-Typ ATP-Synthasen (8 kDa) mit zwei Transmembranhelices und einer konservierten Carboxylat-Seitenkette als Ionenbindestelle. Allerdings wurden bei einigen Vertretern der Archaea (z.B. *Pyrococcus furiosus* (16 kDa)) auch c-Monomere beschrieben, die eher denen von V-Typ ATPasen (16 kDa) ähneln und vermutlich durch Genduplikation bzw. Genvervielfachung entstanden sind (Cross & Müller, 2004). Für die beiden gereinigten Enzyme aus *Methanocaldococcus jannaschii* (Lingl *et al.*, 2003) und *Pyrococcus furiosus* (Pisa *et al.*, 2007) konnten alle annotierten Untereinheiten identifiziert und der vermutete Aufbau aus 9 Untereinheiten bestätigt werden. Einzelpartikelanalysen von *M. jannaschii* zeigten eine zwischen dem A_1 - und A_0 -Teil gelegene kragenartige Struktur, sowie zwei Außenstiele (Lingl *et al.*, 2003), allerdings war die Topologie der Untereinheiten unbekannt. Elektronenmikroskopische Analysen der ATP-Synthase von *P. furiosus* führten 2009 zu einer 3D-Rekonstruktion der Struktur (Vonck *et al.*, 2009). Die Rekonstruktion zeigte einen Komplex aus zwei Domänen, die durch einen zentralen und zwei periphere Stiele miteinander verbunden sind, sowie eine kragenartige Struktur zwischen A_1 und A_0 . Die Stöchiometrie der A_1A_0 ATP-Synthase wurde zu $A_3B_3CDE_2FH_2ac_{10}$ bestimmt (Pisa, 2008).

Im Gegensatz zur Reinigung euryarchaeeller ATP-Synthasen waren Versuche zur Reinigung funktionell gekoppelter ATP-Synthasen aus Vertretern der Crenarchaeota bis heute nicht erfolgreich. Bisher konnten lediglich vier A_1 -Subkomplexe hyperthermophiler Crenarchaeoten gereinigt und charakterisiert werden, die entweder aus drei (*Sulfolobus solfataricus*: 63, 48, 24 kDa), aus vier (*Sulfolobus sp. strain 7*: 66, 51, 25, 13 kDa; *Sulfolobus acidocaldarius*: 65, 51, 20, 12 kDa) oder aus fünf verschiedenen Untereinheiten (*Pyrodictium abyssi* TAG11: 65, 51, 41, 26, 24 kDa) bestanden (Wakagi & Oshima, 1985; Lübber & Schäfer, 1987; Hochstein & Stan-Lotter, 1992; Dirmeier, 1998). Für die Korarchaeota, die Thaumarchaeota und die Nanoarchaeota wurden bisher weder gekoppelte A_1A_0 ATP-Synthasen noch Subkomplexe gereinigt. Im Fall von *Nanoarchaeum equitans*, dem bisher einzigen kultivierbaren Vertreter der Nanoarchaeota (Huber *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2006), war durch Analysen des Genoms nicht einmal ein vollständiger Enzymsatz für eine eigenständige Maschinerie zur Energiekonservierung zu identifizieren (Waters *et al.*, 2003).

Bezüglich der Energiekonservierung fehlen *N. equitans* nicht nur bekannte Gene zur Energiegewinnung durch Substratkettenphosphorylierung, sondern auch Gene primärer Protonenpumpen zur Etablierung einer protonenmotorischen Kraft über der Cytoplasmamembran. Lediglich ein Satz von fünf Genen für unterschiedliche Untereinheiten einer ATP-Synthase (A, B, D, a und c) konnte nachgewiesen werden (Waters *et al.*, 2003), doch bleibt die Funktionalität dieser reduzierten ATP-Synthase fragwürdig und bisher unbeantwortet. Das Genom von *N. equitans* ist

grundsätzlich sehr reduziert und mit nur 0,49 Mbp das kleinste bekannt archaeele Genom (Waters *et al.*, 2003) und eines der kleinsten Genome überhaupt. Im Gegensatz zu Genen für biosynthetische Prozesse wurden alle Komponenten der Informationsprozessierung (DNA-Replikation, Transkription und Translation, sowie Reparatursysteme) und zur Durchführung eines Zellzyklus annotiert. Neben dem sehr kleinen Genom weist *N. equitans* zusätzlich eine sehr geringe Zellgröße von etwa 300-500 nm Durchmesser auf (Huber *et al.*, 2002). Kleine Zellgrößen und reduzierte Genome sind für viele symbiotische oder parasitische Bacteria charakteristisch (Ochman & Moran, 2001; Delaye & Moya, 2010). So bildet auch *Nanoarchaeum equitans* gemeinsam mit *Ignicoccus hospitalis* (Paper *et al.*, 2007) eine sogenannte *intimate association*, die einzig kultivierbare, natürliche Cokultur von zwei Archaeen (Jahn *et al.*, 2008). *N. equitans* Zellen vergesellschaften sich mit *I. hospitalis*, indem sie sich von außen an die Zelloberfläche von *I. hospitalis* anheften. Dabei zeigt *N. equitans* einen typischen archaeeellen Zellwandaufbau aus Cytoplasmamembran und aufgelagertem Surface-Layer (S-Layer) (Schuster, 2003; Gürster, 2007; Rachel, 2010). S-Layer sind als häufiger Bestandteil der prokaryontischen Zellhülle bei über neunzig Prozent der Archaea zu finden. Dieser Proteinschicht werden zahlreiche Funktionen zugeschrieben, so geht man davon aus, dass S-Layer zur Aufrechterhaltung der Zellform und Kompartimentierung der Zelle beitragen, oder der Zelle als Schutzschicht dienen. Eine mögliche Funktion der S-Layer wird auch im Zusammenhang mit Zell-Zell-Kontakten oder der Adhäsion von Mikroorganismen an Oberflächen beschrieben (Beveridge *et al.*, 1997; Engelhardt, 2007a; Engelhardt, 2007b). Da im Genom von *N. equitans* fast keine Gene für Biosyntheseenzyme annotiert werden konnten, ist es sehr wahrscheinlich, dass *N. equitans* nahezu alle Zellbausteine wie Lipide, Zucker oder Aminosäuren von seinem Wirt bezieht. Für Aminosäuren und Lipide wurde bereits gezeigt, dass *I. hospitalis* diese für *N. equitans* bereitstellt (Jahn *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich unmittelbar die Frage, ob *N. equitans* auch seine Energie, in Form von ATP, direkt von seinem Wirt bezieht oder ob die eigene rudimentäre ATP-Synthase (Waters *et al.*, 2003; Lewalter & Müller, 2006) für eine selbstständige ATP-Synthese genutzt werden kann. Alternativ könnte dieses unvollständige Enzym durch Import fertiger Proteinuntereinheiten von *I. hospitalis* funktionell komplementiert werden. Im Falle einer funktionellen ATP-Synthase bleibt allerdings die Frage nach der Triebkraft für die Synthese, da keine primären Protonenpumpen für *N. equitans* identifiziert wurden. Ob allerdings ein ATP-Transfer zwischen den beiden Organismen stattfindet, muss erst noch geklärt werden. Voraussetzung dafür wäre ein Transportsystem, das den Transfer von ATP zwischen *N. equitans* und *I. hospitalis* gewährleistet. Zusätzlich müsste der gesamte Energiebedarf der Lebensgemeinschaft durch die ATP-Synthese von *I. hospitalis* gedeckt werden.

Physiologische Studien haben gezeigt, dass *Ignicoccus hospitalis* Energie ausschließlich aus der Reduktion elementaren Schwefels mit molekularem Wasserstoff gewinnt und CO₂ als obligate Kohlenstoffquelle dient (Paper *et al.*, 2007). Dabei wurde für die CO₂-Fixierung von *I. hospitalis* ein neuartiger Weg nachgewiesen: der Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Weg. In dieser zyklischen Reaktionsabfolge fungiert Acetyl-CoA als primärer CO₂-Akzeptor und wird über das charakteristische Zwischenprodukt 4-Hydroxybutyrat regeneriert (Jahn *et al.*, 2007; Jahn, 2007; Huber *et al.*, 2008). Eine strikt anaerobe, obligat chemolithoautotrophe Lebensweise ist allen

bislang beschriebenen Arten der Gattung gemein (Huber *et al.*, 2000; Lange, 2009). Die Gattung *Ignicoccus* besteht derzeit aus drei beschriebenen Spezies *I. islandicus*, *I. pacificus*, *I. hospitalis* (Huber *et al.*, 2000; Paper *et al.*, 2007) wie einem neu isolierten Vertreter *Ignicoccus* sp. Mex13A („*Ignicoccus morulus*“, Lange, 2009) und ist der Ordnung Desulfurococcales innerhalb der Crenarchaeota zuzuordnen. Ein optimales Wachstum wurde für alle vier Spezies bei etwa 90° C und einem pH-Wert von pH 5,5-6,0 beschrieben. Die Zellen treten einzeln oder in Paaren auf, sind mit einem Zelldurchmesser von 1 bis 3 µm, in Extremfällen bis zu 15 µm, unregelmäßig kokkoid und synthetisieren Zellanhänge. *Ignicoccus* stellt neben *Thermosphaera* die einzige Gattung innerhalb der Crenarchaeota dar, welche keinen S-Layer als äußerste Zellhüllschicht aufweist. Darüber hinaus besitzen alle Vertreter der Gattung *Ignicoccus* eine von Grund auf ungewöhnliche, für Archaeen einzigartige Zellarchitektur, bei der die Zelle nicht nur von der üblichen Cytoplasmamembran, sondern zusätzlich von einer zweiten Membran umschlossen wird (Rachel *et al.*, 2002; Paper, 2005; Lange, 2009). Elektronenmikroskopische Analysen positiv kontrastierter Ultradünnschnitte zeigen ein sehr elektronendichtes Kompartiment, das von der inneren Membran umgeben wird und dem Cytoplasma entspricht. Die zweite Membran grenzt die Zelle nach außen hin ab und spannt ein großes, dem Periplasma ähnliches Intermembran-Kompartiment (IMC) zwischen sich und der inneren Membran auf. Aufgrund einer Weite von bis zu 1 µm ist das Volumen des IMC teilweise um das Zwei- bis Dreifache größer als das Volumen des Cytoplasmas. Dazu wird ein sehr dynamisches Membransystem, mit Vesikeln unterschiedlichster Form und Größe, im IMC beobachtet (Huber *et al.*, 2000; Rachel *et al.*, 2002; Junglas, 2006). Bis dato ist aber nur wenig über die Funktion dieser Strukturen bekannt. EM-Aufnahmen können so interpretiert werden, dass im Anschluss an die Abschnürung der Vesikel von der Cytoplasmamembran eine gerichtete Fusion mit der äußeren Membran erfolgt (Näther & Rachel, 2004). Nachdem diese Strukturen in allen bisher beschriebenen Vertretern der Gattung *Ignicoccus* nachgewiesen werden können, dienen sie vermutlich zur Versorgung der äußeren Membran mit Proteinen und Lipiden durch das weite Intermembran-Kompartiment (Rachel *et al.*, 2002; Jahn *et al.*, 2004; Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008; Heimerl, 2009). Lipidanalysen von *I. hospitalis* haben gezeigt, dass die äußere Membran im Gegensatz zur inneren Membran nur Dietherlipide, jedoch keine Tetraetherlipide besitzt (Jahn *et al.*, 2004). Sie enthält auch keine für äußere Membranen Gram-negativer Bakterien charakteristischen Lipopolysaccharide und Porine (Beveridge, 1999; Nikaido, 2003; Sutcliffe, 2010; Silhavy *et al.*, 2010), jedoch einen bisher unbekanntem hitzestabilen Proteinkomplex: Ihomp1. Dieser integriert als Homodekamer (Molekularmasse des Monomers: 6,2 kDa) in die äußere Membran und bildet eine Art Pore aus, deren Funktion bisher noch unbekannt ist. Allerdings ist dieses Protein nur in der äußeren Membran von *I. hospitalis* nachzuweisen (Burghardt *et al.*, 2007; Burghardt, 2008). Da *I. hospitalis* derzeit der einzige bekannte Wirt für *N. equitans* ist, soll geklärt werden, ob Ihomp1 eine entscheidende Rolle für die Gemeinschaft der beiden Organismen spielt. Neben den genannten Charakteristika weist *I. hospitalis* noch mehr außergewöhnliche Merkmale auf, die seine besondere Stellung innerhalb der Archaea unterstreichen. So wurden vor kurzem neuartige Zellanhänge für *I. hospitalis* beschrieben, die als *Fibers* bezeichnet werden. Sie ähneln keinem bisher bekannten Typus archaeeeller Zellanhänge und dienen allem Anschein nach nicht der Fortbewegung, sondern sind in die Adhäsion der Zellen an Oberflächen involviert (Müller *et al.*,

2009; Meyer, 2010). Noch ist offen, welche Bedeutung den beschriebenen Charakteristika bezüglich der Lebensgemeinschaft mit *N. equitans* zukommt. Sicher ist nur, dass *N. equitans* obligat auf *I. hospitalis* angewiesen ist und zumindest Aminosäuren und Lipide, wenn nicht sogar noch weitere Moleküle von seinem Wirt bezieht (Jahn *et al.*, 2008).

Die Energiegewinnung von *I. hospitalis* basiert einzig auf der bereits genannten Reduktion von elementarem Schwefel durch molekularen Wasserstoff, und wird als anaerobe Schwefelatmung bezeichnet (Madigan *et al.*, 2008). Wasserstoff, Schwefel und Schwefelverbindungen sind ergiebige Elektronendonator- und Elektronenakzeptorquellen in extremen Lebensräumen, wie vulkanischen aktiven Hydrothermalsystemen. Die Reduktion und Oxidation von Schwefelverbindungen (Sulfat, Sulfit, Thiosulfat, organische Sulfoxide, elementarer Schwefel, Polysulfid, organische Disulfide) stellt in diesen Habitaten einen lebenswichtigen Prozess für viele Mikroorganismen dar (Schönheit & Schäfer, 1995; Amend & Shock, 2001). Dabei findet sich die Fähigkeit zur Reduktion von elementarem Schwefel vorwiegend bei hyperthermophilen Vertretern der Archaea und Bacteria, deren Mehrheit für ein optimales Wachstum obligat auf die Schwefelreduktion angewiesen ist (Hedderich *et al.*, 1999). Diese Organismen verwenden entweder molekularen Wasserstoff oder organische Verbindungen als Elektronendonator. Es wurde postuliert, dass die Schwefelatmung vielleicht sogar eine sehr frühe Form der Energiekonservierung ist, da Hyperthermophile als Lebensformen angesehen werden, deren Evolution sehr langsam voranschreitet (Schauder & Kröger, 1993). Der Prozess der Reduktion von Schwefel ist für die meisten Mikroorganismen nicht bekannt und bisher wurden auch nur einige wenige der entsprechenden Enzyme gereinigt und charakterisiert. Das derzeit am besten verstandene System stammt aus dem mesophilen Bakterium *Wollinella succinogenes*, das mit H₂ oder Formiat als Elektronendonator und S⁰ oder Polysulfid als Elektronenakzeptor wächst (Krafft *et al.*, 1995; Klimmek *et al.*, 1998; Klimmek *et al.*, 1999; Dietrich & Klimmek, 2002). Für die chemolithoautotrophe Oxidation von H₂ mit S⁰ als Elektronenakzeptor benötigt *I. hospitalis* zwei Enzyme, die durch eine sehr kurze Elektronentransportkette miteinander verbunden sind - eine Hydrogenase und eine Schwefel- oder Polysulfidreduktase, beide membrangebunden (Kletzin *et al.*, 2004). Solche Superkomplexe wurden bisher nur für die hyperthermophilen Archaeen *Pyrodictium abyssi* TAG11 (Dirmeier *et al.*, 1998), *Acidianus ambivalens* (Laska *et al.*, 2003) und das hyperthermophile Bakterium *Aquifex aeolicus* (Guiral *et al.*, 2005) beschrieben. Genomanalysen von *I. hospitalis* haben die Anwesenheit entsprechender Gene für eine Hydrogenase (Igni1366-1369) und drei Untereinheiten einer Schwefelreduktase (Igni0801-0803) bestätigt. Ein Aufbau der Schwefelreduktase aus nur drei Untereinheiten war auch für das Enzym von *W. succinogenes* und *A. aeolicus* zu beobachten. Die bioinformatischen Analysen identifizierten auch 8 Gene für eine funktionelle A₁A₀ ATP-Synthase in *I. hospitalis*, die den elektrochemischen Gradienten über der Membran für die Synthese von ATP nutzen kann (Podar *et al.*, 2008).

Die bisherigen Vorstellungen von der Energiekonservierung in *I. hospitalis* gingen davon aus, dass Schwefel wie bei *W. succinogenes*, wahrscheinlich als Polysulfid, über die äußere Membran in das IMC transportiert und dort zu Schwefelwasserstoff reduziert wird. Zu vermuten war, dass die entsprechenden Enzymkomplexe in der inneren Membran lokalisiert sind. Über der inneren

Membran würde durch eine H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase eine protonenmotorische Kraft aufgebaut; die A_1A_0 ATP-Synthase könnte die *pmf* zur Generierung von ATP im Cytoplasma nutzen. Die Vermutung der innen gelegenen Lokalisation beider Enzymkomplexe (Podar *et al.*, 2008) beruhte auf der Tatsache, dass ATP-Synthase Komplexe bisher nur in inneren Membranen von Gram-negativen Bakterien, Mitochondrien oder Chloroplasten lokalisiert werden konnten (Nicholls & Ferguson, 2002; von Ballmoos *et al.*, 2009). Um eine Synthese von ATP in *I. hospitalis* zu gewährleisten, bedingt die Abhängigkeit der ATP-Synthase von der H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase eine gemeinsame subzelluläre Lokalisation in mindestens einer der beiden Membranen.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Energiekonservierung von *I. hospitalis* untersucht. Dabei lag ein Schwerpunkt auf den biochemischen Analysen der ATP-Synthase: Hierbei war das Ziel die Untereinheitszusammensetzung der nativen ATP-Synthase von *I. hospitalis* zu ermitteln, um Einblicke in den Aufbau des crenarchaeellen ATP-Synthase Komplexes zu bekommen und eine Basis für zukünftige Vergleiche mit der ATP-Synthase von *N. equitans* zu schaffen. Ein zweites Ziel war die subzelluläre Lokalisation der A_1A_0 ATP-Synthase und H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase von *I. hospitalis*. Durch die Analyse immunmarkierter Zellen und Ultradünnschnitte von *I. hospitalis* sollte primär die Lage der an der Energiegewinnung beteiligten Enzyme geklärt werden. Zusätzlich sollten die Ergebnisse Aufschluss über eine mögliche Energetisierung der äußeren Membran geben. Als Fernziel sollen dadurch grundsätzliche Fragen zur Energiekonservierung in *I. hospitalis* und der Cokultur sowie im speziellen zur Funktionalität der ATP-Synthase von *N. equitans* geklärt werden.

II. Material und Methoden

1. Bezugsquellen von Substanzen

1.1. Chemikalien, Biochemikalien und Lösungsmittel

Substanz	Hersteller
Acetonitril, HPLC-rein	J. T. Baker, Deventer (NL)
Acrylamid 2x, research grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Acrylamid 4x, analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Na ₂ -Adenosin-5'-Triphosphat · 3 H ₂ O	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Na ₂ -Adenosin-5'-Triphosphat · 3 H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Na ₂ -Adenosin-5'-Triphosphat, 98%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aluminiumoxid Alcoa A-305	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl)-Methan, Pufferan™ 99%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid (DDM)	Anatrace Inc., Maumee (USA)
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Complete Mini™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, EDTA-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Deoxycholinsäure, Natriumsalz (DOC)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
DNAse I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethanol, absolut	J. T. Baker, Deventer (NL)
Glycerin, 100%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Imidazol, ACS Reagenz 99%	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Isopropanol	J. T. Baker, Deventer (NL)
Magermilchpulver	J. M. Gabler Saliter GmbH, Obergünzburg
N,N'-Methylenbisacrylamid, 2x	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
2-N-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
2-N-Morpholinoethansulfonsäure (MES), ACS Reagenz 97%	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdisulfid	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ponceau S	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Schwefel	Riedel-de Haen, Seelze

Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	USB, Cleveland (USA)
Tricin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tween 20	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypsin, sequencing grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
ε-Aminocapronsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Alle weiteren Substanzen wurden von der Firma VWR, Darmstadt, bezogen. Der Reinheitsgrad aller Substanzen war, sofern nicht anders angegeben, p.a.. Die zur Kultivierung verwendeten Gase wurden von der Firma Linde Technische Gase GmbH, Höllriegelskreuth, bezogen.

1.2. Molekularmassenstandards

Massenstandards	Hersteller
HMW Calibration Kit for <i>Native</i> Electrophoresis	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)
<i>Native</i> Marker, liquid mix	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Molecular Weight Marker Kit, for Gel Filtration Chromatography (29 – 700 kDa)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas, St Leon-Rot
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St Leon-Rot

1.3. Reaktionskits, Membranen und Filtereinheiten

Artikel	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Thermo, Rockford (USA)
LumiLight™ Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Immobilon™- P Transfermembran	Millipore, Bedford (USA)
Protran™ Nitrocellulose Membran	Whatman, Dassel
Membranfilter (Cellulosemischester)	Whatman, Dassel
Vivaspin™ (Polyethersulfan)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Amicon-Ultra™ (regenerierte Cellulose)	Millipore, Billerica (USA)

1.4. Antikörper

1.4.1. Polyklonale Primärantikörper (1° AK)

Antikörper	Ursprung des Antigens	Antigen produziert in	Hersteller
rabbit anti-A ₁	<i>I. hospitalis</i>	endogen	Davids, Regensburg
rabbit anti-atp a(rek)	<i>I. hospitalis</i>	rekombinant in <i>E. coli</i>	Davids, Regensburg
rabbit anti-atp c(syn)	<i>I. hospitalis</i>	synthetisches Peptid	GenScript, USA
rabbit anti-atp A	<i>M. jannaschii</i>	rekombinant in <i>E. coli</i>	Davids, Regensburg
rabbit anti-atp B	<i>M. jannaschii</i>	rekombinant in <i>E. coli</i>	Davids, Regensburg
rabbit anti-atp C	<i>M. jannaschii</i>	rekombinant in <i>E. coli</i>	Davids, Regensburg
rabbit anti-atp D	<i>M. jannaschii</i>	rekombinant in <i>E. coli</i>	Davids, Regensburg
rabbit anti-atp E	<i>M. jannaschii</i>	rekombinant in <i>E. coli</i>	Davids, Regensburg
rabbit anti-atp F	<i>M. jannaschii</i>	rekombinant in <i>E. coli</i>	Davids, Regensburg
rabbit anti-atp a	<i>M. jannaschii</i>	rekombinant in <i>E. coli</i>	Biomol, Göttingen
rabbit anti-atp c	<i>M. jannaschii</i>	rekombinant in <i>E. coli</i>	Biomol, Göttingen
rabbit anti-atp A	<i>M. mazei</i> Gö1	rekombinant in <i>E. coli</i>	Biomol, Göttingen
rabbit anti-atp B	<i>M. mazei</i> Gö1	rekombinant in <i>E. coli</i>	Biomol, Göttingen
rabbit anti-SRed	<i>P. abyssi</i> TAG 11	endogen	Uni Regensburg

Für die Generierung des anti-A₁ Antikörpers wurde dem Kaninchen der gereinigte, native A₁-Subkomplex injiziert. Für die Generierung von anti-atp a(rek) wurde das Gen *igni0609* in *E. coli* kloniert und das exprimierte Protein einem Kaninchen injiziert (Annegrit Seifried, Goethe Universität, Frankfurt a. M.). Im Fall von anti-atp c(syn) wurde ein Peptid (Länge: 15 AS) synthetisiert und für die Immunisierung verwendet (GenScript, Piscataway, USA). Das Peptid entsprach der Aminosäuresequenz des Gens *igni0682*, die für die vermutlich hydrophile Schleife des prozessierten c-Monomers kodiert. Die Antikörper gegen die Untereinheiten der ATP-Synthasen von *Methanocaldococcus jannaschii* und *Methanosarcina mazei* wurden freundlicherweise von Prof. Volker Müller (Goethe Universität, Frankfurt a. M.) zur Verfügung gestellt. Der Antikörper anti-SRed, gegen die H₂:Schwefel-Oxidoreduktase von *P. abyssi* TAG11, wurde von Herrn Reinhard Dirmeier während seiner Promotion an unserem Lehrstuhl generiert (Dirmeier, 1998)

1.4.2. Sekundärantikörper (2° AK)

Antikörper	Hersteller
goat anti-rabbit IgG + Cy3	Sigma, St. Louis (USA)
goat anti-rabbit IgG + AlexaFluor 488	Invitrogen, Eugene (USA)
goat anti-rabbit IgG + DyLight 488	Thermo, Rockford (USA)
goat anti-rabbit IgG + DyLight 649	Thermo, Rockford (USA)
goat anti-rabbit IgG + HR Peroxidase	Sigma, St. Louis (USA)
goat anti-rabbit IgG + 10nm Gold	Aurion, Wageningen (NL)
goat anti-rabbit IgG + ultrasmall Gold	Aurion, Wageningen (NL)

1.5. Indikatoren für physiologische und zellbiologische Untersuchungen

Indikator	Hersteller
Blei(II)-Acetatpapier	Machery-Nagel, Düren
pH-Indikatorpapier	VWR, Darmstadt
DAPI	Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen
SYTO [®] 9 nucleic acid stain	Invitrogen, Eugene (USA)
SYTOX [®] Green nucleic acid stain	Invitrogen, Eugene (USA)
FM [®] 4-64FX membrane stain	Invitrogen, Eugene (USA)
Live/Dead [®] BaLight [™] Bacterial Viability Kit	Invitrogen, Eugene (USA)
BaLight [™] Bacterial Membrane Potential Kit	Invitrogen, Eugene (USA)

2. Kulturmedien

2.1. ½ SME-Ignicoccus-Medium (Paper et al., 2007)

2.1.1. Zusammensetzung

½ SME-Ignicoccus-Medium		Synthetisches Meerwasser	
		NaCl	27,70 g
KH ₂ PO ₄	0,50 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	7,00 g
(NH ₄) ₂ SO ₂	0,25 g	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5,50 g
NaHCO ₃	0,16 g	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,75 g
synthetisches Meerwasser	500 ml	KCl	0,65 g
Resazurin (0,2 %)	0,50 ml	H ₃ BO ₃	0,03 g
H ₂ O _{Millipore}	ad 1000 ml	NaBr	0,10 g
S ⁰	10 g	SrCl ₂ · 6 H ₂ O	15 mg
Na ₂ S · 7-9 H ₂ O	0,50 g	KJ-Lösung (1 mg/ml)	50 µl
		H ₂ O _{Millipore}	ad 1000 ml

2.1.2. Herstellung und Sterilisation

Die frisch hergestellten Medien wurden in eine 1 l Duranglasflasche (Schott, Mainz) abgefüllt. Schwefel wurde mit Hilfe eines Ultra-Turrax (TP1842, Janke und Kunkel, Staufen) homogenisiert. Die Duranglasflaschen wurden mit einem Gummistopfen und einer durchbohrten Schraubkappe verschlossen. Um den Sauerstoff aus dem Medium zu entfernen, wurde das Medium 30 min unter Druckausgleich mit N₂/CO₂ (80:20, v/v) durchgast. Der im Medium verbliebene Sauerstoff wurde entfernt, indem das Medium durch Zugabe von Na₂S bis zur Entfärbung des Redoxindikators Resazurin reduziert wurde. Durch Zuspritzen von H₂SO₄ wurde anschließend ein pH Wert von pH 5,5-6,0 eingestellt.

Die Medien wurden in der Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., Ann Arbor, USA) abgefüllt. Dabei wurden je 20 ml des Mediums in 120 ml Serumflaschen (Natronkalksilikatglas, Stute GmbH, Rheinbreitbach), bzw. 250 ml in 1 l Druckflaschen (Borsilikatglas, Müller und Krempel

AG, Büllach, CH) überführt. Die Serumflaschen wurden mit Butylsepten (Ochs, Bovenden) verschlossen und mit Aluminiumbördelkappen (WICOM, Heppenheim) gesichert. Die 1 l Druckflaschen wurden mit Gummistopfen und mit Metallschraubkappen verschlossen. Abschließend wurden die Serum- bzw. Druckflaschen an der Gasstation je dreimal evakuiert und H₂/CO₂ (80:20, v/v) mit 300 kPa (Serumflaschen) bzw. 160 kPa (Druckflaschen) aufgepresst. Die Medien wurden für 60 min bei 110 °C im Autoklaven (STM 201, Wolf, Geislingen) sterilisiert.

2.1.3. Herstellung und Sterilisation für Großanzuchten im Fermenter

Die Salze des Mediums wurden eingewogen, im Fermenter (HTE, Bioengineering, Wald, CH) in der entsprechenden Menge H₂O_{Millipore} gelöst und das Medium mit N₂/CO₂ (80:20, v/v) durchgast. Abschließend wurde das Medium im Fermenter für 40 min autoklaviert. Schwefel wurde separat eingewogen, mit dem Ultra-Turrax in H₂O_{Millipore} homogenisiert und im Autoklaven (STM 201, Wolf, Geislingen) für 60 min bei 110 °C gedämpft. Na₂S wurde ebenfalls gesondert in H₂O_{Millipore} gelöst und für 20 min autoklaviert. Für mixotrophe Zellanzuchten wurde dem Medium zusätzlich 0,1 % Hefeextrakt zugegeben, der separat eingewogen und in H₂O_{Millipore} gelöst für 20 min autoklaviert wurde. Vor dem Animpfen wurden Schwefel, Na₂S und gegebenenfalls Hefeextrakt in den Fermenter überführt und der pH Wert mit steriler H₂SO₄ auf pH 5,8-5,9 eingestellt.

2.2. MM-I-Medium

2.2.1. Zusammensetzung

MM-I-Medium		Wolfe's Mineralien 10x pH 1,0 / Titriplex	
KH ₂ PO ₄	0,50 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	30,00 g
(NH ₄) ₂ SO ₂	0,50 g	MnSO ₄ · H ₂ O	5,00 g
NaHCO ₃	0,16 g	NaCl	10,00 g
synthetisches Meerwasser (s. 2.1.1)	250 ml	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1,00 g
Resazurin (0,2 %)	0,50 ml	CoSO ₄ · 7 H ₂ O	1,80 g
Wolfe's Mineralien 10x / pH 1,0/ Titriplex	1,50 ml	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,00 g
H ₂ O _{Millipore}	ad 1000 ml	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1,80 g
Na ₂ S · 7-9 H ₂ O	0,50 g	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,10 g
Glukose	0,5 % (w/v)	KAl (SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O	0,18 g
Hefeextrakt	0,05 % (w/v)	H ₃ BO ₃	0,10 g
		Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,10 g
		(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	2,80 g
		Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	0,1 g
		Na ₂ SeO ₄	0,1 g
		H ₂ O _{Millipore}	ad 1000 ml

Zur Herstellung der Mineralienlösung musste der pH Wert von pH 1,0 bereits vor dem Lösen der Mineralien mit 1 M H₂SO₄ eingestellt werden. Die Medienzusätze (10 %ige Stammlösungen) wurden mit N₂ durchgast, sterilisiert und bei 4° C gelagert.

2.2.2. Herstellung und Sterilisation

Die Herstellung und Sterilisation des MM-I-Mediums erfolgte analog zu 2.1.2. ausgenommen der Homogenisierung mittels Ultra-Turrax.

2.3. HD-Medium

2.3.1. Zusammensetzung

HD-Flüssigmedium	
Pepton aus Casein	5,00 g
Hefeextrakt	1,25 g
D(+)-Glucose	0,50 g
H ₂ O _{Millipore}	ad 500 ml

2.3.2. Herstellung und Sterilisation

Die Komponenten wurden in eine 1 l Duranglasflasche (Schott, Mainz) eingewogen und 450 ml H₂O_{Millipore} zugegeben. Der pH-Wert wurde gegebenenfalls mit 2 M HCL oder 2 M NaOH auf pH 7,0-7,2 eingestellt und das Medium anschließend auf 500 ml aufgefüllt. Je 10 ml HD-Medium wurden in Reagenzröhrchen abgefüllt und mit Aluminiumdeckeln verschlossen. Die Medien wurden für 20 min bei 121 °C und 200 kPa sterilisiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

3. Verwendete Organismen und Kultivierung

3.1. *Ignicoccus* Reinkulturen bzw. Cokultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans*

3.1.1. Verwendete Stämme und Kultivierungsbedingungen

Organismus	Stamm	Herkunft	Hinterlegung	Literatur
<i>Ignicoccus islandicus</i>	KOL8	Kolbeinsey Rücken	DSM 13165	(Huber <i>et al.</i> , 2000)
<i>Ignicoccus pacificus</i>	LPC33	Ostpazifischer Rücken	DSM 13166	(Huber <i>et al.</i> , 2000)
„ <i>Ignicoccus morulus</i> “	MEX13A	Ostpazifischer Rücken	BBR 29/08/4	(Lange, 2009)
<i>Ignicoccus hospitalis</i>	Kin4/l	Kolbeinsey Rücken	DSM 18386	(Paper <i>et al.</i> , 2007)
Cokultur: <i>I. hospitalis</i> mit <i>Nanoarchaeum equitans</i>	Kin4/M	Kolbeinsey Rücken	BBR 17/10/4	(Huber <i>et al.</i> , 2002)

3.1.2. Kultivierung in Serumflaschen

Alle *Ignicoccus* Spezies wurden in ½ SME-*Ignicoccus*-Medium kultiviert. Serumflaschen wurden über eine Spritze (Ersta, Maersk, DK) mit Vorkultur beimpft (Animpfdichte ca. 10⁵ *Ignicoccus*

Zellen/ml). Die Inkubation erfolgte unter Schütteln (50 rpm) bei 90 °C im Wärmeschrank (T5090, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold).

3.1.3. Kultivierung im Fermenter

Großanzuchten von *Ignicoccus* Reinkulturen sowie der Cokultur Kin4/M erfolgten anaerob und bei 90 °C in einem Fermenter (HTE, Bioengineering, Wald, CH) mit 300 l Gesamtvolumen. Das sterile ½ SME-*Ignicoccus*-Medium wurde beimpft, die Kultur mit H₂/CO₂ (80:20, v/v) mit einem Druck von 300 kPa überschichtet und die Rührung auf 100 rpm eingestellt. Ab einer Zellzahl von $5 \cdot 10^6$ *Ignicoccus* Zellen/ml wurde die Kultur zusätzlich mit ca. 60 l/min N₂/H₂/CO₂ (65:15:20, v/v/v) durchgast. Nach Erreichen der gewünschten Wachstumsphase oder Zellzahl wurde die Durchgasung eingestellt und die Kultur auf 20 °C abgekühlt. Abschließend wurde die Rührung eingestellt, so dass der restliche Schwefel sedimentieren konnte.

Abhängig davon, ob die Zellen autotroph oder mixotroph gezüchtet wurden unterschied sich die jeweilige Kultivierung in der Art und Weise des Beimpfens und der zugegebenen Medienzusätze. Bei einer mixotrophen Zellzucht wurde das Medium mit 3 l flüssiger, frischer Vorkultur beimpft (Animpfdichte: 10⁵ Zellen/ml) und mit 1 % (w/v) Schwefel supplementiert. Dagegen wurde eine autotrophe Zellzucht mit etwa 2 g gefrorener Zellen beimpft, und es wurden dem Medium keine Zusätze zugegeben (Animpfdichte: $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml).

3.1.4. Zellernte nach Kultivierung im Fermenter

3.1.4.1. Direkte Zellernte aus einem Fermenter

Die Zellen wurden aus dem Fermenter über eine Durchlaufzentrifuge (Typ CEPA Z41G, Padberg, Lahr) bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 15 l/min geerntet. Die geernteten Zellmassen wurden in dem im Rotor verbliebenem Medienrest suspendiert und im Anschluss mittels der Jouan Zentrifuge (Jouan KR 422, C-60 Rotor, 4300 rpm, 30 min, 4 °C) sedimentiert. Die Zellen wurden entweder direkt verwendet oder in flüssigen N₂ überführt, schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.4.2. Ernte einer Großanzucht unter Erhalt des aktuellen Zellstatus

Bei Großanzuchten, in denen der Status der Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt der Kultivierung erhalten werden sollte, wurde die heiße Kultur (90 °C) zuerst durch eine Gegenflußkühlanlage (Feichtenschlager, Neusäß) in einen sterilisierten Tank (Gresser, Regensburg) überführt. Das schnelle Abkühlen ($\Delta T = 86$ °C in 2 min) der Kultur verhinderte eventuelle Anpassungen der Organismen an veränderte Kultivierungsbedingungen, die durch vergleichsweise langsames Abkühlen der Kultur hervorgerufen werden können ($\Delta T = 86$ °C in 120 min). Dadurch wurde der gegenwärtige Status der Zellen bestmöglich erhalten. Anschließend ruhte die gekühlte Kultur (4 °C) für ca. 2 h im Tank, sodass sich der restliche Schwefel absetzte. Der sedimentierte Schwefel wurde abgelassen, und die Zellen daraufhin analog zu 3.1.4.1. geerntet und weiterverarbeitet.

3.1.5. Anreicherung von *N. equitans* Zellen mittels differentieller Zentrifugation

N. equitans Zellen, die nicht mehr direkt mit *I. hospitalis* assoziiert waren, wurden nach der Zellernte aus dem Fermenter mittels differentieller Zentrifugation von vergesellschafteten Zelleverbänden getrennt und im Weiteren aufkonzentriert. Die suspendierten Zellen der Cokultur wurden dazu auf zwei C-60 Rotorenbecher (Jouan) verteilt und zentrifugiert (Jouan KR 422, C-60 Rotor, 4300 rpm, 45 min, 4 °C). Freie *N. equitans* Zellen verblieben im Überstand, während *I. hospitalis* mit anheftenden *N. equitans* Zellen, wie auch ein geringer Teil freier *N. equitans* Zellen, sedimentiert waren. Der Überstand wurde in GSA Rotorenbecher überführt und die *N. equitans* Zellen abzentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, GSA Rotor, 13000 rpm, 1 h, 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden in 10 ml schwefelfreiem ½ SME-*Ignicoccus*-Medium aufgenommen, suspendiert, in sterile Glasröhrchen (15 ml, Corex) überführt und erneut zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, SS34 Rotor, 13000 rpm, 30 min, 4 °C). Die Zellen wurden entweder direkt verwendet oder in flüssigen N₂ überführt, schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2. *Thermotoga maritima*

3.2.1. Verwendete Stämme und Kultivierungsbedingungen

Organismus	Stamm	Hinterlegung	Literatur
<i>Thermotoga maritima</i>	MSB8	DSM 3109	(Huber <i>et al.</i> , 1986)
<i>Thermotoga</i> sp.	MH-1	DSM 22925	k.A.

3.2.2. Kultivierung in Serumflaschen

Die beiden verwendeten *Thermotoga* Spezies wurden in MM-I-Medium kultiviert. Serumflaschen wurden mit Glukose und Hefeextrakt versetzt und anschließend über eine Spritze (Ersta, Maersk, DK) mit ca. 0,1 ml einer Vorkultur beimpft (Animpfdichte ca. 10⁵-10⁶ Zellen/ml). Die Inkubation erfolgte unter Schütteln (50 rpm) bei 80 °C im Wärmeschrank (T5090, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold).

3.3. *Micrococcus luteus*

3.3.1. Verwendete Stämme und Kultivierungsbedingungen

Organismus	Stamm	Hinterlegung	Literatur
<i>Micrococcus luteus</i>	k.A.	DSM 20030	(Wieser <i>et al.</i> , 2002)

3.3.2. Kultivierung in Reagenzröhrchen

Micrococcus luteus-Zellen wurden steril von HD-Platten gepickt und in mit HD-Medium gefüllte Reagenzröhrchen überimpft. Die Inkubation der Mikroorganismen erfolgte aerob bei 37° C, während die Kulturen kontinuierlich in einer Roller-Drum (New Brunswick, Edison, USA) rotierten.

4. Mikroskopie

4.1. Phasenkontrast und Epifluoreszenzmikroskopie

Zur Mikroskopie wurde ein Olympus BX60 (Olympus Optical, Hamburg) Phasenkontrastmikroskop mit Olympus UPlanFl 100x / 1.30 Oil Ph3 und UPlanFl 40x / 0.75 Ph2 Objektiven, sowie Fluoreszenzausstattung verwendet. Folgende Filtersätze wurden für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet:

Anwendung	Filtersatz	Anregungsfilter	Strahlenteiler	Sperrfilter
DAPI	U-MNU	BP 360-370	DM 400	BA 420
SYTO 9™ nucleic acid stain	F41-054	HQ 480/40	Q 505 LP	HQ 527/30
SYTOX® Green nucleic acid stain	F41-054	HQ 480/40	Q 505 LP	HQ 527/30
Live/Dead® BacLight™ Viability Kit	U-MNU	BP 360-370	DM 400	BA 420
BacLight™ Membrane Potential Kit	U-MNB	BP 470-490	DM 500	BA 515
FM®4-64FX membrane stain	U-MNG	BP 530-550	DM 570	BA 590
AlexaFluor 488	F41-054	HQ 480/40	Q 505 LP	HQ 527/30
Cy3	U-MNG	BP 530-550	DM 570	BA 590

Zur Dokumentation stand eine PixelFly CCD Kamera (PCO, Kelheim) mit CamWare Steuerungssoftware zur Verfügung. Die Aufnahmen wurden mit ImageJ 1.43q (National Institute of Health, Bethesda, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) und Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Inc., San José, USA) digital nachbearbeitet.

4.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Konfokale Aufnahmen, sowie Bildserien entlang der optischen z-Ebene eines Präparates (z-Stack), wurden mit einem LSM 510 Meta oder LSM 710 Mikroskop (Zeiss, Jena) aufgenommen. Beide Mikroskope waren mit einem Argonlaser (λ_{EX} : 458 nm, 488 nm, 514 nm) und einem Helium-Neon Laser (λ_{EX} : 543 nm, 633 nm) ausgestattet. Das LSM 710 war zusätzlich mit einem 2-Photonen Laser ausgestattet, der die Anregung von DAPI bei einer Wellenlänge von 780 nm ermöglichte. Bei gleichzeitiger Detektion mehrerer Wellenlängen wurde das Präparat im „Multi Track“-Modus gescannt. Für die Steuerung der Mikroskope und die digitale Nachbearbeitung der Bildserien wurde das Softwareprogramm ZEN 2009 (Zeiss, Jena) verwendet. Die Untersuchungen wurden unter Anleitung von Dr. Guido Grossmann (LSM 510 Meta, Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie) und Uwe de Vries (LSM 710, Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie) an der Universität Regensburg durchgeführt.

4.3. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Philips CM12 Transmissionselektronenmikroskop (TEM; FEI, Eindhoven, NL) durchgeführt. Zur Dokumentation standen eine digitale Slow-Scan-CCD-Kamera TEM-1000 (TVIPS-Tietz GmbH, Gauting) und die Steuerungssoftware EMMenu 4.0 (TVIPS-Tietz GmbH, Gauting) zur Verfügung. Die Aufnahmen wurden mit ImageJ 1.43q (National Institute of Health, Bethesda, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) und Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Inc., San José, USA) digital nachbearbeitet.

4.3.1. Einzelpartikel Analysen

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen von Proteinlösungen und darin enthaltener Partikel wurden negativ kontrastierte Suspensionspräparate hergestellt. Dazu wurde ein mit Kohlefilm belegtes Kupfernetzchen (G 2200C: 200 Square Mesh, Plano, Wetzlar) in einem Plasma Cleaner (Plasma Cleaner PDC-XG, Harrick Plasma, Ithaca, USA) hydrophilisiert und mit der Kohleseite nach unten auf einen Tropfen der Proteinlösung (20-50 µg / ml) gelegt (10-30 sec). Die Lösung wurde mit einem Filterpapier von unten abgezogen und das Präparat, ohne Waschschrift, mit 2 %iger Uranylacetatlösung kontrastiert (ca. 30 sec). Danach wurde die Flüssigkeit abgezogen, das Kupfernetzchen luftgetrocknet und im TEM unter Low-Dose-Bedingungen analysiert.

4.3.2. Immunmarkierung von Ultradünnschnitten

Die Herstellung und Immunmarkierung von Ultradünnschnitten wurde freundlicherweise von Carolin Meyer, Thomas Heimerl, Jennifer Flechler und Cordula Neuner am Zentrum für Elektronenmikroskopie (Prof. Dr. Reinhard Rachel, Universität Regensburg), durchgeführt. Die untersuchten Zellen wurden dafür in Cellulosekapillaren gezüchtet (Rieger *et al.*, 1997), und wie beschrieben (Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008; Rachel *et al.*, 2010) präpariert und analysiert.

5. Zellaufschlussverfahren

Lysepuffer, pH 7,5

Tris / HCl	25 mM
MgCl ₂	5 mM
PMSF	100 µM
H ₂ O _{Millipore}	ad 1000 ml

5.1. French Press

Die French Press Druckzelle (Aminco, Silver Spring, USA) wurde vor Gebrauch sterilisiert (EtOH 70 %) und nach dreimaligem Waschen (H₂O_{Millipore} + 1 mM PMSF) noch einmal mit Lysepuffer equilibriert. *I. hospitalis* Zellen wurden in Lysepuffer suspendiert (ca. 0,35 g Zellmasse auf 1 ml Puffer), in die gewaschene Druckzelle überführt und durch dreimalige Passage bei 500 psi

(3,4 MPa) aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde mit DNase I versetzt und die Aufschlusseffizienz lichtmikroskopisch kontrolliert.

5.2. FastPrep®-24 Zelmühle

In 2 ml Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel (Sarstedt, Nümbrecht) wurden 0,3 g Zellen vorgelegt und mit 0,5 ml Lysepuffer versetzt. Darauf wurden 0,5 g sterile Glasperlen gegeben ($d = 0,1$ mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Die Lösung wurde in der Zelmühle (FastPrep®-24, MPBio, Solon, USA) zweimal für 1 min bei maximaler Intensität (6,5 m/s) geschüttelt und dazwischen für 5 min auf Eis gekühlt. Das Homogenisat wurde mit DNase I versetzt, die Glasperlen sedimentiert (2 min, 1000 g, 4 °C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Aufschlusseffizienz wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

5.3. Mikro-Dismembrator Schwingmühle

Die Mahleinheit (Sartorius AG, Göttingen) aus Mahlbecher ($V_{\text{gesamt}} = 7$ ml) und Mahlkugel (Chromstahl, $d = 10$ mm) wurde sterilisiert, getrocknet, mit 0,5 g gefrorener Zellmasse bestückt und direkt für 5 min in flüssigem N_2 tiefgekühlt. Die gefrorenen Zellen wurden durch zwei Behandlungen (je 2 min, 2000 rpm) im Mikro-Dismembrator-U (Sartorius AG, Göttingen) zu feinem Zellstaub zermahlen. Zwischen den beiden Schüttelintervallen wurde die Mahleinheit erneut für 5 min in flüssigem N_2 tiefgekühlt. Abschließend wurde der Zellstaub in 2 ml Lysepuffer gelöst, mit DNase I versetzt und die Aufschlusseffizienz lichtmikroskopisch kontrolliert.

5.4. Zellaufschluss mittels Aluminiumoxid (Alcoa A-305)

Reibschale und Pistill (glasiertes Porzellan, Haldenwanger, Berlin) wurden mit 70 %igem EtOH sterilisiert und zusätzlich mit dem Bunsenbrenner abgeflammt. 1 g Zellen wurde in 3 ml Lysepuffer suspendiert und mit 2 g sterilem Alcoa A-305 (Serva, Heidelberg) versetzt. Die Alcoa-Zellsuspension wurde in der Reibschale für mindestens 10 min mit dem Pistill zerrieben. Anschließend wurde die Lösung in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt und das Aluminiumoxid sedimentiert (2 min, 3000 g, 4 °C). Der Überstand wurde mit DNase I versetzt und die Aufschlusseffizienz lichtmikroskopisch kontrolliert.

5.5. Ultraschallbehandlung

In einem 50 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) wurden 5 g *I. hospitalis* Zellen vorgelegt und in 15 ml Lysepuffer gelöst. Die Zellsuspension wurde in 4 Zyklen abwechselnd für 30 s beschallt (Output: 4, Duty Cycle: 30 %) und für 1 min auf Eis gekühlt. Der Schallkopf des Ultraschall-Desintegrators (Sonifier 250, Branson, Danbury, USA) wurde beim Beschallen langsam in der Zellsuspension auf und ab bewegt, ohne die Lösung dabei aufzuschäumen. Das erhaltene Homogenisat wurde mit DNase I versetzt und die Aufschlusseffizienz lichtmikroskopisch kontrolliert.

5.6. Zellaufschluss durch Detergenzien

I. hospitalis Zellen wurden in Membranpuffer (s. 6.1.) suspendiert (ca. 0,35 g Zellmasse auf 1 ml Puffer). und mit Detergenz (1 %, w/v) versetzt. Die Lösung rotierte langsam (F1, 15 rpm, 19 °C) in einem Überkopfschüttler (Intelli-Mixer RM-2, ELMI, Riga, LV), bis das Detergenz völlig gelöst war. Daraufhin wurde die Lösung in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und für 2 h unter leichtem Schwenken (25 rpm) bei 19 °C inkubiert. Die einzelnen Aliquots wurden in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) vereint, mit DNase I versetzt und die Aufschluss-effizienz lichtmikroskopisch kontrolliert.

6. Präparation der Membranen

6.1. Gewinnung von Membranen durch differentielle Zentrifugation

Membranpuffer, pH 7,5	
Tris / HCl	25 mM
MgCl ₂	5 mM
Glycerin	10 % (v/v)
PMSF	100 µM
H ₂ O _{Millipore}	ad 1000 ml

15 g frische oder gefrorene Zellen wurden aufgeschlossen und das Homogenisat mit Lysepuffer auf ein Endvolumen von 190 ml verdünnt. Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen wurden durch 3 niedertourige Zentrifugationen (Beckman Avanti J-25, JLA 16.250 Rotor, 15 min, 4 °C mit 3,000 g, 6750 g und 9500 g) aus dem Zellextrakt entfernt. Das geklärte Homogenisat wurde in 70Ti-Polycarbonatgefäße (Nalge, Rochester, USA) überführt und die Membranen sedimentiert (Beckman Optima LE-80K, 125000 g, 70Ti Rotor, 2 h, 4 °C). Das dunkelbraune Membransediment wurde in Membranpuffer aufgenommen und gewaschen. Nach erneuter Ultrazentrifugation (Beckman Optima LE-80K, 125000 g, 70Ti Rotor, 2 h, 4 °C) wurden die Membranen in Membranpuffer aufgenommen, resuspendiert und für weitere Untersuchungen bei 4 °C gelagert.

6.2. Gewinnung von Membranen durch Dichtegradienten-Zentrifugation

6.2.1. Herstellung der Auftragsuspension

Die Zellen wurden aufgeschlossen, das Homogenisat mit Lysepuffer 1:4 verdünnt und auf JA 25.50 Zentrifugenbecher verteilt. Membranen, Zellfragmente sowie nicht lysierte Zellen wurden sedimentiert (Beckman Avanti J-25, 50000 g, JA 25.50 Rotor, 30 min, 4 °C), und von leichteren, löslichen Zellbestandteilen abgetrennt. Das Sediment wurde in Lysepuffer aufgenommen, in einen Gewebehomogenisator (Wheaton, Millville, USA) überführt und resuspendiert. Die so erhaltene Suspension konnte direkt auf den Gradienten aufgetragen oder bei 4 °C gelagert werden

6.2.2. Saccharose-Dichtegradient

Mit Hilfe eines Gradientenmischers (Eigenbau der Werkstatt) wurde ein linearer Saccharosegradient (20% - 70%) in 12 ml Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Ultra-Clear Tubes, 14 x 89 mm; Beckman Coulter, Unterschleißheim) hergestellt. Dazu wurden jeweils 4,5 ml einer 70 %igen (2 M Saccharose in Lysepuffer, w/v) und 4,5 ml einer 20 %igen (0,58 M Saccharose in Lysepuffer, w/v) Saccharoselösung eingesetzt. Auf diese Art wurde ein vom Boden des UZ-Röhrchens nach oben hin abnehmender, linearer Saccharosegradient erzeugt. Pro Gradient wurden 1,5 ml der vorbereiteten Suspension aufgetragen und die so beladenen UZ-Röhrchen anschließend zentrifugiert (Beckman Optima LE-80K, 200000 g, SW 41 Ti Rotor, 4 h, 4 °C). Nach der Trennung wurde der Gradient in 1 ml Fraktionen aliquotiert und ihre ATPase Aktivität bestimmt.

6.2.3. Percoll-Dichtegradient

In 15 ml Corex-Röhrchen wurden 7 ml Lysepuffer mit 3 ml Percoll (Sigma, Steinheim) versetzt und mit 1,5 ml Auftragssuspension überschichtet. Die beladenen Röhrchen wurden zentrifugiert (Beckman Avanti J-25, 17000 g, JA 25.50 Rotor, 1 h, 4 °C) und der Gradient nach der Auftrennung in 1 ml Fraktionen aliquotiert. Anschließend wurden die Fraktionen mikroskopiert und ihre ATPase Aktivität bestimmt.

7. Chromatographische Trennverfahren

Chromatographische Arbeiten zur Anreicherung bzw. Aufreinigung nativer Proteine aus komplexen Proteinlösungen erfolgten an einem FPLC-System (Fast Protein Liquid Chromatography) unter Verwendung von vorgepackten Säulen (GE Healthcare, Uppsala, S). Die FPLC-Systeme (ÄKTA™*basic*, ÄKTA™*purifier*; GE Healthcare, Uppsala, S) waren mit einer UV-Meßzelle (280 nm), einer Leifähigkeitsmeßzelle, einem Frac950-Fraktionssammler sowie einer P960-Probenpumpe ausgestattet und wurden über die Steuerungssoftware UNICORN™ (GE Healthcare, Uppsala, S) bedient. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden vor dem Gebrauch filtriert (0,45 µm) und gegebenenfalls mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Chromatographien konnten sowohl unter gekühlten Bedingungen bei 4°C (ÄKTA™*purifier*) oder bei Raumtemperatur (ÄKTA™*basic*) durchgeführt werden.

7.1. Ionenaustausch-Chromatographie (IEX)

Das Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie (IEX) basiert auf der reversiblen Bindung von geladenen Biomolekülen (z.B. Proteine) gegenüber einer ebenfalls geladenen stationären Matrix. Je nach Ladung der Matrix unterscheidet man Anionen- von Kationenaustauschern, wobei im Falle der Anionenaustausch-Chromatographie (AEX) eine positiv geladene Matrix für die Wechselwirkung mit den negativ geladenen Aminosäureseitenketten der Proteine verwendet wird. Diese Wechselwirkung beeinflusst im Folgenden die Mobilität des entsprechenden Proteins während der Chromatographie. Je stärker die Interaktion ist, desto langsamer durchläuft das Protein die Trennstrecke. Im Falle der Kationenaustausch-Chromatographie (CEX) verhalten sich die Ladungseigenschaften umgekehrt. Folglich beeinflussen Veränderungen der mobilen Phase (Laufpuffer) in

Bezug auf pH-Wert und / oder Ionenstärke die Wechselwirkung des Proteins mit der Matrix, wodurch eine gezielte Elution von Proteinen erreicht wird.

Die verwendeten Säulenmaterialien waren ausschließlich starke Ionenaustauscher, deren Selektivität und Kapazität über einen weiten pH-Bereich konstant bleibt, wodurch sich diese besonders für die Etablierung von Reinigungsprotokollen eignen. Die Säulen wurde vor der Chromatographie dreimal mit je 5 Säulenvolumen (CV) Puffer B und Puffer A gewaschen und anschließend mit 10 CV Puffer A äquilibriert. Die Probe wurde über eine Probenschleife (0,2 – 3 ml), einen Superloop (3 – 50 ml) oder die P960-Probenpumpe auf die Säule aufgetragen und gegebenenfalls vor dem Auftrag filtriert (0,45 µm), um das Einbringen von störenden Schwebeteilchen in das FPLC-System zu vermeiden. Nach Bindung der Proteine an die Säule konnten diese sowohl über lineare Salzgradienten wie auch über eine schrittweise Stufenelution wieder gezielt von der Säule gelöst werden. Das Eluat, wie auch die Fraktion mit nicht gebundenem Protein wurden im Anschluss biochemisch und / oder enzymatisch auf die Anwesenheit des Zielproteins untersucht. Fraktionen, die das gesuchte Protein enthielten, wurden vereinigt und für den nächsten Reinigungsschritt vorbereitet. Die Flussgeschwindigkeit des Laufpuffers sowie der maximale Druck waren abhängig von der Säule und richteten sich nach den Angaben des Herstellers.

7.1.1. Anionenaustausch-Chromatographie (AEX)

AEX-Säulen		Puffer:	AEX-A	AEX-B
HiTrap DEAE FF	5 ml	Tris	25 mM	25 mM
HiTrap Q XL	5 ml	MgCl ₂	5 mM	5 mM
HiTrap Q HP	1 ml	NaCl	---	1 M
HiTrap Q HP	5 ml	Glycerin	10 % (v/v)	10 % (v/v)
RESOURCE Q	1 ml	DDM	0,05 %	0,05 % (w/v)
Mono Q 5/50 GL	1 ml	PMSF	0,1 mM	0,1 mM
		pH	pH 8,0	pH 8,0

AEX-Säulen wurden in 20 % EtOH bei 4° C gelagert.

7.1.2. Kationenaustausch-Chromatographie (CEX)

CEX-Säulen		Puffer:	CEX-A	CEX-B
		MES	25 mM	25 mM
HiTrap SP FF	5 ml	MgCl ₂	5 mM	5 mM
HiTrap SP HP	1 ml	NaCl	---	1 M
HiTrap SP HP	5 ml	Glycerin	10 % (v/v)	10 % (v/v)
RESOURCE S	1 ml	DDM	0,05 %	0,05 % (w/v)
		PMSF	0,1 mM	0,1 mM
		pH	pH 6,0	pH 6,0

CEX-Säulen wurden in 20 % EtOH, 200 mM Natriumacetat bei 4° C gelagert.

7.2. Gelfiltrations-Chromatographie (SEC)

Die Gelfiltration (SEC = Size Exclusion Chromatography) ist ein Art der Flüssigkeitschromatographie, bei der die Trennung der Moleküle aufgrund ihre Größe in Lösung, sprich dem spezifischen hydrodynamischen Volumen, erfolgt. Die einzelnen Partikel (Beads) der Säulenmatrix sind dabei hochporös, so dass große Moleküle diese passieren und schneller eluieren als kleine Moleküle. Die verminderte Laufgeschwindigkeit von kleinen Molekülen, Salzen und Puffersubstanzen resultiert auf der verlängerten Laufstrecke, bedingt durch das Eintreten in die poröse Säulenmatrix. Eine niedrige Flussrate sowie eine lange Trennstrecke wirken sich positiv auf die Trennleistung der Gelfiltration aus. Insgesamt handelt es sich um eine schonende Art der Chromatographie, ohne Veränderungen des Puffersystems während der Elution. Allerdings ist es ratsam, stets eine gewisse Menge NaCl / KCl im Puffer mitzuführen, da hydrophobe Proteine bei zu geringer Ionenstärke zu starken Wechselwirkungen mit der Matrix tendieren können.

Die Säulen wurde vor der Chromatographie mit 2 CV SEC-Puffer äquilibriert, die Probe über eine Probenschleife (0,2 – 3 ml) aufgetragen und die einzelnen Proteine bei einem Fluss von 0,3 - 0,7 ml pro Minute eluiert. Gegebenenfalls wurde die Probe vor dem Auftrag filtriert (0,45 µm), um das Einbringen von störenden Schwebeteilchen in das FPLC-System zu vermeiden. Die Fraktion des Eluats wurden im Anschluss biochemisch und / oder enzymatisch auf die Anwesenheit des Zielproteins untersucht. Fraktionen, die das gesuchte Protein enthielten, wurden vereinigt und für den nächsten Reinigungsschritt vorbereitet. Die exakte Flussgeschwindigkeit des Laufpuffers sowie der maximale Druck waren abhängig von der Säule und richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Nach 3 - 5 Chromatographien wurden die Säulen mit 2 CV 0,5 M NaOH gereinigt und mit mindestens 5 CV filtriertem H₂O_{Millipore} gewaschen. Anschließend konnten die SEC-Säulen wieder verwendet oder in 20 % EtOH bei 4° C gelagert werden.

SEC-Säulen		SEC-Puffer	
HiPrep 16/60 Sephacryl S300 HR	120 ml	Tris	25 mM
HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR	320 ml	MgCl ₂	5 mM
Superose 6 10/300 GL	24 ml	NaCl	150 mM
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	120 ml	Glycerin	10 % (v/v)
Superdex 200 10/300 GL	24 ml	DDM	0,05 % (w/v)
		PMSF	0,1 mM
		pH	pH 8,0

8. Reinigung des A₁-Subkomplexes der A₁A₀ ATP-Synthase/ATPase von *I. hospitalis*

8.1. Solubilisierung

15 g *I. hospitalis*-Zellen wurden in Lyse-Puffer suspendiert, mittels French Press aufgeschlossen (s. 5.1), die Membranen präpariert (s. 6.1) und der Proteingehalt mittels BCA-Test abgeschätzt. Für das Herauslösen der Membranproteine wurden die Membranen mit DDM behandelt. Standardmäßig wurden 1,5 g DDM pro 1,0 g Protein zugesetzt und die DDM-Konzentration der Lösung anschließend auf 2 % (w/v) eingestellt. Die Solubilisierung wurde bei 19 °C in einem klimatisierten Raum durchgeführt. Dazu wurde die DDM-Membran-Suspension in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und für 2,5 h in einem Überkopfschüttler (SkyLine RM-2L, ELMI, Wasserburg; F1 bei 15 rpm) inkubiert. Anschließend wurde der Solubilisierungsansatz durch Ultrazentrifugation (70.1Ti, 42000 rpm, 1,5 h, 4° C) in Membranfraktion (MnS) und Solubilisat (Sol) getrennt. Die Membranfraktion wurde wieder in Membranpuffer suspendiert, so dass das ursprüngliche Volumen des Solubilisierungsansatzes erreicht wurde. Dadurch war ein schneller Vergleich von ATPase-Aktivität und Proteingehalt mit der Ausgangslösung möglich. Die erhaltenen Proteinlösungen konnten daraufhin bei 4° C gelagert werden.

Anfangs wurden, neben DDM, auch TritonX-100, CHAPS und DOC auf ihre Eignung zur Solubilisierung der ATPase getestet. Hierbei wurden die Detergenzien in einem konstanten Verhältnis von Protein zu Detergenz eingesetzt (1 : 1,5), auf unterschiedliche Konzentrationen eingestellt (0,5 %, 1 %, 2 % und 3 % (w/v)) und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (19° C und 40° C).

8.2. Anionenaustausch-Chromatographie 1: HiTrap Q HP

Vorbereitend für das Auftragen der Probe auf die Säule, wurde der ByPass-Kanal des FPLC Systems mit 50 - 100 µl des Solubilisats beschickt und die Leitfähigkeit der Probe vermessen. Das Solubilisat wurde mit AEX-A soweit verdünnt, dass der Leitfähigkeitswert der Probe ≤ 3 mS/cm betrug, wodurch ein effizientes Binden der ATPase an die Säule gewährleistet war. Das Beladen der HiTrap Q HP Säulen erfolgte bei 4° C und einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Wie in Abb. 2

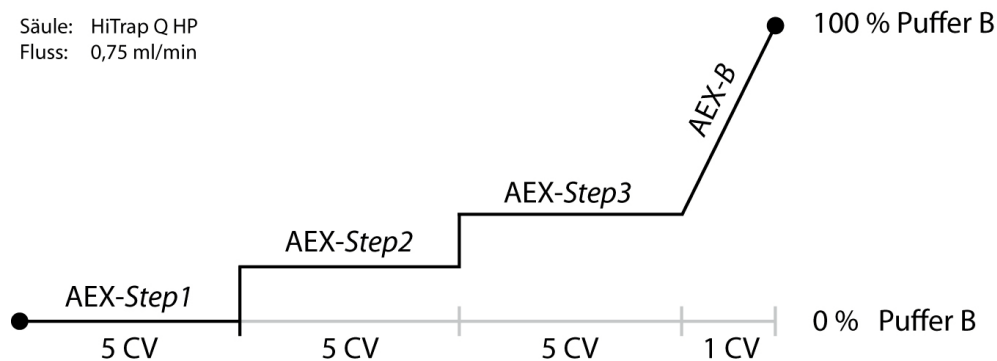


Abb. 2: Elutionsprofil der Anionenaustausch-Chromatographie über eine HiTrap Q HP Säule

illustriert, wurde die Elution der Proteine durch eine Kombination von drei definierten Salzstufen und einem linearen Gradient gesteuert. Für die Stufen wurde der Puffer AEX-A manuell mit AEX-B auf die entsprechenden Leitfähigkeitswerte von 5,5 mS/cm (AEX-Step1), 9,0 mS/cm (AEX-Step2) und 15,0 mS/cm (AEX-Step3) titriert. Die Elutionspuffer der Salzstufen wurden nach je 5 CV manuell am System gewechselt, während der lineare Gradient entsprechend programmiert wurde. Das Eluat wurde fraktioniert und direkt im Anschluß auf ATP-Hydrolyseaktivität getestet. Die Fraktionen höchster Aktivität wurden vereint und konnten bei 4° C aufbewahrt werden.

8.3. Gelfiltration 1: Superose 6 10/300 GL

Das vereinte und aktive Eluat wurde in einer Tischzentrifuge (Labofuge 400R, Heraeus, Hanau) über VivaSpin™6 Röhrchen (MWCO: 100 kDa; Sartorius AG, Göttingen) konzentriert. Der Vorlauf (0,5 CV) der Superose 6-Säule erfolgte mit SEC-Puffer bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 0,3 ml/min. Daraufhin wurden 300 µl der konzentrierten Probe über eine 500 µl-Probenschleife injiziert, und die Proteine über ein Gesamtvolumen von 1,5 CV bei einer Flussrate von 0,25 - 0,3 ml/min getrennt. Das Eluat wurde in 96-Deepwell-Platten (Sarstedt, Nümbrecht) zu je 200 µl fraktioniert. Probenauftrag, Elution und Fraktionierung erfolgten gekühlt bei 4° C. Anschließend wurden die Fraktionen standardmäßig auf ATP-Hydrolyseaktivität getestet. Die Fraktionen höchster Aktivität wurden vereint und konnten bei 4° C aufbewahrt werden.

8.4. Anionenaustausch-Chromatographie 2: Mono Q 5/50 GL

Zur Verringerung der mitgeführten Salzkonzentration des SEC-Puffers (150 mM), wurde die Probe mit AEX-A zehnfach verdünnt, wodurch ein effizientes Binden der ATPase an die Säule gewährleistet war. Das Beladen der Mono Q-Säule erfolgte bei 4° C und einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Dagegen, wurde die Elution der ATPase bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,0 ml/min durchgeführt und primär über einen flachen, linearen Gradienten gesteuert. Eine finale Stoßelution diente nur der Kontrolle, ob sämtliche ATPase-Komplexe von der Säule eluiert waren.

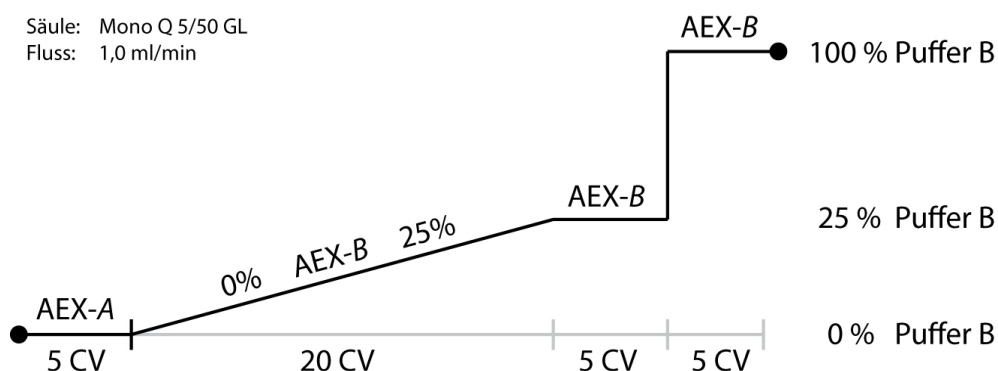


Abb. 3: Elutionsprofil der Anionenaustausch-Chromatographie über eine Mono Q 5/50 GL Säule

Abbildung 3 zeigt das zugehörige schematische Elutionsprofil mit den relevanten Parametern. Das Eluat wurde entsprechend fraktioniert und direkt im Anschluß auf ATP-Hydrolyseaktivität getestet. Die Fraktionen höchster Aktivität wurden vereint und konnten bei 4° C aufbewahrt werden.

8.5. Gelfiltration 2: Superdex 200 10/300 GL

Der Fraktionspool der vorangegangenen Chromatographie musste über VivaSpin™6 Zentrifugenröhrchen (MWCO: 100 kDa; Sartorius AG, Göttingen) konzentriert werden, bevor die Probe (300 µl) in die Probenschleife (V_{ges} : 500 µl) vorgelegt werden konnte. Vor dem Auftrag wurde die Superdex 200-Säule nochmals mit 0,5 CV SEC-Puffer gewaschen, um eine stabile Basislinie der UV-Messung zu erhalten. Anschließend wurde die Säule mit der konzentrierten Probe beladen (0,25 ml/min). Die Trennung der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 0,3 ml/min über ein Gesamtvolumen von 1,5 CV. Das Eluat wurde in 96-Deepwell-Platten (Sarstedt, Nümbrecht) zu je 200 µl fraktioniert. Probenauftrag, Elution und Fraktionierung erfolgten gekühlt bei 4° C. Abschließend wurden die Fraktionen standardmäßig auf ATP-Hydrolyseaktivität getestet. Die Fraktionen höchster Aktivität wurden vereint und konnten bei 4° C aufbewahrt werden.

9. Analyse von Enzymaktivitäten

9.1. Photometrische Bestimmung der ATP Hydrolyseaktivität

A_1A_0 ATP-Synthasen katalysieren neben der Synthese von ATP auch die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i . Eine relative oder absolute Quantifizierung dieser ATPase-Aktivität erfolgte durch Bestimmung der Menge an freigesetztem P_i . Der Nachweis nach Heinonen und Lahti (Heinonen & Lahti, 1981; Hlady, 2007) beruht auf der Komplexbildung des P_i mit Molybdat zu Phosphomolybdat, welches in organischen Lösungsmitteln unter sauren Bedingungen eine Gelbfärbung hervorruft. Die Extinktion wurde im Photometer (Genesys 10vis, Thermo, Madison, USA) bei 355 nm gemessen.

ATPase-Testpuffer, pH 8,0		AAM-Reagenz	
Tris/NaOH	100 mM	Aceton	2 vol
MES	100 mM	2,5 M H_2SO_4	1 vol
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	5 mM	10 mM $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$	1 vol
$Na_3S_2O_5$	40 mM		
KCl	200 mM		

Der ATPase-Testpuffer wurde stets frisch hergestellt und mit 5 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Das AAM-Reagenz wurde frisch hergestellt und maximal einen Tag lang verwendet.

9.1.1. ‚Longtest‘: absolute Aktivitätsbestimmung von Proteinlösungen (Pisa, 2008, modifiziert)

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurden die Proteinlösungen (1-25 µl) mit 1200 µl ATPase-Testpuffer versetzt und im Heizblock bei 90 °C für 7 min vorinkubiert. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von 60 µl einer 100 mM Na₂-ATP-Lösung (Roche, Mannheim) gestartet. Unmittelbar nach Reaktionsstart, sowie nach 3, 6, 9 und 12 min wurden je 200 µl des Testansatzes entnommen und mit 50 µl TCA (30 %, v/v) versetzt, um die Reaktion zu stoppen. Gefälltes Protein wurde in der Tischzentrifuge sedimentiert (13000 g, 3 min, 4 °C), und 200 µl des Überstandes in eine, mit 1 ml AAM-Reagenz gefüllte, Halbmikroküvette (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Ansätze bei 355 nm gemessen. Absolutwerte der ATPase-Aktivität wurden daraufhin mittels Eichgeraden (0-200 nmol P_i) bestimmt oder über die Funktion der zugehörigen Ausgleichsgeraden berechnet. Als Kontrolle wurde die physikalische Hydrolyse von ATP in einem Ansatz ohne Enzym bestimmt. Die Einheit der Enzymaktivität (U) entspricht der Freisetzung von 1 µmol P_i/min.

9.1.2. ‚Quicktest‘: relative Aktivitätsbestimmung von Proteinlösungen (Pisa, 2008, modifiziert)

Mit dem ‚Quicktest‘ wurden Proteinlösungen auf ihre grundsätzliche Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse getestet, oder deren ATP-Umsatzraten relativ miteinander verglichen. In 250 µl ATPase-Testpuffer wurden 1-25 µl der zu untersuchenden Lösung und 8 µl einer 100 mM Na₂-ATP-Lösung (Roche, Mannheim) für 20 min bei 90 °C inkubiert. 200 µl des Testansatzes wurden mit 1 ml frischem AAM-Reagenz versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und die Extinktion bei 355 nm gemessen. Als Kontrolle wurde stets die physikalische Hydrolyse von ATP in einem Ansatz ohne Enzym bestimmt.

9.1.3. Hemmstoffexperimente der ATPase-Aktivität

Die Hemmstoffe DCCD (N’N’-Dicyclohexylcarbodiimid, Sigma, Steinheim), TBT (Bis-(Tributyltin)-Oxid, Sigma, Steinheim), DES (Diethylstilbestrol, Sigma, Steinheim) und Hexestrol (Sigma, Steinheim) wurden 1 M in Ethanol gelöst und den ATPase-Inkubationsansätzen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Das Enzym wurde 30 min bei Raumtemperatur mit dem Inhibitor vorinkubiert, bevor die Reaktion gestartet, und der Test wie in 9.1.1 beschrieben durchgeführt wurde. Bei Inhibitorexperimenten wurden allerdings zwei Kontrollansätze mitgeführt. Ein Ansatz enthielt das Enzym ohne Inhibitor. Der zweite Ansatz enthielt das Enzym und Ethanol, um den Einfluss des Lösungsmittels auf die ATPase-Aktivität zu überprüfen und eine Hemmung durch das Lösungsmittel auszuschließen.

9.2. Aktivitätsfärbungen

9.2.1. ATPase-Aktivitätsfärbung („ATPase-In-Gel-Assay“)

Nach ihrer Auftrennung mittels CNE- oder hrCNE, konnten Proteinkomplexe direkt in den Gelen auf die Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse getestet werden (Wittig *et al.*, 2007a; Wittig *et al.*, 2007b). Die

Gele wurden mit In-Gel-Testpuffer in temperaturbeständige Kunststoffschalen (Gies, Niederaula) überführt und mit einem Schnappdeckel verschlossen. Lichtgeschützt und unter leichtem Schwenken (30 rpm) wurde das Gel für 1 h bei 80 °C im Wärmeschrank inkubiert. Der In-Gel-Testpuffer wurde stets frisch hergestellt, wobei Tris und Glycin zuerst in H₂O_{Millipore} gelöst und der pH Wert auf pH 8,3 eingestellt wurde. Danach wurden MgSO₄ und Pb(NO₃)₂ zugegeben und der Puffer auf $\frac{3}{4}$ des Endvolumens aufgefüllt. ATP wurde erst kurz vor Testbeginn separat in $\frac{1}{4}$ Volumen gelöst und dem Puffer zugesetzt.

In-Gel-Testpuffer	
Tris	35 mM
Glycin	270 mM
MgSO ₄	14 mM
Pb(NO ₃) ₂	0,2 % (w/v)
Na ₂ -ATP · 3 H ₂ O	8 mM

Aktive Komplexe waren durch einen weißlichen Niederschlag im Gel detektierbar, wodurch die apparente molekulare Masse dieser abgeschätzt werden konnte. Der weißliche Niederschlag entstand durch Komplexierung des freigesetzten ortho-Phosphats mit dem vorgelegten Blei(II)-Nitrat.

9.2.1. Hydrogenase Aktivitätsfärbung (,Hydrogenase-In-Gel-Assay')(Küper *et al.*, 2010)

Das CNE- oder hrCNE-Gel wurde nach der Elektrophorese für 30 min in 200 mM Tris/HCl, pH 8,4, 2,5 mM Methylenblau (oxidiert) gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen mit H₂-gesättigtem 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,4, wurde das Gel in diesem Puffer auf 80 °C erwärmt. Hervorgerufen durch die Reduktion des Farbstoffes Methylenblau zu Leukomethylenblau waren hydrogenaseaktive Proteinkomplexe durch Entfärbung der betreffenden Stellen im Gel identifizierbar. Alle Schritte der Aktivitätsfärbung wurden in der Anaerobenkammer durchgeführt und die verwendeten Puffer zuvor mit N₂ bzw. H₂ durchgast.

10. Proteinbiochemische Methoden

10.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Gesamtprotein in Lösungen wurde mittels BCA Protein Assay (Thermo, Rockford, USA) bestimmt. Der Vorteil des Testsystems gegenüber vielen anderen ist seine Kompatibilität mit Detergenzien. Basierend auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ in Anwesenheit von Protein unter alkalische Bedingungen (Biuret-Reaktion), kann Cu⁺ anschließend mittels einer hochsensitiven Nachweisreagenz kolorimetrisch detektiert und die Konzentration quantifiziert werden. Dabei bilden zwei Moleküle Bichinonsäure (BCA) einen stabilen Komplex mit einem Molekül Cu⁺ aus, der für die violette Farbe des Reaktionsproduktes verantwortlich ist. Der Komplex zeigt eine maximale Absorption bei 563 nm, die in einem Bereich von 20 – 2000 µg/ml nahezu

linear ist. Die Abschätzung der entsprechenden Proteinkonzentration erfolgte über den Vergleich mit einer BSA-Eichgrade.

Für die Bestimmung wurden 10 µl der Probe in eine 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 200 µl Arbeitslösung versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37° C wurde die Probe in einem ELISA-Reader (Sunrise Basic, Tecan, Gröding, A) vermessen und die Konzentration bestimmt. Zur direkten Quantifizierung mittels der Software Magellan (Tecan, Gröding, A) wurden auf jeder Mikrotiterplatte zwei Eichreihen (BSA: 0 - 2000 µg/ml) mitgeführt.

10.2. Konzentrierung und Dialyse von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden in VivaSpin™-Zentrifugenröhrchen (Sartorius AG, Göttingen) mit einem MWCO (molecular weight cut off) von 100 kDa, 30 kDa oder 10 kDa nach Angaben des Herstellers konzentriert. Für die Dialyse von Proteinlösungen wurden die entsprechenden Membranen (Serva, Heidelberg) in H₂O_{Millipore} autoklaviert und bei 4° C gelagert. Die Membranen wurden vor dem Einsatz mehrfach mit dem vorgesehenen Puffer gespült und für mindestens 12 h darin äquilibriert. Anschließend wurden die Proteinlösungen gegen das 400 fache Probenvolumen dialysiert. Je nach Versuch erfolgte die Dialyse über Nacht bei Raumtemperatur, oder für mehrere Tage bei 4° C.

10.3. Gelelektrophoretische Verfahren

10.3.1. SDS-PAGE

Die Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) denaturierter Proteine wird verwendet, um die Proteine einer Lösung ihrer molekularen Masse nach aufzutrennen. Dabei wirkt das Gel als Trennmedium (Molekularsieb), wodurch kleinere Proteine das Gel schneller durchwandern als große. Zusätzlich wird durch Zugabe von SDS die Eigenladungen der denaturierten Proteine überdeckt, resultierend in einer konstanten negativen Ladungsverteilung der Proteine, die im elektrischen Feld eine einheitliche, anodengerichtete Migration verursacht.

10.3.1.1. Tris-Glycin-PAGE (Laemmli, 1970)

Die Glycin-SDS-PAGE wurde standardmäßig in einem Mini-Protean™ Tetra System (BioRad, Hercules, USA) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte, bis zum Einlaufen der Proben in das Trenngel, bei 20 V pro Gel und im Anschluss bei einer erhöhten Spannung von insgesamt 150-200 V. Die zugehörigen Gele hatten eine Größe von 10 x 8 cm und waren 0,75 mm oder 1 mm dick. Trenngel und Sammelgel eines 1 mm Polyacrylamidgels setzten sich wie folgt zusammen.

Trenngelpuffer, pH 8,8		Sammelgelpuffer, pH 6,8	
Tris/HCl	1,5 M	Tris/HCl	0,5 M
SDS	0,4 % (v/v)	SDS	0,4 % (v/v)

	Trenngel 10 %	Sammelgel 4,5 %
Trenngelpuffer, pH 8,8	5 ml	---
Sammelgelpuffer, pH 6,8	---	1,5 ml
Rotiphorese®Gel 30 (37,5 : 1)	6,7 ml	1,2 ml
H ₂ O _{Millipore}	8,3 ml	5,1 ml
APS 10 % (w/v)	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Alternativ wurden auch Mini-Protean TGX Precast Gele (BioRad, Hercules, USA) verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Lämmli-Auftragspuffer versetzt und 25 min bei 90 °C denaturiert.

Laemmli Laufpuffer (10x), pH 8,3		Laemmli Auftragspuffer (3x), pH 6,8	
Tris	250 mM	Tris/HCl	175 mM
Glycin	1,92 M	Glycerin	15 % (v/v)
SDS	1 % (w/v)	SDS	5 % (w/v)
		β-Mercaptoethanol	5 % (w/v)
		Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

10.3.1.2. Tris-Tricin-PAGE (Schägger & von Jagow, 1987; Schägger, 2006)

Die Tricin-SDS-PAGE wird für gewöhnlich zur Trennung von Proteinen in einem Molekularmassenbereich von 1 – 100 kDa verwendet, bevorzugter Weise aber für Proteine ≤ 30 kDa. Zusätzlich zeigt die Tris-Tricin-PAGE eine bessere Auflösung, als die Tris-Glycin-PAGE, wenn sie als zweite Dimension einer *Native*-PAGE nachgeschaltet wird. Hier erfolgte die elektrophoretische Trennung über Nacht in einer wassergekühlten (4 °C) Elektrophoresekammer (PerfectBlue™ Maxi Twin, Peqlab, Erlangen) mit folgenden Parametern: 60 V, 60 mA, 5 W für 2 h und anschließend 100 V, 150 mA, 200 W für 14 h.

Kathodenpuffer, pH 8,25		Anodenpuffer, pH 8,8	
Tris/HCl	100 mM	Tris/HCl	200 mM
Tricin	100 mM		
SDS	0,1 % (w/v)		

Die zugehörigen Gele hatten eine Größe von 20 x 20 cm und waren 1 mm oder 1,5 mm dick. Trenngel und Sammelgel eines 1,5 mm Polyacrylamidgels setzten sich wie folgt zusammen:

	Trenngel 12 %	Sammelgel 4 %
Rotiphorese®Gel 30 (37,5 : 1)	17,1 ml	2,25 ml
Schägger Gelpuffer (3x)	14,0 ml	4,7 ml
Glycerin 50 % (v/v)	8,9 ml	---
H ₂ O _{Millipore}	2,8 ml	9,8 ml
APS 10 % (w/v)	150 µl	200 µl
TEMED	50 µl	60 µl

Schägger Gelpuffer (3x), pH 8,45		Schägger Auftragspuffer (1x)	
Tris	3 M	Tris	50 mM
SDS	0,3 % (w/v)	Glycerin	12 % (v/v)
		SDS	4 % (w/v)
		β-Mercaptoethanol	2 % (w/v)
		Serva Blau G	0,01 % (w/v)

Proteinlösungen wurden vor der Elektrophorese mit Schägger-Auftragspuffer (Schägger-AP) versetzt und im Wasserbad für 30 min bei 95 °C inkubiert.

10.3.2. Native-PAGE

Die *Native*-PAGE ist eine Methode zur Trennung nativer Proteinkomplexe unter Beibehaltung ihrer endogenen Untereinheitenzusammensetzung (Schägger, 2003; Wittig & Schägger, 2009). Die Kombination einer *Native*-PAGE (1. Dimension) mit einer denaturierenden Tris-Tricin-PAGE (2. Dimension) ermöglicht es in einem zweiten Schritt, die separierten Proteinkomplexe in die am Aufbau beteiligten Untereinheiten aufzutrennen. Mittels MALDI-TOF MS/MS und einem Datenbankabgleich können die entsprechenden Untereinheiten im Weiteren identifiziert werden.

10.3.2.1. Clear Native Elektrophorese (CNE, Wittig & Schägger, 2005)

Die *Clear Native* Elektrophorese wurde standardmäßig über Nacht in einem wassergekühlten (4 °C) PerfectBlue™ Maxi Twin System (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 300 V, 50 W und 5 mA pro Gel. Zugehörige Gele hatten eine Größe von 20 x 20 cm und waren 1 mm oder 1,5 mm dick. Die Acrylamidlösung (48 % (w/v) Acrylamid, 1,5 % (w/v) Bisacrylamid) wurde unter dem Abzug hergestellt und konnte ca. 1 – 2 Monate bei 4 °C aufbewahrt werden. Ein standardmäßig verwendetes 1,5 mm Polyacrylamidgel setzte sich, wie folgt, aus einem Trenngel (Gradient: 5 – 13 % Acrylamid) und einem Sammelgel (4 % AA) zusammen. Der Gradient des Trenngels wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers (Eigenbau, Werkstatt Biologie) hergestellt.

CNE-Gel (1,5 mm)	Trenngel 13 %	Trenngel 5 %	Sammelgel 4 %
AB-Mix (48 % AA, 1,5 % BA)	5,5 ml	2,1 ml	1,2 ml
Nativ Gelpuffer (3x)	7,0 ml	7,0 ml	4,0 ml
Glycerin 50 % (v/v)	8,4 ml	---	---
H ₂ O _{Millipore}	---	11,8 ml	6,7 ml
APS 10 % (w/v)	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Nativ Gelpuffer (3x), pH 7,0	
BisTris	150 mM
ε-Aminocapronsäure	1,5 M
DDM	0,05 % (w/v)

Nativ Auftragspuffer (10x)	
Ponceau S	0,1 % (w/v)
Saccharose	5 % (w/v)
in Kathodenpuffer	

Kathodenpuffer, pH 7,0	
BisTris	15 mM
Tricin	50 mM

Anodenpuffer, pH 7,0	
BisTris	50 mM

10.3.2.2. High resolution Clear Native Elektrophorese (hrCNE, Wittig *et al.*, 2007b)

Die *high resolution Clear Native* Elektrophorese wurde analog zur *Clear Native* Elektrophorese durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die Puffersubstanz BisTris durch Imidazol ersetzt und dem Kathodenpuffer DDM sowie Deoxcholat (DOC) zugesetzt wurden (Wittig *et al.*, 2007a). Die Detergenzien wechselwirken mit den hydrophoben Bereichen der Membranproteinkomplexe und sorgen für eine konstante negative Ladung der Proteine, die im elektrischen Feld eine einheitliche, anodengerichtete Migration verursacht. BisTris wurde durch Imidazol ersetzt, da es bei vielen proteinanalytischen Methoden eine störende Wirkung hat (Schägger, 2003). Insgesamt wird der hrCNE eine bessere Auflösung als der CNE zugesprochen.

hrCNE-Gel (1,5 mm)	Trenngel 13 %	Trenngel 5 %	Sammelgel 4 %
AB-Mix (48 % AA, 1,5 % BA)	5,5 ml	2,1 ml	1,2 ml
hr-Nativ Gelpuffer (3x)	7,0 ml	7,0 ml	4,0 ml
Glycerin 50 % (v/v)	8,4 ml	---	---
H ₂ O _{Millipore}	---	11,8 ml	6,7 ml
APS 10 % (w/v)	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

hr-Nativ Gelpuffer (3x), pH 7,0		hr-Nativ Auftragspuffer (1x)	
Imidazol	75 mM	Ponceau S	0,1 % (w/v)
ϵ -Aminocapronsäure	1,5 M	Glycerin	50 % (w/v)
DDM	0,05 %	in Kathodenpuffer	

Kathodenpuffer		Anodenpuffer, pH 7,0	
Imidazol	7,5 mM	Imidazol	25 mM
Tricin	50 mM		
DDM	0,02 % (w/v)		
DOC	0,05 % (w/v)		

10.3.3. 2D-Native/SDS-PAGE (Burré *et al.*, 2009)

Für die Auftrennung der Proteinkomplexe in die beteiligten Untereinheiten wurden die entsprechenden Proteinbanden aus dem Nativgel ausgeschnitten, in eine 1 % (w/v) SDS-Lösung überführt, und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde ein Tris-Tricin Trenngel (10 % AA, 20 x 20cm x 1 mm) gegossen und die Laufpuffer vorbereitet. Anschließend wurde das präparierte Gelstück plan auf die Oberfläche des Trenngels aufgebracht und im Sammelgel eingegossen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte über Nacht in einer wassergekühlten (4 °C) Elektrophoresekammer (PerfectBlue™ Maxi Twin, Peqlab, Erlangen) mit folgenden Parametern: 60 V, 60 mA, 5 W für 2 h und anschließend 100 V, 150 mA, 200 W für 14 h.

10.4. Färbung von Proteingelen

10.4.1. Coomassiefärbung

Die Detektion von Protein in Polyacrylamidgelen erfolgte standardmäßig durch ein Anfärben der Gele mit Coomassie-Lösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig) und ein anschließendes Entfärben (30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig) (Neuhoff *et al.*, 1988). Bei der Färbung von Gelen für die Immunisierung von Kaninchen durfte der Färbe- sowie Entfärbelösung kein Methanol zugesetzt werden. Die Einwirkzeit der einzelnen Schritte variierte ja nach Dicke und Acrylamidkonzentration der Gele.

10.4.2. Silberfärbung

Sensitiver als die Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie war die Detektion von Proteinen mittels Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987). Dazu wurden die Gele nacheinander in je 200 ml der folgenden Lösungen inkubiert:

Inkubationsschritt	Dauer	Lösung
		50 % (v/v) Methanol
FIXIEREN	min. 1,5 h	12 % (v/v) Eisessig
		0,37 % (v/v) Formaldehyd
WASCHEN 1	3 x 10 min	50 % (v/v) Ethanol
BLOCKIEREN	1 min	0,8 mM Na ₂ S ₂ O ₃
WASCHEN 2	3 x 20 sec	H ₂ O _{Millipore}
		12 mM AgNO ₃
FÄRBEN	40 - 60 min	0,28 % (v/v) Formaldehyd
WASCHEN 3	3 x 20 sec	H ₂ O _{Millipore}
		0,3 M Na ₂ CO ₃ (x 10 H ₂ O !!!)
ENTWICKELN	bis Banden sichtbar werden	4 ml Blockierlösung
		0,19 % (v/v) Formaldehyd
STOPPEN	15 min	50 % (v/v) Eisessig
WASCHEN 4	3 x 1 min	H ₂ O _{Millipore}

11. Immunologische Verfahren

11.1. Gewinnung spezifischer Antiseren und Antikörper

Für die Herstellung von Antiseren wurden die entsprechenden Proteine gereinigt und einem Kaninchen injiziert (Davids Biotechnologie, Regensburg). Das Antiserum wurde nach 2-3 Monaten gewonnen. Alternativ konnten einem Kaninchen synthetisierte Peptide injiziert werden (Genscript, Piscataway, USA), die zur Produktion von Antikörpern gegen bestimmte Teilbereiche eines Proteins führten. Auf diese Weise gewonnene Peptid-Antikörper wurden vom Hersteller vor der Auslieferung affinitätsgereinigt.

11.2. Western-Blot

11.2.1. Elektrottransfer nativer Proteine

Der Transfer von Proteinen aus nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen (Imobilon-P, Millipore, Bedford, USA) erfolgte mittels Elektrottransfer (90 min bei 2 mA/cm²) in einer Semi-Dry-Apparatur (Trans Blot SD Transfer Cell, Biorad, München) in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Kyhse-Andersen, 1984).

	Anodenpuffer 1	Anodenpuffer 2	Kathodenpuffer
Tris / HCl	0,3 M	25 mM	25 mM
Methanol	20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
ϵ -Aminocapronsäure	---	---	45 mM
pH-Wert	pH 10,4	pH 10,4	pH 9,4

Kathode
6 x Filterpapier in Kathodenpuffer
Gel in Kathodenpuffer
PVDF-Membran
2 x Filterpapier in Anodenpuffer 2
4 x Filterpapier in Anodenpuffer 1

Anode

Zur Kontrolle des Transfererfolges wurde die Membran mit PonceauS-Lösung angefärbt, und vor dem Blockieren mit TBS-TT wieder entfärbt

11.2.2. Elektrotransfer denaturierter Proteine

Der Transfer von Proteinen aus denaturierenden Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen (Imobilon-P, Millipore, Bedford, USA) erfolgte mittels Elektroblob in einer Semi-Dry-Apparatur (Trans Blot SD Transfer Cell, Biorad, München; 60 min bei 2 mA/cm²) oder einer Tank-Blot-Apparatur (Mini Trans Blot, Biorad, München; ü.N. bei konstant 30 V, max. 90 mA, 4 °C,) in einem kontinuierlichen Puffersystem (25 mM Tris / HCl, 192 mM Glycin, 20 % MeOH (v/v), pH 8,3; (Towbin *et al.*, 1979)). Zur Kontrolle des Transfererfolges wurde die Membran mit PonceauS-Lösung angefärbt und vor dem Blockieren mit TBS-TT wieder entfärbt.

11.2.3. Immundetektion

	TBS	TBS-T	TBS-TT
Tris / HCl	50 mM	20 mM	20 mM
NaCl	150 mM	150 mM	150 mM
Tween 20	---	0,05 % (v/v)	0,05 % (v/v)
Triton X 100	---	---	0,5 % (v/v)
pH-Wert	pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0

Die Membran wurde nach dem Transfer für mindestens 2 h mit 1,5 % BSA (w/v) in TBS-T blockiert und anschließend zweimal kurz mit TBS-T nachgewaschen. Der Primärantikörper wurde in TBS-T mit 0,5 % BSA (w/v) verdünnt und die Membran darin inkubiert (1,5 – 4 h, 19 °C). Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1 h, 19 °C, lichtgeschützt) wurde die Membran dreimal mit TBS-TT (15 min, 19 °C) und zweimal mit TBS (15 min, 19 °C) gewaschen. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal mit TBS-TT gewaschen (10 min, 19 °C, lichtgeschützt), in TBS aufgenommen und für die Detektion vorbereitet. Bei Detektion mittels Chemilumineszenz (HR

Peroxidase, 1:5000 in TBS) wurde das Signal mit Lumi Light Western Blotting Substrat (Roche, Mannheim) entwickelt und mit Hilfe des LAS-3000 Imagers (Fujifilm, Düsseldorf) dokumentiert. Die Dokumentation bei Verwendung von fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (AlexaFluor 488 oder DyLight 649, 1:5000 in TBS) erfolgte mit einem FLA-5000 Scanner (Fujifilm, Düsseldorf).

11.3 Dot Blot

Zur Immundetektion von Proteinen ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung wurden Proteinlösungen in einer Dot-Blot-Apparatur (SRC 96 D Minifold I, Schleicher & Schüll) mittels Vakuum auf eine Membran transferiert. Dazu wurde die aktivierte Membran für 10 min in Auftragspuffer (160 mM NaOH in 40 % MeOH) inkubiert und in die Dot-Blot-Apparatur eingespannt. Anschließend wurde in jedes Reservoir der Apparatur 150 µl Auftragspuffer vorgelegt, mit 25 - 50 µl Proteinlösung versetzt und der Transfer durchgeführt. Nachdem die Membran getrocknet war (1 h, 50 °C), wurde diese in Blockierlösung (1,5 % BSA (w/v) in TBS-T, ü.N., 4 °C) inkubiert. Im Anschluss wurde die Immundetektion, unter Verwendung entsprechender Primär- und Sekundärantikörper, wie in 11.2.3 beschrieben, durchgeführt.

11.4. Immunfluoreszenz

	PBS	PBS-G	PBS-BT
Na-Phosphatpuffer (pH 7,2)	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	130 mM	130 mM	130 mM
Glycin	---	50 mM	---
BSA (proteasefrei)	---	---	2 % (w/v)
Tween 20	---	---	0,02 % (v/v)

1 ml frische Kultur (log-Phase) wurde mit 110 µl Fixierlösung (25 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,2; Küper, 2007) versetzt und für 1 h inkubiert. Nach der Fixierung mit Formaldehyd wurden die Zellen sedimentiert (10000 g, 10 min, 4 °C) und im Folgenden mit PBS-G und PBS gewaschen. PBS wurde durch PBS-BT ersetzt und der primäre Antikörper (1:250 in PBS-BT) hinzugegeben. Im Anschluss an diese Inkubation (2 h, 19 °C, 15 rpm) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit sekundär Antikörperlösung (1:500 in PBS) inkubiert (1 h, 19 °C, 15 rpm, lichtgeschützt). Abschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und mit PBS auf ca. 30-50 Zellen pro Gesichtsfeld (bei 100 facher Vergrößerung) eingestellt. Die immunmarkierten Zellen konnten bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden und wurden je nach Fragestellung im Fluoreszenzmikroskop (BX 60, Olympus Optical, Hamburg) oder im Konfokalen Laser Scan Mikroskop (LSM 510 Meta oder LSM 710 Mikroskop, Zeiss, Jena) analysiert.

12. Zellbiologische und physiologische Verfahren

12.1. Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren

12.1.1. Membranimpermeable Farbstoffe

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) ist ein Farbstoff, der selektiv an dsDNA bindet. Nach Bindung an dsDNA verstärkt sich die Intensität der Fluoreszenz (Ex_{max} : 359 nm / Em_{max} : 461 nm) um das 20 fache. Der Farbstoff SYTOX®Green (Molecular Probes, Leiden, NL) bindet ebenfalls hochaffin an Nukleinsäuren. Seine Fluoreszenz (Ex_{max} : 504 nm / Em_{max} : 523 nm) gewinnt nach Bindung an Nukleinsäuren um das 500 fache an Intensität. Beiden Farbstoffen gemein ist die Eigenschaft, biologische Membranen nicht ohne Weiteres passieren zu können (membranimpermeabel), weshalb den Färbelösungen 0,05 % SDS zugesetzt wurde, um die Membranen für die Farbstoffe durchgängig zu machen.

Das Anfärben der Nukleinsäuren von *Ignicoccus*-Zellen erfolgte bei beiden Farbstoffen analog. Dazu wurden 8 µl Kultur auf einem Objektträger vorgelegt, mit 1 µl DAPI-Lösung (Huber *et al.*, 1985; Küper *et al.*, 2010) bzw. 1 µl SYTOX®Green-Lösung (5 µM in PBS + 0,1 % SDS) versetzt, und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Zellen konnten im Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60, Filtersatz: U-MNU und F41-054) oder im Konfokalen Laser Scan Mikroskop (Zeiss LSM 710, Filtersätze: für DAPI und Fluorescein) analysiert werden. Die Anregung der Farbstoffe erfolgte entweder mittels Quecksilberdampflampe oder für DAPI mittels 2-Photonenlaser (780 nm) bzw. für SYTOX®Green durch die 488 nm Spektrallinie des Argon-Lasers. Im Gegensatz zu DAPI nahm die Intensität der Fluoreszenz von SYTOX®Green extrem schnell ab, und war so nur schwer zu dokumentieren.

12.1.2. Membranpermeable Farbstoffe

Der Farbstoff SYTO®9 kann biologische Membranen ohne Vorbehandlung passieren (membranpermeabel) und hochaffin an Nukleinsäuren binden. Die Intensität der Fluoreszenz (Ex_{max} : 485 nm / Em_{max} : 498 nm) vervielfacht sich nach Bindung an Nukleinsäuren. Zum Anfärben der Nukleinsäuren von *Ignicoccus*-Zellen wurden 8 µl Kultur auf einem Objektträger vorgelegt und mit 1 µl SYTO®9-Lösung (1,5 mM in PBS) versetzt. Nach einer Inkubation von 5 min im Dunkeln konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60, Filtersatz: F41-054) oder Konfokalen Laser Scan Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta, Filtersatz: für Fluorescein) analysiert werden. Die Anregung von SYTO®9 erfolgte mittels Quecksilberdampflampe oder der 488 nm Spektrallinie des Argon-Lasers.

12.2. Fluoreszenzmarkierung von Membranen

FM®4-64FX ist eine lipophile Styryl-Verbindung, die in Membranen inserieren kann und dadurch die Intensität der Fluoreszenz vervielfacht (Ex_{max} : 508 nm / Em_{max} : 751 nm). Zum Anfärben der Membranen von *Ignicoccus*-Zellen wurden 8 µl Kultur auf einem Objektträger vorgelegt und mit 1 µl FM®4-64FX-Lösung (40 µM in PBS) versetzt. Die Zellen konnten direkt im

Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60, Filtersatz: U-MNG) analysiert werden. Die Anregung von FM[®]4-64FX erfolgte mittels Quecksilberdampflampe.

12.3. Bestimmung der Überlebensfähigkeit von Zellen (lebend / tot)

Eine Behandlung der untersuchten Zellen mittels Live/Dead[®] BacLight[™] ermöglichte es den jeweiligen physiologischen Aktivitätszustand (grün = „lebend“, rot = „tot“) annähernd abzuschätzen. Diese Abschätzung beruhte auf den unterschiedlichen Eigenschaften der beiden DNA-bindenden Farbstoffe SYTO[®]9 ($E_{x_{max}}$: 485 nm / $E_{m_{max}}$: 498 nm) und Propidiumiodid ($E_{x_{max}}$: 538 nm / $E_{m_{max}}$: 617 nm). Während SYTO[®]9 intakte Membranen passieren kann, ist es Propidiumiodid nur möglich, durch beschädigte Membranen in die Zelle einzudringen, um an DNA binden zu können. Die grüne Fluoreszenz von SYTO[®]9 wird in „toten“ Zellen durch die konkurrierende Bindung von Propidiumiodid stark abgeschwächt und durch die rote Fluoreszenz von Propidiumiodid überstrahlt, so dass eine Unterscheidung zwischen „lebenden“ und „toten“ Zellen möglich wird.

Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden je 1 μ l der Lösungen A und B zusammen in ein PCR Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 18 μ l H₂O_{Millipore} verdünnt. Vorbereitend für die Analyse mit Live/Dead[®] BacLight[™] wurden 4 μ l der Probe mit 1 μ l der Arbeitslösung versetzt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die markierten Zellen konnten im Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60, Filtersatz: U-MNU) analysiert werden. Die Anregung beider Farbstoffe erfolgte mittels Quecksilberdampflampe.

12.4. Nachweis eines Membranpotentials

Der BacLight[™] Bacterial Membrane Potential Kit enthält den Carbocyanin-Farbstoff DiOC₂ (3,3'-Diethyloxacarbocyanin-iodid) und den Protonophor CCCP (Carbonyl-cyanid-3-chlorophenylhydrazon). DiOC₂ ist ein membranpermeanter Farbstoff, der in Zellen grundsätzlich grün fluoresziert ($E_{x_{max}}$: 482 nm / $E_{m_{max}}$: 497 nm). Bei bestehendem Membranpotential wird DiOC₂ vermehrt in die Zelle eingebracht und aggregiert; dabei verschiebt sich die Emissionswellenlänge der Fluoreszenz in den roten Spektralbereich (Cao-Hoang *et al.*, 2008). Zur Kontrolle wurde den Zellen in einem parallelen Experiment neben DiOC₂ stets auch CCCP zugesetzt. Durch die Zugabe des Protonophors brach ein bestehendes Membranpotential zusammen; DiOC₂ konnte nicht aggregieren und die Fluoreszenz verschob sich nicht in den roten Spektralbereich.

Für Experimente mit dem BacLight[™] Bacterial Membrane Potential Kit wurde *I. hospitalis* bis zur log-Phase in Serumflaschen kultiviert und die log-Zellen in 1 ml Aliquots in sterile mit H₂/CO₂ begaste Rollrandröhrchen (Hungate-Röhrchen) überführt. Die Kontrollansätze wurden zuerst mit 10 μ l 500 μ M CCCP versetzt, und die Versuchsreihe durch Zugabe von 10 μ l 3 mM DiOC₂ zu allen Reaktionsansätzen gestartet. Bei 90° C wurden die Zellen weitere 30 min inkubiert und anschließend untersucht. Die behandelten Zellen konnten im Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60, Filtersatz: U-MNB) analysiert werden. Die Anregung von DiOC₂ erfolgte mittels Quecksilberdampflampe.

13. Spektroskopische Verfahren

13.1. MALDI-TOF MS/MS

Im Vorfeld der MALDI-TOF MS/MS-Analyse (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) wurden die zu analysierenden Proteine mittels Trypsin im Gel verdaut. Dazu wurden die entsprechenden Proben elektrophoretisch aufgetrennt, das betreffende SDS-Gel mit Coomassie gefärbt, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ gewaschen (1 h bzw. über Nacht) und die entsprechenden Proteinbanden durch Ausschneiden isoliert. Nachdem die Volumina der ausgeschnittenen Gelfragmente bestimmt waren, wurden diese in kleine Würfel (Kantenlänge ca. 1 mm) geschnitten, um die Reaktionsoberfläche für die weitere Behandlung zu vergrößern. Die Gelwürfel wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und unter leichtem Schütteln für jeweils 30 min in 700 μl der folgenden Lösungen gewaschen:

- 1) 50 mM NH_4HCO_3
- 2) 50 mM NH_4HCO_3 , 25 % (v/v) Acetonitril (ACN)
- 3) 25 % (v/v) ACN
- 4) 50 % (v/v) ACN

Die Gelwürfel wurden daraufhin in 0,5 ml ERG überführt und für mindestens 1 h bis zur Trockene lyophilisiert (Lyophille: Typ Alpha 1-4; Christ, Osterode). Für den proteolytischen Verdau wurden die lyophilisierten Gelwürfel mit Trypsin-Lösung versetzt. Das Trypsin wurde nach Angaben des Herstellers in 1 mM HCl gelöst und auf eine Konzentration von 25 $\mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$ eingestellt. Die lyophilisierten Gelwürfel wurden für 5 min in der noch inaktiven, sauren Trypsin-Lösung inkubiert (2 μg Trypsin / 100 μl Gelvolumen), der pH-Wert der Lösung anschließend mittels 100 mM NH_4HCO_3 auf pH 8,0 – 8,5 eingestellt und das Trypsin dadurch aktiviert. Die Proteine wurden unter leichtem Schütteln für 2 h bis 18 h bei 37 °C verdaut.

Im Anschluss an den Verdau erfolgte die Extraktion der gewonnenen Peptide aus den Gelwürfeln. Der Überstand des Trypsinverdau wurde abgenommen und die Gelwürfel für jeweils 1 – 2 h zweimal mit je 30 μl 100 mM NH_4HCO_3 sowie einmal mit einem Gemisch aus 100 mM NH_4HCO_3 und 25 % ACN bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Extrakte wurden mit dem Überstand aus dem Trypsinverdau vereinigt und bis zur Trockene lyophilisiert. Die anschließende massenspektrometrische Analyse der gewonnenen Peptide und deren Identifizierung wurde von Eduard Hochmuth am Institut für Biochemie der Universität Regensburg im Labor von Prof. Dr. Deutzmann an einem 4700 Proteomics MALDI-TOF MS/MS-Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

13.2. LILBID MS

Die LILBID Massenspektrometrie (*Liquid Bead Laser Induced Ion Desorption*; Kleinekofort *et al.*, 1996; Morgner *et al.*, 2007) ermöglichte es, gereinigte, native Proteinkomplexe hinsichtlich der am Aufbau beteiligten Untereinheiten und Stöchiometrie zu analysieren. Das hochsensitive und schonende Verfahren dient der spezifischen Analyse von nichtkovalent verbundenen Biomolekülen und bietet entgegen der klassischen, matrixgestützten MALDI-TOF MS/MS -Technik den Vorteil, die

für die Analyse notwendigen Ionen direkt aus einer flüssigen Phase zu gewinnen. Verglichen mit der ebenfalls auf flüssigen Proben basierenden ESI-MS/MS-Technik zeigt die LILBID MS eine höhere Ionisierungsrate sowie eine bessere Verträglichkeit gegenüber erhöhten Salz- und Detergenzkonzentrationen. Dies ermöglicht den Erhalt der natürlichen Probenbedingungen, wodurch das Risiko einer Artefaktbildung im Verlauf der Probenpräparation reduziert wird. Durch den Einsatz eines piezogetriebenen Mikrotropfengenerators (*ondemand droplet generator*) werden bei einer Frequenz von 10 Hz definiert kleine Flüssigkeitstropfen (*beads*, $\varnothing = 50\mu\text{m}$) der eingesetzten Probe erzeugt und in das Hochvakuum ($p = 10^{-3} - 10^{-7}$ mbar) überführt. Im Vakuum werden die Tropfen mit einem Infrarot-Laserimpuls angeregt, dessen Wellenlänge ($2,8\mu\text{m}$) dem Absorptionsmaximum von Wasser entspricht. So wird die Energie des Lasers in die H-O-Vibration (Streckschwingungen) der Wassermoleküle transferiert und führt zu einem Übergang der Flüssigkeit in den superkritischen Zustand. Bei der daraus resultierenden Tropfenexplosion werden die im Wasser solvatisierten Ionen freigesetzt und beginnen, aufgrund der Coulombanziehung, zu rekombinieren. Freigesetzte, nicht rekombinierende Ionen werden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt und analog zu einer klassischen TOF-MS bezüglich Masse und Ladung analysiert. Unter sanften Desorptionsbedingungen bleiben nicht kovalent gebundene Komplexe intakt und können als Gesamtkomplex nachgewiesen werden. Erhöhte Laserintensitäten während der Desorption führen zur Zerstörung der nicht kovalenten Bindungen und zu einer Abtrennung aller Wasser- und Detergenzmoleküle. Der zu analysierende Komplex wird folglich bei entsprechend erhöhten Laserintensitäten in einzelne Untereinheiten oder Subkomplexe fragmentiert und bleibt nicht als Gesamtkomplex erhalten. Die Präparation der LILBID-Proben und die LILBID-Analysen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Brutschy (Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main) durchgeführt.

14. Bioinformatische Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Datenbanken und Algorithmen zur Auswertung von Proteinsequenzen verwendet. Die dabei benutzten Programme sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Anwendung / Datenbank	Referenz
JGI	http://www.jgi.doe.gov/
IMG	http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
SignalP	(Emanuelsson <i>et al.</i> , 2007)
Pred-Signal	(Bagos <i>et al.</i> , 2009)
ClustalW2	(Larkin <i>et al.</i> , 2007)
Phobius	(Käll <i>et al.</i> , 2007)
TMpred	(Hofmann & Stoffel, 1993)
PSORTb 3.0.2	(Yu <i>et al.</i> , 2010)
TMHMM 2.0	(Krogh <i>et al.</i> , 2001)
Phyre 2.0	(Kelley & Sternberg, 2009)

15. Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Ein entscheidender Bestandteil für die Beschreibung eines Proteinkomplexes ist die Bestimmung seiner 3-D Struktur. Die Röntgenkristallstrukturaufklärung ist eine bevorzugte Methode, die es ermöglicht die Struktur eines Proteinkomplexes hochauflösend zu klären. Es gibt zahlreiche Parameter, über welche eine Kristallisation beeinflusst werden kann; dazu zählen unter anderem die Reinheit und Konzentration des Proteins, das verwendete Detergenz in Typ und Konzentration, der umgebende Puffer sowie der pH-Wert (Hunte & Michel, 2003; Kuhlbrandt, 2003). Ziel ist es primär gut streuende Kristalle zu züchten, die eine geordnete und periodische Struktur aufweisen, um über die Röntgenstrukturanalyse Detailinformation über die dreidimensionale Struktur des Komplexes zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Schritte der Kristallzüchtung und Analyse der Kristalle in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main in der Abteilung für molekulare Membranbiologie von Frau Dr. Guohong Peng durchgeführt. Der zu untersuchende A₁-ATPase-Komplex wurde im Vorfeld in Regensburg gereinigt und für die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse nach Frankfurt am Main verschickt.

III. Ergebnisse

1. Methodische Vorarbeiten

Im Vorfeld der Untersuchungen dieser Arbeit war es notwendig, einige Methoden zu etablieren, um die geplanten Arbeiten durchführen zu können. Für Experimente mit der ATP-Synthase von *I. hospitalis* wurden effiziente und reproduzierbare Nachweismethoden für die enzymatische ATP-Hydrolyse und die ATP-Synthesefähigkeit benötigt. Darüber hinaus musste eine generelle Methode etabliert werden, die es ermöglichte, *I. hospitalis*-Zellen auch im Großmaßstab (300 l Fermenter) ohne Hefeextrakt kultivieren zu können. Ein potentieller Einfluss der organischen Bestandteile des Hefeextraktes auf die Energiegewinnung von *I. hospitalis* sollte durch autotrophe Zuchtbedingungen von vorn herein ausgeschlossen werden.

1.1. Autotrophe Kultivierung von *I. hospitalis* im Großmaßstab

Versuche zur autotrophen Kultivierung von *I. hospitalis* im Großmaßstab wurden analog dem beschriebenen Protokoll der Standardkultivierung durchgeführt, mit der Ausnahme, dass das Medium nicht durch Hefeextrakt supplementiert wurde. Der pH-Wert des Mediums wurde bei allen Versuchen auf pH 5,85 - 5,90 eingestellt.

1.1.1. Beimpfen des Mediums mittels frischer Vorkultur

Der direkte Transfer des Standardprotokolls auf die autotrophe Kultivierung führte lediglich zu einem gemäßigten Wachstum mit einer Verzehnfachung der Zellzahl. Direkt nach dem Beimpfen mit frischer Vorkultur waren die Zellzahlen ($2 - 5 \cdot 10^4$ Zellen/ml) zwar mit denen einer Standardkultivierung vergleichbar, nicht jedoch die Endzellzahlen nach einer Kultivierungsdauer von etwa 20 h (Abb. 4). Wurden bei einer Zucht mit Hefeextrakt mindestens $6 \cdot 10^7$ Zellen/ml erreicht (Küper, 2007), betrug die Zellkonzentration unter autotrophen Bedingungen nicht mehr als $2 - 4 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Des Weiteren stimulierte die Durchgasung der Kultur mit 60 l/min $N_2/H_2/CO_2$ (65:15:20, v/v/v) oder H_2/CO_2 (80:20, v/v) das autotrophe Wachstums der Zellen nicht wie bei vergleichbaren Zuchten mit Hefeextrakt. Variationen der Substratkonzentration im Medium (0,5 %, 1 % und 2 % (w/v) Schwefel) zeigten ebenfalls keinen Unterschied im Wachstumsverhalten von *I. hospitalis*. Im Gegensatz dazu wurde in einem Kontrollexperiment gezeigt, dass das stagnierende Wachstum unter autotrophen Bedingungen durch nachträgliche Zugabe von Hefeextrakt wieder angeregt werden konnte, allerdings nur bis zu einer Endzellkonzentration von ca. $2,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Gleichzeitig bedeutete dies, dass die Zellen immer noch lebensfähig waren, und ein rein autotrophes Wachstum unter den gegebenen Bedingungen nicht optimal gefördert wurde. Die Lebensfähigkeit der Kultur wurde durch Färbung der Zellen mittels Live/Dead *BacLight* bestätigt. Der pH-Wert der Kultur sank während aller durchgeführten Zellzuchten bis zu einem Minimum von

ca. pH 5,5 ab, stieg aber nach dem Start der Durchgasung wieder auf einen pH-Wert von pH 5,6 -5,7 an. Eine erfolgreiche Kultivierung von *I. hospitalis* unter rein autotrophen Bedingungen war mittels der beschriebenen Vorgehensweisen nicht möglich.

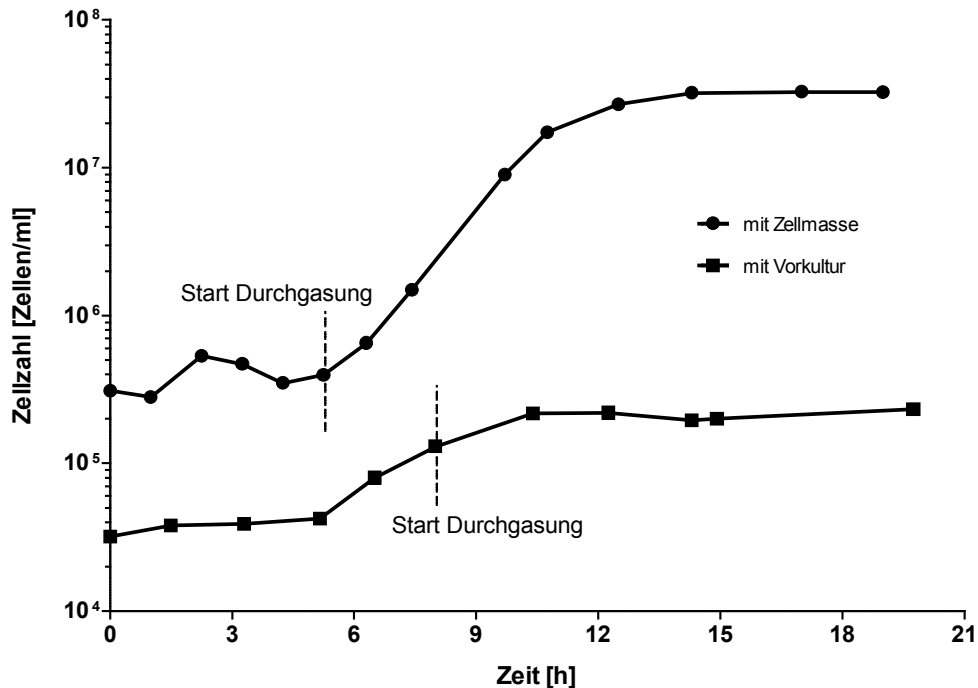


Abb. 4: Wachstumskurve autotropher Kultivierungen von *I. hospitalis*. Die gezeigten Wachstumskurven verdeutlichen den Unterschied des Wachstumsverhaltens nach Beimpfen mit gefrorenen Zellen oder mit flüssiger Vorkultur

1.1.2. Beimpfen des Mediums mittels gefrorener Zellen

Eine erfolgreiche autotrophe Kultivierung von *I. hospitalis* war erst möglich, nachdem das Medium mit ca. 2 g gefrorener Zellen anstelle frischer Vorkultur beimpft wurde. Die dafür verwendeten Zellen stammten aus einer Fermenterzucht mixotroph gezüchteter *I. hospitalis* Zellen. Die Zellkonzentration lag nach dem Beimpfen bei etwa $2,8 \cdot 10^5$ Zellen/ml (Abb. 4), wobei etwa 25 % der Zellen, mittels Live/Dead *BacLight* Färbung, keine Lebensfähigkeit mehr zugesprochen werden konnte. Einhergehend mit einer verlängerten lag-Phase war ein unerwarteter Abfall des pH-Wertes bis auf ein Minimum von pH 5,3 zu beobachten. Versuche den pH-Wert durch mehrmaliges, kurzes Durchgasen (jeweils 5 min, H_2/CO_2 (80:20, v/v), 60 l/min) in den optimalen Bereich zurückzuführen, blieben erfolglos und führten zu einem maximalen Anstieg des pH-Wertes auf pH 5,4. Erst eine dauerhaftes Durchgasen mit 60 l/min $N_2/H_2/CO_2$ (65:15:20, v/v/v) stabilisierte den pH-Wert wieder auf ca. pH 5,6 und stimulierte das Wachstum. In der logarithmischen Phase lag die Verdoppelungszeit bei ca. 60 min. Ein Übergang in die stationäre Phase war nach etwa 11 h zu beobachten. Die Endzellkonzentration lag bei $3,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Da das Medium in diesem Fall mit mixotroph gezüchteten Zellen beimpft wurde, sollte in einer Serie weiterer Fermentationen kontrolliert werden, ob eventuelle Rückstände des Hefeextraktes für den Erfolg der Kultivierung verantwortlich waren. Dazu wurden die geernteten autotrophen Zellen verwendet, um eine weitere

Kultivierung zu starten. Nachdem dieser Vorgang dreimal wiederholt wurde, war davon auszugehen, dass die geernteten Zellen frei von Hefeextrakt waren. Im Gegensatz zu der Kultivierung mit flüssiger Vorkultur war nach dem Beimpfen mit gefrorenen Zellen stets ein Abfall des pH-Wertes zu beobachten. Ein frühes Starten der Durchgasung (60 l/min $N_2/H_2/CO_2$) bei geringen Zellkonzentrationen ($< 1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) erlaubte allerdings die störungsfreie Kultivierung von *I. hospitalis* unter autotrophen Bedingungen. Für zukünftige Fermentationen wurden autotrophe Zellen steril geerntet, in 1,5 g Starter-Aliquots portioniert und bei $-80^\circ C$ gelagert. Der Großteil dieser Experimente wurde während eines Schwerpunktpraktikums von Frau Catrin Wartner durchgeführt.

1.2. Optimierung des Testsystems für die ATP-Hydrolysemessung

Das Testsystem zur Bestimmung der *I. hospitalis* spezifischen ATP-Hydrolyseaktivität wurde im Rahmen einer begleitenden Diplomarbeit von Frau Johanna Hlady etabliert und optimiert (Hlady, 2007). Ausgehend von einem bereits vorhandenen Protokoll zur ATPase-Aktivitätsmessung (Lingl, 2006; Pisa, 2008) konnte die Methode schrittweise an die optimalen Bedingungen für *I. hospitalis* angepasst werden. Dazu wurden Membranen von *I. hospitalis* präpariert, gewaschen und in den Test eingesetzt. Es wurde der Einfluss grundlegender Parameter wie der Temperatur (40 – 100° C), des pH-Wertes (pH 4 - 10) und der Substratkonzentration (0 – 8 mM) auf die ATP-Hydrolyseaktivität untersucht. Weitere Tests sollten zeigen, ob eine Abhängigkeit der Aktivität bezüglich Ammonium (0 – 3 M), Sulfat (0 - 150 mM), Sulfit (0 – 150 mM), sowie einwertiger (Na^+ , K^+) und zweiwertiger Kationen (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) besteht. Insgesamt wurde die maximale ATP-Hydrolyseaktivität der Membranen (2 U/mg) bei 90° C, pH 7, 4,7 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 40 mM $Na_3S_2O_5$ und 200 mM KCl gemessen. Die Anwesenheit von Mg^{2+} war für die Aktivität des Enzyms zwingend notwendig, konnte jedoch durch Mn^{2+} ersetzt werden. Ein Austausch von Mg^{2+} gegen Ni^{2+} , Zn^{2+} oder Cu^{2+} führte dagegen zu keiner messbaren ATP-Hydrolyse. Versuche mit ATPase spezifischen Inhibitoren sprachen dafür, dass die gemessene Aktivität vorwiegend von dem gesuchten Enzym stammt. Eine Hemmung der Aktivität wurde nach Zugabe von DES (95 %), Hexestrol (60 %) und DCCD (55 %) beobachtet. Das optimierte Testsystem wurde wie in Kap. II 9.1.1. beschrieben für die vorliegende Arbeit verwendet.

1.3. Untersuchungen zur ATP-Synthesefähigkeit der A_1A_0 ATP-Synthase

Die Annahme, dass die ATP-Synthase von *I. hospitalis* fähig ist, ATP zu generieren, sollte experimentell bewiesen werden. Ein klassischer Nachweis der ATP-Synthesefähigkeit mittels invertierter Membranvesikel (Inside-Out-Vesikel) war und ist für *I. hospitalis* aber noch nicht möglich. Alternativ wurde eine qualitative Aussage über die Synthesefähigkeit des Enzyms durch sogenannte ‚pH-Jump‘ Experimente getroffen. Angelehnt an die ‚acid bath procedure‘ (Jagendorf & Uribe, 1966), wurde hierbei eine pH-neutrale Suspension (pH 7) frischer, intakter *I. hospitalis* Zellen mit Säure (H_2SO_4) versetzt und die ATP-Konzentration der Lösung vor und nach Säurezugabe bestimmt. Auf diese Weise wird über der Membran ein künstlicher Protonengradient (ΔpH) angelegt, der von der ATP-Synthase genutzt wird und ATP generiert. In Kombination mit

spezifischen Inhibitoren (DCCD, DES, TBT) und einem Entkoppler (TCS) kann zusätzlich abgeschätzt werden, ob und in welchem Umfang die ATP-Synthese durch die A_1A_0 ATP-Synthase erfolgt. Durchgeführt wurden die entsprechenden Experimente von Herrn Florian Mayer, als Teilprojekt seiner Diplomarbeit (Mayer, 2008). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ATP-Synthese durch die Etablierung eines künstlichen Protonengradienten stimuliert werden konnte. Eine Korrelation der Zunahme von ATP-Syntheserate (pmol ATP / mg Protein) und steigendem Protonengradienten wurde eindeutig festgestellt. Bei einer Erhöhung des Protonengradienten um eine pH-Einheit wurde die Syntheserate durchschnittlich um 150 pmol ATP / mg Protein gesteigert (Abb. 5). Ausgenommen davon war die Erhöhung von $\Delta\text{pH } 3$ auf $\Delta\text{pH } 4$, bei der im Vergleich eine 3,5-fach höhere Zuwachsrate der ATP-Synthese (530 pmol ATP / mg Protein) gemessen wurde. Eine weitere Steigerung der Syntheserate, bis zu einem Maximum von 1312 pmol ATP / mg Protein, wurde mit zunehmendem Protonengradienten bis zu einer Konzentrationsdifferenz von $\Delta\text{pH } 6$ gemessen.

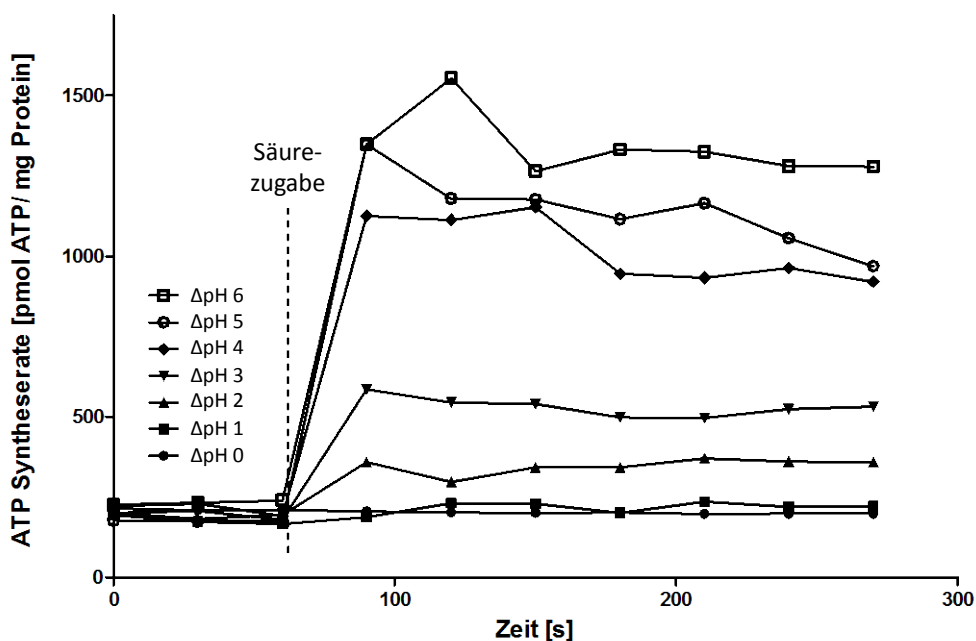


Abb. 5: ATP-Synthese durch einen artifiziellen Protonengradienten an ganzen *I. hospitalis*-Zellen. Einfluss der unterschiedlichen angelegten ΔpH s auf die ATP-Syntheserate (nach Mayer, 2008)

Eine effektive Hemmung der ATP-Syntheseaktivität mittels verschiedener spezifischer Inhibitoren war zu beobachten. Dafür wurden ganze *I. hospitalis* Zellen vor dem ‚pH-Jump‘ Experiment mit dem entsprechenden Hemmstoff behandelt. Sowohl DCCD, DES wie auch TBT führten bei Erhöhung der Hemmstoffkonzentrationen zu einer Abnahme der Syntheseaktivität (Abb. 6). Allerdings war eine stärkere Hemmung durch DCCD als durch DES zu verzeichnen, was im Gegensatz zu bisherigen Ergebnissen steht (Becher & Müller, 1994). Da der exakte Wirkmechanismus von DES nicht bekannt ist (Hong & Pedersen, 2008), kann diese Diskrepanz nicht näher erklärt werden. Zusätzliche Versuche mit dem Protonophor TCS zeigten die Abhängigkeit der ATP-Synthese vom anliegenden Protonengradienten (Abb. 6). Das Erliegen der ATP-Synthese nach dem TCS-vermittelten Kollaps des Protonengradienten veranschaulichte diesen Zusammenhang deutlich.

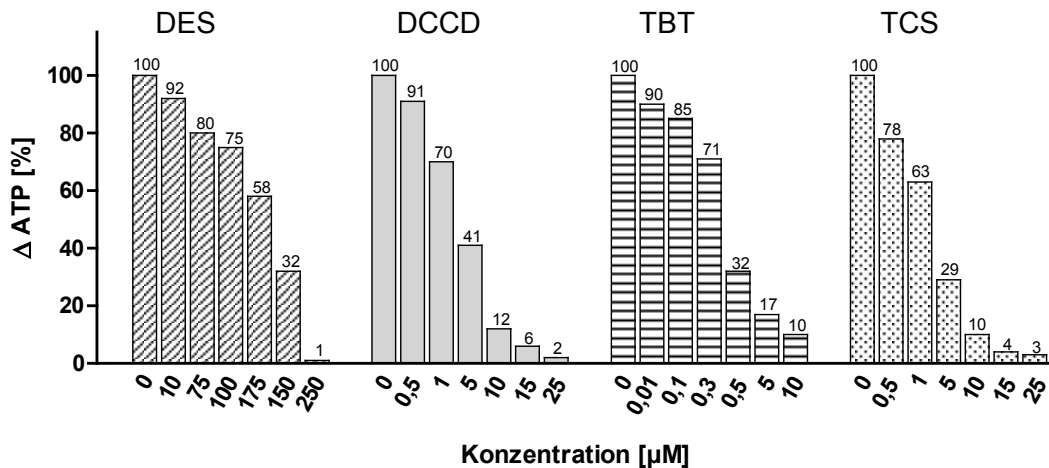


Abb. 6: Einfluss unterschiedlicher Hemmstoffe und Hemmstoffkonzentrationen auf die ATP-Synthese von *I. hospitalis* Zellen

Die Ergebnisse lassen die Aussagen zu, dass die ATP-Synthese in *I. hospitalis* durch einen künstlichen Protonengradienten hervorgerufen werden kann, und dass die Synthese durch die A_1A_0 ATP-Synthase erfolgt.

2. Untersuchungen der A_1A_0 ATP-Synthase / ATPase

2.1. Interpretation der Genomdaten

Bei Analysen der Genomdaten von *I. hospitalis* wurden 8 ORFs annotiert, deren Sequenzen verschiedenen Untereinheiten einer A_1A_0 ATP-Synthase zugeordnet werden konnten (Podar *et al.*, 2008). Die zugehörigen Gene lagen weit über das Genom verteilt vor, und nicht zusammengefasst in einem Operon (Abb. 7A, B). Zusätzlich wurde das Protein Igni1215 als Bestandteil des angereicherten ATP-Synthase-Komplexes analysiert und als Untereinheit H identifiziert (Röhl, 2010). Alle annotierten Untereinheiten wurden bis dato entweder mittels MALDI-TOF MS/MS oder Western-Blot nachgewiesen (Burghardt, 2008; Röhl, 2010). Die Ergebnisse zeigten, dass die A_1A_0 ATP-Synthase von *I. hospitalis* der klassischen Untereinheitenkomposition bekannter archaeller ATP-Synthasen (Lingl *et al.*, 2003; Pisa, 2008) gleicht. Aufgrund unzureichender Daten bezüglich der Struktur crenarchaeeller ATP-Synthasen wurde für die ATP-Synthase von *I. hospitalis* vorerst ein theoretisches Modell, basierend auf der Struktur der ATP-Synthase von *P. furiosus* (Vonck *et al.*, 2009), erstellt (Abb 7C).

Weitere bioinformatische Analysen mit SignalP und Pred-Signal konnten ausschließlich für die membranständige Untereinheit K(c) eine SEC-spezifische Signalsequenz nachweisen. Die wahrscheinlichste Spaltstelle wurde zwischen Alanin³¹ und Alanin³² vorhergesagt (Abb. 8). Demzufolge besteht das prozessierte Protein aus zwei transmembranen, hydrophoben Helices, die über eine kurze hydrophile Schleife miteinander verbunden werden (TMHMM 2.0). Die resultierende molekulare Masse von etwa 8 kDa (81 AS) und die einfache Haarnadelstruktur entsprechen den Charakteristika der meisten bakteriellen wie auch archaellen c-Monomere (Müller *et al.*, 2005). Allerdings muss die molekulare Masse der prozessierten c-Untereinheit erst noch biochemisch verifiziert werden. Ein Sequenzvergleich der K(c)-Untereinheit von *I. hospitalis*

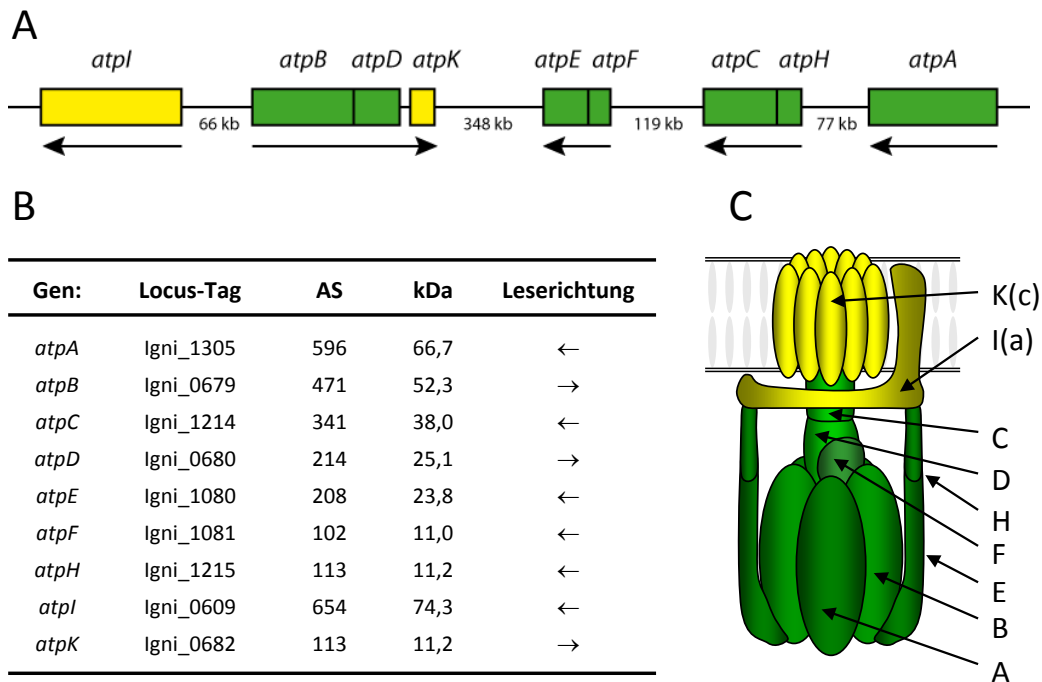


Abb. 7: Übersicht der Genomdaten für die ATP-Synthase von *I. hospitalis*. (A) schematische Darstellung der Genanordnung; (B) tabellarische Auflistung aller zugehörigen Untereinheiten; (C) schematische Darstellung des theoretischen Modells der ATP-Synthase von *I. hospitalis* (angelehnt an Vonck et al., 2009)

mit verschiedenen archaellen und bakteriellen 8 kDa c-Monomeren ergab, dass das Protein mit größter Wahrscheinlichkeit zur Protonentranslokation fähig ist. Die zur Na^+ -Translokation erforderliche Triade aus Q/E (Motiv I) und ET oder ES (Motiv II) (Meier *et al.*, 2005; von Ballmoos *et al.*, 2008) ist in der Sequenz des Proteolipids von *I. hospitalis* nicht vollständig konserviert (Abb. 8). Zwar ist Motiv II ($\text{E}^{96} \text{T}^{97}$) vorhanden, dennoch fehlt das entscheidende Motiv I (Q/E^{67}), so dass eine exklusive Translokation von Protonen wahrscheinlicher ist.

<i>P. modestum</i>	-----MDMVLAKTVVLA-----ASAVGAGAAM-IA	24
<i>I. tartaricus</i>	-----MDMLFAKTVVLA-----ASAVGAGTAM-IA	24
<i>A. woodii</i> c2/3	-----MEGLDFIKA-----CSAIGAGIAM-IA	24
<i>M. mazei</i>	-----MVDAASTGLFLD-----AAGMKALGAIAIAVT	28
<i>N. equitans</i>	-----MD-----LALASALAIGLA	14
<i>I. hospitalis</i>	---MKAEIMPKRAIRSVLLSILFVTLVGASAALAEMGETSLGTG---MMTGLKAVGAGLALLGG	59
<i>H. butylicus</i>	MSPFPNPQSGAHAMRRVGLVLFVLTALSLLAATTLVAAAQEDAVAAAEAAAKGWKAIAAALAMGLS	65
<i>E. coli</i>	-----MENLNMD-----LLYMAAAVMMGLA	20

	Motiv I	Motiv II	
<i>P. modestum</i>	GIGPGVGQGYAAGKAVESVARQPEAKGDIISTMVLGQAI	ESTGIYSLVIALILLYANPFVGLLG	89
<i>I. tartaricus</i>	GIGPGVGQGYAAGKAVESVARQPEAKGDIISTMVLGQAVA	ESTGIYSLVIALILLYANPFVGLLG	89
<i>A. woodii</i> c2/3	GVGPGIGQGFAGKGAEAVGRQPEAQSDIIRTMLLGAAVA	ETGTIYGLVIALILLFANFFF	82
<i>M. mazei</i>	GLASAIAEKDIGTAAIGAMAENE	GLFGKGLILTVIEETIVIFGLVVALINQ	80
<i>N. equitans</i>	AFGSAIAQGLAASAAAATSEKP	DLFGKMLIFAALPETQAIYGLVIAIYLLSKIV	69
<i>I. hospitalis</i>	TIGAGYALGATGAAGIAVISEKP	EEFGRVLLFIGIAETPAIYGLVIAIIVILFAI	113
<i>H. butylicus</i>	AIGAGIALGRTGSAASAAVAIEKP	EVSGLLIIYLVLEGIYGLVIAIIVILFAI	119
<i>E. coli</i>	AIGAAIGIGILGGKFLGGAARQPDLIPLLRTOFFIVMGLVDAI	PIPIAVGLGLYVMFAVA	79

Abb. 8: Multiples Alignment archaeller und bakterieller Aminosäuresequenzen von c-Untereinheiten der jeweiligen ATP-Synthase-Komplexe. Gelbmarkierte AS sind Teil einer identifizierten Signalsequenz; die für das Na^+ -Bindemotiv entscheidenden AS sind durch die Kästen (Motiv I und II, rot) gekennzeichnet.

2.2. Solubilisierung

Detergenzien verschiedener Detergenzklassen (nicht-ionisch: TritonX-100, DDM; zwitterionisch: CHAPS; ionisch: DOC) wurden auf ihre Eignung zur vollständigen Solubilisierung der hydrophoben Untereinheiten des A_0 -Subkomplexes getestet. Dabei war entscheidend, dass die funktionelle Kopplung des Gesamtkomplexes erhalten wurde. Die Wirksamkeit der Detergenzien wurden stets bei einem konstanten Verhältnis von Protein zu Detergenz untersucht (1 : 1,5). Zusätzlich wurde der Einfluss unterschiedlicher Detergenzkonzentrationen (0,5 %, 1 %, 2 % und 3 % (w/v)) und Inkubationstemperaturen (19 °C und 40 °C) auf die Solubilisierungseffizienz analysiert. Die charakteristischen Eigenschaften verschiedener Detergenzien können zu einer unterschiedlichen Effizienz und gegebenenfalls zur Dissoziation der Untereinheiten des Komplexes führen (Le Maire *et al.*, 2000; Garavito & Ferguson-Miller, 2001; Seddon *et al.*, 2004). Als Maß für die Solubilisierungseffizienz wurde die ATP-Hydrolyseaktivität und folgend die Hemmung durch den Inhibitor DCCD herangezogen. Der Hemmstoff DCCD ist lipophil und bindet kovalent an saure Aminosäuren, was im Falle einer Bindung an essentielle Aminosäuren des c-Rings (Aspartat und Glutamat) die Ionentranslokation verhindert und somit zur Inhibierung der Aktivität des Gesamtkomplexes führt. Folglich beweist die Hemmung der Aktivität mittels DCCD, dass die Mehrheit der A_1A_0 -Gesamtkomplexe funktionell gekoppelt vorliegt, und das Enzym bis zu diesem Schritt der Reinigung nicht in A_1 und A_0 -Teil dissoziierte.

Für die Versuchsreihen wurde die Membransuspension ($A_{spez} = 1,9$ U/mg) auf 2 mg/ml verdünnt und 1 ml in jeden Test eingesetzt. Generell führten die Detergenzien nicht zu einer Inaktivierung des Enzyms. Im Fall von DDM, TritonX-100 und DOC konnte sogar, wie auch bei Solubilisierungsversuchen mit *M. jannaschii* und *P. furiosus* (Lingl, 2006; Pisa, 2008), eine Stimulierung der Hydrolyse-Aktivität beobachtet werden. Die Solubilisierungseffizienz der verschiedenen Detergenzien veränderte sich nur marginal durch die Variation der Inkubationstemperatur oder der Detergenzkonzentrationen. Beispielhaft für die Effizienz der gewählten Detergenzien unter den getesteten Bedingungen ist Tabelle 1. Grundsätzlich waren die Versuche mit DDM und TritonX-100 am effektivsten. Konnten hier 83 %, respektive 81 % der Gesamtaktivität aus der Membran herausgelöst werden, waren es bei CHAPS nur 58 %. Mit DOC wurden zwar 82 % der Aktivität solubilisiert, allerdings war durch DOC auch die stärkste Stimulation zu verzeichnen, so dass die im *MnS* (Membran nach Solubilisierung) verbleibende Aktivität deutlich höher war als bei DDM oder TritonX-100. Die funktionelle Kopplung im Solubilisat wurde in jedem Ansatz mittels DCCD kontrolliert. In jedem Fall war eine DCCD-Hemmung der ATP-Hydrolyse zu verzeichnen. Das Ausmaß der Hemmung wurde für die unterschiedlichen Detergenzien in Relation gesetzt, eine quantitative Bestimmung wurde jedoch nicht durchgeführt. Die beste Hemmung war bei TritonX-100 zu beobachten, gefolgt von DDM, DOC und CHAPS. Die Tests belegten, dass der funktionelle A_1A_0 -Gesamtkomplex durch alle Detergenzien herauszulösen war. Die Effizienz von DDM und TritonX-100 übertraf dabei aber die von DOC und CHAPS.

Basierend auf diesen Ergebnissen und auf Erfahrungswerten aus der Literatur (Schimerlik, 2001; Schägger, 2003; Reisinger & Eichacker, 2008) wurde die Solubilisierung mit DDM (2 % (w/v); 2,5 h; 19° C) als Methode der Wahl angesehen. Auch hinsichtlich geplanter Kristallisationsstudien war

DDM das Detergenz mit den vielversprechendsten Erfolgsaussichten (mündliche Mitteilung Dr. Guohong Peng, MPI, Frankfurt am Main).

Tabelle 1: Solubilisierungseffizienz

Detergenz	ATP-Hydrolyseaktivität							
	Membran		Sol		MnS		Sol + MnS	Ausbeute
	[mU]	[%]	[mU]	[%]	[mU]	[%]	[mU]	[%]
DDM	3800	100	3154	83	798	21	3952	104
TritonX-100	3800	100	3078	81	1102	29	4180	110
CHAPS	3800	100	2204	58	1520	40	3724	98
DOC	3800	100	3116	82	1368	36	4484	118

2.3. Reinigung und Untersuchungen des A₁ ATPase-Subkomplexes

Der katalytisch aktive A₁-Subkomplex der ATP-Synthase (440-kDa-Komplex) wurde chromatographisch gereinigt, und Antikörper gegen diesen generiert. Die Untereinheiten-Zusammensetzung des Komplexes wurde mittels 2D-Native/SDS-PAGE bestimmt und die zugehörigen Proteine durch MALDI-TOF-MS/MS und Western-Blot-Analysen identifiziert. Durch elektronenmikroskopische Single-Particle Analysen wurde überprüft, ob der A₁-Teil tatsächlich dissoziiert vom A₀-Teil vorlag. Ergänzend wurde die Stöchiometrie des gereinigten Subkomplexes mittels LILBID-Analysen bestimmt und versucht, die Struktur des Komplexes nach Kristallisation zu klären.

2.3.1. Reinigung des A₁ ATPase-Subkomplexes

Zellen von *I. hospitalis* wurden in Lyse-Puffer aufgenommen und mittels French Press aufgeschlossen (Kap. II 5.1), die Membranen wurden präpariert (Kap. II 6.1) und die Membranproteine mittels DDM solubilisiert (Kap II 8.1). Mit ca. 3850 mU/mg lag die spezifische Aktivität des Solubilisats fast bei dem Doppelten der Ausgangsaktivität (Tab. 2). Die ATP-Hydrolyseaktivität wurde durch DES (1 mM) vollständig gehemmt. Durch DCCD (0,75 mM) war eine maximale Hemmung um 60 % zu beobachten, so dass von einer funktionellen Kopplung der solubilisierten A₁A₀ ATP-Synthase ausgegangen wurde.

Vorversuche zeigten, dass die solubilierte ATP-Synthase nicht an Kationentauscher (HiTrap SP HP, HiTrap SP FF), aber an Anionentauscher (HiTrap Q HP, HiTrap Q XL, HiTrap DEAE FF) gebunden werden konnte. Die effektivste Bindung der ATP-Synthase wurde hierbei für den Anionenaustauscher HiTrap Q HP nachgewiesen. Für die Reinigung des dissoziierten A₁-Subkomplexes wurde das Solubilisat wie beschrieben vorbereitet (Kap. II 8.2) und die Säule langsam über Nacht beladen. Während der Chromatographie lag die Flussgeschwindigkeit konstant bei 0,75 ml/min. Die Elution wurde unter Verwendung von Puffern mit definierter Leitfähigkeit durchgeführt, da dies eine höhere Reproduzierbarkeit erlaubte als eine computergesteuerte

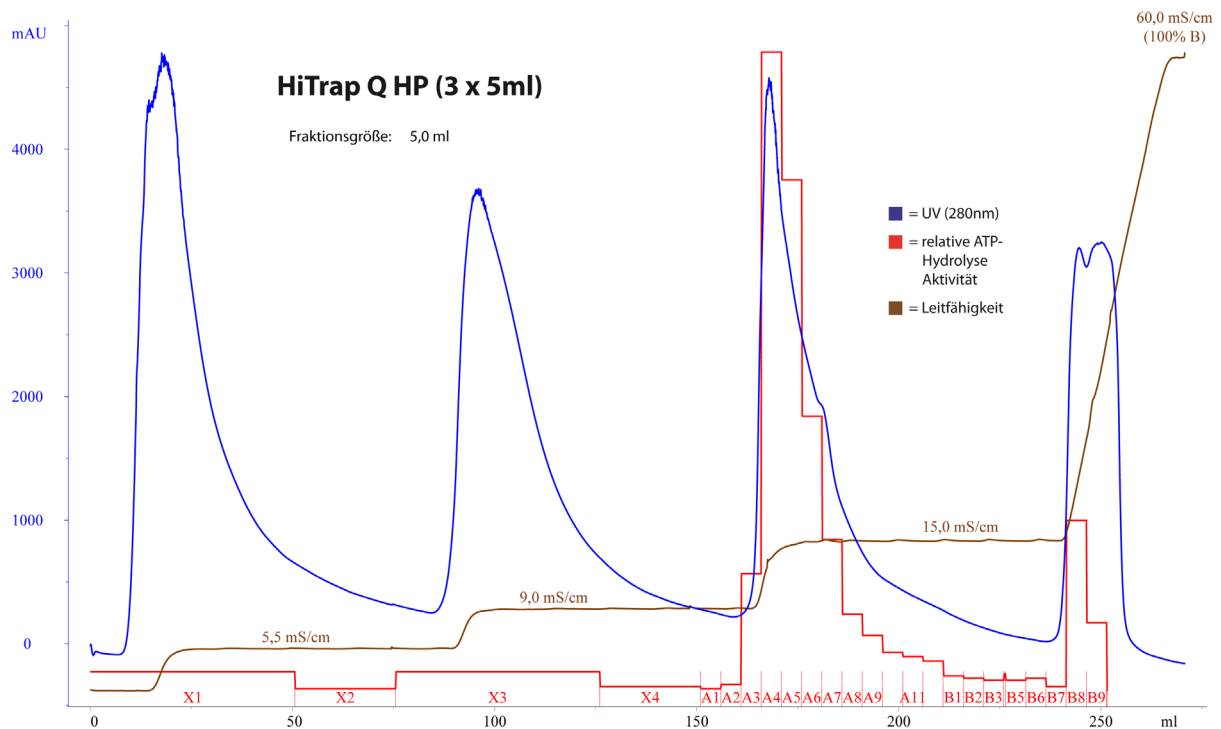


Abb. 9: Chromatogramm der HiTrap Q HP Anionenaustauschchromatographie (3 Säulen in Serie). Angezeigt werden die gesammelten Fraktionen mit den entsprechenden Werten für gemessene Proteinmenge (blau), Leitfähigkeit (braun) und relative ATP-Hydrolyseaktivität (rot)

Regelung seitens des ÄKTA-Systems. Im Gegensatz zu einem linearen Gradienten wurde durch die Stufenelution eine quantitative Trennung von H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase und A_1 -Teil erreicht. Fraktionen mit angereicherter H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase dienen unserem Kollaborationspartner Dr. Arnulf Kletzin als Ausgangsmaterial für Charakterisierungsstudien. Hydrogenase In-Gel-Assays belegten die exklusive Anwesenheit der H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase im Eluat der ersten beiden Elutionsstufen (5,5 und 9,0 mS/cm). Im Eluat der dritten Stufe (15 mS/cm) wurde dagegen ATP-Hydrolyse gemessen. Insgesamt konnten in den entsprechenden Fraktionen 90 % der detektierbaren ATP-Hydrolyseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 9, Fraktionen A3-A9). Allerdings deuteten die korrespondierenden Hemmstoffversuche auf eine Dissoziation der Subkomplexe während der Chromatographie hin, da nach Behandlung mit DCCD (1mM) nur noch eine maximale Hemmung um 10 % gemessen wurde. Durch DES (1 mM) war weiterhin eine vollständige Inhibierung der Aktivität zu beobachten. Ein zweites Aktivitätsmaximum wurde im Eluat der finalen Stoßelution detektiert (Abb. 9, Fraktionen B8, B9). Da diese Aktivität aber weder durch DES noch durch DCCD inhibiert werden konnte, wurde die Aktivität auf andere ATP-hydrolysierende Enzyme zurückgeführt. Die Fraktionen der höchsten Aktivität (Abb. 9, Fraktion A4 und A5) wurden vereint, konzentriert und in den nächsten Reinigungsschritt eingesetzt. Die spezifische Aktivität lag bei 14,7 U/mg.

Die Gelfiltration über eine Superose 6-Säule führte zu einer Anreicherung eines prominenten Komplexes, der im Nativ-Gel (CNE) bei einer apparenten molekularen Masse von 440 kDa detektiert wurde. In allen aktiven Fraktionen (Abb. 10 Fraktionen D1-E6) wurde ausschließlich bei dem

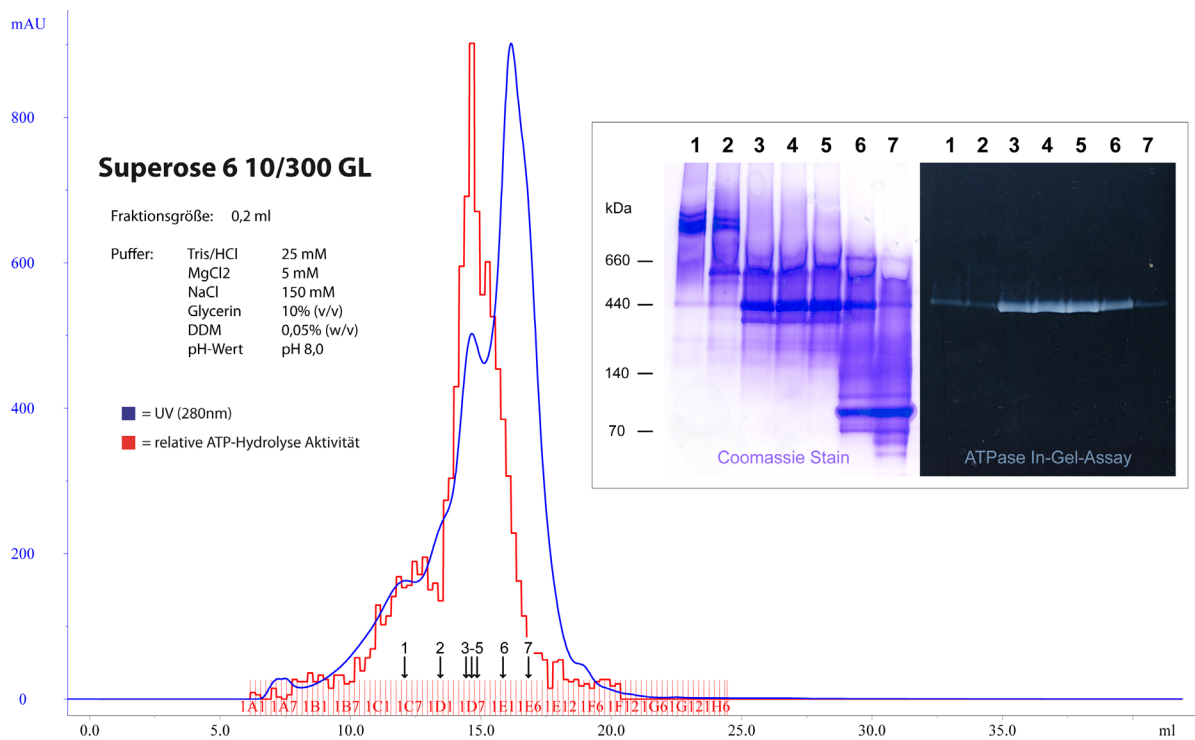


Abb. 10: Chromatogramm der Superose 6 Gelfiltration. Angezeigt werden die gesammelten Fraktionen mit den entsprechenden Werten für gemessene Proteinmenge (blau) und relative ATP-Hydrolyseaktivität (rot); Im Kasten: CNE der mit Pfeilen markierten Fraktionen (1-7,) und korrespondierender ATPase-In-Gel Assay; Bei der CNE wurden pro Spur 10 µl aufgetragen

440 kDa Komplex die Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse nachgewiesen (Abb. 10 Kasten). Vergleich man die Intensität der im Gel detektierten Aktivität in Spur 1, 2 und 7 mit der korrespondierenden Aktivität im Chromatogramm, hatte es den Anschein, dass die Aktivität von Spur 1 und 2 nicht exklusiv durch den 440 kDa Komplex hervorgerufen wurde. Die anfängliche Vermutung, dass ein Teil der Aktivität von verbliebenen gekoppelten ATP-Synthase-Komplexen stammte, wurde durch Hemmstofftests und biochemische Analysen nicht bestätigt. Wahrscheinlich wurde sie durch andere ATP-hydrolysierende Enzyme hervorgerufen, die nicht kompatibel mit dem In-Gel-Assay waren. Beispielsweise wurde das Thermosom, dessen ATP-Hydrolyseaktivität bisher nicht im In-Gel Assay detektiert werden konnte, in Spur 1 und 2 bei ca. 1000 kDa nachgewiesen und über MALDI-TOF MS/MS identifiziert. Die Fraktionen D6-D8 wurden vereint und in den nächsten Reinigungsschritt eingesetzt. Für diese vereinte Fraktion wurde eine spezifische Aktivität von 23 U/mg gemessen, was einer Anreicherung um den Faktor 10,7 im Vergleich zum Ausgangswert entspricht. Eine vollständige Hemmung durch DES (1 mM) war möglich, im Gegensatz dazu hatte DCCD (1 mM) keinen hemmenden Effekt.

Der Anreicherungseffekt der zweiten Anionenaustauschchromatographie über einer Mono Q Säule war eher gering (Abb. 11). Es wurde lediglich eine Steigerung von Faktor 10,7 auf Faktor 12,5 erreicht. Die detektierte Aktivität konnte nur durch DES (1 mM) inhibiert werden und war einzig auf den dominanten 440 kDa Komplex zurückzuführen (Abb.13D). Die Fraktionen D3 und D4 wurden in den nächsten Reinigungsschritt eingesetzt und hatten eine spezifische Aktivität von 27 U/mg.

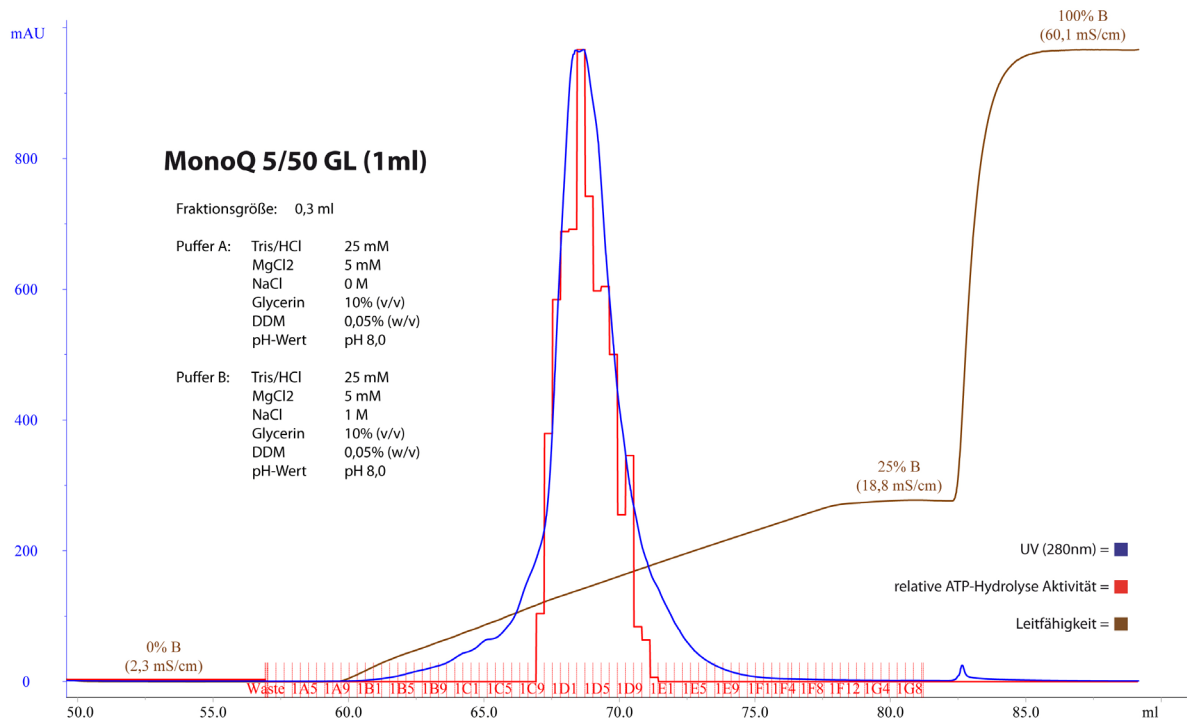


Abb. 11: Chromatogramm der Mono Q Anionenaustauschchromatographie. Angezeigt werden die gesammelten Fraktionen mit den entsprechenden Werten für gemessene Proteinmenge (blau), Leitfähigkeit (braun) und relative ATP-Hydrolyseaktivität (rot)

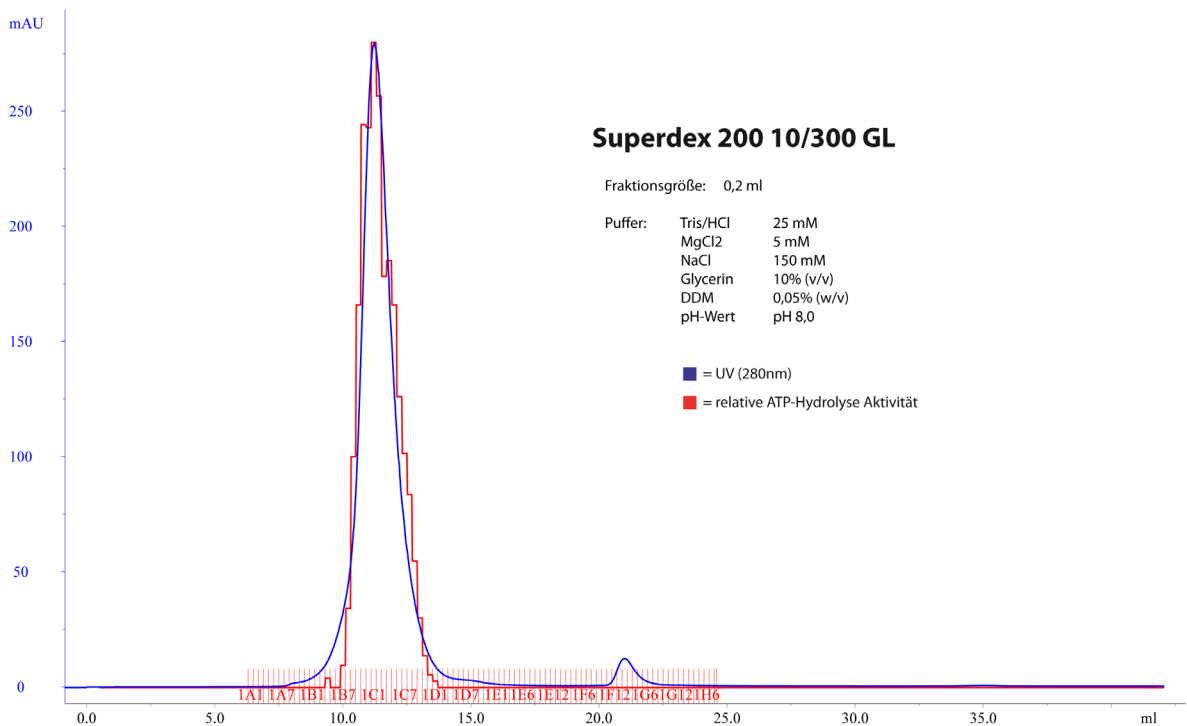


Abb. 12: Chromatogramm der Superdex 200 Gelfiltration. Angezeigt werden die gesammelten Fraktionen mit den entsprechenden Werten für gemessene Proteinmenge (blau) und relative ATP-Hydrolyseaktivität (rot)

Durch eine abschließende Gelfiltration über eine analytische Superdex 200-Säule konnten verbliebene Kontaminanten fast vollständig entfernt werden (Abb. 12). Nur eine geringe Verunreinigung bei einer molekularen Masse kleiner 440 kDa war zu detektieren. Versuche, die Verunreinigung über eine 2D-Native/SDS-PAGE bzw. MALDI-TOF MS/MS zu identifizieren, blieben erfolglos. Es bleibt offen, ob es sich bei der Bande tatsächlich um eine Verunreinigung oder ein Abbauprodukt des 440 kDa Komplexes handelt.

Insgesamt konnte durch dieses Reinigungsprotokoll der A_1 -Subkomplex hoch angereichert werden, wobei die spezifische Aktivität um das knapp 19-fache von 2,1 U/mg auf 40,3 U/mg angereichert wurde (Tab. 2). Die Aktivität des Komplexes wurde vollständig durch die Behandlung mit DES (1 mM) gehemmt, allerdings nicht durch DCCD. Der Reinigungsfortschritt der verschiedenen Schritte wird in Abbildung 13 gezeigt. Die Reinheit des angereicherten Komplexes war ausreichend, um einen ersten hochgeordneten Kristall zu erzeugen und einen spezifischen Antikörper gegen den A_1 -Teil zu generieren.

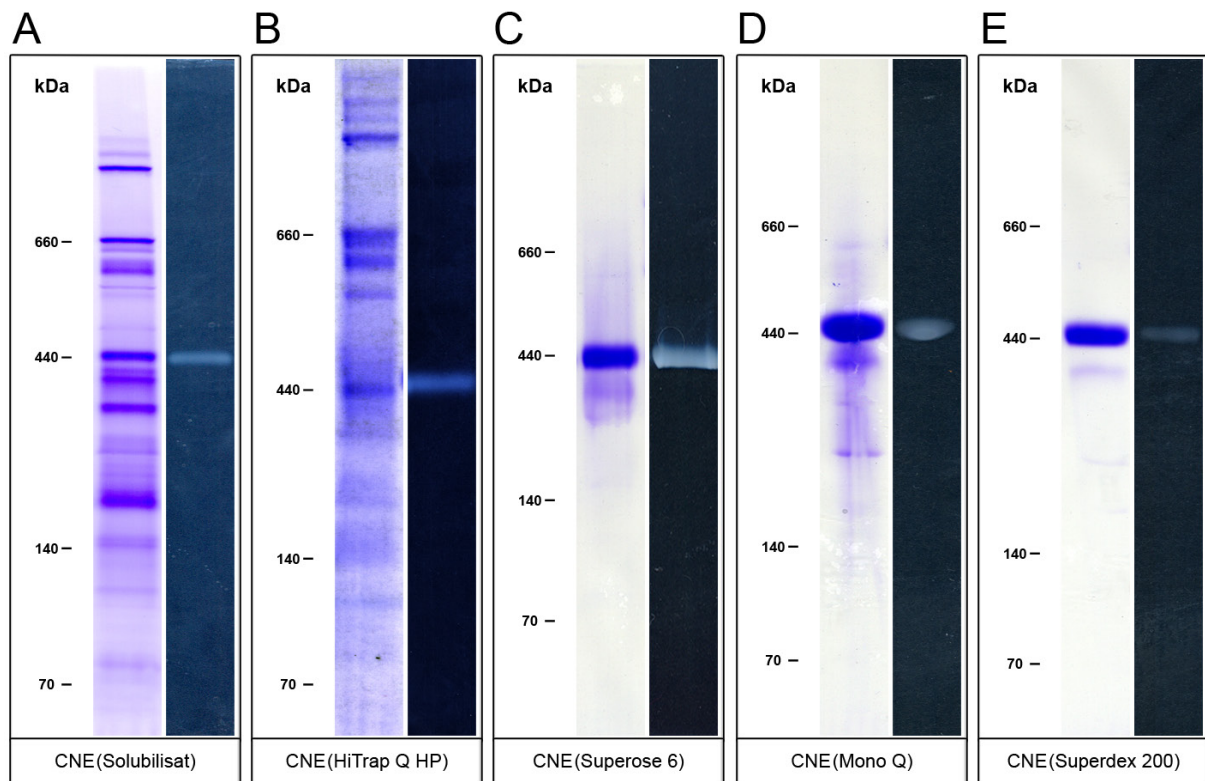


Abb. 13: Verlauf der Reinigung. CNE der maximal aktiven Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte. Die Nativ-Gele wurden jeweils mit Coomassie gefärbt (linke Spur) und die ATP-hydrolysierenden Enzyme mittels ATPase-In-Gel Assay detektiert (rechte Spur). A) Solubilisat B) HiTrap Q HP C) Superose 6 D) Mono Q E) Superdex 200

Tabelle 2: Reinigungstabelle

	Proteinmenge (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spezifische Aktivität (mU/mg)	Anreicherung (x-fach)	Ausbeute (%)
Membranen	356	762	2140	1	100
Solubilisat	156	601	3850	1,8	79
HiTrap Q HP	16	236	14770	6,9	31
Superose 6	8,3	190	22980	10,7	25
Mono Q	3,9	106	27060	12,5	14
Superdex 200	2,1	91	40320	18,8	12

2.2.2. Untereinheitenzusammensetzung des gereinigten A₁-Teils der ATP-Synthase

Im Weiteren sollte die Untereinheitenzusammensetzung des gereinigten A₁-Subkomplexes geklärt und die zugehörigen Untereinheiten identifiziert werden. Dazu wurde die maximal aktive Fraktion der Superdex 200 Gelfiltration direkt über SDS-PAGE analysiert, und der 440 kDa Komplex durch 2D-Native/SDS-PAGE auf die beteiligten Polypeptide hin untersucht.

In beiden Fällen wurden dominante Proteinbanden bei 67, ca. 50, 23 und 11 kDa detektiert und nach MALDI-TOF MS/MS als Untereinheiten A, B, E und F der ATP-Synthase identifiziert (Abb. 14A und B). Bei Western-Blot-Analysen wiesen die vier Untereinheiten spezifische Immunsignale bei der jeweils erwarteten molekularen Masse auf. Hierfür wurden der homologe Antikörper anti-A₁ und die heterologen Antikörper anti-atp A, anti-atp B, anti-atp E und anti-atp F (alle *M. jannaschii*) verwendet. Die molekularen Massen der identifizierten Untereinheiten korrespondierten alle mit den vorhergesagten Massen.

In der SDS-PAGE der maximal aktiven Fraktion der Superdex 200 Gelfiltration wurden im Vergleich zu der 2D-Native/SDS-PAGE des 440 kDa Komplexes drei zusätzliche dominante Banden bei ca. 40 kDa, 35 kDa und 27 kDa detektiert. Durch MALDI-TOF MS/MS wurde die Bande bei 35 kDa als Abbauprodukt der

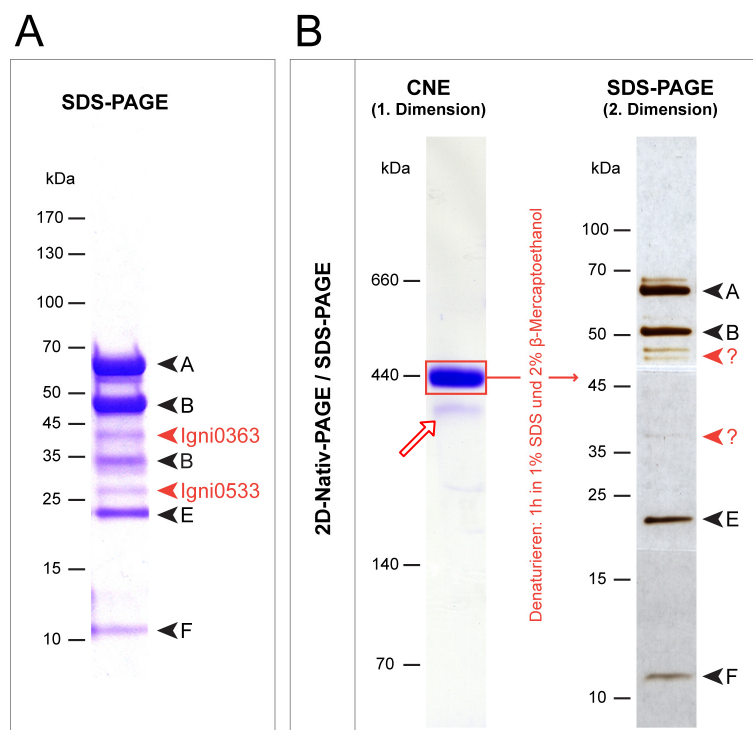


Abb. 14: Untereinheitenkomposition des gereinigten A₁-Teils. (A) SDS-PAGE der maximal aktiven Fraktion der Superdex 200 Gelfiltration; (B) 2D-Native/SDS-PAGE des 440 kDa Komplexes der maximal aktiven Fraktion; Die Identifizierung der angegebenen Untereinheiten erfolgte durch MALDI-TOF MS/MS und Western-Blot

Untereinheit B identifiziert, die 40 kDa Bande als Igri0363 und die 27 kDa Bande als Igri0533. Den beiden letzteren Proteinen konnte bioinformatisch keine mögliche Funktion zugeordnet werden. Da diese Proteine nicht Bestandteil des 440 kDa Komplexes waren, ist es möglich, dass sie Untereinheiten des zweiten, im Nativ-Gel detektierten Komplexes (Abb. 14B Pfeil) sind. Demzufolge kann dieser zweite Komplex kein Abbauprodukt des 440 kDa Komplexes sein. Insgesamt konnten für die Anreicherung 4 ATPase-Untereinheiten nachgewiesen werden, die einen funktionellen A_1 -Teil aufbauen und 2 hypothetische Proteine, die anscheinend Bestandteil des zweiten Komplexes waren. Die genaue Stöchiometrie des 440 kDa A_1 -Komplexes sollte im Weiteren noch bearbeitet werden.

2.2.3. LILBID Massenspektrometrie

Analysen mittels LILBID Massenspektrometrie (*Liquid Bead Laser Induced Ion Desorption*) sollten zusätzliche Informationen zur Untereinheitenzusammensetzung und vor allem Stöchiometrie des A_1 -Subkomplexes liefern. Die aufgezeichneten Massenspektren des ATPase-Komplexes von *I. hospitalis* wurden gegen bekannte Proteine kalibriert. Die molekularen Massen der Vergleichsproteine bewegten sich im gleichen Größenbereich wie die vorhergesagten Größen der Untereinheiten von *I. hospitalis*. Durch LILBID wurde die Masse des gereinigten Komplexes auf 390 kDa +/- 10 kDa und die Stöchiometrie auf A_3B_3EF bestimmt (Abb. 15). Die ermittelte molekulare Masse stimmte mit der theoretischen Masse für den A_3B_3EF -Komplex überein: $3 \times 67\text{kDa} + 3 \times 52\text{kDa} + 24\text{kDa} + 11\text{kDa} = 392\text{kDa}$. Bezüglich der Stöchiometrie war die Anzahl der E

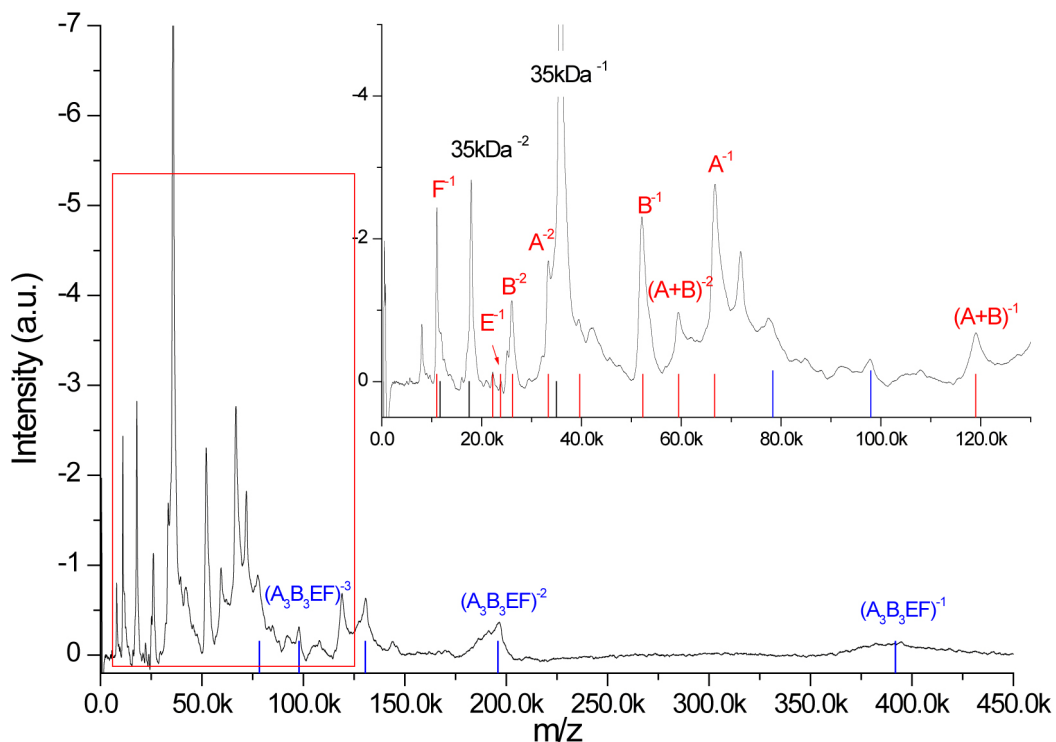


Abb. 15: LILBID-Spektrum des A_1 -Subkomplexes. Die Serie der gemessenen Komplexe ist durch blaue Balken gekennzeichnet, die der Untereinheiten und Subkomplexe durch rote Balken. Die jeweiligen Ladungszustände sind durch Hochzahlen angegeben.

Untereinheiten des Komplexes unerwartet, da analog zu der Stöchiometrie von *P. furiosus* zwei E Untereinheiten erwartet wurden. Die gezielte Variation der Testparameter (z.B. Erhöhung der Laserintensität) bestätigte aber, dass nur eine E Untereinheit im gereinigten Komplex vorhanden war. Es kann allerdings nicht gesagt werden, ob die ATP-Synthase von *I. hospitalis* eine zweite E-Untereinheit besitzt, die z.B. während der Reinigung verloren ging. Vergleicht man die ermittelte Masse von 390 kDa mit der durch Gelfiltration bestimmten Masse (250 kDa), zeigte sich, dass der Komplex in der Gelfiltration deutlich verzögert eluierte. Die Verzögerung könnte beispielsweise auf einer Interaktion des Komplexes mit der Säulenmatrix beruhen. Im Gegensatz zur Gelfiltration ließ sich der Komplex im Nativ-Gel nur bei einer Masse nachweisen (440 kDa), die größer als die tatsächliche war. Welche physikalischen oder chemischen Eigenschaften letztendlich zu dem jeweiligen Phänomen führen, ist derzeit nicht bekannt. Die Präparation der LILBID-Proben und die LILBID-Analysen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Brutschy (Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main) durchgeführt.

2.2.4. Elektronenmikroskopische Analysen

Durch elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalysen sollte überprüft werden, ob der A_1 -Teil quantitativ vom A_0 -Teil abdissoziiert war, oder ob auch noch gekoppelte Komplexe vorhanden waren. Die Analysen wurden stets unter Low-Dose Bedingungen durchgeführt. Zuvor wurde das gereinigte Protein auf 20-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt und mit Uranylacetat kontrastiert. Die Untersuchungen zeigten stets Partikel von homogener Form, die zum größten Teil nicht der „Knob-

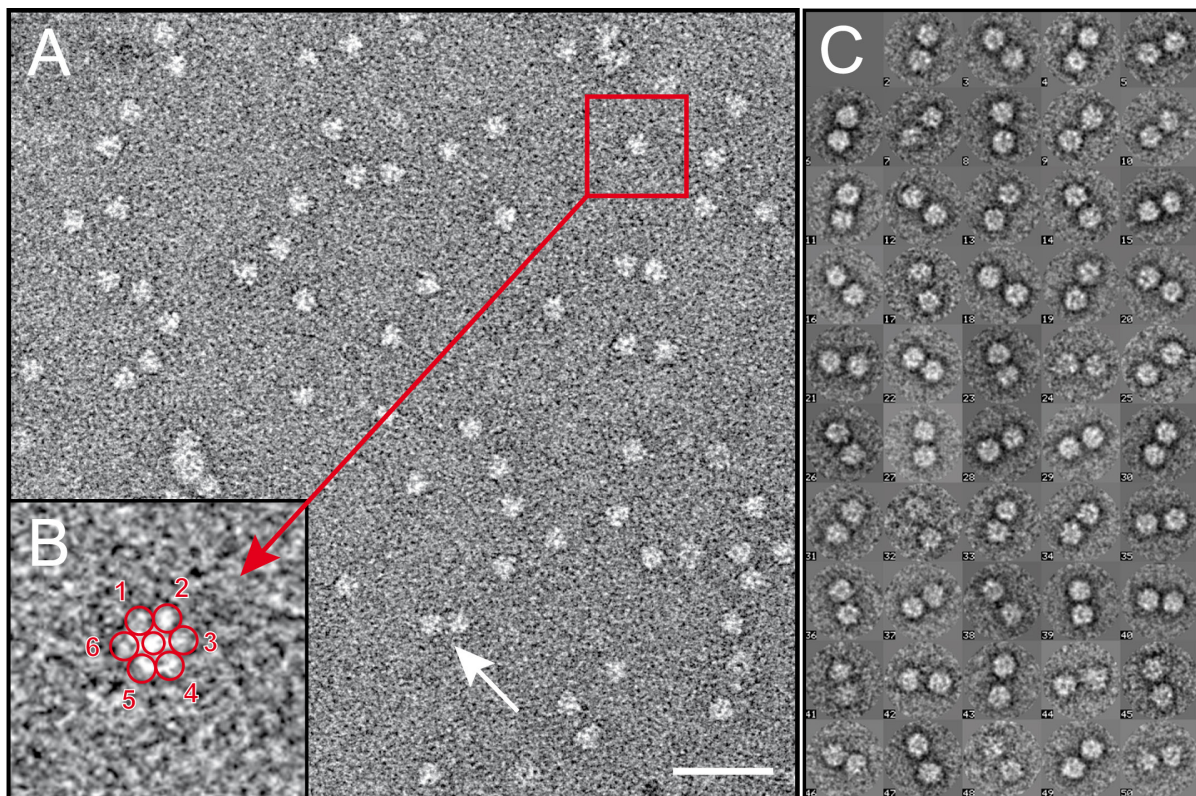


Abb. 16: Elektronenmikroskopische Single-Particle Analysen des A_1 -Subkomplexes. (A) Negativkontrastierung des gereinigten Komplexes mit Uranylacetat bei einer Proteinkonzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Maßstab = 50 nm; (B) Detailvergrößerung aus A, die die pseudo-hexagonale Anordnung des Komplexes erkennen läßt; (C) Versuchsreihe zur Analyse der „Doppelkomplexe“ (durchgeführt von Dr. Janet Vonck).

Stalk-Knob' Struktur des gekoppelten Komplexes entsprachen (Coskun *et al.*, 2004), sondern eine globuläre Form aufwiesen (Abb. 16A). Mit einem mittleren Durchmesser von ca. 10 nm entsprachen diese Partikel auch der erwarteten Größe des archaeellen Kopfteils einer A_1A_0 ATP-Synthase. Die EM Aufnahmen bestätigten somit den bereits vermuteten entkoppelten Zustand der ATP-Synthase. Zusätzlich war in vielen Partikeln die A_1 -typische Anordnung von sechs elektronendichten Bereichen (3 x A und 3 x B), die eine zentrale Kavität umschließen, zu erkennen (Abb. 16B). Vereinzelt waren dennoch Partikel zu detektieren, die der ‚Knob-Stalk-Knob‘ Struktur gekoppelter ATP-Synthase Komplexe ähnelten (Abb. 16A weißer Pfeil). Um sicher zu gehen, dass es sich hierbei nur um zufällig zusammen liegende A_1 -Komplexe handelt, wurden diese Partikel zusätzlich von Frau Dr. Janet Vonck analysiert (Abb. 16C). Es zeigte sich eindeutig, dass es sich hierbei nicht um gekoppelte Komplexe, sondern lediglich um A_1 -Subkomplexe handelte. Allein die einheitliche Größe aller globulären Strukturen deutete stark darauf hin, dass es sich bei den benachbart liegenden Partikeln um identische Subkomplexe handelte. Die Größe des A_0 -Subkomplexes hätte sich messbar von der Größe eines A_1 -Subkomplexes unterscheiden müssen. Des Weiteren war in keinem Fall die für Gesamtkomplexe typische Kragenstruktur oder ein peripherer Stiel zu erkennen (Lingl *et al.*, 2003).

2.2.5. Versuche zur Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des A_1 -Subkomplexes

Die Struktur des A_1 -Komplexes und die Details der Protein-Protein-Interaktion zwischen den Untereinheiten sollte mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Dazu wurde 1 mg des gereinigten nativen A_1 -Komplexes an Frau Dr. Guohong Peng vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt a. M. geschickt (Reinigung durchgeführt von Frau Lydia Kreuter). Im ersten Schritt sollten dort die optimalen Kristallisationsbedingungen ermittelt werden, um die Kristalle im zweiten Schritt einer Röntgenstrukturanalyse im Synchrotron zu unterziehen.

Alle Kristallisationsexperimente wurden im Nanolitermaßstab nach dem Sitting-Drop Verfahren bei 18° C durchgeführt. Mit Hilfe eines Kristallisationsroboters (Honeybee 963 Nano Drop Pipeting Robot, Zinsser Analytic, Frankfurt a. M.) wurde das Protein in insgesamt 110 verschiedene Kristallisationsansätze eingesetzt. Hierbei wurde das Reservoir, bestehend aus Fällungsmittel (PEG; Konzentration und Molekularmasse), Puffer (Puffersubstanz, Ionenstärke und pH-Wert) und Detergenz (Typ und Konzentration), in einem dreidimensionalen, automatisierten Screeningverfahren für alle Ansätze variiert. Im Vorfeld wurde das Protein auf 6 mg/ml eingestellt. Das Volumenverhältnis von Protein zu Reservoir lag in allen Kristallisationsansätzen konstant bei 1:1. Die Beugungsmuster der daraus hervorgehenden Proteinkristalle wurden anschließend freundlicherweise von Dr. Guohong Peng am Institut eigenen Strahlrohr (Beamline X10SA) des SLS-Synchrotrons aufgezeichnet.

Tabelle 3: Kristallisationsbedingungen

Proteinkristall	Bedingungen
A (MPI-Nr.: b128853-1)	18 % w/v PEG 6000, 0,1 M MES, 0,2 M KCl, pH 6,5
B (MPI-Nr.: b128853-2)	0,1 M Mg-Acetat, 0,1M Na-Citrat pH 5,8, 14% w/v PEG 5000 MME
C (MPI-Nr.: b128840-3)	20 % w/v PEG3350, 5 % w/v PGA-LM, 0,1 M Tris-HCl pH 7,8

Die bislang getesteten Kristallisationsbedingungen haben gezeigt, dass eine Kristallisation des Proteinkomplexes unter diversen Bedingungen erzielt werden kann (Abb. 17A-C). Eine für Strukturanalysen ausreichende Röntgenbeugung mit Reflexen von bis zu $2,8 \text{ \AA}$ (Abb. 17D) wurde bisher nur unter den Bedingungen von Kristall C (Tab. 3) erreicht. Allerdings war der Kristall zu klein, um einen kompletten Datensatz für eine erfolgreiche Strukturaufklärung zu sammeln. Gegenwärtig werden diese und weitere Bedingungen getestet, um größere Kristalle zu züchten und die Auflösung der Röntgenbeugung zu optimieren.

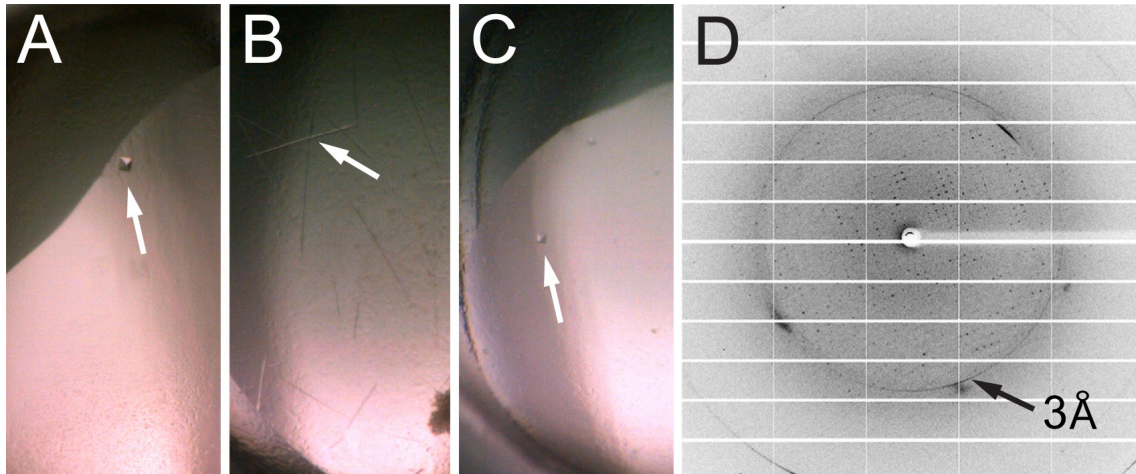


Abb. 17: Kristallisation und Strukturanalyse des gereinigten A_1 -Komplexes. (A-C) Kristalle nach Zucht entsprechend der Bedingungen aus Tabelle 3; (D) Röntgenbeugungsmuster des Kristalls aus C mit einer Auflösung von $2,8 \text{ \AA}$

2.3. Untersuchungen des A_1A_0 ATP-Synthase Gesamtkomplexes

2.3.1. Versuche zur Reinigung

Neben der Reinigung des A_1 -Komplexes sollte auch die gekoppelte A_1A_0 ATP-Synthase als Gesamtkomplex gereinigt werden. Die Problematik einer Dissoziation von A_1 und A_0 im Verlauf der getesteten Ionenaustauschchromatographien sollte dabei mittels alternativer Präparations- und Reinigungsstrategien umgangen werden.

2.3.1.1. Dichtegradientenzentrifugation mit Solubilisat

Es wurde versucht, die Komplexe des Solubilisats über einen Saccharosegradienten (analog Kap. II 6.2.2) aufzutrennen. Der Gradient wurde anschließend in $0,5 \text{ ml}$ Aliquots fraktioniert und diese auf Aktivität und Kopplungsstatus getestet. Der Anreicherungs-effekt war dabei sehr gering und lag nicht über einem Faktor von $2,5$. Zusätzlich war dieser Reinigungsschritt stets mit einem Verlust von 35 bis 50% der Gesamtaktivität verbunden. Es hatte den Anschein, dass durch diese Behandlung mehr gekoppelte Komplexe erhalten wurden als bei einer Ionenaustauschchromatographie, allerdings wurde eine DCCD vermittelte Hemmung größer 25% nicht erreicht.

2.3.1.2. Gelfiltration des Solubilisats

Um die ATP-Synthase nicht durch plötzliche Pufferwechsel oder Interaktionen mit der Säulenmatrix zu stark zu strapazieren, sollten die frisch solubilisierten Komplexe schonend mittels Gelfiltration aufgetrennt werden. Dazu wurde bereits der Zellaufschlusspuffer so gewählt, dass er sich kaum vom Gelfiltrationspuffer unterschied. Für die Versuche wurde bevorzugt eine HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR-Säule verwendet, da sich die analytischen und präparativen Superdex- wie auch Superose-Säulen nicht optimal für diesen Zweck eigneten. Gelfiltrationen mit Solubilisat führten bei den Superdex und Superose Säulen zu einer derart starken Verschmutzung, dass die Säulen erst nach extrem aufwendigen Waschprozeduren wieder gebrauchsfertig waren. Die Flussrate lag bei allen Versuchen mit der HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR-Säule bei 0,75 ml/min. Im Anschluss an die Elution wurden die gesammelten Fraktionen auf Aktivität getestet. Die gesamte detektierbare Aktivität teilte sich in allen Versuchen auf zwei Maxima auf. Das Erste lag bei ca. 120 ml, das Zweite bei ca. 145 ml (Abb.18A, B). Entsprechend einer Kalibrierung mit Vergleichsproteinen korrespondierten die beiden Aktivitätsmaxima mit einer molekularen Masse von ca. 500 kDa bzw. 220 kDa.

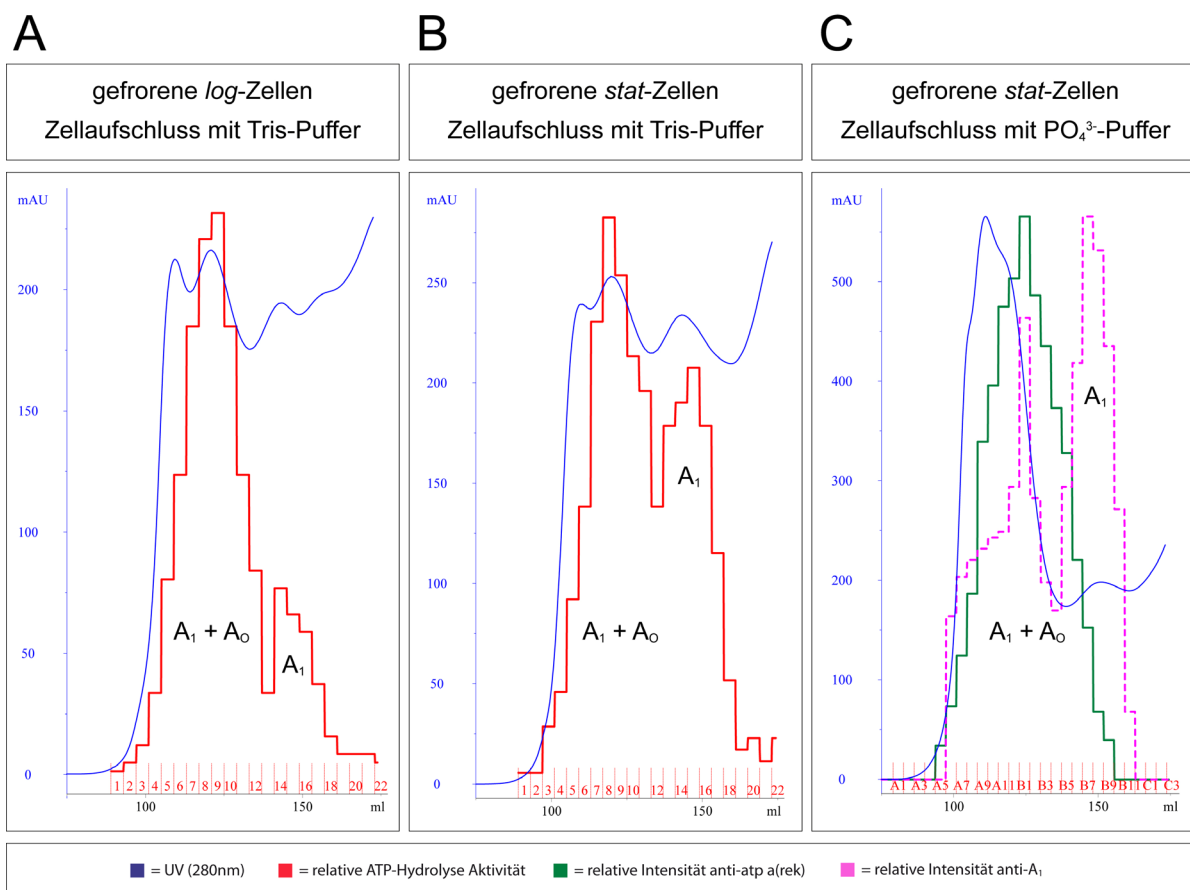


Abb. 18: Chromatogramm der Sephacryl S-300 HR Gelfiltration mit unterschiedlichen Zellen. Angezeigt werden die gesammelten Fraktionen mit den entsprechenden Werten für gemessene Proteinmenge (blau) und relative ATP-Hydrolyseaktivität (rot) bzw. der relativen Intensitäten der Immunreaktion mit anti-atp a(rek) (grün) oder anti-A₁ (violett)

Wiederholt fiel bei den durchgeführten Gelfiltrationen auf, dass bei Verwendung von logarithmischen Zellen die Aktivität der Proteine des ersten Peaks deutlich über der des zweiten lag (Abb. 18A). Im Gegensatz dazu war die Intensität beider Maxima bei Verwendung von stationären Zellen ausgeglichener (Abb. 18B). Es wurde vermutet, dass die im ersten Peak gemessene Aktivität von einer gekoppelten und die im zweiten Peak vom A_1 -Teil stammten. Dafür sprachen die elektrophoretisch ermittelten Massen der prominenten Komplexe von Peak 1 (660 kDa) und 2 (440 kDa) die den erwarteten Größen einer A_1A_0 ATP-Synthase und eines A_1 -Subkomplexes entsprachen (Abb. 20). Allerdings waren die elektrophoretisch ermittelten Massen (Abb. 20) im Vergleich zu den durch Gelfiltration (Abb. 18) ermittelten um durchschnittlich 150-200 kDa kleiner. Anscheinend interagierten die beteiligten Komplexe mit der Säulenmatrix derart, dass daraus eine verzögerte Elution resultierte.

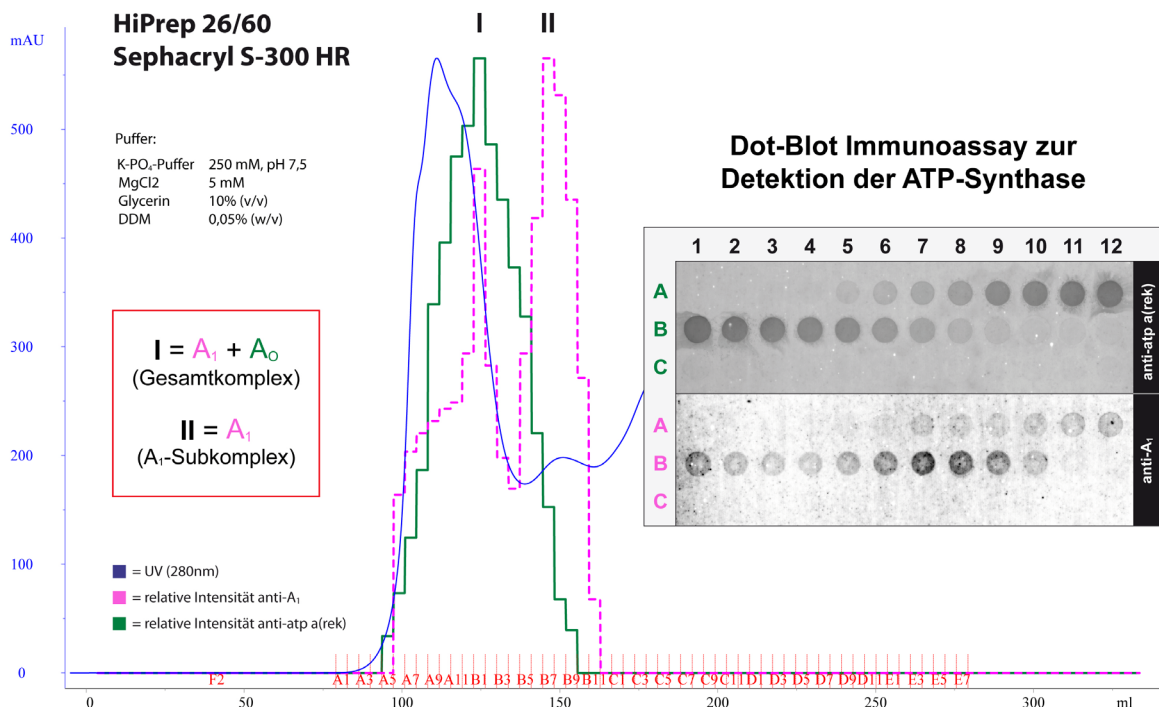


Abb. 19: Immundetektion von A_1 - und A_0 -Teil in den Fraktionen nach Gelfiltration über Sephacryl S-300 HR. Gezeigt wird das Chromatogramm analog zu Abb.15C mit zugehöriger Immundetektion der Untereinheit a (anti-atp a(rek)) und des A_1 -Teils (anti- A_1). Eine Quantifizierung der Intensitätswerte (Auswertung mit AIDA) erlaubte den Übertrag der Dot-Blot Ergebnisse in das Chromatogramm.

Dot-Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen den A_1 - (anti- A_1) wie auch A_0 -Teil (anti-atp a(rek)) bewiesen die Anwesenheit der entsprechenden Untereinheiten von A_1 und A_0 im ersten Peak. Im zweiten Peak konnten nur Untereinheiten des A_1 -Teils detektiert werden (Abb. 18C und 19). Inhibitorstudien mit DCCD führten zu einer Hemmung der Aktivität in Peak 1, aber nicht in Peak 2. Allerdings war nur eine Hemmung von maximal 25 % zu beobachten, was auf eine fortschreitende Dissoziation nach der Gelfiltration hindeutete.

Für Peak 1 wurde durch 2D-Native/SDS-PAGE Analysen und MALDI-TOF MS/MS die Anwesenheit aller annotierten Untereinheiten der A_1A_0 ATP-Synthase, ausgenommen der Untereinheit c(K), bestätigt (Röhl, 2010). Allerdings konnten die 8 Untereinheiten in keinem Fall gemeinsam in nur

einem der prominenten Komplexe nachgewiesen werden (Abb. 20). Die Untereinheiten a, C, D und H waren Bestandteil des 660 kDa Komplexes, während die Untereinheiten A, B, E und F nur im 440 kDa Komplex nachgewiesen wurden. Immunologische Studien mit anti- A_0 und anti-atp a(rek) belegten die Trennung von A_0 (660 kDa) und A_1 (440 kDa) nach hrCNE (Röhl, 2010). Eine ATP-Hydrolyseaktivität (Abb. 20, ATPase-In-Gel-Assay) wurde nur für die 440 kDa Komplexe beider Peaks gezeigt. Durch MALDI-TOF MS/MS Analysen wurde eine identische Untereinheitenzusammensetzung der beiden 440 kDa Komplexe aus A, B, E und F nachgewiesen. Alle Versuche einer weiterführenden Reinigung der ATP-hydrolysierenden Proteine aus Peak 1 führten nur zur Anreicherung des dissoziierten A_1 -Subkomplexes.

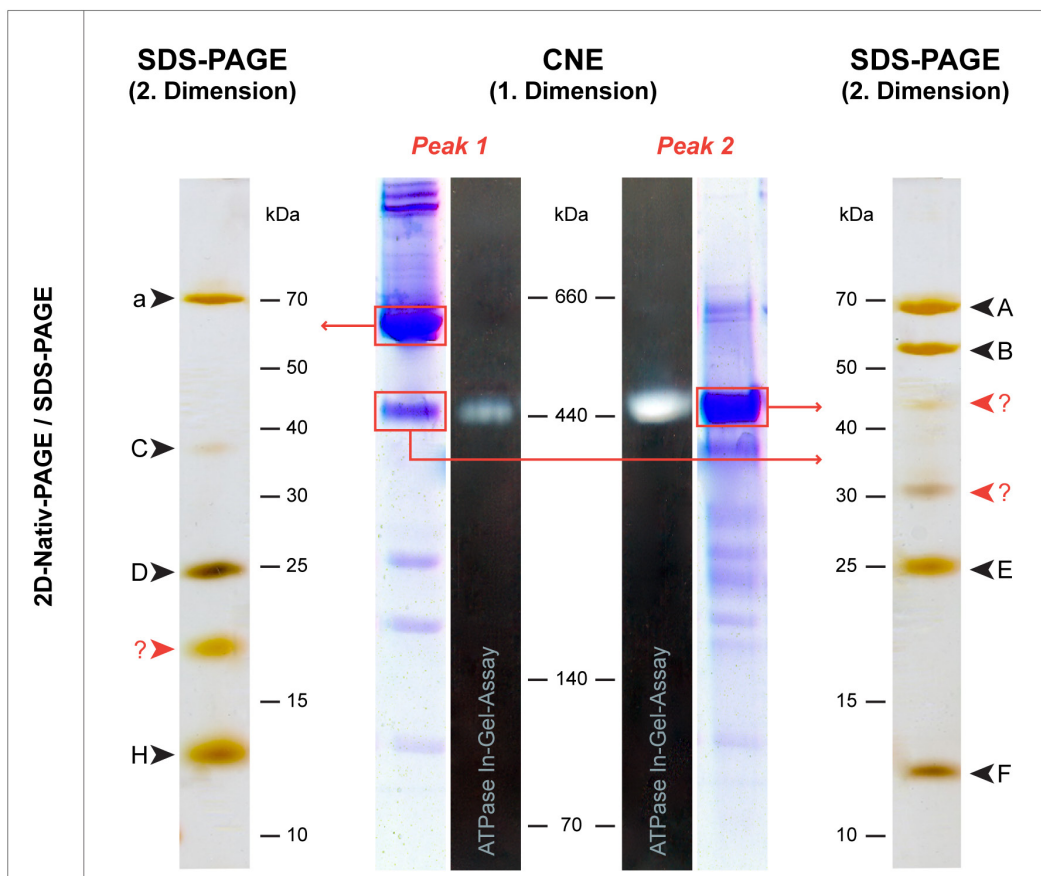


Abb. 20: Untereinheitenkomposition des 660 kDa Komplexes aus Peak 1 und des 440 kDa Komplexes aus Peak 1 und 2 der Gelfiltration aus Abb. 15B. 2D-Native/SDS-PAGE der entsprechenden Komplexe sowie zugehörige ATPase-In-Gel-Assays (1.Dimension für Peak 1 und 2 in der Mitte (hrCNE); 2.Dimension (SDS-PAGE) für den 660 kDa Komplex: links; 2.Dimension (SDS-PAGE) für die beiden 440 kDa Komplexe: rechts) Die Identifizierung der angegebenen Untereinheiten erfolgte durch MALDI-TOF MS/MS und Western-Blot

Insgesamt bewiesen die immunologischen, biochemischen und enzymatischen Versuche, dass in Peak 1 beide Subkomplexe einer A_1A_0 ATP-Synthase vorhanden waren. Hingegen wurde in Peak 2 nur der A_1 -Teil der ATP-Synthase nachgewiesen. Ob der Gesamtkomplex bereits nach der Gelfiltration in A_1 und A_0 dissoziiert war, oder ob dies durch die hrCNE herbeigeführt wurde, bleibt offen. Allerdings deuteten die Hemmstofftests mit DCCD daraufhin, dass wenigstens ein Teil der ATP-Synthase nach der Gelfiltration noch gekoppelt vorlag. Zusätzlich hatte es den Anschein, dass

der Anteil an gekoppelter ATP-Synthase im Vergleich zu dem des dissoziierten A_1 -Teils in logarithmischen Zellen von *I. hospitalis* größer war als in stationären Zellen.

2.3.1.3. Alternative Zellaufschlussmethoden

Es wurde überprüft, ob die Methode des Zellschlusses einen Effekt auf die Stabilität der ATP-Synthase hatte und gegebenenfalls zu einer Dissoziation der beiden Subkomplexe führte. Die Zellen wurden zum einen durch sehr harsche Methoden (FastPrep-Zellmühle, French Press, Ultraschall) oder zum anderen durch vermeintlich schonendere Methoden (Reiben mit Alcoa, Dismembrator-Schwingmühle) aufgeschlossen. Alternativ wurde noch eine Detergenz vermittelte Desintegration der Zellen getestet, um eine Schädigung des Enzyms durch das Einwirken mechanischer Kräfte auszuschließen. Die Stabilität, sprich die funktionelle Kopplung, der ATP-Synthase wurde durch Inhibitorstudien mit DCCD überprüft. Mit Ausnahme der Behandlung mit dem Dismembrator war für alle Methoden ein ähnlich effizienter Zellaufschluss zu verzeichnen. In allen Zellextrakten konnte ATP-Hydrolyseaktivität gemessen und durch DCCD inhibiert werden. Der Effekt der DCCD-Hemmung (1 mM) lag zwischen 40 % (FastPrep-Zellmühle) und 60 % (FrenchPress) (Hemmung: FastPrep < Alcoa < Ultraschall < Detergenz < FrenchPress). Folglich wurde angenommen, dass ein Großteil der ATP-Synthase-Komplexe noch funktionell gekoppelt vorlag. Ein Vorteil der Detergenzmethode gegenüber den mechanischen Methoden war nicht zu erkennen. Eine mögliche Dissoziation schien eher von der Wahl des Aufschlusspuffers abhängig (siehe Kap. III 2.3.1.2) zu sein als von der gewählten Aufschlussmethode.

Vergleichende Gelfiltrationen zeigten, dass nach einem Zellaufschluss im Kalium-Phosphatpuffer-System Komplexe mit einer großen molekularen Masse besser erhalten wurden als bei Verwendung des Tris-Puffer-Systems. Abbildung 18 zeigt die Chromatogramme von drei Gelfiltrationen, die unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden. In allen drei Fällen wurden die Membranproteine auf gleiche Art und Weise solubilisiert und identische Proteinmengen auf die Säule aufgetragen. Bei der Verwendung des Kalium-Phosphatpuffer-Systems war wiederholt zu beobachten (Abb. 18C), dass die gemessenen Proteinmengen ($UV_{280\text{ nm}}$) im oberen Molekularmassenbereich deutlich höher waren als bei den Gelfiltrationen mit Tris-Puffer-Systemen (Abb. 18A, B). Indirekt sprach diese Beobachtung für eine höhere Stabilität der Komplexe im Kalium-Phosphatpuffer-System. Ein Nachweis der ATP-Synthase war im Kalium-Phosphatpuffer-System nur über immunologische Analysen (Dot-Blot, Western-Blot) möglich, da das freie Phosphat im Puffer mit dem Nachweisreagenz des ATP-Hydrolysetests reagierte.

3. Subzelluläre Lokalisation der ATP-Synthase und H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase von *I. hospitalis*

Für *I. hospitalis* sollte geklärt werden, ob die ATP-Synthase (sekundäre Protonenpumpe), wie vermutet in der inneren Membran (Cytoplasmamembran) lokalisiert ist. Zusätzlich sollte auch die subzelluläre Lage der H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase, als primäre Protonenpumpe, ermittelt werden. Dazu wurden zum einen ganze Zellen für Immunfluoreszenzstudien und zum anderen

Ultradünnschnitte für Immuno-EM-Analysen mit den entsprechenden Antikörpern markiert und analysiert.

3.1. Verwendete Antikörper

3.1.1. Herkunft und Generierung der Antikörper

Versuche zur Immunlokalisation der ATP-Synthase wurden sowohl mit Antikörpern gegen die A_1 - wie auch die A_0 -Domäne des Enzyms durchgeführt. Dabei wurden homologe Antikörper (anti- A_1 , anti-atp a(rek) und anti-atp c(syn)) und heterologe Antikörper gegen ATP-Synthase-Untereinheiten aus *Methanocaldococcus jannaschii* (anti-atp A, anti-atp B und anti-atp a) verwendet. Für die Lokalisation der H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase von *I. hospitalis* wurde der heterologe Antikörper anti-SRed gegen die H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase von *P. abyssi* TAG11 verwendet (Dirmeier, 1998).

3.1.2. Spezifität der Antikörper gegen die ATP-Synthase

Die entsprechenden Antikörper wurden auf ihre Spezifität gegenüber den Untereinheiten der ATP-Synthase oder H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase von *I. hospitalis* getestet. Dazu wurden die Proteine von *I. hospitalis* mittels hrCNE oder SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Western-Blots nach nativer Gelelektrophorese (1° AK: anti- A_1 , anti-atp A, anti-atp B) zeigten durchwegs eine ATPase spezifische Immunreaktion bei 440 kDa, ohne detektierbare Kreuzreaktionen (Abb. 21B). Parallel wurden die entsprechenden hrCNE Gele mittels ATPase-In-Gel- Assay auf die Anwesenheit ATP-hydrolysierender Enzyme getestet. Immunreaktion und Aktivitätssignal wurden bei gleicher molekularer Masse nachgewiesen (Abb. 21A und B). Zusätzlich wurde der aktive Komplex in einer zweiten Dimension aufgetrennt und die korrespondierenden Untereinheiten mittels MALDI-TOF MS/MS wie auch Western-Blot identifiziert. Es bestätigte sich, dass die Detektion des nativen A_1 -Subkomplexes tatsächlich nur auf der spezifischen Bindung an die Untereinheiten A und B basierte. Anti-atp A reagierte nur mit der Untereinheit A (Abb. 21F). Dazu reagierte auch anti-atp B vorwiegend mit A und nur schwach mit B (Abb. 21G). Anti- A_1 band gleichermaßen an A und B (Abb. 21C). Eine spezifische Immunreaktion mit einem Komplex einer apparenten molekularen Masse von 660 kDa war mit anti-atp a(rek) detektierbar (Röhl, 2010). Durch Western-Blots nach SDS-PAGE konnte die Immunreaktion auf die Bindung des Antikörpers an ein einziges Protein mit einer Masse von 70 kDa zurückgeführt werden (Abb. 21E). Dieses wurde über MALDI-TOF MS/MS als Untereinheit a(l) (Igni0609) identifiziert. Für den membranständigen Antikörper anti-atp a (*M. jannaschii*) konnte mittels Western-Blot keine Immunreaktion mit Proteinen von *I. hospitalis* nachgewiesen werden.

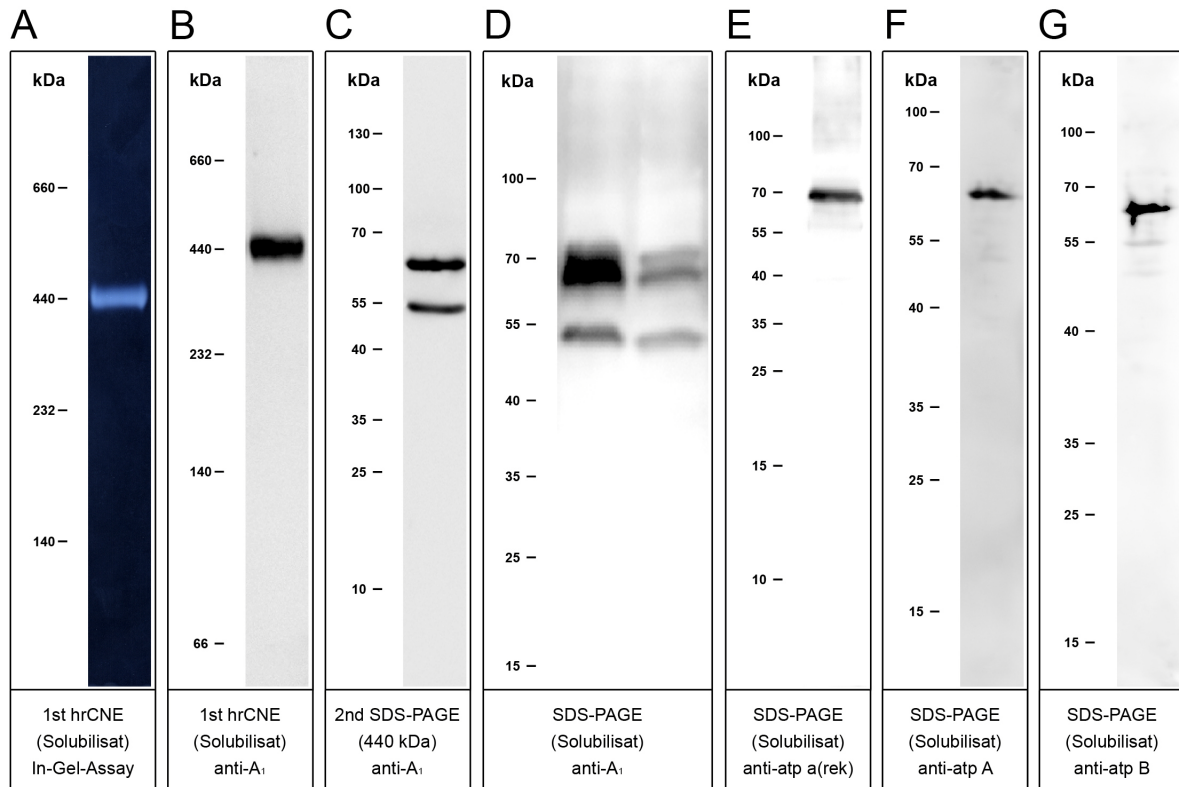


Abb. 21: Spezifität der Antikörper gegenüber der ATP-Synthase von *I. hospitalis*. (A) ATPase-In-Gel-Assay als Referenz für den aktiven Komplex in hrCNE Gelen; (B/C) Western-Blot (WB) nach 2D-hrCNE/SDS-PAGE mit anti-A₁ (1:5000); (D) WB mit anti-A₁ (1:5000); (E) WB mit anti-atp a(rek) (1:10000); (F) WB mit anti-atp A (*M. jannaschii*, 1:1000); (G) WB mit anti-atp B (*M. jannaschii*, 1:1000); 2° Antikörper (B-G) goat anti-rabbit IgG + HR Peroxidase (1:2500)

3.1.3. Spezifität des Antikörpers gegen die H₂:Schwefel-Oxidoreduktase

Der anti-SRed Antikörper zeigte bei Western-Blots nichtdenaturierter Proteine des Solubilisats von *I. hospitalis* genau eine positive Immunreaktion. Das Signal korrespondierte mit der im hrCNE-Gel nachweisbaren Hydrogenaseaktivität bei einer apparenten molekularen Masse von 440 kDa (Abb. 22A und B). Daher musste im Folgenden ausgeschlossen werden, dass der anti-SRed Antikörper mit dem A₁-Teil der ATP-Synthase kreuzreagierte, der bei einer vergleichbaren molekularen Masse zu detektieren war. Dazu wurde ein Western-Blot mit dem gereinigten A₁-Subkomplex und anti-SRed durchgeführt. Das Ausbleiben einer Immunreaktion im Kontrollexperiment sprach für die Spezifität des Antikörpers gegenüber der H₂:Schwefel-Oxidoreduktase und eine Kreuzreaktion mit dem A₁-Teil der ATP-Synthase wurde ausgeschlossen. Western-Blot-Analysen des Solubilisats nach SDS-PAGE zeigten für den Antikörper anti-SRed fünf schwache Immunreaktionen bei ca. 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa und 25 kDa (Abb. 22C). Drei dieser molekularen Massen entsprechen in etwa den erwarteten Massen der kleinen und großen Hydrogenase Untereinheiten (Igni1366, 44 kDa bzw. Igni1367, 74 kDa) wie auch des zugehörigen Eisen-Schwefel-Bindeproteins (Igni1369, 54 kDa). Im Rahmen dieser Arbeit war eine exakte Zuordnung der Proteine mittels MALDI-TOF MS/MS nicht möglich. Über die an der Immunreaktion beteiligten Untereinheiten des 440 kDa Komplexes mit anti-SRed kann derzeit nur spekuliert werden, dennoch spricht die Summe der Ergebnisse und Kontrollen für die Spezifität von anti-SRed gegenüber der H₂:Schwefel-Oxidoreduktase.

3.2. Lokalisation der ATP-Synthase

3.2.1. Immunfluoreszenzstudien

3.2.1.1. Klassische Fluoreszenzmikroskopie

Das endgültige Protokoll für die Immunmarkierung an ganzen Zellen von *I. hospitalis* entstand durch die Kombination der etablierten Protokolle für Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung ganzer Zellen (FISH; Hohn, 2003) und Immunmarkierung von Ultradünnschnitten (Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008). Eine erfolgreiche Markierung der ATP-Synthase wurde nur mit fixierten Zellen erreicht. Am besten eignete sich für die Fixierung von *I. hospitalis* Formaldehyd. Die 30 %ige Formaldehydfixierlösung wurde stets frisch hergestellt. Dazu wurde Paraformaldehyd in PBS gelöst, auf 60° C erhitzt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und mit NaOH versetzt (Fixierlösung für FISH; Küper, 2007). Das Fixieren der Zellen nach Vorschriften aus der klassischen Histologie, beispielsweise mit Bouin`s oder Hartman`s Fixierlösung (<http://www.protocol-online.org/prot/Histology/Fixation>), blieb ohne Erfolg und führte sogar zur Lyse der Zellen. Entscheidend für eine aussagekräftige Immunfluoreszenz war auch die Konzentration des zugegebenen Detergenz Tween-20. Starke Fluoreszenzsignale konnten bei einer Tween-20 Konzentration von 0,02 % (w/v) beobachtet werden. Ab einer Tween-20 Konzentration von 0,04 % bis 0,05 % setzte bereits eine merkliche Veränderung der Morphologie von *I. hospitalis* ein. Im Vergleich zu unbehandelten *I. hospitalis*-Zellen erschienen diese Zellen vergrößert und transparenter. Die weitere Erhöhung der Tween-20-Konzentration führte zur Lyse der Zellen.

Überraschenderweise, konnten die detektierten Fluoreszenzsignale nur der äußeren und nicht wie erwartet der inneren Membran von *I. hospitalis* zugeordnet werden. Die Beurteilung der Lage der Immunsignale basierte auf der Überlagerung von Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen einer Zelle. Die Zelle wurde unter Verwendung aller benötigten Filter dokumentiert und die Einzelaufnahmen nachträglich mit Hilfe von ImageJ überlagert. Alle Immunsignale waren exakt an den Positionen lokalisiert, die im Phasenkontrast dem äußersten Rand der Zelle, und somit der äußeren Membran entsprachen. Das Verteilungsmuster des Enzyms in der äußeren Membran war nicht homogen, sondern deutete eher auf eine Clusterbildung hin. Desweiteren ließen die Überlagerungen von DAPI und Immunsignal meist einen nicht markierten Spalt erkennen (Abb. 23D, H, L). Ein markierungsfreier Bereich der Zelle war auch deutlich auf den Überlagerungen von Phasenkontrast und DAPI zu beobachten (Abb. 23B, F, J). Dadurch wurde die Vermutung bekräftigt, dass die DNA nur im Cytoplasma lokalisiert ist. Insgesamt führten die Beobachtungen zu folgender Interpretation der subzellulären Organisation von *I. hospitalis*: bei dem durch DAPI gefärbten Bereich handelt es sich um das Cytoplasma der Zelle; bei dem fluoreszenzfreien Spalt handelt es sich um das Intermembran-Kompartiment (IMC). Die äußere Membran entsprach dem Bereich, der nach Immunmarkierung als ein aus Fluoreszenzsignalen bestehender Ring zu erkennen war und die beiden vorhergenannten Bereiche umschloss. Da an der Grenze zwischen Cytoplasma und IMC mit dieser Methode keine Fluoreszenzsignale detektiert wurden, war die Folgerung: die ATP-Synthase von *I. hospitalis* ist exklusive in der äußeren Membran lokalisiert.

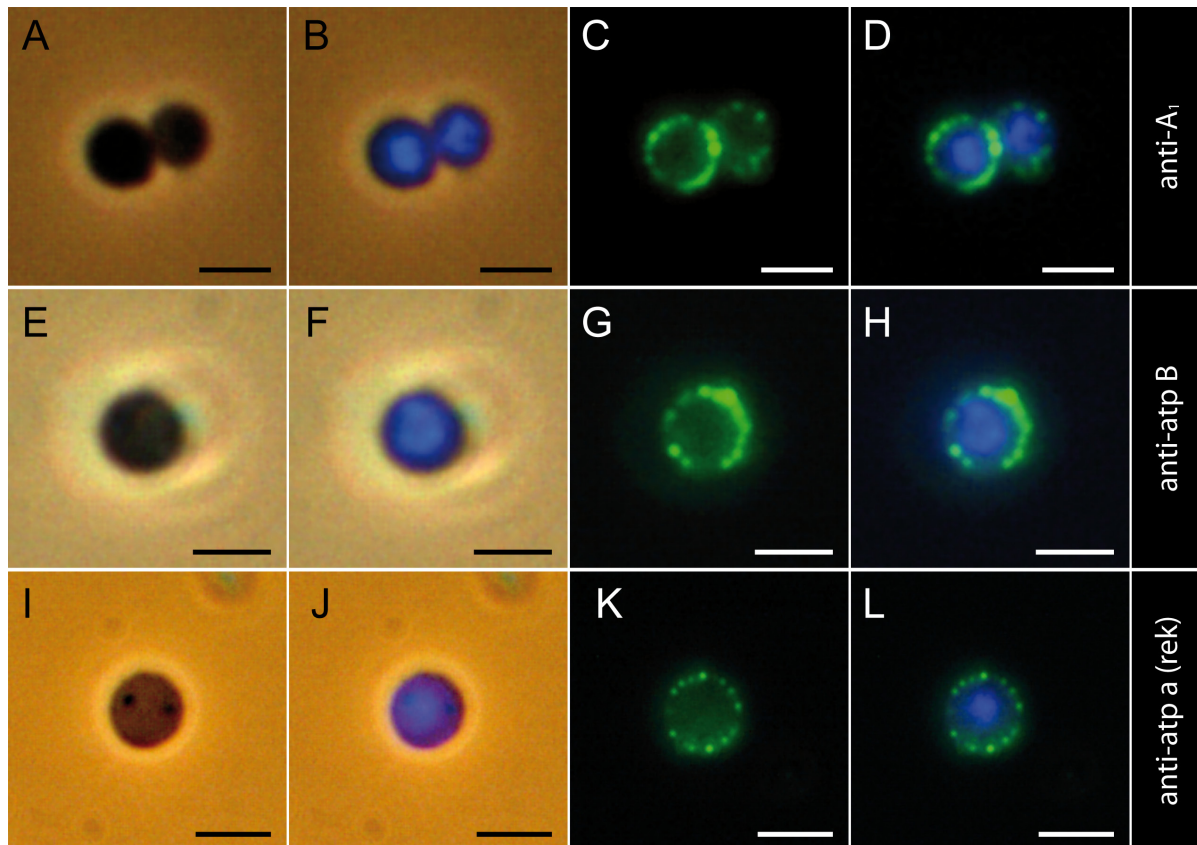


Abb. 23: Lokalisation der A_1A_0 ATP-Synthase von *I. hospitalis* mittels Immunfluoreszenz. (A-D) anti- A_1 (1:500); (E-H) anti-atp B (1:500); (I-L) anti-atp a(rek) (1:500); 2° Antikörper: goat anti-rabbit IgG + AlexaFluor 488 (1:500); (A, E, I) Phasenkontrast (PK); (B, F, J) PK + DAPI; (C, G, K) Immunsignal; (D, H, L) Immunsignal + DAPI; Maßstab je 2 μ m

Um auszuschließen, dass es sich bei den Ergebnissen nur um ein Artefakt des verwendeten Antikörpers anti- A_1 handelte, wurden weitere Markierungen mit verschiedenen ATP-Synthase spezifischen Antikörpern durchgeführt. Unabhängig vom verwendeten Antikörper wurde die ATP-Synthase exklusiv nur in der äußeren Membran lokalisiert. Die verwendeten Antikörper waren sowohl gegen den A_1 -Teil (anti- A_1 , anti-atp B) als auch gegen den A_0 -Teil (anti-atp a(rek), anti-atp a) des Komplexes gerichtet. Bei der Markierung war kein Unterschied zwischen homologen oder heterologen Antikörpern zu erkennen. Als zusätzliche Kontrollen wurde das Markierungsprotokoll mit Präimmenserum von anti- A_1 und anti-atp a(rek), wie auch mit dem jeweiligen 2° Antikörper ohne 1° Antikörper durchgeführt. In allen Kontrollexperimenten konnte keine Immunreaktion detektiert werden.

Durch elektronenmikroskopische Studien von Ultradünnschnitten war bekannt, dass sich bei der Zellteilung von *I. hospitalis* zuerst das Cytoplasma innerhalb der gemeinsamen äußeren Membran teilt, bevor sich die beiden Tochterzellen endgültig trennen (Abb. 24A, Junglas *et al.*, 2008). Lichtmikroskopisch kann dieser zelluläre Status gut bei Zellen der log-Phase beobachtet werden. Immunfluoreszenzexperimente an sich teilenden Zellen zeigten, dass die ATP-Synthase auch während der Teilung augenscheinlich nur in der gemeinsamen äußeren Membran lokalisiert ist (Abb. 24B). Die räumliche Trennung von Cytoplasma und äußerer Membran war in diesen Fällen meist sogar noch deutlicher zu erkennen.

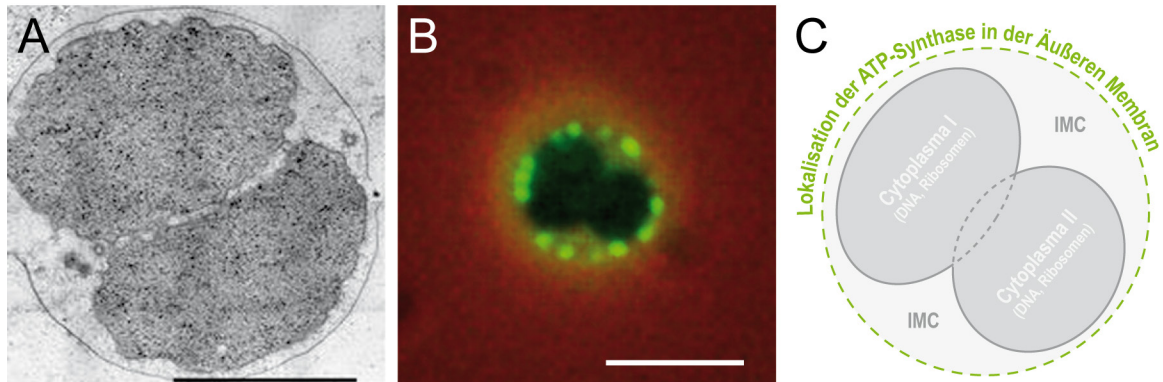


Abb. 24: Zellarchitektur von *I. hospitalis* während der Zellteilung. (A) Ultradünnschnitt einer in Teilung befindlichen *I. hospitalis* Zelle, Maßstab: 1 μm (Junglas *et al.*, 2008); (B) Lokalisation der ATP-Synthase an einer sich teilenden Zelle (1°AK: anti-A₁, 1:500; 2°AK: goat anti-rabbit IgG + AlexaFluor 488, 1:500), Maßstab: 2 μm ; (C) Schematische Darstellung der Zelle aus B

3.2.1.2. Konfokale Laserscan Mikroskopie (CLSM)

Um eine höhere Auflösung der Fluoreszenzsignale zu bekommen, wurden zusätzlich Detailanalysen der immunmarkierten Zellen mit Hilfe des konfokalen Laserscanmikroskops (CLSM) durchgeführt. Unter Anleitung von Dr. Guido Grossmann (Lehrstuhl für Zellbiologie & Pflanzenbiochemie, Regensburg) und Herrn Uwe de Vries (Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie, Regensburg) wurden Serien aufeinander folgender Fokusebenen (z-Stack) erstellt (Abb. 25). Die einzelnen Ebenen eines z-Stacks gaben Aufschluss über die subzelluläre Verteilung der ATP-Synthase innerhalb einer Ebene, ohne störendes Hintergrundrauschen von Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene. Bei der in Abbildung 26 gezeigten Serie wurden die Immunsignale mehrerer Zellen in einem regelmäßigen Abstand von ca. 0,34 μm dokumentiert. Es war stets nur eine Markierung

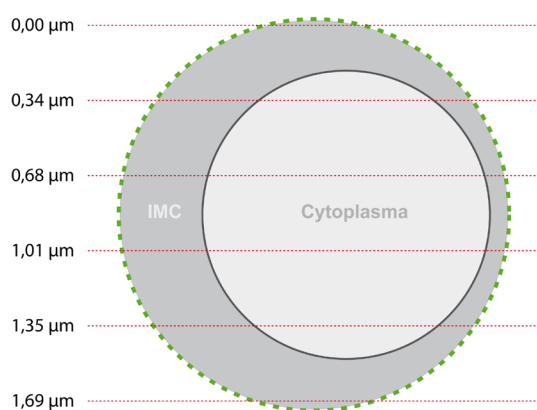


Abb. 25: Schematische Darstellung einer durchschnittlichen *I. hospitalis*-Zelle mit den Fokusebenen eines am CLSM erstellten z-Stacks

der äußeren Membran zu detektieren, die bevorzugt in Clustern lagen. Eine ununterbrochene Markierung der äußeren Membran innerhalb einer Fokusebene wurde bisher nicht beobachtet. Das alternierende Muster von markierten und nicht markierten Bereichen deutete auf eine inhomogene Verteilung der ATP-Synthase in der äußeren Membran hin. Zur Veranschaulichung der Gesamtverteilung der ATP-Synthase in der Membran von *I. hospitalis* wurden alle Fokusebenen überlagert und auf eine Ebene projiziert. Dadurch war eine vorläufige Vorstellung der Verteilung der ATP-Synthase in der äußeren Membran möglich.

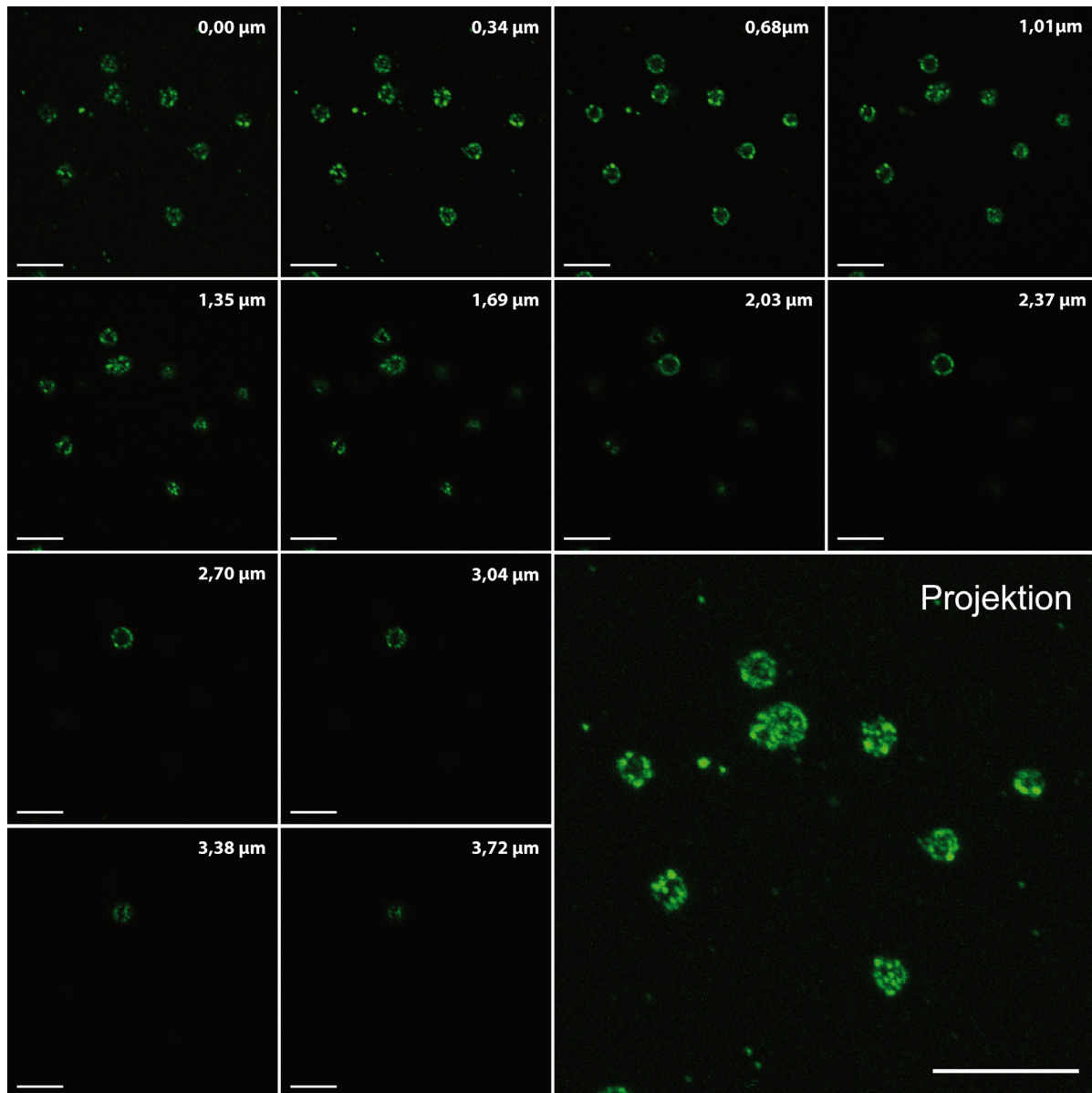


Abb. 26: Detektion der ATP-Synthase an den einzelnen Ebenen eines z-Stacks. Die Serie wurde mit einem regelmäßigen Abstand von ca. $0,34\ \mu\text{m}$ im CLSM hergestellt. Die Anregung erfolgte mit der $488\ \text{nm}$ Linie des Argon-Lasers, Maßstab = $7,5\ \mu\text{m}$. Bei der Projektion wurden alle Signale der einzelnen Fokusebenen auf eine Ebene projiziert, Maßstab = $10\ \mu\text{m}$; 1°AK: anti-A₁, 1:500; 2°AK: goat anti-rabbit IgG + AlexaFluor 488, 1:500

3.2.2. EM-Immunlokalisation an Ultradünnschnitten

Die Lokalisation der ATP-Synthase wurde parallel zu den Immunfluoreszenzstudien auch durch elektronenmikroskopische Analysen immunmarkierter Ultradünnschnitte von *I. hospitalis* untersucht. In enger Zusammenarbeit wurden die zugehörigen Experimente freundlicherweise von Cordula Neuner, Thomas Heimerl, Jennifer Flechler und Carolin Meyer aus der Arbeitsgruppe von Dr. Reinhard Rachel (Zentrum für Elektronenmikroskopie, Regensburg) angeleitet und durchgeführt. Die Kultivierung von *I. hospitalis* in Cellulosekapillaren (Rieger *et al.*, 1997), kombiniert mit schonender Kryopräparation, ermöglichte es, Ultradünnschnitte zu erhalten, die die native Struktur der Zellen in ihrer ganzen Komplexität bestmöglich wiedergeben (Junglas, 2006; Wasserburger, 2008; Heimerl, 2009).

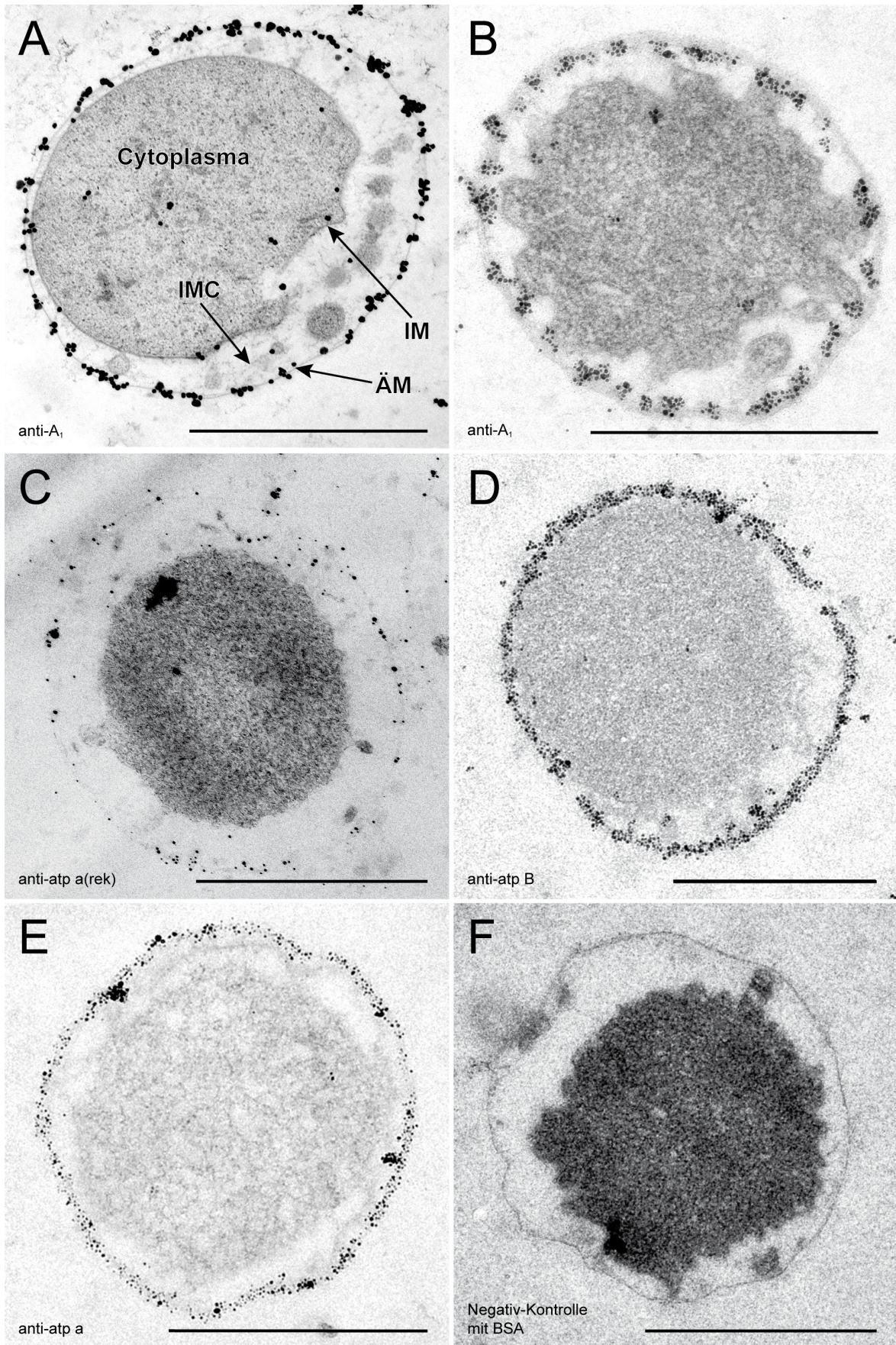


Abb. 27: Immunlokalisation der ATP-Synthase an Ultradünnschnitten von *I. hospitalis*. (A-C) homologe Antikörper gegen A₁- und A₀-Teil der ATP-Synthase; (D-E) heterologe Antikörper (*M. jannaschii*) gegen A₁ und A₀-Teil; (F) Negativ Kontrolle, Inkubation mit BSA an Stelle des 1° AK; Alle 1° AK wurden 1:200 und der 2° AK (goat anti-rabbit IgG + ultrasmall Gold) 1:20 eingesetzt; Maßstab je 1 µm; IMC=Intermembran Kompartiment, IM= Innere Membran, ÄM= äußere Membran.

Die Immunmarkierung der Ultradünnschnitte erlaubte eine exakte subzelluläre Lokalisation der ATP-Synthase und diente gleichzeitig als Referenz für die Ergebnisse der Immunfluoreszenzstudien. Für die Immunlokalisation an diesen Schnitten wurden sowohl homologe Antikörper (anti-A₁, anti-atp a(rek)) als auch heterologe Antikörper gegen Untereinheiten euryarchaeeller ATPasen (anti-atp B, anti-atp a von *Methanocaldococcus jannaschii*) verwendet. Dabei ergab sich einheitlich für alle Immunmarkierungen, dass der katalytische Teil der ATP-Synthase (anti-A₁, anti-B) nahezu ausschließlich im Bereich der äußeren Membran lokalisiert war (Abb. 27A, B, D). Ergänzend zeigten Versuche mit Antikörpern gegen die membranständige a-Untereinheit (anti-atp a(rek), anti-atp a) ebenfalls eine exklusive Markierung in der äußeren Membran von *I. hospitalis* (Abb. 27C, E). In allen Fällen wurden weniger als 10 % der Immunsignale innerhalb des Cytoplasmas, der inneren Membran und des Intermembran-Kompartimentes inklusive der membranumhüllten Vesikel detektiert. Das zeigt deutlich, dass der bei weitem größte Teil der ATP-Synthase-Komplexe von *I. hospitalis* in dessen äußerer Membran lokalisiert ist. Eine exklusive Markierung in der äußeren Membran war sowohl für mixotroph wie auch autotroph gezüchtete Zellen zu beobachten. Kontrollexperimente mit BSA oder verfügbarem Präimmenserum der Antikörper führten nicht zu einer detektierbaren Immunreaktion (Abb. 27F). Die Markierungsmuster auf der äußeren Membran waren je nach verwendetem Antikörper verschieden. Die Immunmarkierung mit anti-A₁ erweckte, wie bei den Immunfluoreszenzstudien, den Eindruck einer inhomogenen Verteilung mit Clusterbildung (Abb. 27A, B). Dagegen zeigten die heterologen Antikörper anti-atp B und anti-atp a eine eher homogene Verteilung (Abb. 27D, E). Der homologe Antikörper anti-atp a(rek) führte zu einer wesentlich schwächeren Markierung an der äußeren Membran als die restlichen Antikörper, so dass hier eine Interpretation bezüglich der Verteilung schwer möglich war. Eine schwächere Markierungsintensität von anti-atp a(rek) war auch schon bei dessen Verwendung für die Immunfluoreszenz zu beobachten (Abb. 23L). Insgesamt zeigten diese Ergebnisse erstmals die Lokalisation einer gekoppelten ATP-Synthase (A₁- und A₀-Teil) in der äußeren Membran eines Prokaryoten.

3.3. Lokalisation der H₂:Schwefel-Oxidoreduktase

Nach unserem heutigen Wissen gewinnt *I. hospitalis* Energie einzig durch die Reduktion von elementarem Schwefel mit molekularem Wasserstoff. Deshalb sollte die subzelluläre Lage der H₂:Schwefel-Oxidoreduktase in *I. hospitalis* geklärt werden, da die Lokalisation der ATP-Synthase in der äußeren Membran nur in Verbindung mit der gleichzeitigen dortigen Lokalisation der H₂:Schwefel-Oxidoreduktase physiologisch sinnvoll ist. Die Verwendung des spezifischen Antiserums (Dirmeier, 1998) gegen die H₂:Schwefel-Oxidoreduktase ergab sowohl bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Ultradünnschnitten wie auch bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen an ganzen Zellen von *I. hospitalis* eine exklusive Lokalisation in der äußeren Membran (Abb. 28). In allen Fällen wurden weniger als 10 % der Immunsignale innerhalb des Cytoplasmas, der inneren Membran und des Intermembran-Kompartimentes inklusive der membranumhüllten Vesikel detektiert. Dies zeigt, dass der bei weitem größte Teil der H₂:Schwefel-Oxidoreduktase in der äußeren Membran von *I. hospitalis* lokalisiert ist und die äußere

Membran folglich energetisiert sein muss. Des Weiteren ließ die Analyse der Markierungsstudien in vielen Fällen eine inhomogene Verteilung des Enzymkomplexes innerhalb der Membran vermuten.

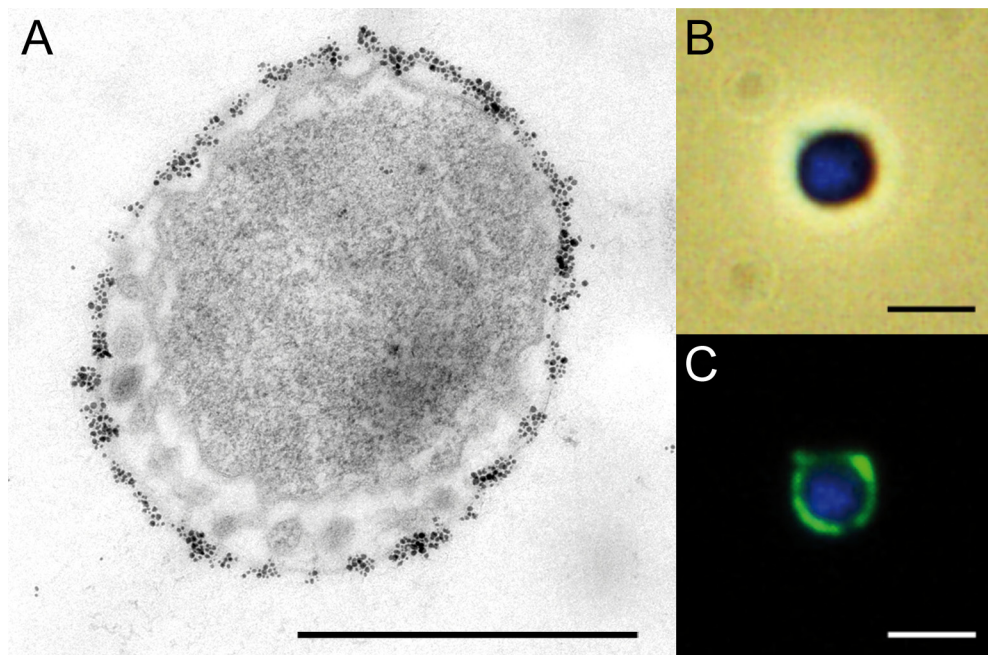


Abb. 28: Lokalisation der H_2 -Schwefel-Oxidoreduktase von *I. hospitalis* (Küper et al., 2010). (A) EM von Ultradünnschnitten, Immunmarkierung mit anti-SRed (1:100), Maßstab = 1 μ m; (B) Überlagerung einer Phasenkontrastaufnahme und einer DAPI-Fluoreszenz (blau), Maßstab = 2 μ m; (C) Colokalisation der H_2 -Schwefel-Oxidoreduktase (anti-SRed (1:250); goat anti-rabbit IgG + AlexaFluor(1:500)) und DNA des Cytoplasmas durch Immunfluoreszenz und DAPI (blau) Maßstab = 2 μ m

4. Lokalisation der ATP-Synthase weiterer Mikroorganismen

Im weiteren Verlauf sollte geklärt werden, ob die außergewöhnliche subzelluläre Lage der ATP-Synthase von *I. hospitalis* ein einmaliges Phänomen ist oder ob dies auch bei weiteren Mikroorganismen beobachtet werden kann. Naheliegender war hierfür die Analyse der verbleibenden Spezies der Gattung *Ignicoccus*. Als Vertreter der Bakterien bot sich für eine Analyse die Gattung *Thermotoga* an. Die Lage der ATP-Synthase in diesen Organismen wurde vorerst nur durch Immunfluoreszenzstudien ermittelt.

4.1. Genus *Ignicoccus*

Es sollte die subzelluläre Lage der ATP-Synthase in *I. islandicus*, *I. pacificus*, „*I. morulus*“ und der Cokultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans* geklärt werden. Dazu wurden die jeweiligen Zellen mit Formaldehyd fixiert, die ATP-Synthase mit dem anti- A_1 Antikörper markiert und mittels Immunfluoreszenz lokalisiert. Die Durchführung der Immunfluoreszenzstudien erfolgte durch Stefanie Daxer im Rahmen eines Schwerpunktpraktikums.

Im Vorfeld wurde die Spezifität des Antikörpers anti- A_1 gegenüber den ATP-Synthase-Untereinheiten der anderen *Ignicoccus*-Spezies überprüft. Dies erfolgte durch Western-Blot-

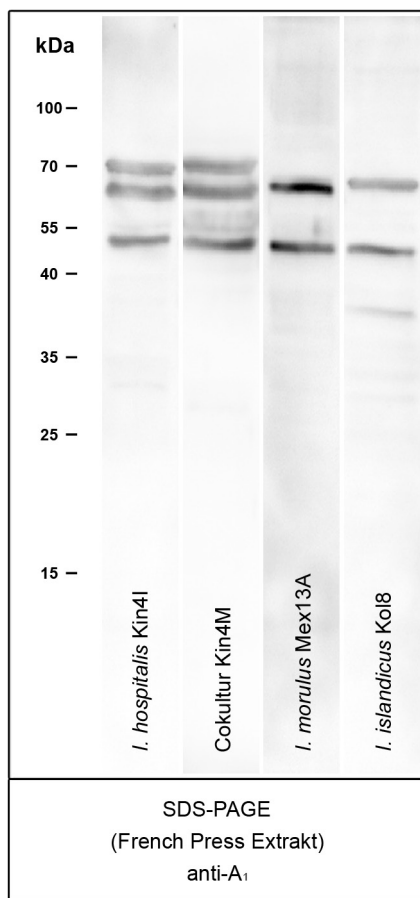


Abb. 29: Überprüfung der Spezifität des anti-A₁-Antikörpers gegenüber Untereinheiten der ATP-Synthase aus *I. hospitalis*, Cokultur Kin4/M, *I. islandicus*, und „*I. morulus*“. Western-Blot des French Press Extraktes (ohne Solubilisierung) nach SDS-PAGE mit anti-A₁ (1:5000); 2° AK: goat anti-rabbit IgG + HR Peroxidase (1:2500); Maßstab = 2 µm.

Analysen des jeweiligen Gesamtzellextraktes (French Press-Extrakt) nach SDS-PAGE. Die Spezifität gegenüber *I. pacificus* konnte im Vorfeld nicht getestet werden, da keine Zellmasse zur Verfügung stand. Für *I. islandicus*, „*I. morulus*“ und die Cokultur wurde eine spezifische Immunreaktion von anti-A₁ mit den Untereinheiten A und B der ATP-Synthase nachgewiesen (Abb. 29). Für *I. islandicus* wurde ein zusätzliches unbekanntes Immunsignal zwischen 35 und 40 kDa detektiert, das bisher nicht identifiziert werden konnte (Abb. 29). Augenscheinlich war, dass der Antikörper im Gegensatz zu „*I. morulus*“ und *I. islandicus* bei *I. hospitalis* mit einem zusätzlichen Protein bei 70 kDa reagiert (Abb. 29). Laut MALDI-TOF MS/MS Analyse war dieses Protein die Untereinheit a(I), und wurde sowohl in der Reinkultur als auch in der Cokultur nachgewiesen. Western-Blot-Analysen mit Gesamtzellextrakt der Cokultur Kin4/M wie auch der *I. hospitalis* Reinkultur zeigten insgesamt ein vergleichbares Markierungsmuster (Abb. 29). Signale, die auf zusätzliche Untereinheiten einer ATP-Synthase von *N. equitans* hindeuten könnten, wurden nicht detektiert.

Die Auswertung der Immunfluoreszenzstudien fixierter *Ignicoccus*-Zellen zeigte für *I. islandicus*, *I. pacificus* und „*I. morulus*“ ein zu *I. hospitalis* vergleichbares Bild. Das Immunsignal war in allen Fällen ausschließlich in der äußeren Membran zu detektieren (Abb. 30D, H, L). Die Gegenfärbung mit DNA spezifischen Farbstoffen ließ wieder vermuten, dass die DNA nur im Cytoplasma

lokalisiert ist (Abb. 30B, F, J). Im Vergleich zu den anderen Spezies war die Intensität der Fluoreszenzsignale bei *I. islandicus* aber eindeutig schwächer. Die außergewöhnliche Lage der ATP-Synthase scheint somit für alle bisher bekannten *Ignicoccus* Spezies zu gelten, und nicht nur für *I. hospitalis*. Untersuchungen der Cokultur führten bisher noch zu keinem eindeutigen Ergebnis. Allem Anschein nach beschränkt sich auch hier die Markierung ausschließlich auf die äußere Membran von *I. hospitalis*, da bisher keine entsprechenden Fluoreszenzsignale im Bereich der *N. equitans*-Zellen detektiert werden konnten. Eine Markierung der ATP-Synthase von *N. equitans* wurde bisher auch nicht bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen immunmarkierter Ultradünnschnitte (1° AK: anti-A₁) beobachtet (Flechsler, 2010).

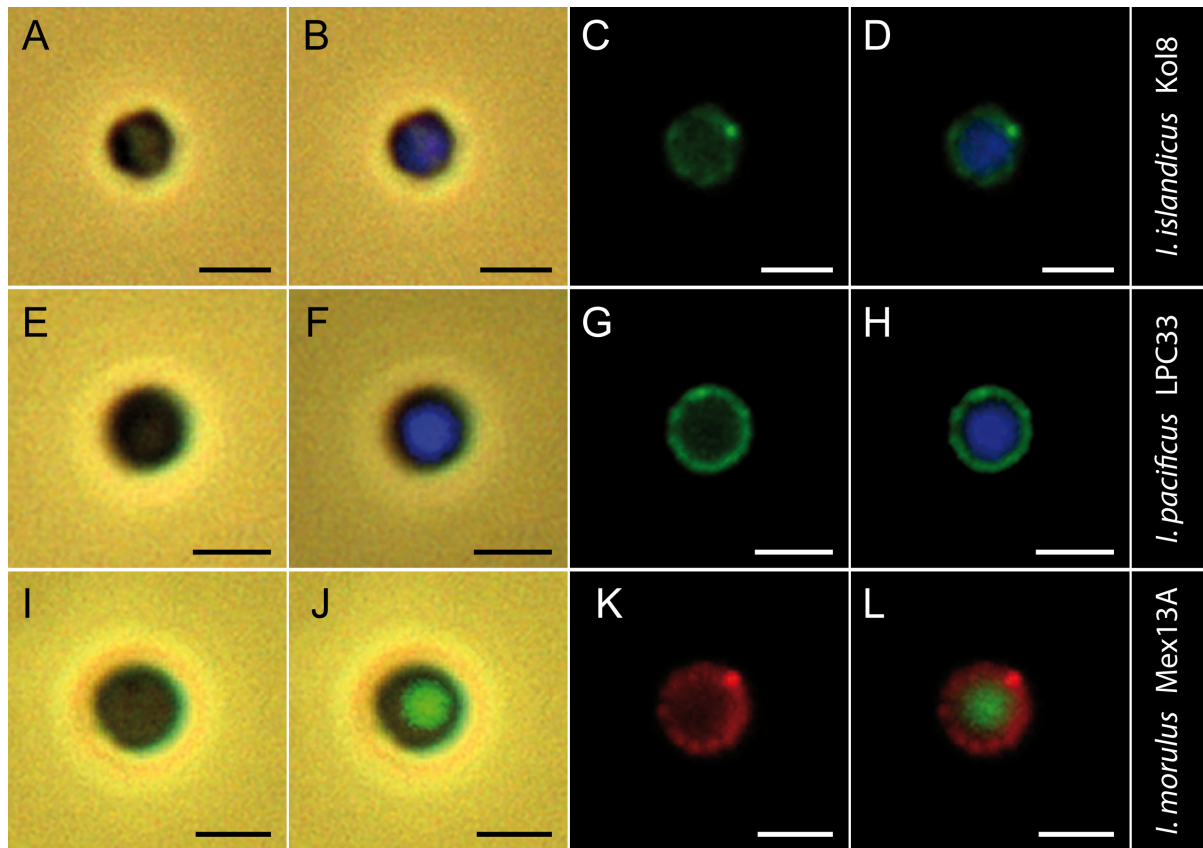


Abb. 30: Lokalisation ATP-Synthase in verschiedenen *Ignicoccus* Spezies mittels Immunfluoreszenz. (A-L) anti-A₁ (1:500); 2° Antikörper: goat anti-rabbit IgG + AlexaFluor 488 (1:500), DNA Stain = DAPI; (I-L) 2° Antikörper: goat anti-rabbit IgG + Cy3 (1:500), DNA Stain = SYTO 9 (A, E, I) Phasenkontrast (PK); (B, F, J) PK + DNA Stain; (C, G, K) Immunsignal; (D, H, L) Immunsignal + DNA Stain; Maßstab je 2 µm

4.2. Genus *Thermotoga*

Für Lokalisationsstudien an Bakterien wurden Vertreter der Gattung *Thermotoga* gewählt. *Thermotoga* besitzt ähnlich der Zellarchitektur von *Ignicoccus*, eine innere und eine äußere Membran, die zudem mikroskopisch eindeutig voneinander unterschieden werden können, da die weit über das Cytoplasma hängende Toga (äußere Membran) eine ausreichende räumliche Auflösung erlaubt.

Für die Immunmarkierungsexperimente wurde der heterologe Antikörper anti-A₁ verwendet. Western-Blot-Analysen nach *Native*-PAGE wie auch SDS-PAGE bestätigten die Spezifität gegenüber der ATP-Synthase (Wartner, 2010). Überraschenderweise wurde bei beiden untersuchten Spezies, *T. maritima* MSB8 und *Thermotoga spec.* MH-1, eine signifikante Markierung in der Toga beobachtet (Abb. 31D, H, L). DNA war durch DAPI Färbung nur im Cytoplasma nachzuweisen. Die Immunmarkierungen zeigten, dass die ATP-Synthase/ATPase bei *Thermotoga* ebenfalls in der äußeren Membran lokalisiert ist. Ob es sich hierbei um eine exklusive Lokalisation handelt, wurde noch nicht abschließend geklärt. Allerdings können die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen so interpretiert werden, dass die ATP-Synthase/ATPase zu einem großen Teil in der Toga lokalisiert ist. Diese Vermutung beruht vor allem auf der Beobachtung, dass nach Trennung von Toga und Cytoplasma ein ATPase spezifisches Fluoreszenzsignal nur in der Toga detektiert wurde (für

experimentelle Details siehe Diplomarbeit von Catrin Wartner; Wartner, 2010). Aussagekräftige Immuno-EM-Analysen liegen bisher noch nicht vor. Insgesamt lassen die Versuche mit *Thermotoga* vermuten, dass die unerwartete Lokalisation einer ATP-Synthase/ATPase in einer äußeren Membran nicht nur für *Ignicoccus* gilt, sondern über die Domänengrenze hinaus auch bei Vertretern der Bacteria zu finden ist.

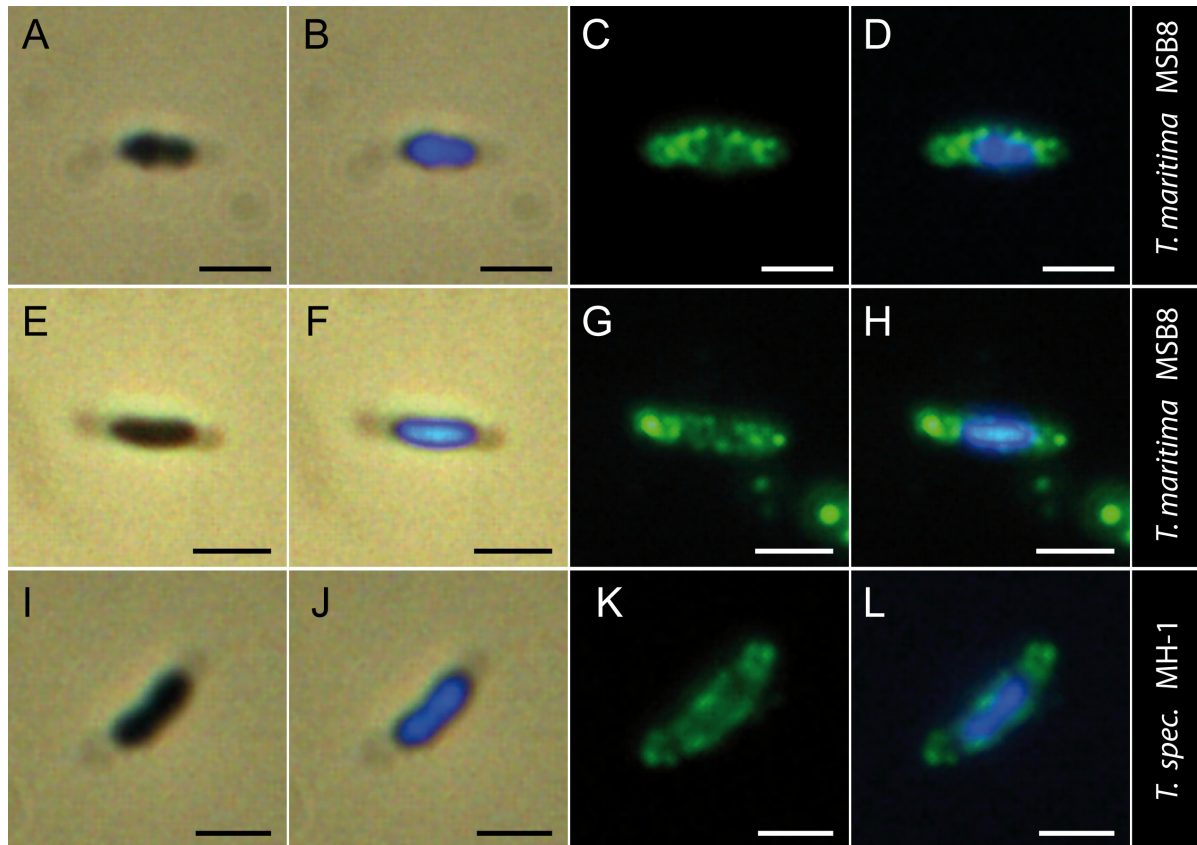


Abb. 31: Lokalisation ATP-Synthase in verschiedenen *Thermotoga* Spezies mittels Immunfluoreszenz. (A-L) anti-A₁ (1:250); 2° Antikörper: goat anti-rabbit IgG + AlexaFluor 488 (1:500), DNA Stain = DAPI; (A, E, I) Phasenkontrast (PK), Pfeil kennzeichnet die Toga; (B, F, J) PK + DNA Stain; (C, G, K) Immunsignal; (D, H, L) Immunsignal + DNA Stain; Maßstab je 2 µm

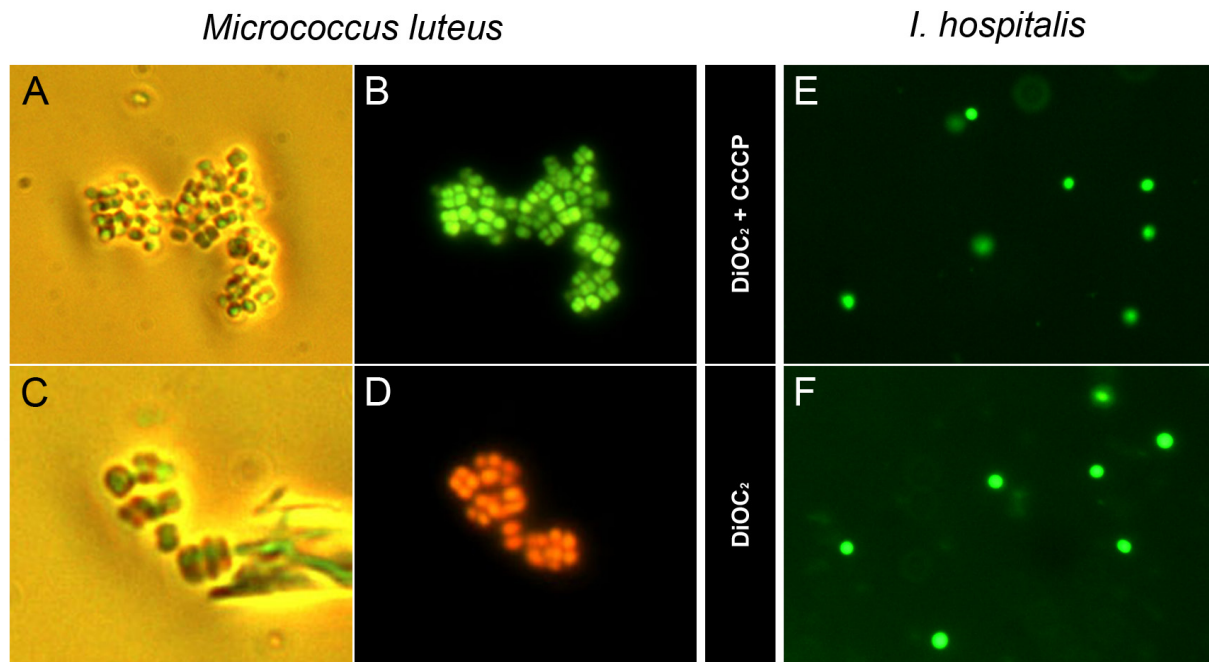
5. Zellbiologische Untersuchungen von *I. hospitalis*

5.1. Versuche zum direkten Nachweis eines Membranpotentials

Studien zur Lokalisation der für eine Energiekonservierung relevanten Enzyme führten zu dem überraschenden Ergebnis, dass sowohl die ATP-Synthase wie auch die H₂:Schwefel-Oxidoreduktase ausschließlich in der äußeren Membran von *I. hospitalis* lokalisiert sind. Dies würde zwingend eine Energetisierung der äußeren Membran zur Folge haben.

Zur Bestätigung eines Membranpotentials wurden Zellen von *I. hospitalis* mit BaCLight™ Bacterial Membrane Potential Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) behandelt. Dieser enthält den Carbocyaninfarbstoff DiOC₂ und den Protonophor CCCP. DiOC₂ ist ein membranpermeanter Farbstoff, der in Zellen grundsätzlich grün fluoresziert. Bei bestehendem Membranpotential wird

DiOC₂ vermehrt in die Zelle eingebracht und aggregiert, dabei verschiebt sich die Emissionswellenlänge der Fluoreszenz in den roten Spektralbereich. Zur Kontrolle wird den Zellen in einem parallelen Experiment neben DiOC₂ auch CCCP zugesetzt. Durch die Zugabe des Protonophors bricht ein bestehendes Membranpotential zusammen, DiOC₂ kann nicht aggregieren, und die Fluoreszenz verschiebt sich nicht in den roten Spektralbereich. Eine grüne Fluoreszenz zeigt



folglich den nicht energetisierten Status einer Membran an, eine rote Fluoreszenz dagegen ein bestehendes Membranpotential.

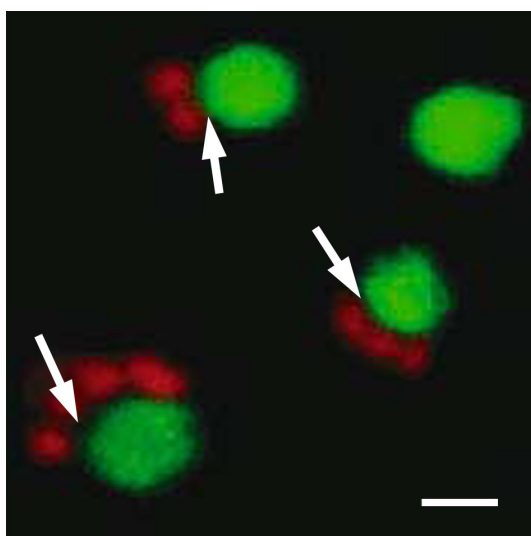
Abb. 32: Versuche zur Detektion des Membranpotentials von *M. luteus* und *I. hospitalis* mittels BacLight™ Bacterial Membrane Potential Kit. In (D) konnte das erwartete Membranpotential für *M. luteus* detektiert werden, eine Detektion für *I. hospitalis* (F) war nicht möglich. Die Zugabe des Ionophors CCCP führte zum Zusammenbrechen des Membranpotentials (B). Fluoreszenzaufnahmen in B, D, E und F wurden mit dem Filter U-MNB erstellt.

Die frischen Zellen der logarithmischen Wachstumsphase wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers behandelt. Die grundsätzliche Funktionalität des verwendeten Testsystems wurde durch Positivkontrollen mit *Micrococcus luteus* bestätigt (Abb. 32D). Die Zugabe von CCCP verhinderte bei *M. luteus* auch wie erwartet die Etablierung eines Membranpotentials (Abb. 32B). Allerdings war für *I. hospitalis* kein Membranpotential nachzuweisen (Abb. 32E, F), weder an der inneren noch an der äußeren Membran. Ohne Einfluss war dabei, ob unter aeroben oder anaeroben Bedingungen getestet wurde. Auch durch die Variation der Temperatur (19° C; 60° C und 90° C) und der zugehörigen Dauer (15, 30, 45 und 60 min) der Inkubation war ein Membranpotential nicht eindeutig nachzuweisen. Zwar hatte es wiederholt den Anschein, dass bei beginnender Anregung ein blitzartiges rotes Emissionssignal zu beobachten war, doch konnte dies in keinem Fall dokumentiert werden. Dafür wäre es notwendig, die Zellen mit einer Highspeed-Kamera zu filmen und die einzelnen Frames der Sequenz auszuwerten. Alternativ könnte eine Analyse der Zellen im CLSM geeignet sein, um ein bestehendes Membranpotential zu detektieren und der entsprechenden Membran von *I. hospitalis* zuzuordnen. Beide Versuchsreihen konnten aus

Zeitgründen in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Insgesamt war ein direkter Nachweis der Energetisierung der äußeren Membran von *I. hospitalis* mittels BaLight™ Bacterial Membrane Potential Kit nicht möglich. Es darf aber auch nicht außer Acht gelassen werden, dass dieses Testsystem für aerobe, mesophile Mikroorganismen entwickelt wurde und die Eignung für *I. hospitalis* im Vorfeld nicht exakt geklärt werden konnte. Eine zeitlich begrenzte Stabilität der verwendeten Reagenzien, unter anaeroben Testbedingungen verbunden mit hohen Inkubationstemperaturen, wurde zwar von Seiten des Herstellers zugesichert, doch konnte der entsprechende Zeitraum nicht näher definiert werden. Trotzdem sollte es ein zukünftiges Ziel sein, die indirekte aber schlüssige Folgerung der Energetisierung der äußeren Membran von *I. hospitalis* auf direktem Weg zu bestätigen.

4.2. Lokalisation von DNA, RNA und Ribosomen

Im Gegensatz zur Maschinerie für die Energiegewinnung konnten DNA, RNA und Ribosomen von *I. hospitalis* ausschließlich im Cytoplasma nachgewiesen werden. Das exklusive Vorkommen von DNA und RNA im Cytoplasma wurde durch die Detektion verschiedener Farbstoffe belegt, die spezifisch nur an DNA oder allgemein an Ribonukleinsäuren binden. Die Überlagerung von Fluoreszenzaufnahme mit der jeweiligen Phasenkontrastaufnahme führte bei allen verwendeten Farbstoffen (DAPI, SYTO 9 und SYTOX-Green) zu einem einheitlichen Ergebnis. Dementsprechend waren die Fluoreszenzsignale niemals über die gesamte Zelle verteilt zu detektieren, sondern konzentrierten sich in einem dem Cytoplasma entsprechenden Bereich (Abb. 33). Die Lokalisation der Ribosomen erfolgte durch Auswertung bereits vorhandenen Bildmaterials. Besonders Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen (FISH) der Cokultur Kin4M waren hierfür hilfreich (Abb. 33), da die simultane Detektion der ribosomalen rRNA von *I. hospitalis* (grüne FISH-Signale) und *N. equitans* (rote FISH Signale) es ermöglichte, das Intermembran-Kompartiment visuell aufzulösen (weiße Pfeile). *N. equitans* heftet an der äußeren Membran von *I. hospitalis* an, folglich musste der



markierungsfreie Spalt dem IMC entsprechen, und der markierte Bereich dem Cytoplasma von *I. hospitalis* (Huber *et al.*, 2006). Diese Annahme wurde durch elektronenmikroskopische Analysen von Ultradünnschnitten unterstützt, bei denen Partikel, die der Größe von Ribosomen entsprechen, bisher nur im Cytoplasma beobachtet wurden (Junglas, 2006).

Abb. 33: Fluoreszenz in situ Hybridisierung der Cokultur Kin4M. rot = spezifische Sonde für *N. equitans*; grün = spezifische Sonde für *I. hospitalis*; Die weißen Pfeile markieren das IMC, in dem keine FISH-spezifische Markierung detektiert wurde; Maßstab: 1 µm

IV. Diskussion

Ignicoccus hospitalis, als obligat chemolithoautotropher Mikroorganismus (Srinivasan *et al.*, submitted), ist bezüglich der Energiegewinnung vollkommen abhängig von einem chemiosmotischen Membransystem (Berry, 2002). Nach derzeitigem Wissen ist eine Energiegewinnung für *I. hospitalis* nur durch anaerobe Schwefelatmung möglich (Paper *et al.*, 2007). Durch die Reduktion von elementarem Schwefel mit molekularem Wasserstoff werden Protonen über die äußere Membran transloziert, wodurch eine *pmf* über dieser aufgebaut wird, die letztendlich als Triebkraft für die Synthese von ATP dient. Die Fähigkeit, Schwefel (Elektronenakzeptor) mit H₂ oder organischem Substrat (Elektronendonor) zu reduzieren, ist bei Vertretern der Archaea wie auch Bacteria weit verbreitet, allerdings sind nicht alle fähig, die Schwefelreduktion mit einer Synthese von ATP zu koppeln (Hedderich *et al.*, 1999). Neben *Ignicoccus* können beispielsweise Vertreter der archaeellen Gattungen *Desulfurococcus*, *Thermoproteus*, *Pyrobaculum*, *Stygiolobus*, *Acidianus* und *Pyrodictium* sowie Vertreter der bakteriellen Gattungen *Wolinella*, *Desulfuromonas* und *Ammonifex* ATP durch lithotrophe Schwefelatmung gewinnen (Hedderich *et al.*, 1999; Huber, 2006). Allen gemein ist eine H₂:Schwefel-Oxidoreduktase als primäre Protonenpumpe und eine ATP-Synthase als essentieller Energiekonverter. Damit stehen diese beiden membrangebundenen Enzymkomplexe auch im Mittelpunkt des Energiestoffwechsels von *I. hospitalis* und spielen nicht nur eine zentrale Rolle für den Metabolismus von *I. hospitalis*, sondern auch für die Lebensgemeinschaft mit *N. equitans*.

1. Vorläufige Charakterisierung der ATP-Synthase

Das Interesse an der ATP-Synthase von *I. hospitalis* wurde primär dadurch geweckt, dass durch bioinformatische Analysen nur eine reduzierte ATP-Synthase aus fünf Untereinheiten für *N. equitans* vorhergesagt wurde (Waters *et al.*, 2003). Die Frage nach der Funktionalität dieses Enzyms und der daraus resultierenden bioenergetischen Verhältnisse in der Cokultur Kin4M führten so auch zu ersten Untersuchungen der ATP-Synthase von *I. hospitalis*. Neben der vergleichsweise einfachen Kultivierung von *I. hospitalis* gegenüber *N. equitans* wurde die ATP-Synthase von *I. hospitalis* anfangs vor allem deswegen untersucht, um Methoden zu erlernen und zu etablieren, die eine spätere Reinigung und Charakterisierung des *N. equitans*-Enzyms erleichtern sollten. Zusätzlich war die Reinigung der ATP-Synthase von *I. hospitalis* als Vorarbeit für zukünftige Vergleichsstudien der beiden Enzyme gedacht. Diese Vergleichsstudien sollen klären, ob *N. equitans* selbstständig ATP synthetisieren kann, ob die ATP-Synthase funktionell ist, ob ATP vielleicht direkt importiert wird oder ob der reduzierte, unvollständige Enzymkomplex in *N. equitans* durch den Import fertiger Untereinheiten funktionell vervollständigt wird. Diese Fernziele konnten bisher allerdings nicht bearbeitet werden, da die ATP-Synthase von *I. hospitalis*,

vor allem aufgrund ihrer außergewöhnlichen Lokalisation, unerwartet in den Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit rückte.

In Vorversuchen wurde an ganzen Zellen gezeigt, dass die ATP-Synthese *in vitro* durch einen künstlichen Protonengradienten stimuliert werden kann (Mayer, 2008). Durch die inhibitorische Wirkung von DES, DCCD und TBT konnte die gemessene ATP-Syntheseaktivität zusätzlich eindeutig auf die ATP-Synthase zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu nahm TCS keinen direkten Einfluss auf die ATP-Synthase, sondern verhinderte als Protonophor den Aufbau eines Protonengradienten über der Membran von *I. hospitalis*. Das Ausbleiben einer messbaren ATP-Syntheseaktivität nach Behandlung mit TCS bestätigte somit, dass die ATP-Synthase zwingend auf einen Protonengradienten für die Synthese von ATP angewiesen ist. Die Notwendigkeit eines Protonengradienten und die Kenntnis, dass die c-Untereinheit nur ein H⁺- und kein Na⁺-Bindemotiv besitzt, führten zu der Hypothese, Protonen als Kopplungionen in *I. hospitalis* zu definieren.

Weiterhin konnte, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Volker Müller, ein ATP-Hydrolyse-Testsystem etabliert werden, das angelehnt war an die Testsysteme für *M. jannaschii* und *P. furiosus* (Lingl, 2006; Pisa, 2008). Dadurch war es möglich, die Hydrolyseaktivität des Enzyms zu bestimmen und durch korrespondierende Inhibitorstudien diese Aktivität auf die ATP-Synthase zurückzuführen bzw. den Kopplungsstatus des A₁A₀-Komplexes zu klären. Die Charakterisierung der Hydrolyseaktivität an Membranen zeigte, dass der größte Teil der gemessenen Aktivität von der ATP-Synthase herrührt. Darüber hinaus lagen die Aktivitätsoptima im erwarteten Bereich bei 90° C und einem pH-Wert von pH 7,0. Auch der Einfluss von einwertigen und zweiwertigen Ionen war mit denen anderer bekannter archaeller ATP-Synthasen zu vergleichen (Lingl, 2006; Hlady, 2007; Pisa, 2008). Die ATP-Synthase zeigte keinerlei Sensitivität gegenüber Sauerstoff, was ein Arbeiten mit dem Enzym in der Anaerobenkammer erübrigte. Das Enzym konnte durch verschiedene Detergenzien im gekoppelten Zustand aus der Membran herausgelöst werden. Dies gelang besonders gut mit TritonX-100 und DDM. Aufgrund der besseren Verträglichkeit mit geplanten Kristallisationsversuchen und aufgrund der für DDM beschriebenen Eigenschaften, ein sehr mildes, aber effektives Detergenz zu sein, wurde DDM als Standarddetergenz verwendet (Garavito & Ferguson-Miller, 2001; Hunte *et al.*, 2003; Reisinger & Eichacker, 2008). Die Hemmung der Hydrolyse mit DCCD (0,75 mM) um 60 % sprach für einen großen Anteil gekoppelter ATP-Synthase-Komplexe im Solubilisat und war ein geeigneter Ausgangspunkt für Reinigungsversuche. Grundsätzlich war bei der Reinigung zu beobachten, dass der Kopplungsstatus des Enzyms nicht lange erhalten blieb. Fraglich ist jedoch, ob dies durch eine generelle Instabilität des Enzymkomplexes zu begründen ist, oder ob eine Dissoziation in A₁- und A₀-Subkomplex durch die gewählten Reinigungsmethoden herbeigeführt wurde. Vergleicht man die Ergebnisse, bei denen entweder eine Anionenaustauschchromatographie oder eine Gelfiltration als erster Reinigungsschritt gewählt wurde, erhärtet sich der Verdacht, dass eine Dissoziation durch die Anionenaustauschchromatographie begünstigt wird. Während bei der Gelfiltration alle Untereinheiten, mit Ausnahme des Proteolipids, in einer Fraktion identifiziert werden konnten (A, B, C, D, E, F, H und a), waren in den aktiven Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie nur vier Untereinheiten der ATP-Synthase nachweisbar (A, B, E und F). Allerdings war auch bei der Gelfiltration ein nicht unerheblicher Teil des Komplexes bereits in die A₁- und A₀-Subkomplexe

dissoziiert. Auffällig war hierbei, dass das Enzym stationärer Zellen labiler zu sein schien (größerer Anteil an freiem A_1) als dies bei logarithmischen Zellen der Fall war. Eine Erklärung dafür kann noch nicht gegeben werden; vielleicht aber unterliegt der Komplex einer den V-ATPasen ähnlichen Regulation (Toei *et al.*, 2010), bei der der Kopf vom Ring dissoziieren und reassemblieren kann. Dies erscheint zwar eher unwahrscheinlich, würde aber das Phänomen erklären, warum in der metabolisch aktiven log-Phase mehr gekoppelte Komplexe zu detektieren sind, als in der inaktiveren stationären Wachstumsphase. Somit stellt sich im Moment noch das Problem, eine erfolgreiche Methode zu etablieren, die in einer guten Anreicherung des gekoppelten A_1A_0 -Komplexes resultiert. Auffällig ist, dass es noch nicht gelungen ist, eine crenarchaeelle ATP-Synthase in gekoppeltem Zustand zu reinigen. So konnten lediglich vier A_1 -Subkomplexe hyperthermophiler Crenarchaeoten gereinigt und charakterisiert werden, die entweder aus drei (*Sulfolobus solfataricus*: 63, 48, 24 kDa), aus vier (*Sulfolobus sp. strain 7*: 66, 51, 25, 13 kDa; *Sulfolobus acidocaldarius*: 65, 51, 20, 12 kDa) oder aus fünf verschiedenen Untereinheiten (*Pyrodictium abyssi* TAG11: 65, 51, 41, 26, 24 kDa) bestanden (Wakagi & Oshima, 1985; Lübben & Schäfer, 1987; Hochstein & Stan-Lotter, 1992; Dirmeier, 1998). Fraglich ist, ob die scheinbar vergleichsweise hohe Instabilität des Enzyms ein generelles Problem bei der Reinigung crenarchaeeller ATP-Synthasen darstellt, oder ob bisher zu wenig Untersuchungen an entsprechenden Enzymen der Crenarchaeoten durchgeführt wurden. Die Frage, ob sich die ATP-Synthase von Crenarchaeen strukturell von einer euryarchaeellen unterscheidet, bleibt hoch spekulativ. Betrachtet man den von uns gereinigten A_1 -Subkomplex, finden sich die klassischen Untereinheiten, die auch für den A_1 -Teil der Euryarchaeoten beschrieben sind (Lingl *et al.*, 2003; Pisa *et al.*, 2007; Vonck *et al.*, 2009). Über LILBID-MS und MALDI-TOF MS/MS wurden die Untereinheiten A, B, E und F für den A_1 -Subkomplex identifiziert und zu einer Stöchiometrie von A_3B_3EF bestimmt. Die Untereinheitenzusammensetzung lässt sich mit den gereinigten A_1 -Teilen von *Sulfolobus* vergleichen (Wakagi & Oshima, 1985; Lübben & Schäfer, 1987; Hochstein & Stan-Lotter, 1992). Klassisch hätte man aber eher einen Komplex aus A_3B_3CDF erwartet, wie er für *P. abyssi* (Dirmeier, 1998), den rekombinant hergestellten A_1 -Teil von *M. mazei* Gö1 (Grüber *et al.*, 2001a; Lemker *et al.*, 2001) und die F-Typ-ATPasen beschrieben ist (von Ballmoos *et al.*, 2009). Dennoch kann auch die von uns gefundene Zusammensetzung plausibel erklärt werden. Der stabile pseudo-hexagonale Ring aus A_3 und B_3 ist über B mit F und über A mit E assoziiert (Schäfer *et al.*, 2006; Raghunathan *et al.*, 2010). Darauf basierend könnte man vermuten, dass der gereinigte A_1 -Teil von *I. hospitalis* nicht zusammen mit dem zentralen Stiel von A_0 abgelöst wurde, sondern nur als A_3B_3EF -Komplex. Dabei verblieb der zentrale Stiel an A_0 . Dementsprechend müsste die theoretische Stöchiometrie von A_1 und A_0 für *I. hospitalis* wie folgt lauten: $A_1 = A_3B_3E_xF$ und $A_0 = CDH_ya_c_z$. Im Weiteren konnte diese vermutete Untereinheitenzusammensetzung durch MALDI-TOF MS/MS bestätigt werden. Trennte man die bereits beschriebene aktive Fraktion der Gelfiltration mittels CNE oder hrCNE in die verschiedenen Komplexe auf, waren durch Western-Blot-Analysen zwei Komplexe zu detektieren, die Untereinheiten der ATP-Synthase beinhalten. Eine 2D-Native/SDS-PAGE dieser 660 kDa und 440 kDa großen Komplexe mit anschließender MALDI-TOF-MS/MS zeigte für den 660 kDa-Komplex eine Untereinheitenzusammensetzung von CDHa und für den 440 kDa-Komplex von ABEF. Die Untereinheit c konnte dabei nur gelegentlich

mittels Western-Blot in den 660 kDa-Komplexen nachgewiesen werden. Für den 440 kDa Komplex stimmte das Laufverhalten in etwa mit der durch LILBID-MS bestimmten molekularen Masse von ca. 390 kDa überein. Dagegen ist das Laufverhalten des 660 kDa Komplexes ungewöhnlich, wäre aber durch den hohen Anteil an hydrophobem Protein zu erklären, ebenso wie der Tatbestand, dass der 660 kDa-Komplex je nach Dauer der Gelelektrophorese bei unterschiedlichen molekularen Massen detektiert wurde (Hunte *et al.*, 2003). Ob der Zerfall in 660 kDa und 440 kDa-Komplex durch die Gelelektrophorese verursacht wird, oder ob der Komplex bereits vorher zerfällt, ist noch nicht geklärt. Allerdings deuten die bisherigen Ergebnisse auch auf einen Zerfall während der Elektrophorese hin. Bei zukünftigen Experimenten sollte versucht werden, den A₁-Subkomplex in großen Mengen zu reinigen, um die ersten positiven Kristallisationsversuche weiterzuführen und zusätzliche Kristallisationsbedingungen testen zu können. Zusätzlich muss, auch vor dem Hintergrund der Lokalisation der ATP-Synthase, über die verwendeten Puffer nachgedacht werden. Solange nicht geklärt ist, wie das IMC beschaffen ist und welcher pH-Wert dort vorherrscht, bleibt es schwierig, ein physiologisches Puffersystem zu etablieren. Einen positiven Effekt auf die Stabilität hatte beispielsweise Kaliumphosphat (getestet bei pH 7,5 und pH 8,0); ob dies daran liegt, dass Kalium das bevorzugte Gegenion ist, oder weil im IMC, aufgrund der dort stattfindenden ATP-Synthese, eine erhöhte Phosphatkonzentration herrscht, bleibt im Moment noch offen. Erfolgsversprechend könnten auch alternative Reinigungsmethoden sein, wie z.B. die hydrophobe Interaktionschromatographie, Immunpräzipitationen oder Affinitätschromatographien.

2. Lokalisation von ATP-Synthase und H₂:Schwefel-Oxidoreduktase

Die ungewöhnliche Zellarchitektur von *I. hospitalis* implizierte die Frage, in welcher der beiden Membranen die ATP-Synthase lokalisiert ist. Für *I. hospitalis* wurde im Vorfeld dieser Arbeit postuliert, dass sich der Enzymkomplex in der inneren Membran (Cytoplasmamembran) befindet (Podar *et al.*, 2008), beruhend auf der Lokalisation der ATP-Synthase in der inneren Membran von Mitochondrien und Chloroplasten sowie in der Cytoplasmamembran von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Allerdings lagen auch biochemische (Gürster, 2007; Hlady, 2007) und elektronenmikroskopische (Junglas, 2006; Mayer, 2008) Daten vor, die eine andere subzelluläre Lage der ATP-Synthase bei *I. hospitalis* als möglich erschienen ließen. Zusätzlich sollte auch die Lage der H₂:Schwefel-Oxidoreduktase (primäre Protonenpumpe) ermittelt werden. Dazu wurden zum einen intakte, fixierte Zellen für Immunfluoreszenzstudien und zum anderen Ultradünnschnitte für Immuno-EM-Analysen mit den entsprechenden Antikörpern markiert.

Betrachtet man die Ergebnisse der Immunmarkierungsexperimente, war sowohl für die ATP-Synthase als auch für die H₂:Schwefel-Oxidoreduktase eine vorherrschende Markierung an der äußeren Membran festzustellen, wobei beide verwendeten Methoden unabhängig voneinander zu vergleichbaren Ergebnissen führten. Dieser Befund war absolut unerwartet, da derartiges bisher noch für keinen Mikroorganismus beschrieben wurde. Daher wurde dieser Befund mehrfach überprüft und es zeigte sich, dass sich die Ergebnisse bei genauerem Betrachten doch in einem Detail unterschieden. Auf Ultradünnschnitten war, neben der vorherrschenden Markierung an der äußeren Membran (min. 90 %), auch ein kleiner, aber signifikanter Anteil des Signals (max. 10 %)

im Inneren der Zelle zu detektieren. Dagegen zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen immunmarkierter Zellen die Markierung einzig an der äußeren Membran. Innerhalb der *I. hospitalis*-Zellen konnten zwar auch im Fluoreszenzmikroskop schwache Fluoreszenzsignale beobachtet werden, allerdings waren diese auf die durchscheinende Fluoreszenz anderer Fokusebenen und nicht auf eine echte Markierung zurückzuführen. Durch Analysen der immunmarkierten Zellen im CLSM konnte die störende Hintergrundfluoreszenz ausgeblendet und eine spezifische Markierung im Zellinneren nicht detektiert werden. Fraglich ist, worauf der Unterschied der Befunde der fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen basiert; letztendlich kann er aber durch die unterschiedlichen Präparationsmethoden erklärt werden. Im Gegensatz zu Ultradünnschnitten kann der Antikörper bei einer Immunmarkierung ganzer Zellen nur durch ausreichende Detergenzbehandlung in alle Kompartimente der Zelle eingebracht werden. Diesbezüglich muss im Falle von *I. hospitalis* der unterschiedliche Aufbau von innerer und äußerer Membran berücksichtigt werden. Während die innere Membran aus Di- und Tetraetherlipiden aufgebaut ist, enthält die äußere Membran nur Dietherlipide, was zu einem deutlichen Stabilitätsunterschied der beiden Membranen führt (Jahn *et al.*, 2004; Jahn, 2007). Daher ist für die Permeabilisierung der labilen, äußeren Membran eine geringere Detergenzkonzentration als für die Permeabilisierung der stabilen, inneren Membran ausreichend. Umgekehrt bedeutet dies, dass bei einer entsprechend hohen Detergenzkonzentration zwar die Zugänglichkeit zum Cytoplasma von *I. hospitalis* gewährleistet wäre, die äußere Membran aber bereits zerfallen würde. Die Konzentration von Tween 20 wurde für *I. hospitalis* so gewählt, dass die äußere Membran von *I. hospitalis* noch erhalten werden konnte. Allem Anschein nach reichten 0,02 % (w/v) Tween 20 aber nicht aus, um auch das Cytoplasma für die Antikörper zugänglich zu machen. Die gewählte Konzentration ist eher als niedrig einzuordnen und liegt deutlich unter den Detergenzkonzentrationen, die für Immunlokalisationen bei anderen Archaeen beschrieben sind. So wurde *Sulfolobus acidocaldarius* beispielsweise für die Immunlokalisation von ESCRT-III und Vps4 mit der zehnfachen Tween 20-Konzentration (0,2 % (w/v)) behandelt (Samson *et al.*, 2008). Letztendlich erlaubten erst elektronenmikroskopische Untersuchungen immunmarkierter Ultradünnschnitte eine objektive Bestimmung der subzellulären Lage von H₂:Schwefel-Oxidoreduktase und ATP-Synthase. Beide Enzyme befinden sich demnach zu mehr als 90 % in der äußeren Membran von *I. hospitalis* und nur ein kleiner Anteil im Inneren der Zelle.

Über eine reine Lokalisation der beiden Enzyme hinaus führten die Immunmarkierungsstudien in einigen Fällen zusätzlich zu der Annahme, dass ATP-Synthase und H₂:Schwefel-Oxidoreduktase bevorzugt in Clustern vorliegen. Dieses Markierungsverhalten konnte an einigen Ultradünnschnitten, aber vor allem an ganzen Zellen im CLSM beobachtet werden. Das alternierende Muster von markierten und nicht markierten Bereichen deutete auf eine inhomogene Verteilung der Enzyme in der äußeren Membran hin. Eine derartige laterale Kompartimentierung biologischer Membranen wurde bisher allerdings vorwiegend für eukaryontische Zellen beschrieben und geht einher mit der Theorie der ‚Lipid Rafts‘. Dabei werden biologische Membranen als inhomogene Strukturen angesehen, die aus verschiedenen Domänen,

den sogenannten ‚Lipid Rafts‘ aufgebaut sind (Edidin, 2003). Diese unterscheiden sich bezüglich ihrer Größe (10-200 nm), der jeweiligen Lipid-/Proteinspezifität wie auch des Lipid-/Proteingehalts und werden zusätzlich als hoch dynamische Strukturen und funktionelle Einheiten beschrieben (Day & Kenworthy, 2009; Lindner & Naim, 2009). Mittlerweile wird sogar angenommen, dass die ‚Lipid Rafts‘ für eine grundlegende funktionelle Organisation biologischer Membranen verantwortlich sind (Lingwood & Simons, 2010). Obwohl die ‚Lipid Raft‘-Thematik intensiv an Membranen eukaryontischer Zellen untersucht wurde (Malínská *et al.*, 2003; Grossmann *et al.*, 2006; Simons & Gerl, 2010), ist über vergleichbarer Phänomene in mikrobiellen Cytoplasmamembranen bisher nur wenig bekannt. Dennoch wurde eine laterale Kompartimentierung auch für prokaryontische Membranen angenommen und in einigen Fällen bereits beobachtet (Johnson *et al.*, 2004, Rudner & Losick, 2010). So ist beispielsweise für *Escherichia coli* bekannt, dass die Chemotaxisrezeptoren exklusiv an den Polen der Zelle lokalisiert sind (Maddock & Shapiro, 1993). Eine inhomogene Verteilung wurde auch für die Succinat-Dehydrogenase und ATP-Synthase in der Cytoplasmamembran von *Bacillus subtilis* gezeigt (Johnson *et al.*, 2004). 3D-Rekonstruktion der zugehörigen CLSM-Studie belegten ein Vorliegen der beiden Enzyme in vielen kleinen Domänen der Membran. Des Weiteren konnte durch Zeitverlaufsstudien gezeigt werden, dass sich die Domänen hochdynamisch frei über die gesamte Membran bewegten. Unbeantwortet bleibt aber vorerst, ob die beobachteten Cluster der ATP-Synthase und H₂Schwefel-Oxidoreduktase von *I. hospitalis* solchen Membrandomänen entsprechen. Unklar ist auch, ob dies die tatsächliche *in vivo* Verteilung des Enzyms widerspiegelt oder nur ein Artefakt darstellt. Gesichert bleibt aber die Beobachtung, dass ATP-Synthase und H₂Schwefel-Oxidoreduktase innerhalb einer Schnittebene nicht homogen über die äußere Membran verteilt sind. Eine genauere Verteilungsbeurteilung sollte durch 3D-Rekonstruktionen elektronenmikroskopisch analysierter Serien von immunmarkierten Ultradünnschnitten möglich sein. Erste einzelne Versuche wurden bereits von Thomas Heimerl (Heimerl, 2009) und Jennifer Flechsler (Flechsler, 2010) durchgeführt, lassen bisher aber keine zuverlässige Beurteilung zu; für eine endgültige Beurteilung ist die derzeitige Datenlage noch zu gering. Neben einer möglichen, generellen inhomogenen Verteilung kann auch hinterfragt werden, ob H₂Schwefel-Oxidoreduktase- und ATP-Synthase-Komplexe in gemeinsamen Clustern vorliegen. Allerdings kann dies vorerst nicht beantwortet werden, da für die untersuchten Enzyme nur anti-rabbit-Antikörper zur Verfügung standen und eine Colokalisation der beiden Enzyme somit bisher nicht möglich war. Für Colokalisationsstudien wäre es notwendig, Antikörper gegen die Zielproteine zusätzlich in Huhn oder Maus zu generieren. Erst dadurch wäre eine immunologisch einwandfreie Unterscheidung der beiden Proteine gewährleistet.

Eine grundsätzliche Problematik bei den durchgeführten Lokalisationsexperimenten ist die Frage nach der Spezifität der Antikörper und damit nach der Aussagekraft der Befunde. Vor allem Ungereimtheiten von Immunmarkierungsexperimenten bereits vorangegangener Arbeiten führten zu einer gewissen Skepsis gegenüber den überraschenden Ergebnissen. So konnten Markierungen mit Antikörpern gegen die *N. equitans*-Proteine Neq263 (B-Untereinheit der ATP-Synthase /ATPase von *N. equitans*), Neq475 (AAA-ATPase) und Neq236 (ein hypothetisches membranverankertes S-Layer assoziiertes Protein) sowie gegen die Acetyl-CoA-Synthetase und das Thermosom von

I. hospitalis in der äußeren Membran von *I. hospitalis* nachgewiesen werden (Junglas, 2006; Wasserburger, 2008; Mayer, 2008; Heimerl, 2009). Die Tatsache, dass bei einigen Immunmarkierungsversuche gegen Proteine von *I. hospitalis* und auch *N. equitans* eine zunächst unerwartete Markierung in der äußeren Membran von *I. hospitalis* nachgewiesen wurde, führte zu einer genaueren Untersuchung der Spezifität aller verwendeten Antikörper, insbesondere der primären Antikörper, und der experimentellen Bedingungen unter denen sie generiert, gereinigt und verwendet wurden.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden deshalb durch Western-Blot-Analysen auf ihre Spezifität gegenüber dem erwarteten Zielantigen überprüft. Ein unspezifisches Bindungsverhalten der verwendeten sekundären Antikörper konnte durch Negativkontrollen (Verwendung von 0,1%igem PBS-BSA statt primärem Antikörper) überprüft werden. Alle primären Antikörper wurden durch Western-Blot-Analysen nach *Native*-PAGE und SDS-PAGE auf ihre Spezifität überprüft. Bezüglich der ATP-Synthase-spezifischen Antikörper wurde ein breit gefächertes Spektrum verwendet und getestet. Es wurden sowohl heterologe wie auch homologe Antikörpern gegen den A₁- und A₀-Subkomplex verwendet; zusätzlich unterschieden sich die für die Antikörpergenerierung verwendeten Proteine. So basierte die Antikörpergenerierung entweder darauf, dass dem Kaninchen ein natives, aus *I. hospitalis* gereinigtes Protein oder ein rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes Protein injiziert wurde. Western-Blot-Analysen zeigten nur ein spezifisches Bindungsverhalten der entsprechenden Antikörper gegenüber Untereinheiten der ATP-Synthase. Ausgenommen davon war der Antikörper anti-atp a (*M. jannaschii*), für den kein Signal in Western-Blots detektiert werden konnte. Warum dieser Antikörper allerdings in den Lokalisationsexperimenten positive Ergebnisse lieferte, kann im Moment nicht erklärt werden. Gegen eine unspezifische Bindung an die äußere Membran spricht hier aber, dass ohne Detergenzbehandlung der *I. hospitalis*-Zellen keine Immunmarkierung mit anti-atp a möglich war. Weiterhin war dies ohne Detergenzbehandlung für alle ATP-Synthase-spezifischen Antikörper (anti-A₁, anti-atp a(rek), anti-atp B und anti-atp a) zu beobachten. Erst ab einer Tween 20-Konzentration von 0,01 % waren signifikante Fluoreszenzsignale nachweisbar. In Konsequenz spricht dies für eine im Intermembran-Kompartiment gelegene ATP-Synthase und gegen eine unspezifische Bindung der Antikörper an das äußere Blatt der äußeren Membran. Für anti-SRed wurden analoge Versuche bisher nicht durchgeführt; ohne Detergenzbehandlung ist aber eine Antikörperbindung zumindest denkbar, da Teile der Hydrogenase und Schwefelreduktase auch nach außen orientiert sein sollten. Die Spezifität des Antikörpers gegen die H₂:Schwefel-Oxidoreduktase konnte nicht so detailliert geklärt werden wie für die ATP-Synthase-spezifischen Antikörper, da nicht alle Antigene, die im Western-Blot nach SDS-PAGE zu detektieren waren, einer der annotierten Untereinheiten zugeordnet werden konnten. Bisher ist aber auch nicht sicher geklärt, welche Untereinheiten tatsächlich am Aufbau des Komplexes beteiligt sind (mündliche Mitteilung von PD Dr. Arnulf Kletzin, Darmstadt). Für ein spezifisches Bindungsverhalten sprachen allerdings die Western-Blot-Analysen nach *Native*-PAGE. Hier wurde nur ein Signal nachgewiesen, das bei derselben molekularen Masse detektiert wurde wie das Signal des korrespondierenden Hydrogenase-In-Gel-Assays. Die Vielzahl der durchgeführten Kontrollen (Negativkontrollen, Kontrollen mit Präimmunserum) und Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen verschiedene Antigene

unterschiedlichster Herkunft belegen ein hoch spezifisches Bindungsverhalten dieser Antikörper gegenüber der ATP-Synthase von *I. hospitalis*. Auch für den Antikörper gegen die H₂:Schwefel-Oxidoreduktase deuten die Ergebnisse stark auf eine spezifische Bindung an das erwartete Antigen hin. Folglich zeigen die Immunmarkierungsversuche, dass ATP-Synthase und H₂:Schwefel-Oxidoreduktase von *I. hospitalis* vor allem in der äußeren und nur in geringen Mengen in der inneren Membran lokalisiert sind. Damit ist erstmals die Lokalisation einer primären Protonenpumpe und gekoppelten ATP-Synthase (A₁- und A_o-Teil) in der äußeren Membran eines Prokaryonten gezeigt.

Für manche Tumorzellen, Hepatocyten, Adipocyten und Endothelialzellen wurde eine Lokalisation vereinzelter F₁F_o ATP-Synthase Komplexe in der Plasmamembran zwar bereits bewiesen, allerdings ist die physiologische Funktion der Komplexe noch nicht genau verstanden (Bae *et al.*, 2004; Champagne *et al.*, 2006). Auszuschließen ist jedoch, dass die sogenannten Ecto-ATP-Synthasen/ATPasen zur Energiegewinnung der Zellen beitragen, was vor allem darauf basiert, dass die F₁-Domäne nach außen orientiert ist. Vielmehr wird vermutet, dass das extrazellulär synthetisierte ATP von tumorspezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche verbraucht werden könnte, um die Zellproliferation und damit das Tumorwachstum zu stimulieren (Chi & Pizzo, 2006). Auch wenn es sich hierbei um klassische mitochondriale F₁F_o ATP-Synthasen handelt, die allem Anschein nach von den Mitochondrien zur Plasmamembran transportiert werden (Ma *et al.*, 2010), kann diese Situation funktionell nicht mit der in *I. hospitalis* verglichen werden.

3. Energetisierte äußere Membran und zellbiologische Konsequenzen

3.1. Konsequenzen für *I. hospitalis*

Aufgrund der ähnlichen Zellarchitektur wurde erwartet, dass die Energiekonservierung bei *I. hospitalis*, analog zu der von Gram-negativen Bakterien, im Cytoplasma an der inneren Membran erfolgt (Podar *et al.*, 2008). Zudem waren primäre Protonenpumpen bisher nicht in der äußeren Membran und ATP-Synthase-Komplexe nur in der inneren Membran von Gram-negativen Bakterien, Mitochondrien oder Chloroplasten lokalisiert worden (Nicholls & Ferguson, 2002; von Ballmoos *et al.*, 2009). Entgegen aller Erwartungen wurde sowohl die ATP-Synthase wie auch die H₂:Schwefel-Oxidoreduktase in der äußeren Membran von *I. hospitalis* nachgewiesen. Die subzelluläre Lage von primärer und sekundärer Protonenpumpe führt zu der zwingenden Notwendigkeit, dass die äußere Membran von *I. hospitalis* energetisiert sein muss. Ansonsten wäre die Versorgung mit ATP für *I. hospitalis* nicht erklärbar, zumindest nicht durch einen der bekannten Prozesse. Damit wurde erstmals bewiesen, dass die Energiekonservierung bei einem Prokaryonten über einen Ionengradienten an der äußeren Membran abläuft, und die ATP-Produktion somit im Intermembran-Kompartiment und nicht im Cytoplasma erfolgt (Abb. 34).

Folglich muss ATP für weitere zelluläre Prozesse, wie DNA-Replikation oder Proteinbiosynthese, über die innere Membran in das Cytoplasma transportiert werden. Im Gegenzug ist ein Export von ADP aus dem Cytoplasma in das IMC notwendig, um ausreichend ADP für die ATP Synthese zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich muss auch P_i wieder in das IMC transportiert werden, um die

Elektroneutralität der Kompartimente aufrecht zu erhalten. Transportsysteme, die fähig sind, einen derartigen Transfer von ATP und ADP durchzuführen, sind bereits für Mitochondrien wie auch Vertreter der endosymbiontischen, bakteriellen Gattungen *Rickettsia* und *Chlamydia* bekannt (Winkler & Neuhaus, 1999; Schmitz-Esser *et al.*, 2004). Die Transporter werden unter dem Begriff der ADP/ATP-Translokasen zusammengefasst, wobei zwischen den mitochondrialen und den nicht-mitochondrialen ADP/ATP-Translokasen unterschieden wird. Die beiden Translokasetypen gehören zu unterschiedlichen Proteinfamilien und zeigen keine Homologie in der Aminosäuresequenz. Die

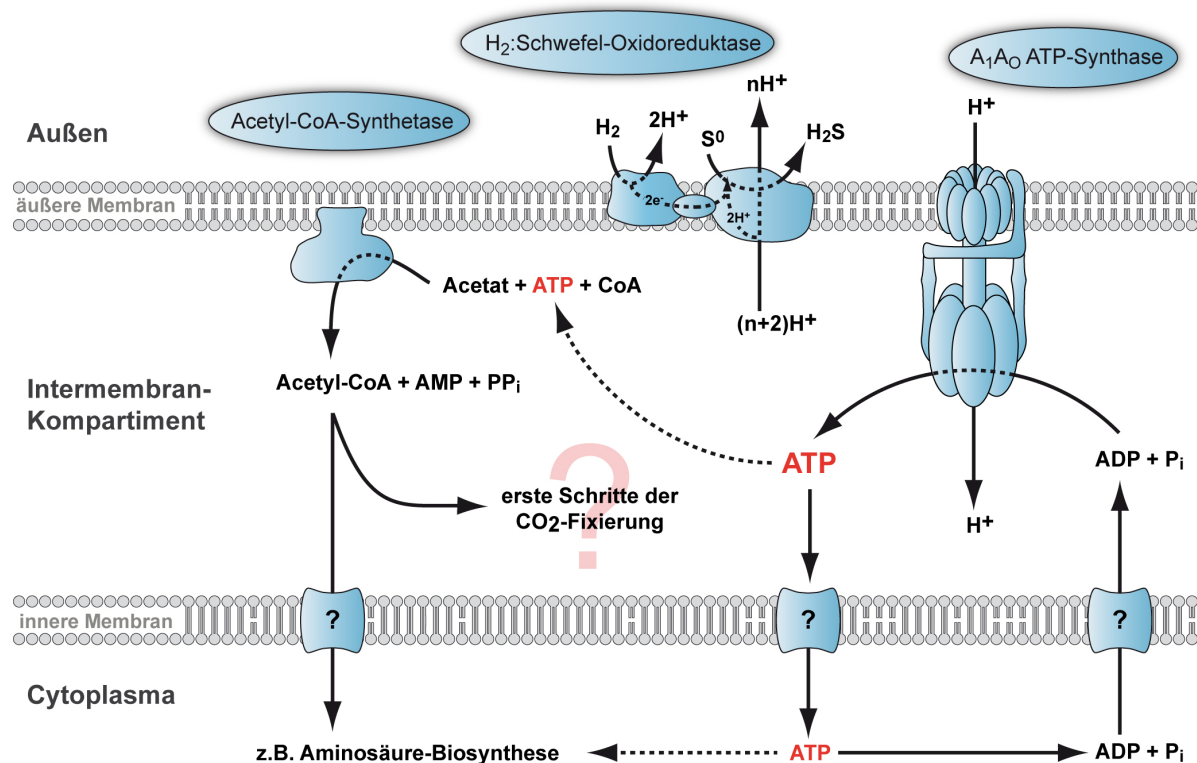


Abb. 34: Schema der Energiekonservierung und Aktivierung von Acetat in *Ignicoccus hospitalis*. Der H_2 -Schwefel-Oxidoreduktase-Komplex pumpt Protonen aus der Zelle heraus (Efflux), die beim Reflux in die Zelle den Membran-integrierten c-Ring der ATP-Synthase in Rotation versetzen. Diese Drehbewegung wird auf den A_1 -Teil übertragen und von diesem für die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P_i) genutzt. Dies erklärt, dass die ATP-Produktion bei *I. hospitalis* im Intermembran-Kompartiment abläuft. Die Acetyl-CoA Synthetase liegt assoziiert mit der äußeren Membran vor und ist das erste im IMC nachgewiesene, ATP verbrauchende Enzym.

mitochondrialen ADP/ATP-Translokasen werden auch als ‚ADP/ATP-Carrier‘ (AAC) bezeichnet und gehören zur Familie der mitochondrialen Carrier-Proteine (‚MCF‘) (Klingenberg, 2008). Der Transport ist hochspezifisch auf einen 1:1 Antiport von ADP und ATP ausgelegt, wobei Orthophosphat in Mitochondrien mit Hilfe von eigenen P_i -Carrier über die innere Membran zurücktransportiert wird (Laco *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu sind die nicht-mitochondrialen NTT (‚nucleotide transporter‘) ADP/ATP-Translokasen fähig, ATP im Austausch gegen $ADP + P_i$ über die Membran zu transportieren (Trentmann *et al.*, 2008). Seit längerem wird bereits diskutiert, ob die NTT-Translokasen nicht als eigene Proteinfamilie klassifiziert werden sollen (Haferkamp *et al.*, 2006). ADP/ATP-Translokasen konnten im Genom von *I. hospitalis* jedoch nicht nachgewiesen

werden, was nicht verwunderlich ist, da die Sequenzähnlichkeit der bekannten Translokasen eher gering ist. Welche bisher unbekannt ATP-Transporter *I. hospitalis* in der inneren Membran nutzt, bleibt daher eine spannende offene Frage. Für den Fall eines aktiven Transports müsste die innere Membran allerdings entsprechend energetisiert sein (Forrest *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu einer Gram-negativen Zelle steht damit *I. hospitalis* vor der Aufgabe, Energie von außen nach innen zu transferieren. Der Energietransfer zwischen innerer und äußerer Membran erfolgt bei Gram-negativen Bakterien über die spezifischen Proteine des TonB-Systems (TonB, ExbB und ExbD; Braun, 2006; Braun & Endriss, 2007; Brinkman & Larsen, 2008). Durch BLAST-Analysen konnten aber keine TonB-Homologe in *I. hospitalis* identifizieren werden. Da ein rückwärtiger Energietransfer von außen nach innen bisher noch nicht beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass *I. hospitalis* über andere Transportmechanismen verfügt. Versuche, ein Membranpotential über der inneren Membran von *I. hospitalis* nachzuweisen, blieben ebenso erfolglos, wie Versuche zur Detektion des Membranpotentials über der äußeren Membran. Allerdings scheint dies bisher an einem methodischen Problem bei der Detektion der Fluoreszenzsignale des Membranpotential-Indikators zu liegen. Eine Wiederholung der Versuche unter Verwendung des CLSM erscheint hierbei vielversprechend. Es sollte auf jeden Fall das zukünftige Ziel sein, die indirekte Folgerung einer Energetisierung der äußeren Membran auf direktem Weg zu bestätigen.

Die Energetisierung einer Membran beruht auf der Etablierung einer protonenmotorischen Kraft über derselben. Im Regelfall wird die *pmf* durch zwei Größen bestimmt: die Konzentrationsdifferenz der Protonen (Protonengradient, ΔpH) sowie die elektrische Potentialdifferenz (Membranpotential, $\Delta\psi$) über einer Membran (Kaim & Dimroth, 1999; Dimroth *et al.*, 2000; Nicholls & Ferguson, 2002). Es ist jedoch vom Organismus abhängig (Fischer *et al.*, 2000; Dimroth *et al.*, 2003), in welchem Maße die einzelnen Größen zum Aufbau der *pmf* beitragen. Für Mitochondrien wurde gezeigt, dass der Anteil des Membranpotentials weit über dem des Protonengradienten liegt und in Mitochondrien somit als Haupttriebkraft für die ATP Produktion dient (Serviddio & Sastre, 2010). In nur wenigen Fällen, wie beispielsweise dem der Chloroplasten, wird die *pmf* hauptsächlich aus einem Protonengradienten aufgebaut (Gräber & Witt, 1976; Junesch & Gräber, 1991). Im Fall von *I. hospitalis* ist bisher nicht bekannt, welches Gewicht ΔpH und $\Delta\psi$ bei der Etablierung der *pmf* über der äußeren Membran zukommt. Ein erster großer Schritt wäre hier bereits die Bestimmung der zellinternen pH-Werte von *I. hospitalis*, und zwar sowohl des Cytoplasmas (pH_{Cyt}) als auch des Intermembran-Kompartimentes (pH_{IMC}). Durch den Vergleich des zellexternen pH-Wertes ($\text{pH}_{\text{extern}}$) mit dem pH_{IMC} wäre dann eine Abschätzung des an der Energiekonservierung beteiligten physiologischen ΔpH möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Pilotversuche unternommen, die zellinternen pH-Werte von *I. hospitalis* zu ermitteln, allerdings ohne Erfolg. Dabei fiel die Wahl auf eine bildgebende Methode, die mit Hilfe eines fluoreszenten Indikators (SNARF-1) die pH-Verhältnisse innerhalb einer *I. hospitalis*-Zelle darstellen sollte. Es entstand allerdings der Eindruck, dass der Indikator, der ursprünglich für Eukaryonten entwickelt wurde, nicht mit dem archaeellen, hyperthermophilen System *I. hospitalis* kompatibel war. So konnten die pH-Verhältnisse von Cytoplasma und Intermembran-Kompartiment bisher nicht geklärt werden. Allerdings führen verschiedene Hypothesen zu der

Annahme, dass der pH-Wert des IMC wahrscheinlich eher im Alkalischen als im Sauren liegt. Nimmt man beispielsweise an, dass die ATP-Synthese ausschließlich durch den Protonengradienten über der äußeren Membran angetrieben wird, wäre eine Protonenkonzentrationsdifferenz von etwa $\Delta\text{pH } 3$ zwischen Zelläußerem und IMC notwendig, um eine für die ATP-Synthese ausreichend große pmf aufbauen zu können. Unter optimalen Wachstumsbedingungen ($\text{pH}_{\text{extern}} 5,5-6,0$) würde der pH_{IMC} somit bei etwa $\text{pH } 8,5-9,0$ liegen. Ein alkalischer pH-Wert des IMC wäre auch besser mit der Vorstellung in Einklang zu bringen, dass die ersten Schritte der CO_2 -Fixierung in diesem Kompartiment stattfinden. In diesem Fall könnte eine vorläufige Abschätzung des pH_{IMC} auch über die Bestimmung der pH-Optima der entsprechenden CO_2 -fixierenden Enzyme erfolgen. Die biochemische Charakterisierung könnte hierbei sowohl an endogenen Proteinen aus *I. hospitalis* als auch an rekombinant hergestellten Proteinen durchgeführt werden.

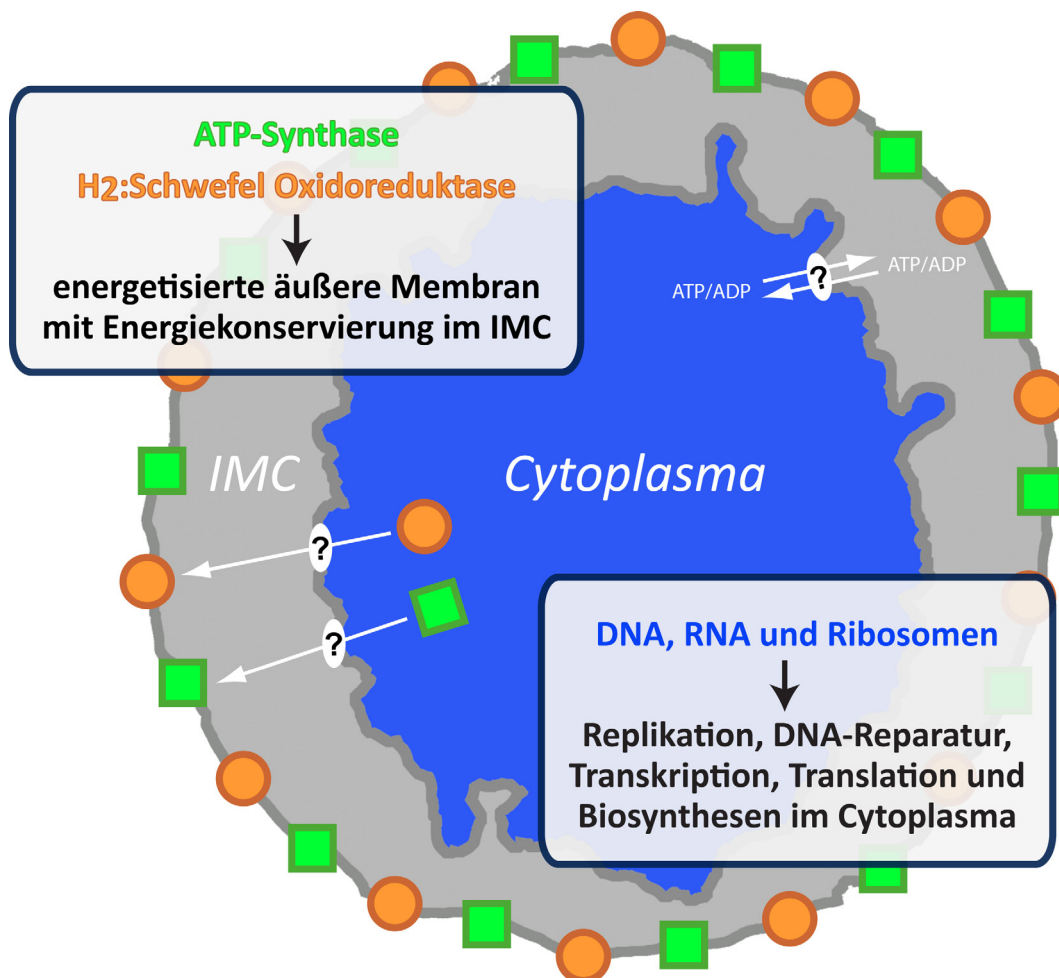


Abb. 35: Schematische Darstellung der funktionellen Kompartimentierung einer *I. hospitalis*-Zelle

Das IMC wurde bisher als metabolisch weitgehend inaktiv angesehen, auch basierend auf der Beobachtung, dass es in Ultradünnschnitten nur wenig kontrastierbares Biomaterial aufweist (Abb. 27). Zusätzlich lässt das Vorhandensein von DNA, RNA und Ribosomen im Cytoplasma bei gleichzeitiger Abwesenheit im Intermembran-Kompartiment den Schluss zu, dass die wichtigen

Prozesse der Informationsverarbeitung (Replikation, Transkription und Translation) im Cytoplasma stattfinden. Auch das anscheinend hocheffiziente DNA-Reparatursystem (Beblo, 2010) muss dementsprechend hier lokalisiert sein. In Verbindung mit der ermittelten Lage der Energiekonservierungsmaschinerie führten die Ergebnisse zu dem Schluss, dass Energiekonservierung und Informationsprozessierung in *I. hospitalis* räumlich getrennt voneinander stattfinden. Damit darf die Unterteilung von *I. hospitalis* in Intermembran-Kompartiment und Cytoplasma nicht nur als räumliche Kompartimentierung, sondern muss vielmehr als funktionelle Kompartimentierung angesehen werden, wie sie derart für einen Prokaryonten noch nicht beschrieben wurde (Abb. 35).

Grundsätzlich wurden Endomembransysteme und eine daraus resultierende Kompartimentierung der Zelle früher als typisch eukaryontisches Charakteristikum angesehen (Dacks & Field, 2007). Mittlerweile kennt man allerdings auch verschiedene Prokaryonten, deren Zellarchitektur durch ein intrazelluläres Membransystem räumlich oder funktionell kompartimentiert wird. Die Hauptfunktion intrazellulärer Membranen liegt in der Vergrößerung der Membranoberfläche, in die metabolisch wichtige Enzyme integriert werden können, was zu einer erhöhten metabolischen Aktivität der Zelle führen kann (Shively, 2006). Das morphologische Erscheinungsbild intrazellulärer Membransysteme kann dabei sehr variabel sein, und von einfachen Invaginationen der Cytoplasmamembran (Heimerl, 2009) bis hin zu membranumschlossenen ‚Organellen‘ reichen (Shively, 2006; Murat *et al.*, 2010). Diese prokaryontischen ‚Organelle‘ können der Zelle dabei als Reaktionsraum für zusätzliche zelluläre Funktionen dienen, wohingegen eine reine Invagination nur unterstützend auf bereits existierende Funktionen wirkt. Solche intrazellulären Membransysteme sind beispielsweise bei Vertretern von phototrophen, methanotrophen und ammonium- wie auch nitritoxidierenden Bakterien zu finden (Madigan *et al.*, 2008; Slonczewski & Foster, 2009). Neben einer metabolischen Funktion können die membranumschlossenen ‚Organelle‘ vielfältigen Zwecken dienen, so auch als reine Speicher für wichtige Substrate oder Metabolite, wie z.B die Nitratvakuolen und Schwefeleinschlüsse bei *Thioploca* oder *Thiomargarita* (Jorgensen & Gallardo, 1999; Schulz *et al.*, 1999).

Interessant für einen Vergleich mit *I. hospitalis* ist aber vor allem das vielgestaltige intrazelluläre Membransystem der *Planctomyceten*. Neben Gram-negativen Bakterien und *Ignicoccus* besitzen auch Vertreter der *Planctomyceten* zwei Membranen, die die Zelle in zwei Kompartimente unterteilen (Rachel *et al.*, 2002; Nikaido, 2003; Fuerst, 2005; Bos *et al.*, 2007). Die Kompartimente werden hier als Paryphoplasma und als Riboplasma bezeichnet. Die Funktion des Paryphoplasma ist noch weitgehend unbekannt; die Hypothese, dass in diesem Kompartiment mRNA lokalisiert ist, ist nicht gut gesichert und beruht nur auf einem Gesamt-RNA-Nachweis mit an Gold gekoppelten RNAase Molekülen (Lindsay *et al.*, 2001). Im Riboplasma befinden sich dagegen nachweislich DNA, RNA und Ribosomen, auch findet hier die ATP-Synthese statt (van Niftrik, 2008; van Niftrik *et al.*, 2010). Von außen nach innen gliedert sich eine *Planctomyceten*-Zelle also wie folgt: Zellwand, Cytoplasmamembran, Paryphoplasma, Intracytoplasmamembran und abschließend das Riboplasma. Im Fall der Anammox-Bakterien ist im Riboplasma ein weiteres membranumschlossenes Organell eingebettet. Dieses sogenannte Anammoxosom dient der Energiekonservierung, d.h. im Anammoxosom laufen katabole Reaktionen ab, die letztendlich für

eine Energetisierung und eine *pmf* über der Anammoxosomenmembran sorgen und dadurch die F_1F_0 ATP-Synthase antreiben (van Niftrik, 2008; van Niftrik *et al.*, 2010). Der F_1 -Subkomplex ist dabei in das Riboplasma gerichtet, so dass ATP-Synthese und Informationsprozessierung nicht wie bei *I. hospitalis* räumlich getrennt sind, sondern gemeinsam im Riboplasma stattfinden. Trotz einer oftmals ähnlichen Zellarchitektur zwischen *Ignicoccus*, Gram-negativen Bakterien und den *Planctomyceten*, zeigt sich, dass daraus nicht direkt auf eine ähnliche Funktion der Kompartimente geschlossen werden kann.

Grundlegend muss für *I. hospitalis* über eine adäquate Terminologie der Membranen und Kompartimente diskutiert werden. Die innere Membran umschließt bei *I. hospitalis* die gesamte Informationsprozessierung und trennt zwei elektronenoptisch deutlich unterscheidbare subzelluläre Räume oder Kompartimente. Da sie so gut wie keine energiekonservierenden Enzymkomplexe besitzt, bleibt die Frage nach ihrer Energetisierung offen. Damit stellt sie definitionsgemäß keine prokaryontische Cytoplasmamembran dar. Im Gegenzug kann aber auch die äußere Membran trotz ihrer Energetisierung nicht als Cytoplasmamembran bezeichnet werden, da sie nicht das Kompartiment der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese umschließt. Eine Neubenennung der Membranen und Kompartimente von *I. hospitalis* ist derzeit nahezu unmöglich. Zum einen fehlen allgemeingültige Definition für Cytoplasma, Periplasma, Cytoplasmamembran oder auch Äußere Membran. Zum anderen ist unser Wissen um die Funktion der Kompartimente und Membranen in *I. hospitalis* noch zu gering, um eine exakte Neubenennung der Strukturen vertreten zu können. Dennoch können wir für den Raum zwischen diesen beiden Membranen den klassischen Terminus Periplasma ausschließen, da hier die ATP-Synthese stattfindet. Wegen der noch unvollständigen Daten zur Funktionalität dieses Raums erscheint die „neutrale“ Bezeichnung Intermembran-Kompartiment (IMC) derzeit am passendsten. Es bleibt daher zu klären, welche weiteren zellbiologischen und biochemischen Reaktionen darin ablaufen. Die im IMC lokalisierte ATP-Synthase impliziert, dass hier auch energieverbrauchende Prozesse in größerem Umfang stattfinden. Welche, vielleicht ungeahnte, zellbiologische Relevanz dieses Kompartiment für *I. hospitalis* noch spielt, und ob hier weitere wichtige zelluläre Prozesse ablaufen, wird derzeit untersucht. So kann über die Vielzahl der möglichen Reaktionen zurzeit nur spekuliert werden. Allerdings konnten Immunlokalisationsexperimente an Ultradünnschnitten neben der Maschinerie für die Energiekonservierung kürzlich auch ein erstes energiekonsumierendes Enzym im IMC nachweisen. So wurde gezeigt, dass die Acetyl-CoA-Synthetase im IMC mit der äußeren Membran assoziiert vorliegt und nicht wie erwartet frei im Cytoplasma (Mayer *et al.*, in Vorbereitung). Die subzelluläre Lage der Acetyl-CoA-Synthetase, die die ATP-abhängige Reaktion von Acetat und Coenzym A zu Acetyl-CoA, AMP und PP_i katalysiert (Abb. 34), lässt vermuten, dass hier weitere Schritte der CO_2 -Fixierung ablaufen könnten, allen voran die energieaufwendigen Schritte der Pyruvat-Synthetase und der PEP-Carboxylase, die zur Bildung von Pyruvat bzw. Oxalacetat führen (Huber *et al.*, 2008). Im IMC könnten auch weitere Aktivierungsprozesse bestimmter Metabolite mit Coenzym A, wie beispielsweise Succinat, ablaufen. Um genauere Vorhersagen über die Funktionalität des IMC machen zu können, wäre vor allem wichtig, die physikochemische Beschaffenheit des IMC zu klären, z.B. den bereits angesprochenen pH-Wert, die Na^+ - oder K^+ -Konzentration oder auch die Gesamtosmolarität. Aufgrund der Synthese von ATP im IMC liegt auch

eine erhöhte Phosphatkonzentration im Bereich des vorstellbaren. Und natürlich dürfen die osmoprotektiven und thermostabilisierenden kompatiblen Solute nicht außer Acht gelassen werden, allen voran phosphathaltige kompatible Solute wie die Phosphodiester Diglycerolphosphat (DGP) und Dimyoinositolphosphat (DIP), die bevorzugt von Hyperthermophilen für thermoprotektive Zwecke eingesetzt werden (Empadinhas & da Costa, 2006). Allerdings war durch BLAST-Analysen nicht eindeutig zu klären, ob die entsprechenden Gene für die Synthese von DIP, das bereits in den nahen Verwandten *H. butylicus*, *P. occultum* und *A. pernix* nachgewiesen wurde, im Genom von *I. hospitalis* vorhanden sind (Rodrigues *et al.*, 2007; Empadinhas & da Costa, 2008).

Trotz der außergewöhnlichen und faszinierenden Eigenschaften des IMC darf die Wichtigkeit des Cytoplasmas für die *Ignicoccus*-Zelle als Gesamtes nicht vergessen werden. Hier finden die essentiellen Biosynthesen statt. Hier wird die DNA repliziert, die DNA in RNA transkribiert und die RNA translatiert. Die Kenntnis über die Trennung der Funktionen von Informationsprozessierung und Energiekonservierung eröffnet ein weites Feld an Spekulationen, die sogar versuchen, in *I. hospitalis* einen möglichen Vorläufer der Eukaryonten zu sehen. Dementsprechend führte die Vorstellung eines membranumschlossenen, DNA beinhaltenden Kompartiments schnell zu der Frage, ob dies nicht eine Art Zellkern bzw. Zellkernvorläufer sei. Auch wenn einige Theorien der Evolution von Eukaryonten davon ausgehen, dass ein archaeller Vorfahre eine bakterielle Zelle inkorporierte (Poole & Penny, 2007), bleibt dies eine gewagte Vermutung. Genauso spekulativ ist die Hypothese, dass *Planctomyces* aufgrund ihrer Zellarchitektur optimale Kandidaten für einen eukaryontischen Vorfahren wären (Forterre & Gribaldo, 2010; Gribaldo *et al.*, 2010). Begründet wird dies neben der Zellarchitektur darauf, dass kürzlich für die Gattung *Gemmata* Proteine identifiziert wurden, die Proteinen eines eukaryontischen Endocytosesystems gleichen, das bei Prokaryonten derart noch nie zuvor beschrieben wurde (Lonhienne *et al.*, 2010). Dennoch wird die Frage um den „letzten Vorfahren“ der Eukaryonten weder durch die Entdeckungen in *Gemmata* noch durch die in *Ignicoccus* in der nahen Zukunft geklärt werden, aber die neuen Erkenntnisse um die funktionelle Trennung in *I. hospitalis* dienen immer wieder als Zündfunke für kontroverse Diskussionen.

Vor diesem Hintergrund stellt sich auch die Frage, wie die ATP-Synthase und die H₂:Schwefel-Oxidoreduktase von ihrem Syntheseort über die innere Membran an ihren Zielort gelangen. Mögliche Erklärungen schließen auf jeden Fall die beiden klassischen Transportsysteme, das ‚twin arginine translocation‘-System (Tat) (Robinson & Bolhuis, 2001) und das ‚secretion‘-System (Sec) (Pohlschröder *et al.*, 2005; Gold *et al.*, 2007) mit ein. Das Tat-System ist für Bakterien, Archaeen und Chloroplasten beschrieben, wobei es Proteine im gefalteten Zustand über die Membran transportiert. In Bakterien wird es sogar mit dem Transport von Co-Faktor-beihaltenden Redoxenzymen in Verbindung gebracht, die bereits vor dem Transport im Cytoplasma assembliert werden (Berks *et al.*, 2005). Die Mehrzahl der nicht-cytosolischen Proteine wird allerdings im entfaltenen Zustand über das SEC-Translocon transportiert (Albers *et al.*, 2006). Für *I. hospitalis* konnten im Genom die essentiellen Komponenten beider Transportsysteme (Tat: TatA, TatC; Sec: SecYEG, FtsY, SRP) annotiert werden (Podar *et al.*, 2008; Ridder *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010), wobei SecY bisher als einziges der beteiligten Protein durch MALDI-TOF MS/MS nachgewiesen

wurde (Burghardt, 2008). Erstaunlicherweise waren über bioinformatische Analysen nur für zwei der Untereinheiten von ATP-Synthase und H₂Schwefel-Oxidoreduktase eine Tat- bzw. Sec-spezifische Signalsequenzen zu identifizieren. Dabei war das Tat-Signal Igni1366, als kleine Untereinheit der Hydrogenase, und das Sec-Signal der c-Untereinheit der ATP-Synthase (Igni0682) zuzuordnen. In *I. hospitalis* könnte der Transport zur äußeren Membran auch über die hochdynamischen Vesikel stattfinden. Unterstützt wird diese Hypothese durch Immunmarkierungen von Ultradünnschnitten, in denen die ATP-Synthase vereinzelt auch in den Vesikeln zu lokalisieren war (Heimerl, 2009; Flechsler, 2010). Da die Lipidzusammensetzung der Vesikel noch nicht geklärt wurde, kann derzeit nicht gesagt werden, ob diese der Lipidzusammensetzung der inneren oder der äußeren Membran gleicht. Ein Vesikeltransport kann derzeit somit den Transfer durch das weite IMC erklären, aber noch nicht, auf welche Art und Weise die Proteine von den Vesikeln in die äußere Membran transferiert werden. Im einfachsten Fall wäre hier natürlich eine Fusion der Vesikel mit der äußeren Membran denkbar (Näther & Rachel, 2004). Vor dem Hintergrund, dass *I. hospitalis*-Zellen eine gewisse Polarität aufweisen, bei der das Cytoplasma immer an einer Stelle mit der äußeren Membran in Kontakt zu sein scheint, wäre auch ein direkter Transport über diese Kontaktstelle möglich. In diesem Fall müsste das Protein nicht erst in Vesikel verpackt werden, um durch das IMC zur äußeren Membran transportiert zu werden, sondern könnte aus dem Cytoplasma heraus direkt in die Zielmembran integriert werden. Derzeit kann allerdings keine der Spekulationen bewiesen werden; die Ergebnisse der Immunmarkierungsversuche sprechen eher für einen vesikelbasierten Transport (Flechsler, 2010). Der unterschiedliche Aufbau der inneren und äußeren Membran stellt nicht nur ein Problem für eine mögliche Fusion der Vesikel mit der äußeren Membran dar, sondern für die gesamte *Ignicoccus*-Zelle. Da die bisher untersuchten Membranen aus Dietherlipiden bei hohen Temperaturen weniger protonendicht zu sein scheinen als Membranen aus Di- und Tetraetherlipiden (Albers *et al.*, 2001), steht *I. hospitalis* vor der Aufgabe, dieser passiven Diffusion entgegenzuwirken. Einige Organismen wirken dem hohen Influx von Protonen durch eine drastische Erhöhung der Atmungsaktivität entgegen, um die *pmf* über der Membran aufrecht erhalten zu können (de Vrij *et al.*, 1988). Dies könnte den extrem hohen Schwefelumsatz von *I. hospitalis* erklären, der im Durchschnitt bei etwa 0,2 g Schwefel / h pro Liter Medium liegt. Die hohe Protonendiffusion über die äußere Membran würde von *I. hospitalis* folglich durch eine Steigerung der Schwefelatmung kompensiert. Die Koppelung der Energiekonservierung an Na⁺ Ionen wäre in diesem Fall von Vorteil, da Na⁺-Ionen eine deutlich geringere Diffusion über Membranen aufweisen als Protonen. Allerdings deuten alle bisherigen Ergebnisse auf eine Kopplung der Energiekonservierung von *I. hospitalis* an einen Protonengradienten hin.

3.2. Konsequenzen für die Cokultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans*

Als einziger bekannter Wirt von *N. equitans* nimmt *I. hospitalis* derzeit eine Sonderstellung innerhalb der Gattung *Ignicoccus* ein. Desweiteren besitzt er, anscheinend ebenfalls als einzige Spezies innerhalb der Gattung, einen neuartigen porenähnlichen Proteinkomplex: Ihomp1 (Burghardt *et al.*, 2007). Dieses Protein ist wie die ATP-Synthase ausschließlich in der äußeren Membran lokalisiert. Es wird vermutet, dass Ihomp1 eine wichtige Rolle in der Assoziation mit

N. equitans spielt und *I. hospitalis* dadurch als einziger Wirt in Frage kommt (Burghardt, 2008; Heimerl, 2009). Dies führte vorerst auch zu der Überlegung, ob die ungewöhnliche Lage der ATP-Synthase eine weitere Eigenheit von *I. hospitalis* ist und womöglich unerlässlich für die Partnerschaft der beiden Mikroorganismen. Aufgrund des nachgewiesenen Aminosäure- und Lipidimports aus *I. hospitalis* (Jahn *et al.*, 2004, Huber *et al.*, 2008) stellte sich die Frage, ob *N. equitans* auch seine Energie, in Form von ATP, direkt von seinem Wirt bezieht oder ob doch die eigene rudimentäre ATP-Synthase (Waters *et al.*, 2003; Lewalter & Müller, 2006) für eine selbstständige ATP-Synthase genutzt werden kann. Solange aber die Funktionalität der ATP-Synthase von *N. equitans* nicht bewiesen ist und keine primäre Protonenpumpe identifiziert wurde, ist ein ATP-Import die plausible Hypothese, um die Deckung des Energiebedarfs von *N. equitans* erklären zu können. Die Lage der ATP-Synthase von *I. hospitalis* führt auch hierbei zu neuen Erklärungsmöglichkeiten, warum ein minimal ausgestatteter Organismus wie *N. equitans*, der womöglich selbstständig keine Energie konservieren kann, außerhalb seines Wirts überlebt. Die an der äußeren Membran lokalisierte ATP-Synthase und der damit einhergehende hohe ATP-Gehalt im IMC von *I. hospitalis* könnte *N. equitans* die direkte Aufnahme von ATP erheblich erleichtern. Anstatt ATP über die innere und äußere Membran des Wirts sowie die eigene Cytoplasmamembran zu transportieren, müsste ATP jetzt „nur noch“ zwei Membranen passieren, um für *N. equitans* verfügbar zu sein. Tatsache ist, dass die Untereinheiten der ATP-Synthase von *N. equitans* exprimiert werden und teilweise (Untereinheit: A, B und a) bereits über MALDI-TOF MS/MS identifiziert werden konnten (Burghardt, 2008). Allerdings war bisher mit keinem Antikörper eine Immunmarkierung einer ATP-Synthase in *N. equitans* möglich. Außerdem sind die für einen ATP-Import notwendigen Transporter noch nicht identifiziert, da weder im Genom von *N. equitans* noch von *I. hospitalis* Gene für bekannte ADP/ATP-Translokasen (NTT und MCF) zu finden sind. Betrachtet man aber die annotierten Untereinheiten der ATP-Synthase von *N. equitans* genauer, fällt auf, dass die c-Untereinheit ein Na⁺-Bindemotiv besitzt, und nicht wie *I. hospitalis* ein H⁺-Bindemotiv. Ein Na⁺-Bindemotiv ist typisch für die c-Untereinheiten vieler Endosymbionten, wie *Mycoplasma genitalium*, *Treponema pallidum* oder auch für ATP-Parasiten wie *Chlamydia trachomatis* und *Borrelia burgdorferi* (Häse *et al.*, 2001; Dzioba *et al.*, 2003). Dabei muss *Borrelia burgdorferi* für einen Vergleich mit *N. equitans* besonders hervorgehoben werden, da es ebenfalls keine bekannte primäre Protonenpumpe besitzt. Die ATP-Synthase wird von *Borrelia burgdorferi* nur für ATP-Hydrolyse-Zwecke verwendet, um eine *pmf* über der Membran aufzubauen. Ob dies auch der Fall für *N. equitans* ist, bleibt derzeit mehr als spekulativ. Eine mögliche Kopplung der ATP-Synthase von *N. equitans* an Na⁺-Ionen könnte aber teilweise erklären, warum die auf Säurezugabe basierenden ‚pH-Jump‘-Experimente zwar an *I. hospitalis*-Zellen, nicht aber an ganzen *N. equitans*-Zellen funktioniert haben (Mayer, 2008).

4. Lage der ATP-Synthase von *I. hospitalis*: Ein einzigartiges Phänomen?

Die Frage, ob die Lage der ATP-Synthase sowie die Energetisierung der äußeren Membran einzigartig für die Spezies *I. hospitalis* ist, kann bereits verneint werden. Immunmarkierungs-

experimente mit *I. islandicus*, *I. pacificus* und „*I. morulus*“ Mex13A zeigten zumindest bei Versuchen mit ganzen Zellen eine eindeutige Markierung in der äußeren Membran (Daxer, mündliche Mitteilung). Versuche an Ultradünnschnitten führten bisher nur mit *I. islandicus* zu Immunmarkierungen, die eine exklusive Lage in der äußeren Membran belegen könnten (Flechsler, 2010). Auffällig war hierbei, dass die Markierungsintensität sowohl an ganzen Zellen von *I. islandicus* wie auch an Ultradünnschnitten deutlich niedriger war als bei den anderen *Ignicoccus*-Spezies. Im Vergleich mit den Ergebnissen von *I. hospitalis* lässt sich aber alleine durch die Immunfluoreszenz folgern, dass die ATP-Synthase mit großer Wahrscheinlichkeit in der äußeren Membran aller Vertreter der Gattung *Ignicoccus* lokalisiert ist. Diese Tatsache widerlegt allerdings die Vermutung, dass die besondere Lage des Enzyms eine Grundlage für die Assoziation zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* ist. Mehr noch ist davon auszugehen, dass die äußere Membran der verbleibenden *Ignicoccus*-Spezies in einer zu *I. hospitalis* vergleichbaren Art und Weise energetisiert ist. Auch wenn bisher keine Genomsequenzen für *I. islandicus*, *I. pacificus* und „*I. morulus*“ Mex13A verfügbar sind, zeigen die physiologischen und ultrastrukturellen Untersuchungen zu *I. hospitalis* identische Eigenschaften (Huber *et al.*, 2000; Paper *et al.*, 2007; Lange, 2009) und lassen den Schluss zu, dass die *pmf* auch bei den anderen Spezies über eine H₂:Schwefel-Oxidoreduktase aufgebaut wird und ATP im Intermembran-Kompartiment synthetisiert wird.

Experimentelle Hinweise für eine mögliche Lokalisation von ATP-Synthase/ATPase-Komplexen in einer äußeren Membran konnte auch über die Domänengrenze hinaus bei Vertretern der Gattung *Thermotoga* erhalten werden (Wartner, 2010). Allerdings erscheint es hier eher unwahrscheinlich, dass die Membran zugleich über eine primäre Protonenpumpe wie bei *Ignicoccus* energetisiert wird, da der bevorzugte Weg zur ATP-Gewinnung bei *Thermotoga* die Substratkettenphosphorylierung ist, die vermutlich im Cytoplasma abläuft. Zugleich war nicht eindeutig zu klären, ob die ATPase in beiden Membranen oder nur der äußeren Membran, der ‚Toga‘, lokalisiert ist. Unabhängig davon ist es vorstellbar, dass das Enzym nicht zur ATP-Synthese, sondern zum Aufbau einer protonenmotorischen Kraft über der äußeren Membran benötigt wird. Klassisch wird *Thermotoga* zwar den Gram-negativen Bakterien zugeordnet, doch stellt sich mittlerweile die Frage, ob dies so korrekt ist. *Thermotoga* besitzt kein LPS, ein signifikanter Teil der Gene ist archaellen Ursprungs (lateraler Gentransfer), es besitzt teilweise archaelle Tetraetherlipide in seiner Membran und nun es gibt Hinweise, dass die ATPase in der äußeren Membran lokalisiert ist (Nelson *et al.*, 1999; Sutcliffe, 2010). Insgesamt entspricht dies nicht der klassischen Definition von Gram-negativen Bakterien (Beveridge, 1999; Nikaido, 2003). Welche Relevanz diese Lokalisation für *Thermotoga* letztendlich hat, bleibt abzuwarten. Geplante biochemische Detailanalysen und elektronenmikroskopische Studien sollen den genauen Sachverhalt für *T. maritima* noch klären.

5. Ausblick

Die Gattung *Ignicoccus* fasziniert und überrascht, seitdem ihr erster Vertreter *I. islandicus* entdeckt wurde. Noch ungewöhnlicher ist ihr Vertreter *I. hospitalis*, nicht zuletzt als einziger bekannter Wirt von *N. equitans*. In den letzten Jahren gelangen wichtige Einblicke in die Zellbiologie und Ultrastruktur von *I. hospitalis*. Neben der Entdeckung des Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus als

sechsten CO₂-Fixierungsweg (Huber *et al.*, 2008), des neuartigen Ihomp1-Porenkomplexes (Burghardt *et al.*, 2007) und den kürzlich beschriebenen außergewöhnlichen ‚Fibers‘ (Müller *et al.*, 2009; Meyer, 2010), haben auch die hier präsentierten Ergebnisse mit zu dem neuen Verständnis von *I. hospitalis* beigetragen. Die derzeitige Datenlage unterstützt die Vorstellung, dass *I. hospitalis* einen hochorganisierten prokaryontischen Organismus von nicht geahntem Ausmaß darstellt. Zusätzlich wurde durch das neue Wissen um eine energetisierte äußere Membran und die damit einhergehende funktionelle Kompartimentierung ein neues Feld für Untersuchungen eröffnet, die vorher nicht vorstellbar waren. Für die Zukunft bedeutet dies, dass es umso wichtiger wird, die Komplexe der Energiekonservierung zu charakterisieren und sowohl ATP-Synthase wie auch H₂:Schwefeloxidoreduktase mit bekannten Enzymen zu vergleichen, um eventuell Rückschlüsse hinsichtlich der außergewöhnlichen Funktion und Lage ziehen zu können. Bezüglich der H₂:Schwefeloxidoreduktase laufen bereits erste erfolgreiche Untersuchungen (Forth, 2010), die in Zusammenarbeit mit PD Dr. Arnulf Kletzin und seiner Arbeitsgruppe in Darmstadt durchgeführt werden. Für die Charakterisierung der ATP-Synthase von *I. hospitalis* sollte angestrebt werden, den gekoppelten Komplex über affinitätschromatographische Verfahren zu reinigen, nicht nur für eine weitere Charakterisierung des Enzyms, sondern auch für einen Vergleich mit dem Enzymkomplex von *N. equitans*. Zur Optimierung der Solubilisierung sollten weitere Detergenzien auf eine mögliche Eignung getestet werden, allen voran Digitonin. Zusätzlich sollten spezifische Antikörper gegen Untereinheiten der ATP-Synthase von *N. equitans* generiert werden, um eine Immundetektion des Enzyms für zukünftige Untersuchungen zu ermöglichen. Dabei wäre wichtig, die Antikörper nicht nur in Kaninchen, sondern möglichst auch in Maus und/oder Huhn zu generieren, damit Kollaborationsstudien ermöglicht werden. Gleiches gilt auch für Antikörper gegen die ATP-Synthase und H₂:Schwefeloxidoreduktase von *I. hospitalis*. Ein entscheidender Punkt wäre auch ein direkter Nachweis eines Membranpotentials über der äußeren Membran, um mögliche Zweifel an diesem Befund auszuräumen. Des Weiteren sollte versucht werden, die Beschaffenheit des IMC zu klären. Denkbar wären hierbei Versuche zur Ermittlung des pH-Wertes, ein Nachweis von kompatiblen Soluten, wie beispielsweise DIP und ionenspezifische Untersuchungen, z.B. mittels ‚Inductive Coupled Plasma‘-Analysen (ICP) oder energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) an Kryoschnitten. Letztendlich sollte aber das anfängliche Ziel, die Klärung der Funktionalität der ATP-Synthase von *N. equitans* wie auch der generellen bioenergetischen Verhältnisse der Cokultur Kin4M, nicht aus den Augen verloren werden.

V. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die A_1A_0 ATP-Synthase von *I. hospitalis* zu reinigen und die Untereinhenzussammensetzung des Komplexes zu bestimmen. Obwohl der gekoppelte Komplex erfolgreich durch das Detergenz DDM (n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid) aus der Membran herausgelöst werden konnte, war eine Reinigung des Gesamtkomplexes bisher nicht möglich. Zahlreiche Versuche, das Enzym über säulenchromatographische Verfahren zu reinigen, führten lediglich zu einer Anreicherung der dissoziierten A_1 - und A_0 -Subkomplexe der ATP-Synthase. Eine Identifizierung der Untereinheiten war durch eine Kombination von 2D-Native/SDS-PAGE, Western-Blot-Analysen und MALDI-TOF MS/MS möglich. So konnte die *in vivo* Expression von acht annotierten Untereinheiten der ATP-Synthase (A, B, C, D, E, F, a(I) und c(K)) bestätigt und das Protein Igni1215 als Bestandteil der ATP-Synthase (Untereinheit H) identifiziert werden. Die beiden erhaltenen Subkomplexe bestanden aus A, B, E und F (A_1) und aus C, D, H und a (A_0). Die Untereinheit c war nur unregelmäßig als Bestandteil des A_0 -Subkomplexes nachzuweisen. Der A_1 -Subkomplex wurde erfolgreich über zwei Chromatographien gereinigt. Durch LILBID-MS wurde die molekulare Masse des A_1 -Subkomplexes auf 390 kDa und die Stöchiometrie zu A_3B_3EF bestimmt. Erste Kristallisationsversuche mit dem gereinigten A_1 -Komplex führten bereits zu einem Kristall, der eine Röntgenbeugung mit Reflexen von bis zu 2,8 Å erreichte. Allerdings war der Kristall zu klein, um einen vollständigen Datensatz für eine erfolgreiche Strukturaufklärung zu sammeln. Die ATP-Synthasefähigkeit der A_1A_0 ATP-Synthase wurde durch sogenannte ‚pH-Jump‘ Experimente an frischen, intakten *I. hospitalis*-Zellen bewiesen. Hierbei konnte die ATP-Synthase durch den künstlich angelegten Protonengradienten signifikant stimuliert und durch die Behandlung mit den Inhibitoren DES, DCCD, TBT sowie dem Protonophor TCS inhibiert werden. Das Fehlen eines Na^+ -Bindemotivs in der c-Untereinheit deutet darauf hin, dass *I. hospitalis* Protonen als Kopplungionen verwendet.

Die subzelluläre Lage der A_1A_0 ATP-Synthase wurde nach Immunmarkierung von ganzen *I. hospitalis*-Zellen und an Ultradünnschnitten durch fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen geklärt. Überraschenderweise zeigten die Immunmarkierungsversuche, dass die ATP-Synthase nicht in der inneren, sondern in der äußeren Membran von *I. hospitalis* lokalisiert ist. In gleicher Weise wurde auch die H_2 :Schwefel-Oxidoreduktase in der äußeren Membran lokalisiert, was zu dem Schluss einer energetisierten äußeren Membran von *I. hospitalis* und einer ATP-Synthase im Intermembran-Kompartiment führte. Im Gegensatz dazu wurden DNA, RNA und Ribosomen im Cytoplasma lokalisiert. Folglich findet die Energiekonservierung in *I. hospitalis* räumlich getrennt von der Informationsprozessierung statt. Damit wurde für *I. hospitalis* eine funktionelle Kompartimentierung nachgewiesen, die derart für einen Prokaryonten noch nicht beschrieben wurde.

VI. Literaturverzeichnis

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. und Walker, J.E. (1994).** Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628.
- Aksimentiev, A., Balabin, I.A., Fillingame, R.H. und Schulten, K. (2004).** Insights into the molecular mechanism of rotation in the F₀ sector of ATP synthase. *Biophys. J.* **86**, 1332-1344.
- Albers, S.V., van de Vossenberg, J.L., Driessen, A.J. und Konings, W.N. (2001).** Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles* **5**, 285-294.
- Albers, S.-V., Szabó, Z. und Driessen, A.J.M. (2006).** Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 537-547.
- Amend, J.P. und Shock, E.L. (2001).** Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 175-243.
- Aufurth, S., Schägger, H. und Müller, V. (2000).** Identification of subunits a, b, and c1 from *Acetobacterium woodii* Na⁺-F₁F₀-ATPase. Subunits c1, c2, AND c3 constitute a mixed c-oligomer. *J. Biol. Chem.* **275**, 33297-33301.
- Bae, T.-J., Kim, M.-S., Kim, J.-W., Kim, B.-W., Choo, H.-J., Lee, J.-W., Kim, K.-B., Lee, C.S., Kim, J.-H., Chang, S.Y., et al. (2004).** Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface. *Proteomics* **4**, 3536-3548.
- Bagos, P.G., Tsigirigos, K.D., Plessas, S.K., Liakopoulos, T.D. und Hamodrakas, S.J. (2009).** Prediction of signal peptides in archaea. *Protein Eng. Des. Sel.* **22**, 27-35.
- Ballmoos, C. von, Cook, G.M. und Dimroth, P. (2008).** Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 43-64.
- Ballmoos, C. von, Wiedenmann, A. und Dimroth, P. (2009).** Essentials for ATP synthesis by F₁F₀ ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 649-672.
- Beblo, K. (2010).** Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit thermophiler und hyperthermophiler Mikroorganismen nach Trocknung und Strahlenexposition. *Dissertation*, Universität Regensburg.
- Becher, B. und Müller, V. (1994).** Delta mu Na⁺ drives the synthesis of ATP via an delta mu Na⁺-translocating F₁F₀-ATP synthase in membrane vesicles of the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Bacteriol.* **176**, 2543-2550.
- Berks, B.C., Palmer, T. und Sargent, F. (2005).** Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 174-181.
- Berry, S. (2002).** The chemical basis of membrane bioenergetics. *J. Mol. Evol.* **54**, 595-613.

- Beveridge, T.J. (1999).** Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725-4733.
- Beveridge, T.J., Pouwels, P.H., Sára, M., Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Kari, K., Kerosuo, E., Haapasalo, M., Egelseer, E.M., Schocher, I., et al. (1997).** Functions of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 99-149.
- Beyenbach, K.W. und Wiczorek, H. (2006).** The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* **209**, 577-589.
- Biegel, E. und Müller, V. (2010).** Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 18138-18142.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Boekema, E.J., van Breemen, J.F., Brisson, A., Ubbink-Kok, T., Konings, W.N. und Lolkema, J.S. (1999).** Connecting stalks in V-type ATPase. *Nature* **401**, 37-38.
- Bos, M.P., Robert, V. und Tommassen, J. (2007).** Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 191-214.
- Boyer, P.D. (1993).** The binding change mechanism for ATP Synthase - some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 215-250.
- Boyer, P.D. (1997).** The ATP Synthase - a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717-749.
- Braun, V. (2006).** Energy transfer between biological membranes. *ACS Chem. Biol.* **1**, 352-354.
- Braun, V. und Endriss, F. (2007).** Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals* **20**, 219-231.
- Brinkman, K.K. und Larsen, R.A. (2008).** Interactions of the energy transducer TonB with noncognate energy-harvesting complexes. *J. Bacteriol.* **190**, 421-427.
- Buchanan, S.K. und Walker, J.E. (1996).** Large-scale chromatographic purification of F₁F₀-ATPase and complex I from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **318**, 343-349.
- Burghardt, T. (2008).** Einblicke in die Interaktion zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*: Das Membranprotein lhomp1 sowie Nachweis weiterer Proteine der Zellhüllen. *Dissertation*, Universität Regensburg.
- Burghardt, T., Näther, D.J., Junglas, B., Huber, H. und Rachel, R. (2007).** The dominating outer membrane protein of the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*: a novel pore-forming complex. *Mol. Microbiol.* **63**, 166-176.
- Burré, J., Wittig, I. und Schägger, H. (2009).** Non-classical 2-D electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **564**, 33-57.
- Cao-Hoang, L., Marechal, P.-A., Lê-Thanh, M., Gervais, P. und Waché, Y. (2008).** Fluorescent probes to evaluate the physiological state and activity of microbial biocatalysts: a guide for prokaryotic and eukaryotic investigation. *Biotechnol. J.* **3**, 890-903.
- Champagne, E., Martinez, L.O., Collet, X. und Barbaras, R. (2006).** Ecto-F₁F₀ ATP synthase/F₁ ATPase: metabolic and immunological functions. *Curr. Opin. Lipidol.* **17**, 279-284.

- Chi, S.L. und Pizzo, S.V. (2006).** Cell surface F_1F_0 ATP synthase: a new paradigm? *Ann. Med.* **38**, 429-438.
- Coskun, U., Chaban, Y.L., Lingl, A., Müller, V., Keegstra, W., Boekema, E.J. und Grüber, G. (2004).** Structure and subunit arrangement of the A-type ATP synthase complex from the archaeon *Methanococcus jannaschii* visualized by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **279**, 38644-38648.
- Cross, R.L. und Müller, V. (2004).** The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H^+ /ATP coupling ratio. *FEBS Lett.* **576**, 1-4.
- Dacks, J.B. und Field, M.C. (2007).** Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode. *J. Cell. Sci.* **120**, 2977-2985.
- Day, C.A. und Kenworthy, A.K. (2009).** Tracking microdomain dynamics in cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 245-253.
- Delaye, L. und Moya, A. (2010).** Evolution of reduced prokaryotic genomes and the minimal cell concept: variations on a theme. *Bioessays* **32**, 281-287.
- Dietrich, W. und Klimmek, O. (2002).** The function of methyl-menaquinone-6 and polysulfide reductase membrane anchor (PsrC) in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1086-1095.
- Dimroth, P., Kaim, G. und Matthey, U. (2000).** Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F_1F_0 ATP synthases. *J. Exp. Biol.* **203**, 51-59.
- Dimroth, P., Ballmoos, C. von, Meier, T. und Kaim, G. (2003).** Electrical power fuels rotary ATP synthase. *Structure* **11**, 1469-1473.
- Dirmeier, R., Keller, M., Frey, G., Huber, H. und Stetter, K.O. (1998).** Purification and properties of an extremely thermostable membrane-bound sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic *Pyrodictium abyssi*. *Eur. J. Biochem.* **252**, 486-491.
- Dirmeier, R. (1998).** Untersuchungen membrangebundener Enzymkomplexe zur lithotropen Energiegewinnung durch Schwefelatmung aus *Pyrodictium abyssi* Isolat TAG11. *Dissertation*, Universität Regensburg.
- Dzioba, J., Häse, C.C., Gosink, K., Galperin, M.Y. und Dibrov, P. (2003).** Experimental verification of a sequence-based prediction: F_1F_0 -type ATPase of *Vibrio cholerae* transports protons, not Na^+ ions. *J. Bacteriol.* **185**, 674-678.
- Edidin, M. (2003).** The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257-283.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H. (2007).** Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* **2**, 953-971.
- Empadinhas, N. und da Costa, M.S. (2006).** Diversity and biosynthesis of compatible solutes in hyper/thermophiles. *Int. Microbiol.* **9**, 199-206.
- Empadinhas, N. und da Costa, M.S. (2008).** Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int. Microbiol.* **11**, 151-161.

- Engelhardt, H. (2007a).** Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *J. Struct. Biol.* **160**, 115-124.
- Engelhardt, H. (2007b).** Mechanism of osmoprotection by archaeal S-layers: a theoretical study. *J. Struct. Biol.* **160**, 190-199.
- Fillingame, R.H. (1997).** Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F₁F₀-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. *J. Exp. Biol.* **200**, 217-224.
- Fischer, S., Graber, P. und Turina, P. (2000).** The activity of the ATP synthase from *Escherichia coli* is regulated by the transmembrane proton motive force. *J. Biol. Chem.* **275**, 30157-30162.
- Flechsler, J. (2010).** Immunlokalisation von Proteinkomplexen und Enzymen an Isolaten der hyperthermophilen Archaeen der Gattung *Ignicoccus*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Forrest, L.R., Krämer, R. und Ziegler, C. (2011).** The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1807** 167-188
- Forster, P. und Gribaldo, S. (2010).** Bacteria with a eukaryotic touch: a glimpse of ancient evolution? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12739-12740.
- Forth, M. (2010).** Aufreinigung und Charakterisierung des Hydrogenase / Schwefelreduktase Komplexes aus *Ignicoccus hospitalis*. *Diplomarbeit*, Technische Universität Darmstadt.
- Fritz, M. und Müller, V. (2007).** An intermediate step in the evolution of ATPases-the F₁F₀-ATPase from *Acetobacterium woodii* contains F-type and V-type rotor subunits and is capable of ATP synthesis. *FEBS J.* **274**, 3421-3428.
- Fuerst, J.A. (2005).** Intracellular compartmentation in planctomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 299-328.
- Futai, M. und Kanazawa, H. (1983).** Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F₀F₁): biochemical and molecular biological approaches. *Microbiol. Rev.* **47**, 285-312.
- Futai, M., Noumi, T. und Maeda, M. (1989).** ATP synthase (H⁺-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 111-136.
- Futai, M., Omote, H., Sambongi, Y. und Wada, Y. (2000).** Synthase (H⁺-ATPase): coupling between catalysis, mechanical work, and proton translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 276-288.
- Garavito, R.M. und Ferguson-Miller, S. (2001).** Detergents as tools in membrane biochemistry. *J. Biol. Chem.* **276**, 32403-32406.
- Gogarten, J.P. und Taiz, L. (1992).** Evolution of proton pumping ATPases: Rooting the tree of life. *Photosynthesis Research* **33**, 137-146.
- Gold, V.A.M., Duong, F. und Collinson, I. (2007).** Structure and function of the bacterial Sec translocon. *Mol. Membr. Biol.* **24**, 387-394.
- Gräber, P. und Witt, H.T. (1976).** Relations between the electrical potential, pH gradient, proton flux and phosphorylation in the photosynthetic membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **423**, 141-163.
- Gribaldo, S., Poole, A.M., Daubin, V., Forster, P. und Brochier-Armanet, C. (2010).** The origin of eukaryotes and their relationship with the Archaea: are we at a phylogenomic impasse? *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 743-752.

- Grossmann, G., Opekarova, M., Novakova, L., Stolz, J. und Tanner, W. (2006). Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **5**, 945-953.
- Grüber, G., Svergun, D.I., Coskun, U., Lemker, T., Koch, M.H., Schägger, H. und Müller, V. (2001a). Structural Insights into the A₁ ATPase from the archaeon, *Methanosarcina mazei* Gö1. *Biochemistry* **40**, 1890-1896.
- Grüber, G., Wieczorek, H., Harvey, W.R. und Müller, V. (2001b). Structure-Function Relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.* **204**, 2597-2605.
- Guiral, M., Tron, P., Aubert, C., Gloter, A., Iobbi-Nivol, C. und Giudici-Ortoni, M.-T. (2005). A membrane-bound multienzyme, hydrogen-oxidizing, and sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *J. Biol. Chem.* **280**, 42004-42015.
- Gürster, S. (2007). Versuche zur Reindarstellung und strukturellen und proteinbiochemischen Charakterisierung des Archaeums *Nanoarchaeum equitans*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Haferkamp, I., Schmitz-Esser, S., Wagner, M., Neigel, N., Horn, M. und Neuhaus, H.E. (2006). Tapping the nucleotide pool of the host: novel nucleotide carrier proteins of *Protochlamydia amoebophila*. *Mol. Microbiol.* **60**, 1534-1545.
- Häse, C.C., Fedorova, N.D., Galperin, M.Y. und Dibrov, P.A. (2001). Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 353-70, table of contents.
- Hazen, R.M. (2005). *Genesis: The Scientific Quest for Life's Origins*. (National Academies Press).
- Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Keller, M. und Stetter, K.O. (1999). Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 353-381.
- Heimerl, T. (2009). Ultrastruktur der Co-Kultur Kin4/M: Serienschritte, 3D-Modelle und Immunmarkierungsversuche. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Heinonen, J.K. und Lahti, R.J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* **113**, 313-317.
- Herrmann, G., Jayamani, E., Mai, G. und Buckel, W. (2008). Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* **190**, 784-791.
- Hirata, T., Nakamura, N., Omote, H., Wada, Y. und Futai, M. (2000). Regulation and reversibility of vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 386-389.
- Hlady, J. (2007). ATP-Hydrolyse und biochemische Charakterisierung der A1AO-ATP-Synthase /ATPase von *Ignicoccus hospitalis*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Hochstein, L.I. und Stan-Lotter, H. (1992). Purification and properties of an ATPase from *Sulfolobus solfataricus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 153-160.
- Hoffmann, J., Sokolova, L., Preiss, L., Hicks, D.B., Krulwich, T.A., Morgner, N., Wittig, I., Schägger, H., Meier, T. und Brutschy, B. (2010). ATP synthases: cellular nanomotors characterized by LILBID mass spectrometry. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 13375-13382.

- Hofmann, K. und Stoffel, W. (1993).** TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem.* **374**, 166.
- Hohn, M. (2003).** Nachweis neuartiger Wirts-Parasiten-Systeme bei thermophilen Archaeen sowie Genomanalyse und molekularbiologische Untersuchungen von *Nanoarchaeum equitans*. *Dissertation*, Universität Regensburg.
- Hong, S. und Pedersen, P.L. (2008).** ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 590-641.
- Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyschkony, I., Rachel, R. und Stetter, K.O. (2000).** *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp nov and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 2093-2100.
- Huber, H. (2006).** Crenarchaota. In *Encyclopedia of Life Sciences* (New York, USA: John Wiley & Sons, Ltd.).
- Huber, H., Gallenberger, M., Jahn, U., Eylert, E., Berg, I.A., Kockelkorn, D., Eisenreich, W. und Fuchs, G. (2008).** A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 7851-7856.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C. und Stetter, K.O. (2002).** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**, 63-67.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R. und Stetter, K.O. (2006).** Nanoarchaeota. In *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer and E. Stackebrandt, eds. (Berlin: Springer), pp. 274–280.
- Huber, H., Hohn, M.J., Stetter, K.O. und Rachel, R. (2003).** The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Res. Microbiol.* **154**, 165-171.
- Huber, H., Huber, G. und Stetter, K.O. (1985).** A Modified DAPI Fluorescence Staining Procedure Suitable for the Visualization of Lithotrophic Bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 105-106.
- Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woese, C.R., Sleytr, U.B. und Stetter, K.O. (1986).** *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch. Microbiol.* **144**, 324-333.
- Hunte, C., von Jagow, G. und Schägger, H. (2003).** Membrane Protein Purification and Crystallization. A Practical Guide (London, UK: Academic Press).
- Hunte, C. und Michel, H. (2003).** Membrane Protein Crystallization. In *Membrane Protein Purification and Crystallization. A Practical Guide*, C. Hunte, G. von Jagow and H. Schägger, eds. (London, UK: Academic Press), pp. 143–160.
- Jagendorf, A.T. und Uribe, E. (1966).** ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **55**, 170-177.
- Jahn, U. (2007).** Aspekte der Zellbiologie des archaeellen Wirt-Parasit-Systems *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*; Zentrale Stoffwechselwege, Lipide und Histone. *Dissertation*, Universität Regensburg.

- Jahn, U., Gallenberger, M., Paper, W., Junglas, B., Eisenreich, W., Stetter, K.O., Rachel, R. und Huber, H. (2008). *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: new insights into a unique, intimate association of two archaea. *J. Bacteriol.* **190**, 1743-1750.
- Jahn, U., Huber, H., Eisenreich, W., Hügler, M. und Fuchs, G. (2007). Insights into the autotrophic CO₂ fixation pathway of the archaeon *Ignicoccus hospitalis*: comprehensive analysis of the central carbon metabolism. *J. Bacteriol.* **189**, 4108-4119.
- Jahn, U., Summons, R., Sturt, H., Grosjean, E. und Huber, H. (2004). Composition of the lipids of *Nanoarchaeum equitans* and their origin from its host *Ignicoccus sp.* strain KIN4/l. *Arch. Microbiol.* **182**, 404-413.
- Jefferies, K.C., Cipriano, D.J. und Forgac, M. (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 33-42.
- Jefferies, K.C. und Forgac, M. (2008). Subunit H of the vacuolar (H⁺) ATPase inhibits ATP hydrolysis by the free V₁ domain by interaction with the rotary subunit F. *J. Biol. Chem.* **283**, 4512-4519.
- Johnson, A.S., van Horck, S. und Lewis, P.J. (2004). Dynamic localization of membrane proteins in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **150**, 2815-2824.
- Jorgensen, B.B. und Gallardo, V.A. (1999). *Thioploca spp.*: filamentous sulfur bacteria with nitrate vacuoles. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**, 301-313.
- Junesch, U. und Gräber, P. (1991). The rate of ATP-synthesis as a function of delta pH and delta psi catalyzed by the active, reduced H⁺-ATPase from chloroplasts. *FEBS Lett.* **294**, 275-278.
- Junglas, B. (2006). Die hyperthermophilen Archaeen *Ignicoccus sp.* KIN4/M und *Nanoarchaeum equitans*: Ultrastrukturelle und Immuncytochemische Untersuchungen an Ultradünnschnitten. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Junglas, B., Briegel, A., Burghardt, T., Walther, P., Wirth, R., Huber, H. und Rachel, R. (2008). *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. *Arch. Microbiol.* **190**, 395-408.
- Kaim, G. und Dimroth, P. (1999). ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage. *EMBO J.* **18**, 4118-4127.
- Kakinuma, Y. und Igarashi, K. (1994). Purification and characterization of the catalytic moiety of vacuolar-type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *J. Biochem.* **116**, 1302-1308.
- Käll, L., Krogh, A. und Sonnhammer, E.L.L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction - the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* **35**, W429-32.
- Kelley, L.A. und Sternberg, M.J.E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363-371.
- Kleinekofort, W., Avdiev, J. und Brutschy, B. (1996). A new method of laser desorption mass spectrometry for the study of biological macromolecules. *IJMS* **152**, 135-142.
- Kletzin, A., Urich, T., Müller, F., Bandejas, T.M. und Gomes, C.M. (2004). Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**, 77-91.

- Klimmek, O., Kreis, V., Klein, C., Simon, J., Wittershagen, A. und Kröger, A. (1998).** The function of the periplasmic Sud protein in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **253**, 263-269.
- Klimmek, O., Stein, T., Pisa, R., Simon, J. und Kröger, A. (1999).** The single cysteine residue of the Sud protein is required for its function as a polysulfide-sulfur transferase in *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **263**, 79-84.
- Klingenberg, M. (2008).** The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1978-2021.
- Kolb, V.M. (2007).** On the applicability of the Aristotelian principles to the definition of life. *International Journal of Astrobiology* **6**, 51-57.
- Krafft, T., Gross, R. und Kröger, A. (1995).** The function of *Wolinella succinogenes* psr genes in electron transport with polysulphide as the terminal electron acceptor. *Eur. J. Biochem.* **230**, 601-606.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E.L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567-580.
- Kuhlbrandt, W. (2003).** Two-Dimensional Crystallization of Membrane Proteins: A Practical Guide. In Membrane Protein Purification and Crystallization. A Practical Guide, C. Hunte, G. von Jagow and H. Schägger, eds. (London, UK: Academic Press), pp. 253–284.
- Küper, U. (2007).** Fermenterstudien zur Ertragsoptimierung des Organismensystems *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Küper, U., Meyer, C., Müller, V., Rachel, R. und Huber, H. (2010).** Energized outer membrane and spatial separation of metabolic processes in the hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 3152-3156.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- Laco, J., Zeman, I., Pevala, V., Polcic, P. und Kolarov, J. (2010).** Adenine nucleotide transport via Sal1 carrier compensates for the essential function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *FEMS Yeast Res.* **10**, 290-296.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lange, M. (2009).** Neue Hochtemperatur-Organismen von Lesbos und dem Ostpazifischen-Rücken. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Laska, S., Lottspeich, F. und Kletzin, A. (2003).** Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Microbiology* **149**, 2357-2371.
- Laubinger, W. und Dimroth, P. (1988).** Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. *Biochemistry* **27**, 7531-7537.

- Le Maire, M., Champeil, P. und Moller, J.V. (2000).** Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 86-111.
- Lemker, T., Ruppert, C., Stöger, H., Wimmers, S. und Müller, V. (2001).** Overproduction of a functional A₁ ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3744-3750.
- Lewalter, K. und Müller, V. (2006).** Bioenergetics of archaea: ancient energy conserving mechanisms developed in the early history of life. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 437-445.
- Lindner, R. und Naim, H.Y. (2009).** Domains in biological membranes. *Exp. Cell Res.* **315**, 2871-2878.
- Lindsay, M.R., Webb, R.I., Strous, M., Jetten, M.S., Butler, M.K., Forde, R.J. und Fuerst, J.A. (2001).** Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Arch. Microbiol.* **175**, 413-429.
- Lingl, A. (2006).** Reinigung, biochemische Charakterisierung und Struktur der A₁A₀-ATPase aus *Methanococcus jannaschii*. *Dissertation*, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main.
- Lingl, A., Huber, H., Stetter, K.O., Mayer, F., Kellermann, J. und Müller, V. (2003).** Isolation of a complete A₁A₀ ATP synthase comprising nine subunits from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Extremophiles* **7**, 249-257.
- Lingwood, D. und Simons, K. (2010).** Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50.
- Lonhienne, T.G.A., Sagulenko, E., Webb, R.I., Lee, K.-C., Franke, J., Devos, D.P., Nouwens, A., Carroll, B.J. und Fuerst, J.A. (2010).** Endocytosis-like protein uptake in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12883-12888.
- Lübben, M. und Schäfer, G. (1987).** A plasma-membrane associated ATPase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* **164**, 533-540.
- Ma, Z., Cao, M., Liu, Y., He, Y., Wang, Y., Yang, C., Wang, W., Du, Y., Zhou, M. und Gao, F. (2010).** Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase translocates to cell surface in hepatocytes and has high activity in tumor-like acidic and hypoxic environment. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **42**, 530-537.
- Maddock, J.R. und Shapiro, L. (1993).** Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* **259**, 1717-1723.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P. und Clark, D.P. (2008).** Brock Biology of Microorganisms (Pearson Education Limited).
- Malínská, K., Malínský, J., Opekarová, M. und Tanner, W. (2003).** Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4427-4436.
- Mayer, F. (2008).** Isolierung und biochemische Charakterisierung von membran-assoziierten Proteinkomplexen des hyperthermophilen Archaeums *Ignicoccus hospitalis*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Mayer, F., Küper, U., Meyer, C., Müller, V., Rachel, R. und Huber, H. (in Vorbereitung).** AMP-forming Acetyl-CoA Synthetase of *Ignicoccus hospitalis*: A protein complex associated to the outer membrane.

- Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W. und Dimroth, P. (2005).** Structure of the rotor ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science* **308**, 659-662.
- Meyer, C. (2010).** Die Fibers von *Ignicoccus hospitalis*: Ultrastruktur, Verankerung und molekularbiologische Untersuchungen. *Dissertation*, Universität Regensburg.
- Mitchell, P. (1961).** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.
- Mitchell, P. (1972).** Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge. *J. Bioenerg.* **3**, 5-24.
- Morgner, N., Kleinschroth, T., Barth, H.-D., Ludwig, B. und Brutschy, B. (2007).** A novel approach to analyze membrane proteins by laser mass spectrometry: from protein subunits to the integral complex. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1429-1438.
- Mulkidjanian, A.Y., Dibrov, P. und Galperin, M.Y. (2008).** The past and present of sodium energetics: may the sodium-motive force be with you. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 985-992.
- Mulkidjanian, A.Y., Makarova, K.S., Galperin, M.Y. und Koonin, E.V. (2007).** Inventing the dynamo machine: the evolution of the F-type and V-type ATPases. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 892-899.
- Müller, D.W., Meyer, C., Gürster, S., Küper, U., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R. und Bellack, A. (2009).** The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a new type of archaeal cell surface appendage. *J. Bacteriol.* **191**, 6465-6468.
- Müller, V. und Grüber, G. (2003).** ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 474-494.
- Müller, V., Blaut, M., Heise, R., Winner, C. und Gottschalk, G. (1990).** Sodium bioenergetics in methanogens and acetogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **87**, 373-376.
- Müller, V., Lingl, A., Lewalter, K. und Fritz, M. (2005).** ATP synthases with novel rotor subunits: new insights into structure, function and evolution of ATPases. *J. Bioenerg. Biomem.* **37**, 455-460.
- Murat, D., Byrne, M. und Komeili, A. (2010).** Cell biology of prokaryotic organelles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000422.
- Nakanishi-Matsui, M., Sekiya, M., Nakamoto, R.K. und Futai, M. (2010).** The mechanism of rotating proton pumping ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1343-1352.
- Näther, D.J. und Rachel, R. (2004).** The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 199-203.
- Nelson, H. und Nelson, N. (1989).** The progenitor of ATP synthases was closely related to the current vacuolar H⁺-ATPase. *FEBS Lett.* **247**, 147-153.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., et al. (1999).** Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**, 323-329.

- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988).** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Neumann, S., Matthey, U., Kaim, G. und Dimroth, P. (1998).** Purification and properties of the F_1F_0 ATPase of *Ilyobacter tartaricus*, a sodium ion pump. *J. Bacteriol.* **180**, 3312-3316.
- Nicholls, D.G. und Ferguson, S.J. (2002).** Bioenergetics3 (London, UK: Academic Press).
- Nikaido, H. (2003).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593-656.
- Nishi, T. und Forgac, M. (2002).** The vacuolar (H^+)-ATPases-nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 94-103.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. und Kinosita, K. (1997).** Direct observation of the rotation of F_1 -ATPase. *Nature* **386**, 299-302.
- Ochman, H. und Moran, N.A. (2001).** Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**, 1096-1099.
- Paper, W. (2005).** Wachstumsuntersuchungen und physiologische Charakterisierungen des Organismensystems *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sowie der Anreicherungskultur CU1. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Paper, W., Jahn, U., Hohn, M.J., Kronner, M., Näther, D.J., Burghardt, T., Rachel, R., Stetter, K.O. und Huber, H. (2007).** *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of '*Nanoarchaeum equitans*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 803-808.
- Pisa, K. (2008).** ATP-Synthasen aus Archäen: Reinigung und Charakterisierung der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *Pyrococcus furiosus*. *Dissertation*, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main.
- Pisa, K.Y., Huber, H., Thomm, M. und Müller, V. (2007).** A sodium ion-dependent A_1A_0 ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *FEBS J.* **274**, 3928-3938.
- Podar, M., Anderson, I., Makarova, K.S., Elkins, J.G., Ivanova, N., Wall, M.A., Lykidis, A., Mavromatis, K., Sun, H., Hudson, M.E., et al. (2008).** A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*. *Genome Biol.* **9**, R158.
- Pohlschröder, M., Giménez, M.I. und Jarrell, K.F. (2005).** Protein transport in Archaea: Sec and twin arginine translocation pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 713-719.
- Poole, A.M. und Penny, D. (2007).** Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *Bioessays* **29**, 74-84.
- Qi, J., Wang, Y. und Forgac, M. (2007).** The vacuolar (H^+)-ATPase: subunit arrangement and in vivo regulation. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 423-426.
- Rachel, R. (2010).** Cell Envelopes of Crenarchaeota and Nanoarchaeota. In Prokaryotic Cell Wall Compounds: Structure and Biochemistr, H. König, H. Claus and A. Varma, eds. (Berlin: Springer), pp. 271-291.
- Rachel, R., Meyer, C., Klingl, A., Gürster, S., Heimerl, T., Wasserburger, N., Burghardt, T., Küper, U., Bellack, A., Schopf, S., et al. (2010).** Analysis of the ultrastructure of archaea by electron microscopy. *Methods Cell Biol.* **96**, 47-69.

- Rachel, R., Wyszchony, I., Riehl, S. und Huber, H. (2002). The ultrastructure of *Ignicoccus*: evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea* **1**, 9-18.
- Raghunathan, D., Gayen, S., Grüber, G. und Verma, C.S. (2010). Crosstalk along the stalk: dynamics of the interaction of subunits B and F in the A_1A_0 ATP synthase of *Methanosarcina mazei* Gö1. *Biochemistry* **49**, 4181-4190.
- Reisinger, V. und Eichacker, L.A. (2008). Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *J. Proteomics* **71**, 277-283.
- Ridder, A.N.J.A., Jong, E.J. de, Jongbloed, J.D.H. und Kuipers, O.P. (2009). Subcellular localization of TatAd of *Bacillus subtilis* depends on the presence of TatCd or TatCy. *J. Bacteriol.* **191**, 4410-4418.
- Rieger, G., Müller, K., Hermann, R., Stetter, K.O. und Rachel, R. (1997). Cultivation of hyperthermophilic archaea in capillary tubes resulting in improved preservation of fine structures. *Arch. Microbiol.* **168**, 373-379.
- Robinson, C. und Bolhuis, A. (2001). Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 350-356.
- Rodrigues, M.V., Borges, N., Henriques, M., Lamosa, P., Ventura, R., Fernandes, C., Empadinhas, N., Maycock, C., da Costa, M.S. und Santos, H. (2007). Bifunctional CTP:inositol-1-phosphate cytidyltransferase/CDP-inositol:inositol-1-phosphate transferase, the key enzyme for di-myoinositol-phosphate synthesis in several (hyper)thermophiles. *J. Bacteriol.* **189**, 5405-5412.
- Röhl, A. (2010). Reinigung und biochemische Charakterisierung der A_1A_0 -ATP-Synthase/ ATPase von *Ignicoccus hospitalis*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Rudner, D.Z. und Losick, R. (2010). Protein subcellular localization in bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000307.
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. und Futai, M. (1999). Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F_0F_1): direct observation. *Science* **286**, 1722-1724.
- Samson, R.Y., Obita, T., Freund, S.M., Williams, R.L. und Bell, S.D. (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science* **322**, 1710-1713.
- Schäfer, G. und Meyering-Vos, M. (1992). F-type or V-type? The chimeric nature of the archaeobacterial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 232-235.
- Schäfer, I., Rössle, M., Biuković, G., Müller, V. und Grüber, G. (2006). Structural and functional analysis of the coupling subunit F in solution and topological arrangement of the stalk domains of the methanogenic A_1A_0 ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **38**, 83-92.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Schägger, H. (2003). Blue Native Electrophoresis. In Membrane Protein Purification and Crystallization. A Practical Guide, C. Hunte, G. von Jagow and H. Schägger, eds. (London, UK: Academic Press), pp. 105–130.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16-22.

- Schauder, R. und Kröger, A. (1993). Bacterial Sulphur Respiration. *Arch. Microbiol.* **159**, 491-497.
- Schimerlik, M.I. (2001). Overview of membrane protein solubilization. *Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 5*, Unit 5.9.
- Schmitz-Esser, S., Linka, N., Collingro, A., Beier, C.L., Neuhaus, H.E., Wagner, M. und Horn, M. (2004). ATP/ADP translocases: a common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to *Chlamydiae* and *Rickettsiae*. *J. Bacteriol.* **186**, 683-691.
- Schönheit, P. und Schäfer, T. (1995). Metabolism in Hyperthermophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 26-57.
- Schulz, H.N., Brinkhoff, T., Ferdelman, T.G., Mariné, M.H., Teske, A. und Jorgensen, B.B. (1999). Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science* **284**, 493-495.
- Schulze-Makuch, D. und Irwin, L.N. (2008). Life in the Universe. Expectations and Constraints (Berlin, Heidelberg: Springer).
- Schuster, K. (2003). Der Surface Layer von "Nanoarchaeum equitans": Elektronenmikroskopische, proteinbiochemische und immunologische Untersuchungen. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Seddon, A.M., Curnow, P. und Booth, P.J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 105-117.
- Serviddio, G. und Sastre, J. (2010). Measurement of mitochondrial membrane potential and proton leak. *Methods Mol. Biol.* **594**, 107-121.
- Shively, J.M. (2006). Complex Intracellular Structures in Prokaryotes. Microbiology Monographs, Vol. 2 (Berlin: Springer).
- Silhavy, T.J., Kahne, D. und Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000414.
- Simons, K. und Gerl, M.J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 688-699.
- Slonczewski, J.L. and Foster, J.W. (2009). Microbiology (New York, USA: W. W. Norton & Company).
- Speelmans, G., Poolman, B., Abee, T. und Konings, W.N. (1994). The F- or V-type Na⁺-ATPase of the thermophilic bacterium *Clostridium fervidus*. *J. Bacteriol.* **176**, 5160-5162.
- Speelmans, G., Poolman, B. und Konings, W.N. (1995). Na⁺ as coupling ion in energy transduction in extremophilic Bacteria and Archaea. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 58-70.
- Srinivasan, V., Morowitz, H.J. und Huber, H. (submitted). What is an Autotroph? *FEMS Microbiol. Ecol.*
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G. und Walker, J.E. (2000). The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 672-679.
- Sutcliffe, I.C. (2010). A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends Microbiol.* **18**, 464-470.
- Toei, M., Saum, R. und Forgac, M. (2010). Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry* **49**, 4715-4723.

- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.
- Trentmann, O., Jung, B., Neuhaus, H.E. und Haferkamp, I. (2008).** Nonmitochondrial ATP/ADP transporters accept phosphate as third substrate. *J. Biol. Chem.* **283**, 36486-36493.
- van Niftrik, L. (2008).** Cell biology of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Dissertation*, Universität Nijmegen.
- van Niftrik, L., van Helden, M., Kirchen, S., van Donselaar, E.G., Harhangi, H.R., Webb, R.I., Fuerst, J.A., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M. und Strous, M. (2010).** Intracellular localization of membrane-bound ATPases in the compartmentalized anammox bacterium '*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*'. *Mol. Microbiol.* **77**, 701-715.
- Vonck, J., Pisa, K.Y., Morgner, N., Brutschy, B. und Müller, V. (2009).** Three-dimensional structure of A_1A_0 ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **284**, 10110-10119.
- Vrij, W. de, Bulthuis, R.A. und Konings, W.N. (1988).** Comparative study of energy-transducing properties of cytoplasmic membranes from mesophilic and thermophilic *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* **170**, 2359-2366.
- Wakagi, T. und Oshima, T. (1985).** Membrane-bound ATPase of a thermoacidophilic archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta* **817**, 33-41.
- Wartner, C. (2010).** Reinigung und Charakterisierung der ATPase von *Thermotoga maritima*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Wasserburger, N. (2008).** Anzucht, elektronenmikroskopische Präparation und Darstellung der archaeellen Kokultur von *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Waters, E., Hohn, M.J., Ahel, I., Graham, D.E., Adams, M.D., Barnstead, M., Beeson, K.Y., Bibbs, L., Bolanos, R., Keller, M., et al. (2003).** The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 12984-12988.
- Wieser, M., Denner, E.B.M., Kämpfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., Vybiral, D., Lubitz, W., Maszenan, A.M., Patel, B.K.C., et al. (2002).** Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 629-637.
- Wilms, R., Freiberg, C., Wegerle, E., Meier, I., Mayer, F. und Müller, V. (1996).** Subunit structure and organization of the genes of the A_1A_0 ATPase from the Archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Biol. Chem.* **271**, 18843-18852.
- Winkler, H.H. und Neuhaus, H.E. (1999).** Non-mitochondrial ATP transport. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 64-68.
- Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F.M. und Schägger, H. (2007a).** Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* **28**, 3811-3820.

- Wittig, I., Karas, M. und Schägger, H. (2007b).** High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell Proteomics* **6**, 1215-1225.
- Wittig, I. und Schägger, H. (2005).** Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* **5**, 4338-4346.
- Wittig, I. und Schägger, H. (2009).** Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics* **9**, 5214-5223.
- Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K. und Yoshida, M. (1998).** F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell* **93**, 1117-1124.
- Yokoyama, K., Ohkuma, S., Taguchi, H., Yasunaga, T., Wakabayashi, T. und Yoshida, M. (2000).** V-Type H⁺-ATPase/synthase from a thermophilic eubacterium, *Thermus thermophilus*. Subunit structure and operon. *J. Biol. Chem.* **275**, 13955-13961.
- Yokoyama, K., und Imamura, H. (2005).** Rotation, structure, and classification of prokaryotic V-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 405-410.
- Yoshida, M., Muneyuki, E. und Hisabori, T. (2001).** ATP synthase-a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 669-677.
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S.C., Ester, M., Foster, L.J., et al. (2010).** PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* **26**, 1608-1615.
- Yuan, J., Zweers, J.C., van Dijl, J.M. und Dalbey, R.E. (2010).** Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 179-199.

VII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elementsymbole wurden gemäß der IUPAC-Richtlinien verwendet.

1° AK	primärer Antikörper
2° AK	sekundärer Antikörper
3D	dreidimensional
Å	Angström
AA	Acrylamid
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
ÄM	äußere Membran
BBR	Bakterienbank Regensburg
BNE	Blaunativ-Elektrophorese
bp	Basepaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytoplasma
CM	Cytoplasmamembran
CNE	<i>Clear Native</i> -Elektrophorese
CLSM	Konfokales Laserscanmikroskop
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DCCD	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid
DES	Diethylstilbestrol
DIP	Di-myo-Inositol-1,1'-(3,3')-Phosphat
DGP	1-1'-Diglycerolphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	DSMZ-Numerierung der hinterlegten Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	D,L-Dithiothreitol
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae</i> , und andere
h	Stunde

hrCNE	<i>high resolution Clear Native</i> -Elektrophorese
ICP	induktiv gekoppeltes Plasmaanalyseverfahren (inductive coupled plasma)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
Ihomp	<i>Ignicoccus hospitalis</i> outer membrane protein
IM	innere Membran
IMC	Intermembran-Kompartiment
kDa	Kilodalton
KS	kompatibles Solut
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M	molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MES	2-(N-Morpholino-)Ethansulfonsäure
min.	Minute
MM	Magermilch
mod.	modifiziert
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut Off
N	normal
p.A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
pH	Pondus hydrogenii (Wasserstoff-Exponent)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Periplasma
PPV	periplasmatische Vesikel
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rek.	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S ⁰	Elementarer Schwefel
SDS	Natriumdodecylsulfat
SME	synthetisches Meerwasser
<i>spec.</i>	Spezies
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline)
TBT	Tributylzinn

TCS	Tetrachlorosalicylanilid
(T)EM	(Transmissions-) Elektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
UAc	Uranylacetat
US	Ultradünnschnitt
UZ	Ultrazentrifugation bzw. Ultrazentrifuge
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
v/w	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
YE	Hefeextrakt (yeast extract)

2. Begleit-CD

Die Begleit-CD ist auf der Innenseite des rückwärtigen Umschlags angeheftet. Da einige Abbildungen in dieser Arbeit druckerbedingt nicht optimal wiedergegeben werden konnten, ist die Arbeit zusätzlich als PDF-Datei angehängt. Zur besseren Übersicht ist in folgender Abbildung die Orderstruktur der Begleit-CD dargestellt:

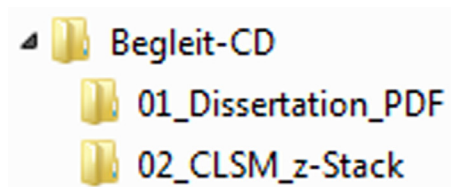


Abb. 36: Ordnerstruktur der Begleit-CD

3. Publikationen

Küper, U., Rachel, R., Meyer, C., Müller, V., and Huber, H. (2010). *Ignicoccus hospitalis* und sein Weg, ATP zu gewinnen. *Biospektrum* **16**, 628-630.

Rachel, R., Meyer, C., Klingl, A., Gürster, S., Heimerl, T., Wasserburger, N., Burghardt, T., Küper, U., Bellack, A., Schopf, S., et al. (2010). Analysis of the ultrastructure of archaea by electron microscopy. *Methods Cell Biol.* **96**, 47-69.

Küper, U., Meyer, C., Müller, V., Rachel, R. und Huber, H. (2010). Energized outer membrane and spatial separation of metabolic processes in the hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 3152-3156.

Müller, D.W., Meyer, C., Gürster, S., Küper, U., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R. und Bellack, A. (2009). The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a new type of archaeal cell surface appendage. *J. Bacteriol.* **191**, 6465-6468.

4. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Ulf Küper
geboren am:	13.09.1979 in München
Familienstand:	Ledig
Nationalität:	deutsch

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule an der Rainerstrasse in Kolbermoor
1990 – 1999	Gymnasium Bad Aibling
	Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

Universität Regensburg

2000 - 2007	Studium der Biologie und Diplomarbeit mit dem Thema „Fermenterstudien zur Ertragsoptimierung des Organismensystems <i>Ignicoccus hospitalis</i> und <i>Nanoarchaeum equitans</i> “ unter der Betreuung von Prof. Dr. Reinhard Rachel, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum
-------------	---

Promotion

Universität Regensburg

Seit Mai 2007	Promotion mit dem Thema „Untersuchungen zur Energiegewinnung des hyperthermophilen, schwefelreduzierenden Archaeons <i>Ignicoccus hospitalis</i> “ unter der Betreuung von Prof. Dr. Reinhard Rachel, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum
---------------	---

5. Danksagung

Zum Schluss möchte ich Allen danken, die durch ihre tatkräftige Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

...meinem Doktorvater **Prof. Dr. Reinhard Rachel**, der diese Arbeit stets mit großer Begeisterung begleitet hat. Danke für die hilfreichen Diskussionen, die Unterstützung bei theoretischen und praktischen Fragen sowie dem großen Vertrauen in meine Arbeit.

...meinem Betreuer **Dr. Harald Huber**, der es mir ermöglicht hat diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen. Danke für die Einführung in die Welt der Wissenschaft, das Vertrauen in meine Fähigkeiten, die zahlreichen Diskussionen und die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen.

...**Prof. Dr. Volker Müller** für die Zusammenarbeit, die Einführung in die Welt der ATP-Synthasen und das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich nochmals herzlichst für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

...**Prof. Dr. Michael Thomm** für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

...**Prof. Dr. Reinhard Wirth** für die immer hilfreichen Diskussionen und Anregungen wie auch das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

...**Dr. Guohong Peng** und **Dr. Janet Vonck** für hilfreiche Anregungen und Diskussionen sowie die Durchführung der Proteinkristallisation sowie Röntgenstruktur- und Einzelpartikelanalysen.

...**Prof. Dr. Bernd Brutschy** für die Durchführung der LILBID Analysen.

...**Dr. Guido Grossmann** und **Uwe de Vries** für die Einführung und Hilfe am CLSM.

...**Carolin Meyer, Thomas Heimerl, Jennifer Flechsler** und **Cordula Neuner** für die Durchführung der Immunmarkierungen und elektronenmikroskopischen Analysen.

...**Thomas Hader** und **Konrad Eichinger** für die Hilfe bei den vielen, vielen Fermentationen und dem Espresso im richtigen Moment.

...„**Famous Gabi**“ **Leichtl** und **Elisabeth Naglfeld** für einfach Alles! Danke für Eure uneingeschränkte Hilfe, die vielen Ermutigungen, den gelegentlichen Klaps auf den Hinterkopf, die vielen Gespräche und die unzähligen Versuche, mir verständlich zu machen, wie Frauen wirklich denken.

...dem Huber-Labor, sprich **Vroni Menath, Lydia Kreuter, Catrin Wartner, Alina Röhl, Steffi Daxer, Martina Lange, Astrid Stacheter, Florian Mayer, Kristina Beblo, Johanna Aigner** und **Uli „Jahn“ Friedrich**. Bedanken will ich mich für die harmonische Laboratmosphäre, den Spaß an und bei der Arbeit, die gute Zusammenarbeit und gegebenenfalls für den jeweiligen Beitrag zu dieser Arbeit.

...der gesamten **Belegschaft des Lehrstuhls für Mikrobiologie**, allen voran **Andreas „Andikörper“ Bosch** für seinen männlichen Beistand in einem frauengeprägten Laboralltag, der uns oft mit unergründlichen Fragestellungen konfrontiert hat.

...**Kim Pisa** für ihre Ausdauer, mir die Welt der ATP-Synthasen und der Hessen verständlich zu machen, ihren unglaublichen Humor und all die mehr oder weniger fachlichen Gespräche, Anregungen und Diskussionen. Mein Dank gilt dabei auch **Eva Biegel** und **Silke Schmidt** für die herzliche Aufnahme in ihr Labor!

...**meinen Freunden**, die mich all die Jahre begleitet und mir im richtigen Moment immer wieder gezeigt haben, worauf es im Leben wirklich ankommt.

...**Nicole Küper**, der besten Schwester der Welt! Danke für Alles!

...meiner Freundin **Kristina Schilling**, die immer an meiner Seite steht, fest an mich glaubt und mich so nimmt, wie ich bin! Danke für Deine Liebe, Deine Freundschaft und Dein Verständnis!

...nicht zu Letzt möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern **Gabi** und **Uwe Küper** bedanken, die immer für mich da waren. Ohne Euch, Eure Unterstützung, Euren Glauben in mich, Eure Aufmunterungen sowie all die großen und kleinen Hilfestellungen wäre dies niemals möglich gewesen.

6. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, Dezember 2010

.....