

# *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum*: 3D-Struktur und Proteom

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
Thomas Heimerl

aus  
Regensburg

im Jahr  
2014



Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 06.05.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von: apl. Prof. Dr. Reinhard Rachel

Unterschrift:



# Inhaltsverzeichnis

<b>I Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 <i>Ignicoccus</i></b> .....	<b>4</b>
<b>2 <i>Nanoarchaeum</i></b> .....	<b>5</b>
<b>3 Aktuelle Untersuchungen</b> .....	<b>6</b>
<b>4 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>7</b>
<b>II Material und Methoden</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Substanzen und Bezugsquellen</b> .....	<b>9</b>
<u>1.1 Chemikalien</u> .....	9
<u>1.2 Molekularmassenstandards</u> .....	10
<u>1.3 Enzyme und kommerzielle Produkte</u> .....	10
<u>1.4 PCR-Primer</u> .....	11
<u>1.5 Vektoren</u> .....	11
<u>1.6 Antikörper</u> .....	11
<u>1.7 Organismen</u> .....	13
<b>2 Kulturmedien</b> .....	<b>13</b>
<u>2.1 <i>Ignicoccus/Nanoarchaeum</i></u> .....	13
2.1.1 Modifiziertes ½ SME-Medium .....	13
2.1.2 Herstellung und Sterilisation - 20 ml.....	14
2.1.3 Herstellung und Sterilisation - Fermenter-Vorkulturen .....	14
2.1.4 Herstellung und Sterilisation - Fermenter.....	14
<u>2.2 <i>Escherichia coli</i></u> .....	15
2.2.1 LB-Medium (Platten und flüssig).....	15
2.2.2 SOB/SOC-Medium (Platten und flüssig) .....	15
2.2.3 'Auto-Induction'-Medium (AI).....	16
2.2.4 Antibiotika-Zusätze .....	16
<u>2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (YPD-Medium)</u> .....	16
<b>3 Sterilisation</b> .....	<b>17</b>
<b>4 Anzucht</b> .....	<b>17</b>
<u>4.1 <i>Ignicoccus/Nanoarchaeum</i></u> .....	17
4.1.1 in Serumflaschen.....	17
4.1.2 in Cellulosekapillaren .....	17
4.1.3 im Fermenter .....	17
4.1.3.1 Ernte von Zellen direkt aus dem Fermenter .....	18
4.1.3.2 Ernte unter Erhalt des physiologischen Zellstatus .....	18
4.1.3.3 Ernte zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphase.....	18
<u>4.2 <i>Escherichia coli</i></u> .....	19
<u>4.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u> .....	19
<b>5 Herstellung von Zelllysaten</b> .....	<b>19</b>
<u>5.1 <i>Ignicoccus/Nanoarchaeum</i></u> .....	19
<u>5.2 <i>Escherichia coli</i></u> .....	20
<u>5.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u> .....	20
<b>6 Lichtmikroskopie</b> .....	<b>21</b>
6.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie .....	21
6.2 Thermomikroskop.....	21
6.3 Thoma-Zählkammer .....	21

<b>7 Elektronenmikroskopie</b> .....	<b>21</b>
<u>7.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)</u> .....	22
7.1.1 Suspensionspräparate .....	22
7.1.2 Filtermethoden .....	22
7.1.3 Herstellung von Ultradünnschnitten und Semidünnschnitten .....	23
7.1.3.1 'High Pressure Freezing' (HPF) .....	23
7.1.3.2 Gefriersubstitution .....	23
7.1.3.3 Einbettung in Epon .....	24
7.1.3.4 Trimmen .....	24
7.1.3.5 Ultramikrotomie.....	24
7.1.3.6 Befilmung von Slot-Grids.....	25
7.1.3.7 Schnittkontrastierung.....	25
7.1.4 (Serien-)Tomographie .....	26
<u>7.2 'Energy Dispersive X-Ray Analysis' (EDX)</u> .....	26
<u>7.3 'Focused Ion Beam/Scanning Electron Microscopy' (FIB/SEM)</u> .....	26
<b>8 Molekulargenetische Methoden</b> .....	<b>27</b>
<u>8.1 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion</u> .....	27
<u>8.2 Konzentrationsmessung von DNA</u> .....	27
<u>8.3 Isolierung von gDNA</u> .....	28
<u>8.4 Plasmid-Präparation</u> .....	29
8.4.1 Plasmid-Mini-Präparation .....	29
8.4.2 Plasmid-Midi-Präparation .....	29
<u>8.5 'Polymerase-Chain-Reaction' (PCR) und 'Colony-PCR'</u> .....	30
<u>8.6 Restriktionsverdau</u> .....	30
<u>8.7 Ligation</u> .....	31
8.7.1 T4-DNA-Ligase .....	31
8.7.2 Topoisomerase .....	31
<u>8.8 Transformation von Plasmiden in <i>Escherichia coli</i></u> .....	31
8.8.1 Herstellung elektrokompeter Zellen .....	31
8.8.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	32
8.8.3 Transformation durch Elektroporation .....	32
8.8.4 Transformation durch Hitzeschock .....	33
<u>8.10 Glycerinkulturen</u> .....	33
<u>8.11 Genexpressions-Microarray-Analysen</u> .....	34
<b>9 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine</b> .....	<b>34</b>
<u>9.1 Synthetisierung von Expressionsvektoren</u> .....	34
<u>9.2 Expression</u> .....	34
9.2.1 Induktion der Expression mit IPTG .....	34
9.2.2 Autoinduktion .....	35
<u>9.3 Hitzefällung</u> .....	35
<u>9.4 'Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography' (IMAC)</u> .....	35
<b>10 Proteinbiochemische Methoden &amp; Massenspektroskopie</b> .....	<b>35</b>
<u>10.1 Konzentrationsbestimmung</u> .....	35
<u>10.2 SDS-PAGE</u> .....	36
10.2.1 Herstellung der Gele, verwendete Puffer und Elektrophoresebedingungen.....	36
10.2.2 Coomassie-Färbung.....	37
10.2.3 Silberfärbung .....	37
10.2.4 Gelrocknung.....	38
<u>10.3 Massenspektroskopie</u> .....	38
10.2.1 'Matrix-assisted laser desorption/ionization' (MALDI) .....	38
10.2.2 'Electrospray Ionization' (ESI).....	39

<b>11 Immunologische Verfahren .....</b>	<b>40</b>
<u>11.1 Immunisierung .....</u>	40
<u>11.2 Western Blots .....</u>	41
11.2.1 'SemiDry'-Elektrotransfer .....	41
11.2.2 Immunreaktion .....	42
11.2.3 Detektion durch Chemolumineszenz .....	42
<u>11.3 Immunmarkierung an Ultradünnschnitten .....</u>	43
11.3.1 Immunmarkierung .....	43
11.3.2 Silberverstärkung .....	44
11.3.3 Quantifizierung.....	44
<u>11.4 'Freeze Fracture Labeling' .....</u>	45
<u>11.5 Fluoreszenzmarkierung .....</u>	46
<u>11.6 Co-Immunpräzipitation .....</u>	46
<b>12 Bildbearbeitung, Datenverarbeitung, Bioinformatik und Datenbanken.....</b>	<b>47</b>
<b>III Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
<b>1 Vorarbeiten und Methodik .....</b>	<b>49</b>
<u>1.1 Filtermethode .....</u>	49
<u>1.2 FIB/SEM .....</u>	50
<u>1.3 (Serien-)Elektronentomographie .....</u>	55
1.3.1 Einfluss verschiedener Parameter auf den visuellen Eindruck der Tomogramme .....	55
1.3.2 Tomographie von Serienschnitten .....	57
<b>2 Strukturelle Aspekte .....</b>	<b>61</b>
<u>2.1 Allgemeiner Zellaufbau .....</u>	61
<u>2.2 Ausläufer des Cytoplasmas und Vesikel .....</u>	66
<u>2.3 Die Dynamik des endogenen Membransystems.....</u>	71
<u>2.4 Intrazelluläre Matrix.....</u>	74
<u>2.5 Kontaktstellen der Ausläufer/Vesikel untereinander und mit der Cytoplasmamembran .....</u>	80
<u>2.6 Kontakte des endogenen Membransystems zur äußeren Membran .....</u>	82
<u>2.7 Potentieller Phosphatspeicher und weitere Strukturen im Cytoplasma.....</u>	85
<u>2.8 <i>Nanoarchaeum equitans</i> und die Kontaktstelle zu <i>Ignicoccus hospitalis</i> .....</u>	89
<b>3 Proteomanalysen .....</b>	<b>92</b>
<u>3.1 Untersuchung des Proteoms in der stationären Phase.....</u>	92
3.1.1 'Proteome Coverage'.....	93
3.1.2 Überblick über detektierte Proteinfamilien .....	93
3.1.3 <i>I. hospitalis</i> -Proteom - die häufigsten Proteine .....	93
3.1.4 <i>N. equitans</i> -Proteom - die häufigsten Proteine .....	95
3.1.5 Einfluss von <i>N. equitans</i> auf das Proteom von <i>I. hospitalis</i> .....	95
3.1.6 Korrelation zwischen Proteomdaten und genomischer Operonstruktur .....	97
3.1.7 <i>Ignicoccus hospitalis</i> -Proteine in <i>Nanoarchaeum equitans</i> .....	97
<u>3.2 'Time-Course Proteomics' und Microarrays.....</u>	99
3.2.1 Kultivierung der Zellen .....	99
3.2.2 Proteomics der <i>Ignicoccus-Nanoarchaeum</i> -Interaktion .....	100
3.2.3 Membranproteine.....	100
3.2.4 Genexpressionsanalysen .....	101

<b>4 Nähere Charakterisierung ausgewählter Proteine</b> .....	<b>101</b>
4.1 Proteine mit WD40-Domäne.....	102
4.2 Proteine mit V4R-Domäne .....	106
4.3 AAA-ATPase CDC48/p97 .....	111
4.4 ESCRT-III-System .....	114
4.4.1 Vps4.....	115
4.4.2 CdvB .....	117
4.4.3 CdvA .....	119
4.4.4 'Snf7-like' Proteine .....	120
4.5 Weitere Proteine.....	123
4.5.1 Sec61 $\beta$ .....	123
4.5.2 SUMO .....	124
<b>IV Diskussion</b> .....	<b>127</b>
<b>1 Methodische Aspekte</b> .....	<b>127</b>
1.1 Filtermethode .....	127
1.2 Vor- und Nachteile der einzelnen Tomographie-Methoden.....	127
1.2.1 Serienschnitte .....	128
1.2.2 FIB/SEM.....	129
1.2.3 (Serien-)Elektronentomographie .....	130
1.3 Vergleich zwischen WBP und SIRT .....	132
1.4 Einfluss von Defokus und CTF .....	133
<b>2 Strukturelle Aspekte</b> .....	<b>134</b>
2.1 Allgemeiner Zellaufbau .....	134
2.2 Zelleinschlüsse .....	135
2.3 Struktur und Dynamik des endogenen Membransystems.....	136
2.4 Cytoskelett .....	139
2.5 Poren in der äußeren Membran .....	141
2.6 <i>Nanoarchaeum equitans</i> .....	142
<b>3 Proteomics</b> .....	<b>143</b>
3.1 Vergleich Reinkultur/Co-Kultur (stationäre Phase).....	143
3.2 'Time-Course Proteomics/Transcriptomics' .....	145
<b>4 Immunmarkierungen</b> .....	<b>145</b>
4.1 WD40-Proteine .....	145
4.2 V4R-Proteine .....	146
4.3 ESCRT-III .....	147
4.4 CDC48/p97 .....	148
4.5 Sec61 $\beta$ .....	149
4.6 SUMO .....	150
<b>5 Spekulation</b> .....	<b>151</b>
<b>V Zusammenfassung</b> .....	<b>153</b>
<b>VI Ausblick</b> .....	<b>155</b>
<b>VII Literaturverzeichnis</b> .....	<b>157</b>

<b>VIII Anhang .....</b>	<b>179</b>
<b>1 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>179</b>
<b>2 'Supplemental Blu-ray Disc' .....</b>	<b>187</b>







## I Einleitung

Die Entstehung der eukaryotischen Zelle gehört zu den spannendsten Fragen der heutigen Biologie, nicht zuletzt, da wir selbst Eukaryoten sind und somit für uns die Frage existentiellen Charakter besitzt. Vermutlich gerade deswegen gehört das Thema daher mitunter zu den strittigsten in wissenschaftlichen Abhandlungen. Während weitgehend Konsens in der Endosymbiontentheorie und den Endosymbionten besteht ( $\alpha$ -Proteobakterium evolviert zu Mitochondrium, Hydrogenosom oder Mitosom; Cyanobakterium evolviert zu Chloroplast; Gray, 1992; Simpson & Roger, 2004), ist die Identität und Beschaffenheit der Wirtszelle hierbei sowie die Entstehung des Zellkerns und des endogenen Membransystems viel diskutiert. Es gibt verschiedene Theorien einer graduellen Entwicklung zu dieser Wirtszelle auf einer eigenen Linie im Stammbaum, die das Woese'sche Drei-Domänen-Modell nahe legt. Die Komplexität eines solchen 'Proto-Eukaryoten' vor der "Aufspaltung" in Archaea und Eucarya wird unterschiedlich gesehen (z.B. Vesteg & Krajčovič, 2011; Forterre, 2013). Daneben werden zahlreiche archaeele Wirtszellen diskutiert und teils spezifisch, teils unspezifisch benannt: u.a. methanogene Archaeen (Martin & Müller, 1998), *Thermoplasma* (Pisani *et al.*, 2007) und Crenarchaeoten. Für Crenarchaeoten basiert diese Idee auf der bereits 1984 entstandenen "Eocyten"-Hypothese (Lake *et al.*, 1984). Wie letztlich für alle archaeele Wirtszellen-Szenarien impliziert, untergräbt die zu Grunde liegende Hypothese das heutige Paradigma der drei Domänen aus Bacteria, Archaea und Eucarya (Woese & Fox, 1977; Woese *et al.*, 1990). Basierend auf Form- und Strukturunterschieden von ribosomalen Untereinheiten wurden höhere Ähnlichkeiten zwischen "Eocyten" (heute bekannt als Crenarchaeota) und Eukaryoten festgestellt als zwischen "Eocyten" und den heutigen Euryarchaeota. Demnach wurden Crenarchaeota und Eucarya als Schwesterngruppen eingeordnet. Gestützt auf zunehmend bessere phylogenetische Methodik häufen sich in den letzten Jahren Publikationen, die ähnliche Modelle befürworten und erweitern (Cox *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2009; Guy & Ettema, 2011; Kelly *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2012; Yutin *et al.*, 2012; Lasek-Nesselquist & Gogarten, 2013; Martijn & Ettema, 2013; Williams *et al.*, 2013; Williams & Embley, 2014; Koonin & Yutin, 2014) oder zumindest nicht ausschließen (Rochette *et al.*, 2014). Die "Eocyten"-Hypothese erweiternd, wurde ein 'TACK'-Superphylum vorgeschlagen, bestehend aus Thaumarchaeota (Brochier-Armanet *et al.*, 2008), Aigarchaeota (Nunoura *et al.*, 2010), Crenarchaeota (Woese *et al.*, 1990) und Korarchaeota (Barns *et al.*, 1996), das die Schwesterngruppe zu den Eucarya darstellt. In einem derartigen Superphylum wären zahlreiche homologe Proteine zu vermeintlichen 'eukaryotic signature proteins' vertreten: Artubulin (Yutin & Koonin, 2012), Crenactin (Ettema *et al.*, 2011; Lindås *et al.*, 2014), Vps4, ESCRT-III (Samson *et al.*, 2008; Lindås *et al.*, 2008), 'ubiquitin-like modifier system' (Nunoura *et al.*, 2010) sowie einige Proteine aus den Bereichen Transkription, Translation und 'DNA packaging/replication/repair' (siehe Guy & Ettema, 2011). In Bezug auf die Erklärung der Entstehung der eukaryotischen Zelle wird somit ein 'TACK'-Vertreter als potentielle Wirtszelle für die (vermutete) Phagozytose/Endosymbiose mit einem  $\alpha$ -Proteobakterium angesehen.

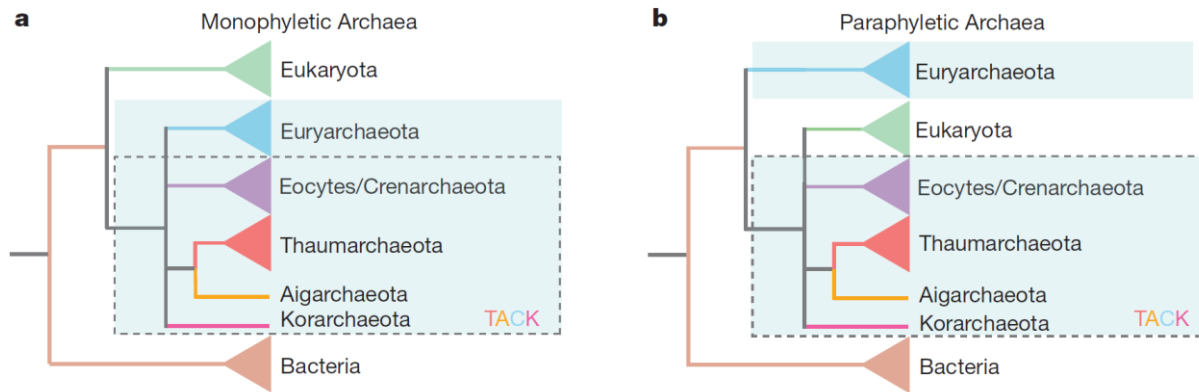


Abbildung 1 a) Drei-Domänen Modell b) (erweiterte) 'Eocyten'-Hypothese (aus Williams *et al.*, 2013)

Darüber hinaus gibt es auch Theorien, dass die Wirtszelle selbst eine Chimäre war, z.B. aus *Thermoplasma/Spirochaeta* (Margulis *et al.*, 2006) oder (dem Gegenstand dieser Arbeit) *Ignicoccus/Nanoarchaeum* (Godde, 2012). Auch wurden hierfür Endosymbioseszenarien vorgeschlagen vor allem aus Bakterium ('host')/ Archaeum (Endosymbiont) (Horiike *et al.*, 2001) bzw. weiter eingegrenzt, Myxobakterium ('host')/Methanogene (Endosymbiont) (López-García & Moreira, 2006) oder gram-negatives Bakterium ('host')/Crenarchaeot (Endosymbiont) (Gupta & Golding, 1996). Oftmals wird mit einer möglichen Endosymbiose aus bakteriellm 'host' und archaeellem Endosymbionten die Erklärung für die Entstehung des Zellkerns (und endogenen Membransystems) geliefert. Doch auch dieses Thema der Eukaryogenese ist höchst umstritten. Weitere Theorien gehen von einer Einkapselung eines Viruspartikels als Ursprung des Zellkerns aus, andere sehen eine *de novo* Membran-Genese aus Assemblierung von Lipidvesikeln und wieder andere eine Einstülpung der Membran aus "prokaryotischen" Vorfahren. Basierend auf strukturellen Überlegungen (z.B. Lage und Orientierung der 'Nuclear Pore'-Komplexe = NPC und des SecY/Sec61-Komplexes) wäre letzteres am wahrscheinlichsten (Jékely, 2007). Eine Herausforderung aller Theorien mit wie auch immer gearteten archaeellen Vorläuferzellen ist zudem die Erklärung des Übergangs von archaeellen zu eukaryotischen Membranen. Typischerweise sind die Phospholipide in Archaeen an (sn)-2,3-Position des Glycerins veretherte Ketten aus Isoprenuntereinheiten (also sn-Glycerin-1-Phosphat; sn-G1P), während in Eukaryoten (und Bakterien) an (sn)-1,2-Position Fettsäuren verestert sind (also sn-G3P) (Klingl *et al.*, 2013). Jedoch können auch Fettsäuren sowie Homologe zu bakteriellen Fettsäure-Synthese-Enzymen in Archaeen gefunden werden (Lombard *et al.*, 2012; Dibrova *et al.*, 2014). Im Gegenzug konnten Etherlipide in Bakterien gefunden werden (Weijers *et al.*, 2006; Sinninghe Damsté *et al.*, 2007), jüngst sogar sn-G1P-Etherlipide mit Isoprenoid-Seitenketten (Guldan *et al.*, 2011). Auch für Eukaryoten gibt es ein Beispiel für sn-G1P Lipide (Tan *et al.*, 2012). Einen wichtigen Beitrag zur Plausibilität zu Szenarien mit archaeellen Vorläuferzellen konnten darüber hinaus 2011 Shimada und Yamagishi liefern, die vermeintlich unstabile heterochirale Membranen aus bakteriellen und archaeellen Lipiden herstellten. Somit wäre ein sukzessiver Übergang von einem Membrantyp zum anderen bzw. eine Mischung der Membran nach Endosymbiose zumindest theoretisch möglich. In der Natur wurde dergleichen bisher jedoch nie gefunden (Shimada & Yamagishi, 2011).

Wie sich bereits in diesem extrem komprimierten Überblick über Eukaryogenese-Hypothesen zeigt, ist der Sachverhalt äußerst komplex und ließe sich beliebig erweitern (z.B. um Diskussionen über die zeitliche Abfolge der einzelnen Ereignisse auf dem Weg zum Eukaryoten, horizontaler Gentransfer, Entstehung des Cytoskelettes, die Rolle von Viren, etc.). Zu vielschichtig ist das Problem, zu zahlreich und zu kreativ waren die Autoren, als dass hier auch nur annähernd Anspruch auf Vollständigkeit

erhoben werden könnte (die angegebenen Zitate sollten jedoch im Bedarfsfall einen guten Ausgangspunkt zur eigenen Recherche bieten). Die Intention dieser Kurzübersicht ist eine andere: Gegenstand dieser Arbeit ist *Ignicoccus*, ein Crenarchaeot bzw. gegebenenfalls ein Vertreter des 'TACK'-Superphylums und könnte nicht nur aufgrund seiner phylogenetischen Stellung bzw. genomischen Ausstattung sondern auch aufgrund seiner einzigartigen strukturellen Eigenschaften, die in dieser Arbeit detailliert dargelegt werden, entscheidende Argumentationshilfe für bestehende und zukünftige Hypothesen zur Entstehung der eukaryotischen Zelle leisten.

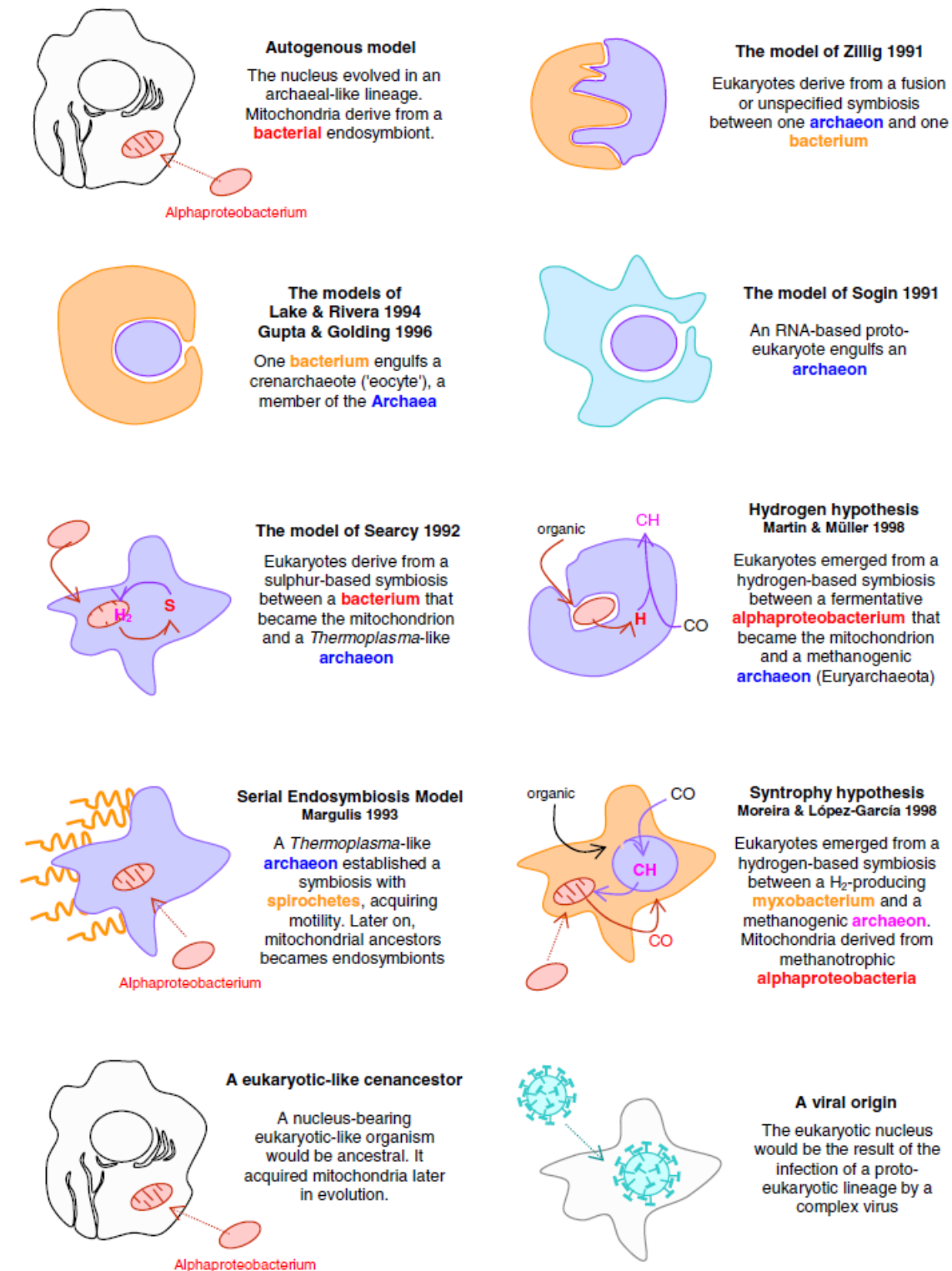


Abbildung 2 Modelle zum Ursprung der eukaryotischen Zelle (aus López-García *et al.*, 2006)

## 1 *Ignicoccus*

Innerhalb der Crenarchaeota wird *Ignicoccus* zur Ordnung Desulfurococcales bzw. der Familie der Desulfurococcaceae zugeordnet (Huber & Stetter, 2006). Bis heute sind vier Spezies bekannt: *Ignicoccus hospitalis* (Paper *et al.*, 2007), *Ignicoccus islandicus*, *Ignicoccus pacificus* (Huber *et al.*, 2000) und ein neues Isolat, das 2008 bei einem Tauchgang am ostpazifischen Rücken nahe der mexikanischen Küste gefunden wurde, MEX13A (Lange, 2009). Allesamt wurden sie isoliert aus Proben von marinen Hydrothermalsystemen oder deren besonderen Ausprägungsformen, den 'black smokers'. Alle *Ignicoccus*-Spezies sind anaerobe, hyperthermophile Organismen mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 90°C. Zur Energiegewinnung reduziert *Ignicoccus* elementaren Schwefel, wobei elementarer Wasserstoff als Elektronendonator agiert. Der Kohlenstoffbedarf wird gedeckt über einen vorgeschlagenen neuartigen CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg, den Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Weg, der zwischenzeitlich auch für weitere Crenarchaeoten nachgewiesen/gemutmaßt wurde (Jahn *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2008; Berg *et al.*, 2010; Siebers *et al.*, 2011). Somit sind alle *Ignicoccus*-Spezies obligat chemolithoautotroph. Eine genauere Charakterisierung dieses CO<sub>2</sub>-Fixierungsweges in *Ignicoccus* ist aktueller Gegenstand wissenschaftlicher Betrachtung (laufende Dissertation Jennifer Flechsler).

Ein taxonomisches Charakteristikum, das *Ignicoccus* von allen anderen Archaeen unterscheidet, ist der Zellaufbau. Anders als die meisten anderen Archaeen besitzt *Ignicoccus* keinen S-Layer, sondern eine äußere Membran zusätzlich zur Cytoplasmamembran (Näther & Rachel, 2004; Albers & Meyer, 2011). Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Membranen in ihrer Lipidzusammensetzung: die äußere Membran besteht allein aus Archaeol, wohingegen in der (inneren) Cytoplasmamembran zusätzlich Caldarchaeol zu finden ist und diese deshalb partiellen Monolayercharakter besitzt (Jahn *et al.*, 2004; Klingl *et al.*, 2013). Zwischen beiden Membranen liegt ein vergleichsweise großer periplasmatischer Raum, der auch als 'Intermembrane Compartment' (IMC) bezeichnet wird. In diesem IMC zeigen sich in Ultradünnschnitten und 3D-Modellen membranumschlossene vesikuläre Strukturen, die sich von der Cytoplasmamembran abzuschneiden scheinen bzw. mit ihr fusionieren. Darüber hinaus konnte anhand von 3D-Modellen eine Polarisierung der Zellen festgestellt werden (Heimerl, 2009).

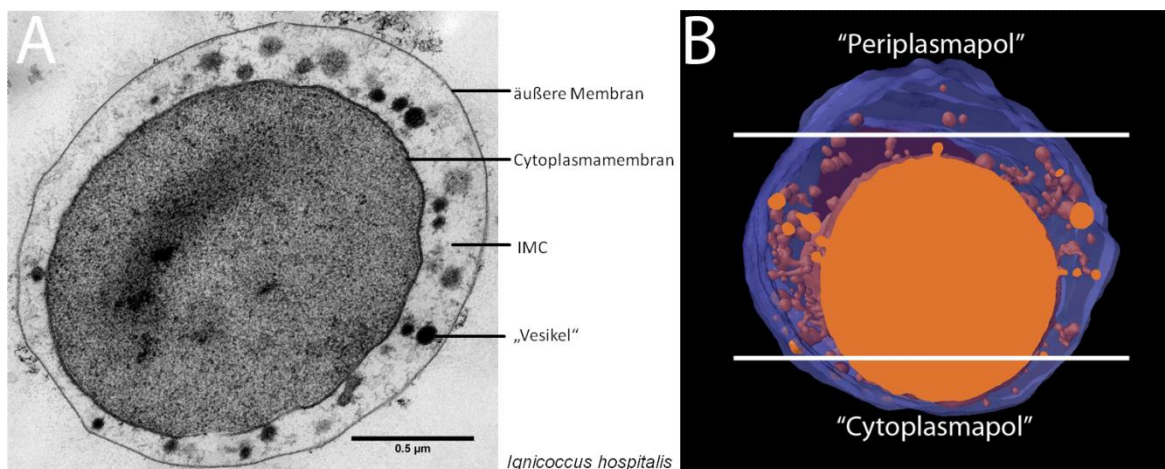


Abbildung 3 (A) Ultradünnschnitt (50 nm) von *Ignicoccus hospitalis* (B) 3D-Modell basierend auf Ultradünnschnitten; (aus Heimerl, 2009)

Zur Unterscheidung der äußeren Membran in *Ignicoccus* von der bakteriellen äußeren Membran wurde unlängst der Begriff 'outer cellular membrane' (vormals 'outermost membrane') für die äußere Membran eingeführt (Huber *et al.*, 2012). Da eine Übersetzung des Begriffes wenig sinnvoll erscheint (ob generell die Einführung dieses Begriffes sinnvoll ist, mag jeder für sich entscheiden) und in dieser Arbeit in erster Linie topologische Aspekte eine Rolle spielen, wird im Folgenden die äußere Membran als äußere Membran bezeichnet. Das häufigste Protein der äußeren Membran von *Ignicoccus hospitalis* ist Ihomp1, ein 8 kDa großes Protein, das oligomerisiert und Porenkomplexe bildet (Burghardt *et al.*, 2007; Burghardt, 2008; Burghardt *et al.*, 2008). Eine Besonderheit der äußeren Membran ist außerdem die Anwesenheit der energieerzeugenden Enzyme: die H<sub>2</sub>:Schwefel-Oxidoreduktase und die archaeelle A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATP-Synthase. Auch ATP-verbrauchende Enzyme wie die Acetyl-CoA-Synthetase konnten bereits assoziiert mit der äußeren Membran gefunden werden. Hieraus lässt sich eine funktionelle Kompartimentierung der Zellen ableiten. Während Replikation, Transkription und Translation im Cytoplasma stattfinden, wird ATP im IMC produziert und es finden dort auch energieverbrauchende Prozesse statt. Streng genommen kann dies derzeit nur für *Ignicoccus hospitalis* geltend gemacht werden. Für alle anderen Spezies sind die Ergebnisse (für die ATP-Synthase) von Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten und fluoreszenzmarkierten Zellen unterschiedlich (Mayer, 2008; Heimerl, 2009; Flechler, 2010; Küper, 2010; Küper *et al.*, 2010; Daxer, 2011; Mayer *et al.*, 2012; Huber *et al.*, 2012; Foith, 2013; Ziegler, 2014).

## 2 Nanoarchaeum

Der bisher best charakterisierte *Ignicoccus*-Vertreter ist *Ignicoccus hospitalis*. Dies lässt sich mit einer zusätzlichen Attraktivität (im wahrsten Sinne) dieser Spezies begründen: Zusammen mit *Ignicoccus hospitalis* wurden kleine Kokken auf deren Zelloberfläche gefunden. Diese kleinen Kokken mit etwa 400 nm Durchmesser sind *Nanoarchaeum equitans*-Zellen und besitzen einen S-Layer mit p6-Symmetrie (Huber *et al.*, 2002). Bei Anheftung sind sie vor allem in Regionen des "Cytoplasmapols" von *Ignicoccus hospitalis* zu finden (Heimerl, 2009). Für den Interaktionsprozess an sich wurde insbesondere für den S-Layer von *Nanoarchaeum* sowie für Ihomp1 eine zentrale Rolle gemutmaßt (Burghardt *et al.*, 2009). *Nanoarchaeum equitans* kann (unter Laborbedingungen) nicht in Reinkultur gezüchtet werden, sondern nur in Co-Kultur mit *Ignicoccus hospitalis* (Huber *et al.*, 2002). Vermutlich handelt es sich bei *Nanoarchaeum equitans* um einen Parasiten (Wasserburger, 2008; Heimerl, 2009), was aber letztlich nicht endgültig erwiesen ist. In jedem Fall gilt die Beziehung als Modell für die strikte Abhängigkeit eines Archaeums von einem anderen (Jahn *et al.*, 2008). Die phylogenetische Stellung von *Nanoarchaeum equitans* ist äußerst umstritten. Ein eigenständiges, tief abzweigendes Phylum Nanoarchaeota wurde ursprünglich vorgeschlagen (Huber *et al.*, 2002). Andere Einteilungsversuche stellen die Nanoarchaeota als Schwesterngruppe neben die Crenarchaeota (Cicarelli *et al.*, 2006) oder innerhalb der Euryarchaeota in enge Verwandtschaft zu den Thermococcales (Brochier *et al.*, 2005). Auch wurde unlängst ein 'DPANN'-Superphylum vorgeschlagen (Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanohaloarchaeota, Nanoarchaeota), das alle kleinen Archaeen mit kleiner Genomgröße zusammenfasst ('DPANN' ist nur in rein archaeellen Bäumen monophyletisch) (Rinke *et al.*, 2013).

Das extrem reduzierte Genom von *Nanoarchaeum equitans* hat lediglich 0.49 Mbp. Aufgrund des Fehlens eines Lipidbiosyntheseweges im Genom (auch die eingangs erwähnten homologen bakteriellen Fettsäure-Synthese-Enzyme fehlen) (Waters *et al.*, 2003; Dibrova *et al.*, 2014) und der

Tatsache, dass die Cytoplasmamembranen beider Organismen eine ähnliche Zusammensetzung haben, wurde geschlossen, dass Lipide von *Ignicoccus hospitalis* zu *Nanoarchaeum* transportiert werden (Jahn *et al.*, 2004). Ebenso kann kein Biosyntheseweg für Aminosäuren im *Nanoarchaeum*-Genom gefunden werden (Waters *et al.*, 2003). Nach Gabe von radioaktiv markiertem Acetat waren die Verteilungsmuster radioaktiv markierter Aminosäuren in beiden Organismen dennoch gleich, so dass auch hieraus auf einen Transport von *Ignicoccus* zu *Nanoarchaeum* geschlossen werden konnte (Jahn *et al.*, 2008). Da für *Nanoarchaeum equitans* nur eine "reduzierte" ATP-Synthase annotiert ist, wurde über einen Transport von "fehlenden" Untereinheiten bzw. über den Transport von ATP spekuliert; darüber hinaus über den Transport von weiteren Nukleotiden, abermals aufgrund der Genomdaten von *Nanoarchaeum* (Waters *et al.*, 2003; Küper *et al.*, 2010; Huber *et al.*, 2012). Als größtes Problem für derartige Hypothesen erscheint, dass die Stoffe mutmaßlich über drei (im Falle von ATP über zwei) Membranen transportiert werden müssten. Zudem konnten nur wenige Transporter im Genom von *Ignicoccus* gefunden werden. Auch ein potentielles Vesikel-transportsystem wurde als Theorie ins Spiel gebracht (Huber *et al.*, 2012).

### 3 Aktuelle Untersuchungen

Aktuelle Untersuchungen zu *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum* konzentrieren sich vor allem auf physiologische und strukturelle Aspekte und sind breit gefächert: Kürzlich wurden Cytochrom-Proteine von *Ignicoccus hospitalis* charakterisiert und aufgrund der Lokalisation in beiden Membranen eine Rolle als Elektronen-'shuttle' gemutmaßt (Naß *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurden Zellanhänge von *Ignicoccus hospitalis* und *Ignicoccus pacificus* strukturell analysiert. In diesem Zusammenhang konnte auch erstmalig eine Ankerstruktur von Zellanhängen in Archaeen genauer charakterisiert werden. Es handelt sich um eine kugelartige Struktur unterhalb der Cytoplasmamembran (Meyer, 2010; Yu *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, Manuskript in Arbeit). Außerdem wird der ATP-Synthase-Komplex in *Ignicoccus* weiter untersucht (Kreuter, 2010; Wiegmann, 2011; Weinfurter, 2012; Weigl, 2013; Ziegler, 2014; laufende Dissertation Lydia Kreuter) und ebenso, wie erwähnt, der CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg näher charakterisiert (laufende Dissertation Jennifer Flechsler). Auch werden Protokolle zur Präparation der äußeren Membran für Cryo-Elektronentomographie entwickelt (Veronika Heinz) und Membran- und Transporter-Proteine aus *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum* zur weiteren Untersuchung rekombinant hergestellt (Wiegmann, 2013; laufende Dissertationen Steffanie Daxer und Pia Wiegmann). Darüber hinaus wurde auf der 'Thermophiles'-Tagung 2013 in Regensburg eine neue, stabile Co-Kultur aus einer *Acidilobus*-Spezies und einem *Nanoarchaeum* präsentiert (Mircea Podar, Oak Ridge, Tennessee, USA). Davon wurden bereits Suspensionspräparate gemacht bzw. Präparate hochdruckgefroren und eingebettet. Erste Ergebnisse gibt es bereits (siehe Abbildung 4), weitere strukturelle Untersuchungen werden folgen (AG Rachel).



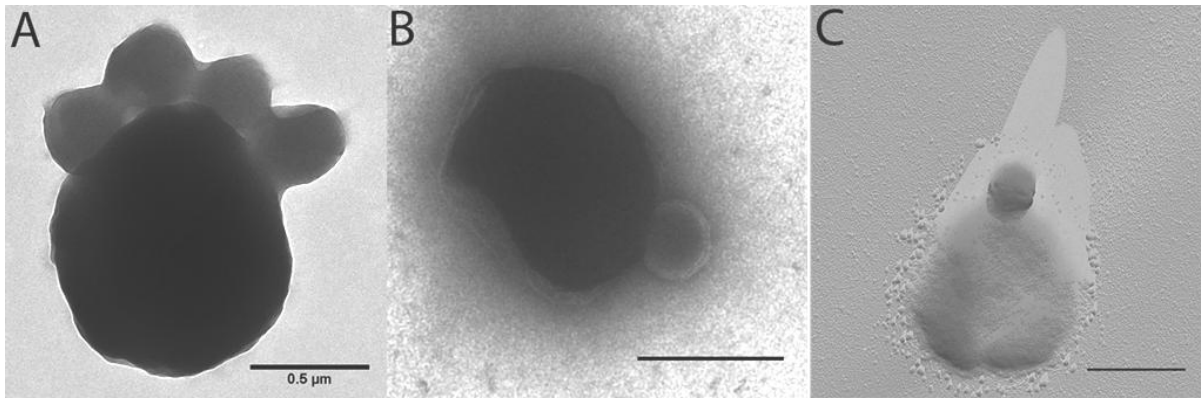


Abbildung 4 (A) *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*, GA fixiert; (B) *Acidilobus* sp. und *Nanoarchaeum* sp., GA fixiert und UAc kontrastiert; (C) *Acidilobus* sp. und *Nanoarchaeum* sp., Pt/C bedampft; Balken je 500 nm

#### 4 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollten die zahlreichen gefundenen strukturellen Eigenheiten von *Ignicoccus* in 50 nm-Ultradünnschnitten und darauf basierenden 3D-Modellen (Heimerl, 2009) eine Revision erfahren (bzw. um weitere Details ergänzt werden), da die in diesem Verfahren erreichte Auflösung die Interpretation limitiert. Somit sollte eine detailliertere Betrachtung mittels höher räumlich auflösender Techniken, wie FIB/SEM und (Serien-)Elektronentomographie stattfinden. Der Fokus lag erneut auf der allgemeinen Zellstruktur, dem endogenen Membransystem und der Kontaktstelle zu *Nanoarchaeum equitans*. Als Voraussetzung für die FIB/SEM-Analysen musste zunächst eine Methode zur schonenden Konzentration der Zellen gefunden werden. Für eine auffällige dunkel kontrastierte Struktur im Cytoplasma sollte zusätzlich eine EDX-Analyse nähere Erkenntnisse liefern.

Außerdem sollten Antikörper gegen homologe Proteine zum eukaryotischen, endogenen Membransystems generiert werden. Um die potentielle Rolle dieser Proteine in *Ignicoccus* näher einzugrenzen, sollten Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten erfolgen.

In Zusammenarbeit mit dem Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA, sollten darüber hinaus Zellmassen der Reinkultur von *Ignicoccus hospitalis* und der Co-Kultur mit *Nanoarchaeum equitans* generiert werden. Diese sollten mit Hilfe von Massenspektroskopie hinsichtlich ihrer Proteome verglichen werden, um Erkenntnisse über den Einfluss von *Nanoarchaeum* auf *Ignicoccus* zu gewinnen. Um zusätzlichen Einblick in den Infektionsprozess zu bekommen, sollten in einem späteren Experiment Proben zu verschiedenen Zeiten in der Wachstumsphase verglichen werden (also Proben mit steigender durchschnittlicher Anzahl von *Nanoarchaeum*-Zellen pro *Ignicoccus*-Zelle). Diese 'Time-Course'-Proteom-Daten sollten zusätzlich um Genexpressions-Microarray-Analysen ergänzt werden.



## II Material und Methoden

### 1 Substanzen und Bezugsquellen

#### 1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösung (37,5:1)	Serva, Heidelberg
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniumhydroxid	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau (BPB)	Serva, Heidelberg
BSA, Fraktion V	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Dinatriumsalz)	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glutardialdehyd	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Glycerin	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Glycin	Riedl de Haën, Seelze
Goldlösung, kolloidal, 15 nm	Miriam Breug (Pharmazie Uni Regensburg)
Gummi arabicum	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Hexamincobalt(III)chlorid	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
Hydrochinon	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedl de Haën, Seelze
Kanamycinsulfat	AppliChem, Darmstadt
Magermilchpulver	TSI, Zeven
MES	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
Methylnadic Anhydrid (MNA)	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Natriumchlorid	VWR Int., Leuven (B)
Natriumhydrogencarbonat	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
Natriumsulfid	VWR, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
Pepton	BD, Heidelberg
Pioloform	Plano, Wetzlar
PMSF	Roth, Karlsruhe
Resazurin	Serva, Heidelberg
Schwefel	Riedl de Haën, Seelze
SDS	Serva, Heidelberg
Silberlaktat	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)

Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure	Applied Biosystems Ltd., Warrington (UK)
Tricin	Roth, Karlsruhe
Tris	USB, Cleveland (USA)
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypton	BD, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Zitronensäure	Sigma -Aldrich, Taufkirchen

Alle weiteren verwendeten Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p.a. Qualität bezogen. Alle verwendeten Gase kamen von Linde, Nürnberg.

### 1.2 Molekularmassenstandards

<b>Protein-Massenstandard</b>	<b>Hersteller</b>
PageRuler™ Unstained Protein Ladder; SM0661	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder; SM0671	Fermentas, St. Leon-Rot

<b>DNA-Längenstandard</b>	<b>Hersteller</b>
1kb DNA Ladder; N3232	New England Biolabs, Frankfurt am Main
100bp DNA Ladder; N3231	New England Biolabs, Frankfurt am Main

### 1.3 Enzyme und kommerzielle Produkte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
α-Chymotrypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit	Life Technologies, Darmstadt
dNTP-Mix; NTPMX100	Qbiogene, Heidelberg
Dynabeads® Protein A Immunoprecipitation Kit	Life Technologies, Darmstadt
Epon® 812 Mix	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
E.Z.N.A.™ Gel Extraction Kit	Omega Bio-Tek, Norcross, GA, (USA)
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
NdeI (20U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NEBuffer 3 (10x)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NEBuffer 4 (10x)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
One Color DNA-labeling kit	Roche NimbleGen, Indianapolis, IN, (USA)
Phusion DNA Polymerase (2U/μl)	Finnzymes, Espoo (FIN)
Phusion HF Buffer (5x)	Finnzymes, Espoo (FIN)
Protease Inhibitor - Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Protino Ni-TED 150	Macherey-Nagel, Düren
Protino Ni-TED 2000	Macherey-Nagel, Düren
PureLink RNA Kit	(ehemals) Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Qiagen Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNase A	Serva, Heidelberg
RNase AWAY®	Roth, Karlsruhe
Roti®-Quant	Roth, Karlsruhe
SuperScript® ds-cDNA Synthesis Kit	(ehemals) Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
T4 DNA Ligase (400U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4 DNA Ligase Buffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
TRIzol® Reagent	(ehemals) Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin (sequencing grade)	Promega, Mannheim
Trypsin (sequencing grade)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Western Lightning® ECL	PerkinElmer, Rodgau
XhoI (10U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot

#### 1.4 PCR-Primer

Primer	5'-Sequenz-3'	Hersteller
Igni_1431_NdeI_for	GCGCATATGGCTCTGCTCCCGGTAAG	Metabion, Martinsried
Igni_1431_kurz_Stop_XhoI_rev	TCTCGAGTTACACGCCCTGACGGCTT	Metabion, Martinsried
Igni_0008_f	CACCTTGAAGAGGAAGTGGATCG	Metabion, Martinsried
Igni_0008_r	TTATCGTTCCTAGCTCG	Metabion, Martinsried

#### 1.5 Vektoren

Vektor	Hersteller
pET15b	Novagen, Darmstadt
pET200 D-Topo	Life Technologies, Darmstadt
pJExpress + Igni_1332 (codon optimized)	DNA2.0, Menlo Park, CA, USA

#### 1.6 Antikörper

Antikörper	Protein	aus	generiert in	Bezugsquelle
α-Igni_0008	WD40	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	rabbit	Davids Biotechnologie, Burgweinting
α-Igni_0561	WD40	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	rabbit	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
α-Igni_1332	V4R	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	rabbit	Covance Research Products Inc., Denver, PA, USA

$\alpha$ -Igni_0994	Vps4	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	rabbit	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
$\alpha$ -Saci1372	Vps4	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	rabbit	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
$\alpha$ -Igni_1431	CDC48	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	rabbit	Davids Biotechnologie, Burgweinting
$\alpha$ -YDL126C	CDC48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	rabbit	AG Buchberger, Universität Würzburg
$\alpha$ -Igni_0101	ESCRT-III	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	rabbit	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
$\alpha$ -Igni_1156	ESCRT-III	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	rabbit	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
$\alpha$ -Saci1373	ESCRT-III	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	goat	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
$\alpha$ -Sso0619	ESCRT-III	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	guinea pig	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
$\alpha$ -Sso0910	ESCRT-III	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	guinea pig	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
$\alpha$ -Igni_0996	CdvA	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	rabbit	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
$\alpha$ -Saci1374	CdvA	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	rabbit	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
$\alpha$ -Igni_1061	Sec61 $\beta$	<i>Ignicoccus hospitalis</i>	rabbit	Stephen Bell, Bloomington, IN, USA
$\alpha$ -Sec61 $\beta$	Sec61 $\beta$	mammalian (9 AS-Peptid)	rabbit	LS Prof. Witzgall, Universität Regensburg
$\alpha$ -SUMO	SUMO	mammalian	rabbit	LS Prof. Witzgall, Universität Regensburg
$\alpha$ -poly-Histidine	His-Tag	/	mouse	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Mit Ausnahme des monoklonalen  $\alpha$ -poly-Histidine Antikörper waren alle oben genannten Antikörper polyklonal.

sekundäre Antikörper & Protein A-Konjugate	Hersteller
$\alpha$ -goat IgG + HRP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\alpha$ -rabbit IgG + HRP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\alpha$ -mouse IgG + HRP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\alpha$ -rabbit IgG Alexa Fluor® 488	Life Technologies, Darmstadt
goat anti rabbit (ultrasmall gold)	Aurion, Wageningen, NL
rabbit anti goat (10 nm gold)	Aurion, Wageningen, NL
Protein A (6 nm gold)	Aurion, Wageningen, NL
Dynabeads® Protein A	Life Technologies, Darmstadt

1.7 Organismen

Organismus	Stamm	Bezugsquelle	Literatur (ggf.)
<i>Ignicoccus hospitalis</i> + <i>Nanoarchaeum equitans</i>	KIN4/M	BBR 17/10/4	Huber <i>et al.</i> , 2002
<i>Ignicoccus hospitalis</i>	KIN4/I	BBR 17/12/4	Paper <i>et al.</i> , 2007
<i>Ignicoccus islandicus</i>	Kol8	BBR 17/10/1	Huber <i>et al.</i> , 2000
<i>Ignicoccus pacificus</i>	LPC33	BBR 17/10/2	Huber <i>et al.</i> , 2000
" <i>Ignicoccus morulus</i> "	MEX13A	BBR 29/08/4	Lange, 2009
<i>Escherichia coli</i>	DH10b	Life Technologies, Darmstadt	
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	Life Technologies, Darmstadt	
<i>Escherichia coli</i>	Rosetta (DE3) pLys	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt	
<i>Escherichia coli</i>	Rosetta 2 (DE3)	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WT-Stamm	AG Tschochner (Universität Regensburg)	

**2 Kulturmedien**2.1 *Ignicoccus/Nanoarchaeum*

## 2.1.1 Modifiziertes ½ SME-Medium

½ SME (modifiziert)	
Synthetisches Meerwasser*	500 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.16 g
Resazurin (0.1 %)	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 1000 ml

Zusätze	
NaS	~0.5 g
Schwefel	Spatelspitze/20ml
Hefeextrakt	0.05% od. 0.1%

*Synthetisches Meerwasser	
NaCl	27.70 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	7.00 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	5.50 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.75 g
KCl	0.65 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.03 g
NaBr	0.10 g
SrCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	15 mg
KI-Lösung (1mg/ml)	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 1000 ml

### 2.1.2 Herstellung und Sterilisation - 20 ml Serumflaschen

Für die Anzucht in Serumflaschen wurden die entsprechenden Substanzen eingewogen und in einer Duranglasflasche (Schott, Mainz) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  gelöst. Die Flasche wurde mit einem Gummistopfen (mit angebrachter Kanüle und Schlauch) und einer Schraubkappe mit Loch verschlossen. Unter Druckausgleich mittels Gegenkanüle wurde auf die Kanüle mit Schlauch ein Gasgemisch aus  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80:20, v/v) angelegt, um Sauerstoff auszutreiben. Nach etwa 45 min wurden beide Kanülen gezogen. Anschließend wurde NaS, das zuvor in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  gelöst worden war mit einer Spritze zugesetzt, um das Medium zu reduzieren. Mit Hilfe von 50%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wurde der pH Wert auf 6 eingestellt. Das Medium wurde dann in der Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA) mit einer Dispensette auf 120 ml Serumflaschen (Natronkalksilikatglas, Stute GmbH, Rheinbreitbach), zu je 20 ml aufgeteilt. Bevor diese mit einem Gummistopfen (Ochs, Bovenden) verschlossen wurden, wurde in jede Serumflasche eine Spatelspitze Schwefel gegeben. Anschließend wurden die Gummistopfen der einzelnen Serumflaschen zusätzlich mit einem Aluminiumring (WICOM, Heppenheim) gesichert. Die Serumflaschen wurden dann evakuiert, anschließend eine Gasphase von  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80:20, v/v) mit 1.5 bar Überdruck aufgespresst. Evakuieren und Aufpressen von Gas wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurde das Medium bei 110°C für eine Stunde sterilisiert. Hefeextrakt wurde als 10%ige (w/v) Stammlösung separat autoklaviert und je nach Bedarf beim Animpfen zu 0.05% bzw. 0.1% zugegeben oder auch nicht.

### 2.1.3 Herstellung und Sterilisation - Fermenter-Vorkulturen

Für die Medien der Fermenter-Vorkulturen unterschied sich das Prozedere geringfügig: Hier wurde bereits zu den eingewogenen Salzen 10 g Schwefel pro Liter Medium gegeben. Vor dem Durchgasen wurde Schwefel mit Hilfe eines Ultra-Turrax Gerätes (TP1842, Janke und Kunkel, Staufen) zerkleinert. Das Medium wurde in 1 l Druckflaschen (Borsilikatglas, Müller und Krempel AG, Büllach, CH) verteilt, zu je 250 ml. Auf die Flaschen wurde nach dreimal Evakuieren und Begasen ein Überdruck von 1 bar  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80:20, v/v) aufgespresst.

### 2.1.4 Herstellung und Sterilisation - Fermenter

Für die Anzucht im 300 l Fermenter (HTE, Bioengineering, Wald, CH) wurden die Salze entsprechend für 250 l Medium eingewogen. Das Medium wurde direkt im Fermenter für 40 min autoklaviert. NaS und gegebenenfalls Hefeextrakt wurden separat in Wasser gelöst und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Ca. 1 kg Schwefel wurde auf zwei Plastik-Bechergläser verteilt und je 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  zugegeben und mit einem Ultra-Turrax zerkleinert. Die Suspension wurde dann bei 110°C für 1 h sterilisiert. Alle Zusätze wurden jeweils kurz vor dem Beimpfen des Fermenters zugegeben. Ebenso wurde der pH-Wert direkt beim Animpfen mit 50%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf 5.8-5.9 eingestellt.



2.2 Escherichia coli

## 2.2.1 LB-Medium (Platten und flüssig)

LB-Medium		
Trypton	10 g	1%
NaCl	10 g	1%
Hefeextrakt	5 g	0.5%
(Agar	15 g)	1.5%
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 1000 ml	

Neben selbst hergestelltem LB-Medium wurde auch eine kommerziell erhältliche Mischung sowohl mit als auch ohne Agar verwendet (siehe 1.3). Die einzelnen Substanzen bzw. Fertigmischungen wurden eingewogen, in H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gelöst und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Antibiotika-Lösungen (siehe 2.2.4) wurden gegebenenfalls anschließend ins Medium gegeben.

## 2.2.2 SOB/SOC-Medium (Platten und flüssig)

SOB			SOC		
Trypton	20 g	2%	Trypton	20 g	2%
Hefeextrakt	5 g	0.5%	Hefeextrakt	5 g	0.5%
NaCl	0.58 g	10 mM	NaCl	0.58 g	10 mM
KCl	0.19 g	2.5 mM	KCl	0.19 g	2.5 mM
MgSO <sub>4</sub>	4.92 g	20 mM	MgSO <sub>4</sub>	4.92 g	20 mM
(Agar	15 g)	1.5%	Glucose	3.60 g	20 mM
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 1000 ml		H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 1000 ml	

Der pH-Wert wurde für SOB sowie SOC mit NaOH auf 7 eingestellt. Daneben wurde auch kommerzielles SOC-Medium aus dem TOPO-Cloning-Kit verwendet (siehe 1.3). Für die Selbsterstellung wurden die einzelnen Substanzen eingewogen, in H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gelöst und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Erst nach dem Autoklavieren wurde sterile MgSO<sub>4</sub>-Lösung bzw. für SOC zusätzlich sterile Glucose-Lösung ins Medium gegeben um Maillard-Reaktionen zu verhindern. Antibiotika-Lösungen (siehe 2.2.4) wurden ggf. ebenfalls anschließend ins Medium gegeben.

## 2.2.3 'Auto-Induction'-Medium (AI)

AI		Separat autoklaviert und zugesetzt	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g	60% Glycerin	10 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g	10% Glucose	5 ml
Trypton	20 g	8% Lactose	25 ml
Hefeextrakt	5 g		
NaCl	5 g		
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 1000 ml		

Das Auto-Induktions-Medium basiert auf der Idee von Studier, 2005, wurde jedoch in einer modifizierten (vereinfachten) Variante verwendet. Die einzelnen Substanzen wurden eingewogen, in H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gelöst und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Glycerin, Glucose und Lactose wurden jeweils gesondert bei gleichen Bedingungen autoklaviert und anschließend ins Medium gegeben, um Maillard-Reaktionen zu verhindern. Benötigte Antibiotika-Lösungen (siehe 2.2.4) wurden ebenfalls anschließend ins Medium gegeben.

## 2.2.4 Antibiotika-Zusätze

Antibiotika-Zusätze wurden verwendet für LB-, SOB- und AI-Medium. Hierfür wurden Stammlösungen angefertigt, welche mit einem 0.2 µm Filter (Filtropur S 0.2; Sarstedt, Nürnberg) sterilisiert wurden. Für diese Stammlösungen wurden Ampicillin und Kanamycin jeweils in H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gelöst bzw. Chloramphenicol in Ethanol (Ampicillin 50 mg/ml; Kanamycin 10 mg/ml; Chloramphenicol 34 mg/ml). Ampicillin und Chloramphenicol-Stammlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt, Kanamycin-Lösungen bei 4°C. Sie wurden zu Endkonzentrationen von 50 µg/ml (Ampicillin), 100 µg/ml (Kanamycin) bzw. 34 µg/ml (Chloramphenicol) in die jeweiligen zu verwendenden Medien gegeben.

2.3 *Saccharomyces cerevisiae* (YPD-Medium)

YPD	
Hefeextrakt	4 g
Pepton	8 g
D(+)-Glucose	8 g
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 400 ml

Für die Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* wurden die oben genannten Substanzen für das YPD-Medium eingewogen und in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  gelöst und anschließend autoklaviert. Ein separates Autoklavieren der Glucose war laut verwendetem Protokoll nicht nötig und es ergaben sich auch keine Probleme.

### 3 Sterilisation

In der Regel wurden alle zu sterilisierenden Flüssigkeiten bei 121°C und 1 bar für 20 min autoklaviert (LaM-MCS; SANOclav, Bad Überkingen bzw. 5050 ELV; Tuttnauer, Breda, NL). Ausnahme hiervon waren Flüssigkeiten, die elementaren Schwefel enthielten. Diese wurden für 1 h bei 110°C sterilisiert. Hitzelabile Lösungen (z.B. Antibiotika-Stammlösungen) wurden mit einem 0.2 µm Filter sterilisiert (Filtropur S 0.2; Sarstedt, Nürnberg). Glaswaren, Plastikreaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden bei 121°C für 40 min autoklaviert und anschließend bei 60°C im Trockenschrank getrocknet (T 6200, Heraeus, Hanau).

### 4 Anzucht

#### 4.1 *Ignicoccus/Nanoarchaeum*

##### 4.1.1 in Serumflaschen

Alle *Ignicoccus*-Spezies wurden anaerob in modifiziertem ½ SME-Medium (siehe 2.1) kultiviert. Mit Hilfe einer Spritze (Ersta, Maersk, DK) wurde das Medium in den Serumflaschen mit 0.2 ml Vorkultur beimpft. Gegebenenfalls wurde zuvor Hefextrakt zu einer Endkonzentration von 0.05% bzw. 0.1% zugegeben. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln (50 rpm) bei 90°C im Wärmeschrank (T5090, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold). Geerntet wurde nach ca. 16 h.

##### 4.1.2 in Cellulosekapillaren

In dieser Arbeit wurden auch in Kunstharz eingebettete Zellen (siehe 7.1.3.3) verwendet, welche in Cellulosekapillaren kultiviert wurden. Diese Präparate wurden von Nadine Wasserburger im Rahmen ihrer Diplomarbeit angefertigt (Wasserburger, 2008), basierend auf der Methode von Rieger *et al.*, 1997. Cellulosekapillaren (Gambro Hospal GmbH, Planegg-Martinsried) wurden auf eine Länge von 1.5 cm zugeschnitten. Unter Argon-Atmosphäre wurden die Kapillaren mit einem Ende in einen Tropfen einer über Nacht gewachsenen Vorkultur getaucht. Durch Kapillarkräfte stieg die Kultur so in die Kapillare. Jeweils drei Kapillaren wurden in eine frisch angeimpfte Vorkultur gegeben. Diese wurde wie unter 2.1.2 beschrieben mit einem Gummistopfen und einem Aluminiumring verschlossen und ein  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  Gasgemisch aufgedrückt. Die Kulturen wurden dann bei 90°C liegend inkubiert.

##### 4.1.3 im Fermenter

Für Großanzuchten im Fermenter wurden zunächst 1 l Druckflaschen (mit je 250 ml Medium) mit je 2 ml Vorkultur einer 20 ml Serumflasche beimpft und unter gleichen Bedingungen wie die 20 ml

Serumflaschen inkubiert (siehe 4.1.1). Statt Vorkulturen konnten auch gefrorene Zellpellets (~2 g) zum Animpfen verwendet werden (siehe Küper, 2010). Die Vorkultur bzw. das Pellet wurde dabei mit den Zusätzen (Schwefel, NaS, gegebenenfalls Hefeextrakt) in steriles  $\frac{1}{2}$  SME-Medium in den Fermenter gegeben (siehe 2.1.4). Nach Verschließen des Fermenters wurde  $H_2/CO_2$  (80:20, v/v) mit einem Druck von 2 bar aufgepresst und die Rührung auf 100 rpm eingestellt. Ab einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  *Ignicoccus* Zellen/ml wurde die Kultur mit ca. 60 l/min  $N_2/H_2/CO_2$  (65:15:20, v/v/v) durchgast. Nach Erreichen der gewünschten Wachstumsphase oder Zellzahl wurde die Durchgasung eingestellt, die Rührung gestoppt und geerntet.

#### 4.1.3.1 Ernte von Zellen direkt aus dem Fermenter

Die Kultur wurde direkt aus dem Fermenter in eine Durchlaufzentrifuge (Typ CEPA Z41G, Padberg, Lahr) geleitet und bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 15 l/min zentrifugiert. Die so geerntete Zellmasse wurde in dem im Rotor verbliebenem Medienrest suspendiert und im Anschluss mittels einer weiteren Zentrifuge (Jouan KR 422, C-60 Rotor, 4300 rpm, 30 min, 4°C bzw. Sorvall RC 5C Plus, GS3 Rotor, 9000 rpm, 30 min, 4°C) sedimentiert, in flüssigem  $N_2$  schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.1.3.2 Ernte unter Erhalt des physiologischen Zellstatus

Um den physiologischen Status der Zellen zu erhalten, wurde die noch heiße Kultur (90°C) aus dem Fermenter durch eine Gegenflusskühlanlage (Feichtenschlager, Neusäß) in einen sterilen Tank (Gresser, Regensburg) geleitet. Dies ermöglichte das Abkühlen der Kultur auf 4°C binnen 2 min und verhinderte eventuelle Anpassungen der Organismen an veränderte Umweltbedingungen, die durch vergleichsweise langsames Abkühlen der Kultur möglich werden. Die so gekühlte Kultur verblieb für ca. 2 h im Tank. Restlicher elementarer Schwefel konnte sich so absetzen und wurde aus dem Tank abgelassen. Die Zellen wurden danach wie in 4.1.3.1 beschrieben geerntet und weiterverarbeitet.

#### 4.1.3.3 Ernte zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphase

Zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumskurve wurden Zellen in einen sterilen Tank überführt. Für den ersten Zeitpunkt waren dies 25 l, für weitere Zeitpunkte 15 l. Der Rest der Kultur wurde wie unter 4.1.3.2 beschrieben geerntet. Die einzelnen Teilkulturen wurden dabei aus dem Probennehmer des Fermenters in den Tank überführt. Die Schläuche führten hierbei durch ein Eisbad. Vom Tank aus wurden die einzelnen Teilkulturen in eine Durchlaufzentrifuge (Heraeus, Contifuge stratos mit 'Titanium continuous flow rotor'; Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) mit ca. 280 ml/min geleitet und bei 16 500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und im Anschluss mittels einer weiteren Zentrifuge (Sorvall RC 5C Plus, GSA Rotor, 13 000 rpm, 30 min, 4°C) abzentrifugiert. Erneut wurden die Zellen im jeweiligen Überstand resuspendiert, diesmal jedoch in geringerem Volumen (ca. 5-6 ml). Die Suspensionen wurden in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und in einer Tischzentrifuge (Himac CT15RE; Hitachi, Tokyo, JP) (10 min, 13 000 rpm, 4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Reaktionsgefäße in flüssigen Stickstoff gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

Da die Proben auch für RNA-Analysen zum Einsatz kommen sollten, wurden Zellenschaber und Löffel im Vorfeld in verdünnte Chlorbleichlauge eingelegt, bei 121°C für 40 min autoklaviert sowie RNase Away® unmittelbar vor deren Benutzung verwendet. Der Titan-Rotor der Durchlaufzentrifuge wurde nach jeder Teilernte zerlegt, gesäubert, zusammengebaut und vor erneuter Teilernte mit Ethanol und RNase Away® behandelt.

#### 4.2 Escherichia coli

*Escherichia coli*-Bakterien wurden sowohl in Flüssigmedium als auch auf Agarplatten kultiviert. Für Flüssigkulturen fanden Erlenmeyer-Kolben verschiedenster Größen Verwendung. Diese wurden im Vorfeld bei 121°C für 40 min autoklaviert und zu 1/4 ihres Volumens mit entsprechendem Medium (LB, SOB oder AI) und Antibiotika-Lösung befüllt. Für Mini-Präps (siehe 8.4.1) wurden 5 ml Kulturen in 15 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nürnbrecht) verwendet. Für alle *E. coli*-Anzuchten (auch Expressionsstämme) wurde stets eine Inkubationstemperatur von 37°C verwendet.

#### 4.3 Saccharomyces cerevisiae

Für die Herstellung eines Hefezelllysates wurde eine Übernachtskultur von *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt. Hierfür wurden 250 ml YPD-Medium mit Zellmaterial von einer bewachsenen Agarplatte (AG Tschochner, Universität Regensburg) beimpft und bei 30°C inkubiert.

### 5 Herstellung von Zelllysaten

#### 5.1 Iqnicoccus/Nanoarchaeum

Lysepuffer (nach Burghardt, 2008)		Lysepuffer (für CoIP)	
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM	HEPES	30 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM	NaCl	150 mM
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1.4 mM	EGTA	1 mM
PMSF	1 mM	Natriumdeoxycholat	0.1%
@pH (ergibt sich)	4.4	Triton X-100	0.5%
		Glycerin	10%
Lysepuffer (für LC-MS/MS)		Benzamidin	2 mM
SDS	4% (w/v)	PMSF (in EtOH)	1 mM
Tris/HCl (pH 8)	100 mM	Roche Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette
DTT	50 mM	@pH	7.5-8

Zellpellets von Fermenteranbauten wurden im Lysepuffer (Burghardt, 2008) suspendiert und mit einem Glas-Homogenisator (Wheaton, UK) aufgeschlossen. Die Überprüfung erfolgte lichtmikroskopisch. Alternativ dazu wurden Zelllysate verwendet (verschiedene *Ignicoccus*-Spezies und *Sulfolobus solfataricus*) die im Rahmen der Doktorarbeit von Ulf Küper gemacht wurden (Küper, 2010). Für eine Co-Immunpräzipitation (siehe 11.6) wurde ein eigener Lysepuffer Puffer entworfen. Durch die zugesetzten Detergenzien Triton X-100 und Natriumdexoycholot war kein weiterer mechanischer Aufschluss nötig. Für LC-MS/MS (siehe 10.3.2) wurden kleine gefrorene Zellpellets im entsprechenden Puffer resuspendiert und für 5 min aufgeköcht. Zum besseren Aufschluss und zur besseren Solubilisierung wurde die Suspension zusätzlich mit Ultraschall behandelt.

### 5.2 *Escherichia coli*

Für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen (siehe 9.4) wurden zum Zellaufschluss von *E. coli* zwei verschiedene Puffer verwendet:

Lysepuffer (á la Invitrogen)		Lysepuffer (LEW)	
Kaliumphosphat (pH 7.8)	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	400 mM	NaCl	300 mM
KCl	100 mM		
Glycerin	10%		
Triton X-100	0.5%		
Imidazol	10 mM		

Im Falle der Verwendung des Lysepuffers á la Invitrogen wurden resuspendierte Zellen mehrmals in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Im Falle der Verwendung von LEW wurde Lysozym zur Zellsuspension gegeben (Endkonzentration 1 mg/ml) und die Zellen zusätzlich mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Überprüfung erfolgte jeweils lichtmikroskopisch.

### 5.3 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* wurde aufgeschlossen wie in Böhm *et al.*, 2011, beschrieben mit kleinen Unterschieden: Statt NP-40 wurde Triton X-100 verwendet und außerdem wurden die Zellen zusätzlich zu 'glass beads' mehrmals mit Ultraschall behandelt. Die Überprüfung erfolgte lichtmikroskopisch.

## 6 Lichtmikroskopie

### 6.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Mittels Phasenkontrastmikroskopie wurden Zellaufschlüsse kontrolliert, Wachstum überprüft sowie Zellzahlen von *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum* bestimmt. Hierbei kamen zwei Mikroskope zum Einsatz: Zeiss Axiostar plus (Zeiss, Oberkochen) und Olympus BX60 (Olympus, Hamburg) mit jeweils 40x/NA0.65 Luftobjektiv und 100x/NA1.25 Ölimmersionsobjektiv. Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Olympus BX 53 ausgestattet mit einer monochromen 14 bit XM10 Kamera (jeweils Olympus, Hamburg) gemacht.

### 6.2 Thermomikroskopie

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei Videos bearbeitet und analysiert, die von Martina Lange für ihre Diplomarbeit an einem Thermomikroskop gemacht wurden (Horn *et al.*, 1999; Lange, 2009). Die entsprechende Vorgehensweise ist daher dieser Arbeit zu entnehmen.

### 6.3 Thoma-Zählkammer

Zellzahlen von *Ignicoccus* (z.B. für die 'Time-Course'-Experimente) wurden mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (0.02 mm x 0.0025 mm<sup>2</sup> pro Kleinstquadrat; Brand, Wertheim) unter Verwendung eines 40x Objektivs ermittelt.

$$\text{Gesamtzellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Kleinstquadrate}} \times 2 \times 10^7$$

Die Zellzahl für *Nanoarchaeum* wurde nach einem Verfahren von Ulf Küper ermittelt: Unter Verwendung eines 100x Objektivs wurden adherierte *Nanoarchaeum*-Zellen von mindestens 50 *Ignicoccus*-Zellen ausgezählt und ein mittleres "*Nanoarchaeum* pro *Ignicoccus*"-Verhältnis errechnet. Mit Hilfe der zuvor bestimmten *Ignicoccus*-Zellzahl konnte somit die *Nanoarchaeum*-Zellzahl bestimmt werden. Auch wenn diese Methode potentiell vorkommende freie *Nanorchaeeum*-Zellen unterschlägt, ist derzeit kein geeigneteres Verfahren bekannt.

## 7 Elektronenmikroskopie

### 7.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für strukturelle Analysen wurden drei TEMs verwendet: ein 120 kV Philips CM12 (FEI, Eindhoven, NL) mit LaB<sub>6</sub>-Kathode und einer 1k x 1k (Pixel) Slow-Scan CCD-Kamera (TEM-1000, TVIPS, Gauting), ein 200 kV JEOL JM-2100 (JEOL Ltd., Tokyo, JP), ebenfalls mit LaB<sub>6</sub>-Kathode und 1.3k x 1k Kamera (Erlangshen ES500W; Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) der Universität Bayreuth unter Anleitung von PD Dr. Stefan Geimer, und ein JEOL JM-2100F (JEOL Ltd., Tokyo, JP) mit Feldemissionskathode und 4k x 4k CMOS Kamera (TemCam-F416; TVIPS, Gauting). Verwendung fanden hierbei die Softwarepakete EM-Menu 4.0 (TVIPS, Gauting) und SerialEM (Mastrorarde, 2005). Der Großteil der

nachfolgend beschriebenen verwendeten Präparationsmethoden basiert auf bestehenden Protokollen, detailliert dargelegt in Rachel *et al.*, 2010.

### 7.1.1 Suspensionspräparate

Zellsuspensionen wurden in einen Tropfen 25%ige Glutardialdehyd-Lösung in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß (Saarstedt, Nürnberg) pipettiert. Die Suspension wurde anschließend in einer Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert und der Überstand bis auf wenige  $\mu\text{l}$  abgenommen. Die Proben wurden auf kohlebefilmte und beglimmte Kupfernetzchen aufgetragen (400 square mesh; Plano, Wetzlar) und die überschüssige Flüssigkeit mittels Filterpapier 'abgeblotted'. Zum Beglimmen (hydrophilisieren/sterilisieren) wurde hierfür ein Harrick Plasma Cleaner/Sterilizer (PDC-3xG; Harrick Plasma, Ithaca, NY, USA) verwendet. Anschließend wurde zweimal mit einem Tropfen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  nachgewaschen. Gegebenenfalls wurden die Proben dann mit essigsäurem Uranylacetat (2% w/v; UAc) kontrastiert (wenige Sekunden) oder mit 1 nm Platin/Kohle (Pt/C) aus einem  $15^\circ$  Winkel bedampft (in einer CFE-50 Bedampfungsanlage; Cressington Ltd., Watford, UK) (Abbildung 4 zeigt die drei Methoden). Für eine 'On-Grid'-Lyse der Zellen wurden die Netzchen mit den Proben 1-2 min in einem Lysepuffer (20 mM HEPES, 15 mM KCl, 5 mM EGTA, pH 7 mit KOH eingestellt plus 1% Triton X-100) inkubiert und anschließend mit UAc kontrastiert.

### 7.1.2 Filtermethoden

Um Zellen nach der Anzucht möglichst schonend zu konzentrieren wurden zwei verschiedene Techniken des Filterns getestet: Die erste Methode basiert dabei auf einer bereits im Kleinmaßstab erprobten Idee von Prof. Gerhard Wanner (LMU München), die den entsprechenden Bedürfnissen angepasst wurde. Ein 50 ml Reaktionsgefäß (Saarstedt, Nürnberg) wurde abgeschnitten und ein Loch in den Deckel gebohrt. Über die eigentliche Öffnung wurde eine PVDF-Membran (Immobilion-P,  $0.45 \mu\text{m}$ ; Merck Millipore, Darmstadt) sowie zwei bis drei Lagen zurechtgeschnittenes Whatman-Papier (Whatman® Chromatography Paper, 3 mm, GE Healthcare Science, Freiburg) in den Deckel gelegt, bevor dieser wieder vorsichtig aufgeschraubt wurde. Das Reaktionsgefäß wurde nun durch das hintere Ende befüllt und auf Papiertücher gestellt, bis die Flüssigkeit annähernd vollständig abgesaugt worden war. Die Prozedur wurde sowohl aerob (unter dem Abzug) als auch anaerob (im Anaeroben-Zelt; Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA) vollzogen. Bei der zweiten verwendeten Methode kam ein kommerziell erhältlicher Filteraufsatz für Spritzen (25 mm Swinnex Filter Holder; Merck Millipore, Darmstadt) zum Einsatz. Als Membranmaterial wurden Polycarbonat-Rundfilter mit den Porengrößen  $0.4 \mu\text{m}$  und  $0.2 \mu\text{m}$  (Sartorius AG, Göttingen) verwendet. Nach dem Filtern verblieben die Zellen meist in einem kleinen Flüssigkeitsrest, was eventuell bereits ausreichte; gegebenenfalls wurden die Zellen vorsichtig mit Medium vom Filter gewaschen.



### 7.1.3 Herstellung von Ultradünnschnitten und Semidünnschnitten

#### 7.1.3.1 'High Pressure Freezing' (HPF)

Um die Ultrastruktur bestmöglich zu erhalten, wurden Zellen unter Hochdruck (ca. 2000 bar) in flüssigem Stickstoff gefroren. Hierfür wurde das Gerät EM PACT2 verwendet (Leica, Wetzlar). Die Proben wurden hierzu in goldbeschichtete Flachpräparatehalter (Tiefe 200 µm, Innendurchmesser 1,5 mm; Leica, Wetzlar) pipettiert und mittels Halters in das Gerät "eingeschossen". Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert, um den Vitrifikationszustand des Wassers aufrecht zu erhalten.

#### 7.1.3.2 Gefriersubstitution

Eine Gefriersubstitution dient dem Austausch intrazellulären Wassers mit organischem Lösungsmittel. Um die Zellstruktur dabei zu erhalten, enthalten Substitutionslösungen zusätzlich Fixantien, wie z.B. Glutardialdehyd. Ebenso sind Kontrastmittel, wie Uranylacetat enthalten. Um eine Rekristallisation von vitrifiziertem Wasser und daraus resultierende Strukturschäden der Proben zu vermeiden, wird die Temperatur nach dem Hochdruckgefrieren sukzessive über einen langen Zeitraum erhöht. Die Probe liegt dabei in der Substitutionslösung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Gefriersubstitution mit einer EM AFS 2 Analge (Leica, Wetzlar) durchgeführt. Alle eingebetteten Zellen wurden mit folgendem "Cocktail" (HUGA) nach unten stehendem Protokoll gefriersubstituiert. Die Zugabe von Wasser mag auf den ersten Blick widersinnig erscheinen, führt aber tatsächlich zu klarer definierbaren Membranen bei Betrachtung mit dem Elektronenmikroskop. Der Effekt ist jedoch bisher nicht genau verstanden (Walther & Ziegler, 2002; Buser & Walther, 2008). Vermutet wird, dass das Wasser die hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipide stabilisiert und die Membran während der Gefriersubstitution sozusagen in Form hält.

HUGA		
H <sub>2</sub> O	5%	0.5 ml
Uranylacetat	0,5% (w/v)	50 mg
Glutardialdehyd (10% in Aceton)	0,5% (v/v)	0.5 ml
Aceton	94.5%	9 ml

Gefriersubstitution	
-140°C bis -90°C	8 h
-90°C	8 h
-90°C bis -60°C	6 h
-60°C	8 h
-60°C bis -30°C	4 h
-30°C	3 h
-30°C bis 0°C	4 h
0°C	4 h

### 7.1.3.3 Einbettung in Epon

Das Infiltrieren der Proben mit Epon erfolgte nach unten stehendem Schema. Für die letzten beiden Schritte wurde stets frisch angerührtes Epon verwendet. Zum Auspolymerisieren der Proben kamen diese in einen Wärmeschrank.

Eponeinbettung		
0°C	Aceton	3 x 30 min
0°C bis 4°C	Aceton	30 min
4°C bis 25°C	Aceton/Epon (2:1)	1 h
25°C	Aceton/Epon (2:1)	1 h
25°C	Aceton/Epon (1:1)	2 h
25°C	Aceton/Epon (1:2)	20 h
30°C	Epon	2 h
60°C	Epon	2 d

### 7.1.3.4 Trimmen

Das Trimmen von Blöckchen war insbesondere für die Anfertigung von Serienschritten notwendig. Es wurde entweder eine Fräse (EM TRIM2; Leica, Wetzlar) verwendet oder manuell mit einer Rasierklinge getrimmt. Um beim Schneiden am Ultramikrotom ein Band von Schnitten zu erhalten, wurde die Stirnseite der Blöckchen so geschnitten, dass Oberseite und Unterseite parallel waren. Für Serienschritte war es außerdem das Ziel, die Stirnseite möglichst klein zu halten, um viele Serienschritte auf einem einzelnen Slot-Grid unterzubringen (Elliot, 2002). Oftmals wurde erst nach einem ersten Screening der Blöckchen im TEM feingetrimmt, um überhaupt erst die Lage der Zellen auszumachen.

### 7.1.3.5 Ultramikrotomie

Geschnitten wurden die Blöckchen an den Ultramikrotomen "Ultracut E" bzw. "Leica EM UC 6" (beide Leica, Wetzlar). Hierfür wurden die Blöckchen in spezielle Halterungen eingespannt, welche wiederum am jeweils verwendeten Ultramikrotom fixiert wurden. Ebenso wurden bereits zuvor bewässerte (mit steril filtriertem  $H_2O_{\text{Millipore}}$ ) Diamantklingen (Diatome AG, Biel, CH) am Ultramikrotom befestigt. Für Ultradünnschnitte á 50 nm wurden Klingen mit der Typenbezeichnung "Ultra" oder "Histo" verwendet. Dickere Schnitte, wie sie bei der Tomographie benötigt wurden (á 200 nm), wurden ausschließlich mit "Histo"-Klingen gefertigt. Für den Schneidevorgang wurden zunächst der Winkel des Messers zur Stirnseite des Blöckchens und das Schneidefenster eingestellt sowie die Schneidegeschwindigkeit auf 0.8 - 1.5 mm/s gesetzt. Die auf der Wasseroberfläche

schwimmenden Schnitte wurden mit einem 'Loop' (Perfect-Loop; Diatome, Biel, CH) gefischt und auf Pioloform befilmte Slot-Grids aufgebracht. Nach Abziehen des Wassers mit Filterpapier wurden die Grids kurz luftgetrocknet und in einer Gridbox aufbewahrt.

#### 7.1.3.6 Befilmung von Slot-Grids

Zur Befilmung von Slot-Grids, auf die die Schnitte aufgebracht wurden, wurde eine 1.5%ige (w/v) Pioloformlösung (1.5 g Pioloform pro 100 ml Chloroform) in einen Schliffkolben gefüllt und eine spezielle Apparatur (Eigenbau nach Frau Kühn, Zoologie, Universität Regensburg) aufgesteckt. In den oberen Teil wurde ein staubfreier Glasobjektträger gestellt, die Pioloformlösung nach oben gepumpt und über ein Ventil wieder nach unten abgelassen. Der Objektträger wurde so mit der Pioloformlösung benetzt und es bildete sich letztlich nach kurzer Verflüchtigungszeit des Chloroforms ein Pioloformfilm auf dem Objektträger. Mit einer Rasierklinge wurde der Pioloformfilm rechteckig ausgeschnitten und im Wasserbad abflotiert. Die zu beschichtenden Slot-Grids aus Kupfer, G2500C 2 mm x 1 mm (3.05 mm) bzw. aus Nickel, G2500N 2 mm x 1 mm (3.05 mm) (jeweils Plano, Wetzlar), wurden anschließend mit der glänzenden Seite nach unten auf den schwimmenden Pioloformfilm gelegt. (Um die Grids fettfrei zu machen, wurden sie bereits einige Stunden vorher in Chloroform eingelegt.) Danach wurde der Plastikfilm mit den Grids mit Hilfe eines Stücks Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA) aus dem Wasser gefischt, indem der Parafilm über den Pioloformfilm gelegt wurde. Bis zum Gebrauch wurden die befilmten Grids in einer Plastikpetrischale aufbewahrt. Zur Entnahme wurde rund um das entsprechende Grid der Pioloformfilm mit einer Pinzette perforiert.

#### 7.1.3.7 Schnittkontrastierung

Wenn notwendig, wurden Schnitte mit Uranylacetat nachkontrastiert, um eine Verbesserung der Kontrastverhältnisse der Präparate für die Untersuchungen im Transmissionselektronenmikroskop zu erzielen. (Eine erste Kontrastierung mit Uranylacetat fand bereits bei der Gefriersubstitution statt.) Vor Verwendung wurden die entsprechenden Lösungen 3 min bei 14 000 rpm in einer Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert, um störende Präzipitate zu entfernen. Für jedes zu kontrastierende Grid wurde ein Tropfen einer 2%igen (w/v) essigsäuren Uranylacetatlösung auf ein Stück Parafilm gegeben. Die Grids wurden dann mit der Seite, auf denen sich der Schnitt befand, auf den Tropfen gelegt und für 20-30 min unter Lichtausschluss (Uranylacetat zersetzt sich im Licht) inkubiert. Anschließend wurde die Uranylacetatlösung mit Filterpapier seitlich vom Grid abgezogen. Danach wurden die Grids kurz in einen sterilen Tropfen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  gelegt und ebenfalls wieder mit einem Filter die Flüssigkeit abgezogen. Dieser Waschschrift wurde jeweils zweimal wiederholt.

#### 7.1.4 (Serien-)Tomographie

Für die Elektronentomographie wurden Grids mit einzelnen oder Serien von 200 nm-Schnitten mit einer dünnen Schicht Kohlenstoff bedampft (CFE-50; Cressington, Watford, UK). Für die beiden JEOL-Geräte lief die Aufzeichnung von Kippserien vollautomatisch. Für Kippserien am CM12 musste manuell gekippt werden. Die genauen Kippwinkel und Kippinkremente der einzelnen Tomogramme finden sich in einer Tabelle unter III/1.3; dort finden sich auch nähere Details zur genauen Vorgehensweise. Eine weitere Bearbeitung der Kippserien fand ausschließlich mit dem Programm IMOD statt (Kremer *et al.*, 1996). Visualisiert wurden die errechneten Tomogramme mit AMIRA (FEI, Eindhoven, NL).

#### 7.2 'Energy Dispersive X-Ray Analysis' (EDX)

Die EDX-Analysen wurden zusammen mit Prof. Dr. Josef Zweck am Institut für Physik der Universität Regensburg durchgeführt. Hierbei wurde ein Philips CM30 TEM verwendet (FEI, Eindhoven, NL), ausgestattet mit einem XFlash 5030 Detektor (Bruker AXS, Billerica, MA, USA). Zur Stabilisierung wurde auf die zu analysierenden 200 nm-Schnitte eine wenige Nanometer dünne Kohlenstoffschicht aufgedampft (CFE-50; Cressington, Watford, UK). Es wurden Gesamtströntgenspektren aufgezeichnet sowie sog. 'Line-Scans' und 'Mapping'-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde die Software Esprit/Quantax1.8.5 verwendet (Bruker AXS, Billerica, MA, USA).

#### 7.3 'Focused Ion Beam/Scanning Electron Microscopy' (FIB/SEM)

Die Weiterentwicklung und Anpassung des bestehenden Präparationsverfahrens für *Ignicoccus* zur Ermöglichung von FIB/SEM-Analysen war ein erklärtes Ziel dieser Arbeit. Folglich ist das genaue Verfahren der Probenvorbereitung unter III/1.1 und III/1.2 erläutert. Die Aufzeichnung der FIB/SEM-Datensätze erfolgte durch Prof. Dr. Gerhard Wanner an der LMU München an einem Zeiss Auriga 60 (Zeiss, Oberkochen) im 'slice and view'-Verfahren. Für die Abtragung von 5-10 nm-Materialschichten wurde der Galliumionenstrahl mit 30 kV und 1 nA bzw. 500 pA betrieben. Zur Bildaufzeichnung wurde eine Beschleunigungsspannung von 1.5 kV, der 'high-current'-Modus sowie eine Apertur von 60 µm gewählt. Ferner wurde ein 'in-lens' EsB ('energy selective backscattered')-Detektor mit einer 'EsB grid'-Spannung von 1400 V verwendet. Die Datensätze wurden mit dem ImageJ-Plugin 'StackReg' (unter Verwendung der Option 'Rigid Body') aligniert (Thévenaz *et al.*, 1998; Abramoff *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2012) und mit AMIRA (FEI, Eindhoven, NL) visualisiert.

## 8 Molekulargenetische Methoden

### 8.1 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

TAE (1x)		TBE (0.5x)	
Tris/Acetat (pH 8)	40 mM	Tris/Borsäure (pH 8)	44.5 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM

10x Auftragspuffer	
Bromphenolblau	0.25% (w/v)
Xylencyanol	0.25% (w/v)
Glycerin	50% (v/v)
EDTA	20 mM
@pH 8 (ergibt sich)	

Es wurden 1%ige Agarose-Gele verwendet. Als Pufferlösung wurde 1x TAE bzw. 0.5x TBE verwendet. 20 ml 1x TAE bzw. 0.5x TBE wurden mit 0.2 g Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht. Wenn die Lösung handwarm, war wurde als Detektionsmittel 15 µl Ethidiumbromidlösung (Stammlösung 1 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde in Elektrophoresekammern (Horizon® 58, GibcoBRL, Gaithersburg) gegossen und bis zum Erkalten stehen gelassen. Im Anschluss wurde das Gel mit 1x TAE oder 0.5x TBE überschichtet (je nachdem welcher Puffer zuvor verwendet wurde). Die Proben wurden entsprechend ihrem Volumen mit 10x Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Proben in den Gelen erfolgte bei 120 V für ca. 25 min (Biometra Standard Power Pack P25; Biometra, Göttingen). Auf einem UV-Leuchtschirm wurden die Gele im Anschluss dokumentiert. Zur Extraktion von DNA-Banden aus Agarose-Gelen wurden die entsprechenden Banden am UV-Schirm mit einem Skalpell ausgeschnitten. Ferner wurde ein E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers verwendet (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA, USA).

### 8.2 Konzentrationsmessung von DNA

DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt oder mittels Nanodrop (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen). Für die photometrische Bestimmung wurde die zu messende DNA-Lösung 1:20 mit H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> verdünnt (Gesamtvolumen 100 µl) und gegen eine Referenz mit reinem H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> an einem U 2000 Spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, JP) in einer Quarzküvette (Hellma 105.202-QS, Schichtdicke 10 mm, Zentrum 10 mm; Hellma GmbH & Co. KG, Mülldorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Mit Hilfe der unten stehenden Formel konnte die Konzentration bestimmt werden.

$$c(\text{DNA}) = OD_{260\text{nm}} \times 20 \times 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Für die Messungen am Nanodrop wurde 1 µl DNA-Lösung gegen eine Referenz von 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gemessen. Die entsprechende DNA-Konzentration sowie der Reinheitsgrad ( $A_{260}/A_{280}$ ) waren direkt abzulesen.

### 8.3 Isolierung von gDNA

Zellsuspensionslösung	
Tris/HCl (pH 8)	0.5 M
EDTA	0.2 M
NaOH	0.46 M

Protease-Lösung	
Proteinase K	20 mg/ml
Tris/HCl (pH 8)	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	5 mM

RNase-Lösung	
RNase A	1 mg/ml
NaCl	20 mM
EDTA	1 mM
Tris/HCl (pH 7.5)	50 mM

TE-Puffer	
Tris/HCl (pH 8)	10 mM
EDTA	1 mM

Die Isolierung genomischer DNA von *Ignicoccus* wurde in Anlehnung an ein entsprechendes Protokoll für schwefelabhängige Hyperthermophile von Ramakrishnan & Adams (1995) durchgeführt: Ca. 0.2 g gefrorenes Zellpellet einer Fermenter-Anzucht wurden mit 1.85 ml Zellsuspensionslösung resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl der RNase Lösung dazugegeben, kurz gemischt und 100 µl 15%ige SDS-Lösung (pH 6.6) zur Zelllyse dazugegeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei 55°C inkubiert. 25 µl der Protease-Lösung wurden zugegeben und der Ansatz für weitere 60 min bei 55°C inkubiert. Um Proteine "auszusalzen" wurden 500 µl 5 M NaCl Lösung (anstelle der vorgeschlagenen kommerziell erhältlichen 'Salt-Out-Mixture') zugegeben, vorsichtig gemischt und die Ansätze für 10 min auf Eis gestellt. Ausgefällene Proteine sowie sonstige Zellbestandteile wurden bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge (Himac CT15RE; Hitachi, Tokyo, JP) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 2 ml TE Puffer sowie 8 ml Ethanol hinzugegeben. Sichtbare DNA-Fäden wurden aus der Lösung gefischt, der Rest abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gefischte sowie die abzentrifugierte DNA wurden dann etwa 20 min luftgetrocknet und in H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gelöst.

## 8.4 Plasmid-Präparation

### 8.4.1 Plasmid-Mini-Präparation

GTE		Alkali-SDS		Acetatlösung	
Glucose	50 mM	NaOH	0.2 N	Kaliumacetat	5 M
Tris/HCl (pH 8)	25 mM	SDS	1% (w/v)	Eisessig (5 M)	zum Titrieren auf pH 4.8
EDTA (pH 8)	10 mM				

Es wurden 5 ml Kulturen (in LB bzw. SOB mit entsprechendem Antibiotikum) über Nacht inkubiert. Die Kulturen wurden kurz (30 s - 1 min) bei 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge (5417C; Eppendorf AG, Hamburg) pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert. Zudem wurde 1 µl einer RNase A Lösung (mit 1 µg/µl) zugegeben und der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde 200 µl Alkali-SDS-Lösung zugegeben, kurz geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Vor weiteren 5 min auf Eis wurden 150 µl der Acetat-Lösung hinzugegeben und kurz gevortext (Vortex-Genie 2; Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA). Im Anschluss wurde in der Tischzentrifuge (13 000 rpm, 3 min) abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, bevor nach Zugabe von 900 µl eiskaltem (-20°C) Ethanol die DNA auf Eis gefällt wurde. Die Dauer des Fällungsschritts war variabel, jedoch mindestens 5 min. Die gefällte DNA wurde bei 4°C für 3 min bei 14 000 rpm abzentrifugiert (Himac CT15RE; Hitachi, Tokyo, JP) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die DNA nochmal mit 70%igem, ebenfalls eiskaltem Ethanol gewaschen und in derselben Zentrifuge unter denselben Bedingungen weitere 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in 35 µl H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gelöst.

### 8.4.2 Plasmid-Midi-Präparation

Für größere Mengen Plasmid-DNA bzw. wenn höhere Reinheit der DNA benötigt wurde (z.B. für die Sequenzierung), wurde auf ein 'QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit' (Qiagen GmbH, Hilden) zurückgegriffen. Die Präparation wurde dabei nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 8.5 'Polymerase-Chain-Reaction' (PCR) und 'Colony-PCR'

PCR-Ansatz		PCR-Programm			
5x Phusion HF Puffer	4 µl	Denaturierung	98°C	30 s	(1x)
dNTP-Mix (je 10 mM)	0.4 µl	Denaturierung	98°C	10 s	
Primer (je 10 mM)	Je 2 µl	Annealing	x	30 s	(30x)
DNA-Template	5-100 ng	Elongation	72°C	25 s	
Phusion DNA-Polymerase	0.2 µl	Elongation	72°C	5 min	(1x)
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	Ad 20 µl	Ende	4°C	∞	

Standardmäßig wurde oben stehender/s PCR-Ansatz/PCR-Programm verwendet. Selten wurden größere Ansätze (á 50 µl) verwendet und entsprechend hochskaliert. Die 'Annealing'-Temperatur wurde abhängig von den verwendeten Primern gewählt. Außerdem wurde in der Regel ein 'hot start' bei 98°C verwendet. Zum 'Screening' von Klonen wurde gelegentlich eine 'Colony-PCR' verwendet. Hierfür wurde mit einem sterilen Zahnstocher geringfügig Zellmaterial einer Kolonie von einer bewachsenen Platte entnommen und zum PCR-Ansatz als DNA-Template gegeben. Im PCR-Programm wurde für diese 'Colony-PCR'-Ansätze eine anfängliche Denaturierungszeit von 6 min bei 98°C eingestellt.

### 8.6 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau	
pET15b (0.55 µg/µl) bzw. Eluat (PCR-Produkt)	5.5 µl (pET15b) bzw. 30 µl (Eluat)
10 x NEBuffer 4	4 µl
NdeI (20U/µl)	1 µl
XhoI (10U/µl)	2 µl
100x BSA	0.4 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	Ad 40 µl

Für die Klonierung von CDC48 (durchgeführt von Cordula Neuner, vormals Universität Regensburg) wurden sowohl der Vektor pET15b als auch die entsprechenden (zuvor aus einem Gel eluierten) PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI geschnitten. Hierfür wurde der oben stehende Reaktionsansatz für den Vektor bzw. das Insert 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend die Reaktion bei 65°C (20 min) gestoppt.



## 8.7 Ligation

### 8.7.1 T4-DNA-Ligase

Um ein Insert in einen Vektor zu ligieren, wurde zunächst das optimale einzusetzende Verhältnis von Plasmid zu Insert ermittelt. Hierfür wurde das Online-Tool 'Ligation-Calculator' ([http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html)) bemüht. Als molares Verhältnis wurde der vorgeschlagene Wert von 1:3 (Vektor zu Insert) verwendet. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Gesamtmenge an eingesetzter DNA (Plasmid + Insert) 100 ng nicht übersteigt. Die berechneten Volumina von Vektor und Insert wurden zusammen mit 1.5 µl 10x DNA Ligase Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase vermischt und mit H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> zu 15 µl ergänzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

### 8.7.2 Topoisomerase

Für Ligationen mit pET200 wurde kein zusätzliches Ligase-Enzym benötigt, da der Vektor bereits mit einer Topoisomerase assoziiert vorlag. Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben für chemisch kompetente Zellen vorbereitet (siehe 8.8.2). Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach bis zur Transformation auf Eis gestellt.

## 8.8 Transformation von Plasmiden in *Escherichia coli*

### 8.8.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Das Protokoll zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde basierend auf den Erkenntnissen einer Studie zur Verbesserung der Transformationseffizienz des Stammes DH10b erstellt (Wu *et al.*, 2010): 10 ml LB Medium wurden mit Zellmaterial eines gefroren aufbewahrten Stammes mit Hilfe einer Impföse beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Mit 2.5 ml dieser Vorkultur wurden dann 500 ml LB Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.15 - 0.25 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 15 min auf Eis gekühlt und die Zellen abzentrifugiert (4600 rpm, 4°C, 10 min; Heraeus Multifuge 3L-R mit Ch. 2454-Rotor, Buckinghamshire, UK). Mit 15 ml 10%igem eiskaltem Glycerin wurden die Zellen resuspendiert, 15 min auf Eis stehen gelassen und unter gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert; diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt. Bei der vierten Resuspension in 10%igem Glycerin wurde das Volumen auf 1 ml verkleinert und nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

## 8.8.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983), beschrieben in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", auch bekannt als "Maniatis" (Sambrook & Russell, 2001).

TFB	
MES/KOH (1 M, pH 6.3)	10 mM
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	45 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10 mM
KCl	100 mM
Hexamincobaltchlorid	3 mM

FSB	
Kaliumacetat/Eisessig (pH 7.5)	10 mM
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	45 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10 mM
KCl	100 mM
Hexamincobaltchlorid	3 mM
Glycerin	10 % (v/v)

DnD	
DTT	1 M
DMSO	90% (v/v)
Kaliumacetat/Eisessig (pH 7.5)	10 mM

Mit Hilfe einer Impföse wurde von gefroren gelagerten *E. coli*-Stämmen Zellmaterial in 100 ml SOB-Medium (mit 20 mM MgSO<sub>4</sub>) übertragen. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4 inkubiert. Danach wurden die Zellen in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (2700 g, 10 min, 4°C; Ch. 2454-Rotor, Heraeus Multifuge 3L-R, Buckinghamshire, U.K.) und der Überstand verworfen. Je nachdem, ob die Zellen sofort verwendet werden sollten oder ob sie bei -80°C eingefroren werden sollten, wurde das Zellpellet in 20 ml eiskaltem TFB ('Transformation Buffer') oder FSB ('Frozen Stock Buffer') resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Erneut wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen wie zuvor abzentrifugiert und dieses Mal in 4 ml TFB bzw. FSB resuspendiert. Anschließend wurden 140 µl DnD auf die in TFB resuspendierten Zellen bzw. 140 µl DMSO auf die in FSB resuspendierten Zellen gegeben und jeweils 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden jeweils weitere 140 µl DnD bzw. DMSO zu den entsprechenden Suspensionen gegeben. Zellen in TFB mit DnD wurden weitere 15 min auf Eis inkubiert, bevor sie aliquotiert wurden. Zellen in FSB mit DMSO wurden ebenfalls wieder auf Eis gestellt, aber sofort und zügig aliquotiert und letztlich in einem Bad aus flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie bei -80°C gelagert wurden.

## 8.8.3 Transformation durch Elektroporation

Für die Elektroporation wurde ein Gene Pulser XCell (Biorad, München) verwendet. Wenn Ligationsprodukte transformiert werden sollten, war zuvor eine Dialyse des Ligationsproduktes

notwendig, um Bogenströme (Arc-Errors) durch Salzreste beim Elektroporationsvorgang zu vermeiden. Hierfür wurde der Ligationsansatz auf ein in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  schwimmendes Dialyseplättchen (MF<sup>TM</sup>-Membrane Filters, Filter Type 0,025  $\mu\text{m}$  VSWP, Millipore, Eschborn) pipettiert. Nach 30 min wurden 5  $\mu\text{l}$  des Ansatzes in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß mit elektrokompetenten *E. coli*-Zellen überführt, welche unmittelbar zuvor auf Eis aufgetaut wurden. Für die Transformation von Leervektoren konnte auf die Dialyse verzichtet werden (da Leervektoren in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  gelöst vorlagen). Die Ansätze wurden dann in spezielle, vorgekühlte 2 mm Küvetten (Biorad, München) zur Elektroporation überführt. Der elektrische Puls wurde mit 2500 V gesetzt. Im Anschluss an den Puls wurde 1 ml LB-Medium zur Suspension gegeben und die Zellen bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nach einer Regenerationszeit von 45 min wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) bei 3000 rpm für 3 min abzentrifugiert. Ca. 3/4 des Überstandes wurde abgenommen und die Zellen im Restmedium vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde nun auf zwei vorgewärmte LB-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) gegeben, wobei auf einer Platte etwa 1/10 des Ansatzes, auf der anderen der Rest ausplattiert wurde.

#### 8.8.4 Transformation durch Hitzeschock

Für die Transformation durch Hitzeschock wurden *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz bzw. bereits zuvor präparierte Plasmide mit Insert (ca. 10 ng in einem Volumen von 1-5  $\mu\text{l}$ ) zu den Zellen gegeben. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis stehen gelassen. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42°C für 30 s in einem Wasserbad ausgesetzt und anschließend wieder auf Eis gestellt. Zur Regeneration der Zellen wurde jeder Ansatz mit 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium versetzt und für 30 min bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Die Ansätze wurden danach auf LB- oder SOB-Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausplattiert, über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert und am Tag darauf entsprechende Kolonien von der Platte gepickt, mit denen dann weitergearbeitet wurde. Im Falle der Transformation von Plasmiden in Expressionsstämme, wurde mit jedem Ansatz nach der Regeneration 10 ml LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotikazusätzen) angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurde dann der eigentliche Expressionsansatz angeimpft.

#### 8.9 Sequenzierungsdaten

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Entelechon (Regensburg) ausgeführt. Eine Sequenzierung von pET200 mit Igni\_0008 Insert lieferte in einem ersten Anlauf kein brauchbares Ergebnis trotz der Angabe "hoher GC-Gehalt" im Auftrag. Erst mit einem "eigentlich firmeninternen Spezialprotokoll" (Zitat Entelechon-Support) gelang die Sequenzierung.

#### 8.10 Glycerinkulturen

Für die Konservierung und Aufbewahrung von rekombinanten Klonen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden von entsprechenden  $\mu\text{N}$ -Kulturen je 850  $\mu\text{l}$  in ein Kryoreaktionsgefäß überführt zusammen mit 150  $\mu\text{l}$  99.5%igem Glycerin. Diese Glycerinkulturen wurden bei -80°C gelagert.

### 8.11 Genexpressions-Microarray-Analysen

Von den 'Time-Course'-Proben der *Ignicoccus hospitalis*-Reinkultur und der Co-Kultur mit *Nanoarchaeum equitans* (4.1.3.3) wurden Genexpressionsanalysen (und Proteomanalysen; 10.3.2) gemacht. Die Genexpressionsanalysen wurden von PhD Louis Wurch am Oak Ridge National Laboratory (Tennessee, USA) durchgeführt. Das Vorgehen ist im Folgenden kurz erläutert: Von jeder Probe wurden drei Ansätze gemacht. Hierfür wurden Zellpellets mit Trizol (ehemals Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) homogenisiert, und mit einem 'PureLink RNA-Kit' (ehemals Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde die Gesamt-RNA aufgereinigt. Jeweils 10 µg RNA wurden mit dem 'ds-cDNA Synthese-Kit' zu cDNA (ehemals Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) konvertiert und mit dem 'One Color DNA labeling kit' (Roche NimbleGen, Indianapolis, IN, USA) markiert. Von der Firma Roche NimbleGen (Indianapolis, IN, USA) wurden entsprechende Microarrays mit 60mer-Oligonukleotiden (bis zu 20 verschiedene pro Gen) der Protein codierenden Gene aus *Ignicoccus hospitalis* entworfen und hergestellt. Die Hybrisisierung der cDNA an die Microarrays wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Microarrays mit einem 'HR DNA Microarray Scanner' (Agilent, Santa Rosa, CA, USA) ausgelesen. Mit NimbleScan 2.6 (Roche NimbleGen, Indianapolis, IN, USA) wurden die Ergebnisse quantifiziert. Die Rohdaten jeden Arrays wurden  $\log_2$  transformiert und in die Statistiksoftware JMP Genomics 3.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) importiert. Eine Loess-Normalisierung erfolgte für alle Daten zusammengenommen. Um die Genexpressionslevel zwischen den einzelnen Zeitpunkten und zwischen Reinkultur und Co-Kultur zu vergleichen wurden Varianzanalysen durchgeführt. Aufgrund des Problems multipler Vergleiche wurde ein FDR-Filter ('false-discovery-rate') auf einen Wert von 0.05 gesetzt (siehe Reiner *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2013).

## **9 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine**

### 9.1 Synthetisierung von Expressionsvektoren

Zur Expression von Igni\_1332 wurde ein pJExpress-Plasmid mit einem entsprechenden codon-optimierten Insert von der Firma DNA2.0 (Menlo Park, CA, USA) anfertigen lassen. Die Expression und Aufreinigung des Proteins wurde von Loieue Wurch und Mircea Podar am Oak Ridge National Laboratory (TN, USA) durchgeführt.

### 9.2 Expression

#### 9.2.1 Induktion der Expression mit IPTG

Für die Expression des Proteins CDC48 (Igni\_1431) wurden 400 ml LB-Medium mit 3 ml einer üN-Vorkultur transformierter Rosetta (DE3) pLys Zellen angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0.6 inkubiert. Danach wurde die Expression mit IPTG induziert (Endkonzentration 1 mM) und die Zellen für weitere 2 h inkubiert. Dann wurden die Zellen bei 6000 rpm für 10 min (5417C; Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in LEW-Puffer resuspendiert und die Zellen aufgeschlossen (siehe 5.2). Unlösliche Zellbestandteile wurden für 1 h bei maximaler Drehzahl (5417C; Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 9.2.2 Autoinduktion

Bei dieser Methode (Studier, 2005) befinden sich Glucose und Lactose im Medium. Zunächst wird von *E. coli* bevorzugt Glucose verstoffwechselt. Je geringer die Glucosekonzentration im Medium wird, umso mehr wird auf Lactose zurückgegriffen, welches schließlich die Expression induziert. Die Umstellung des Stoffwechsels und der Beginn der Expression geschieht so weitaus natürlicher als mit der IPTG-Methode. Dies hat den Vorteil, dass die Chance vergleichsweise geringer wird, dass überexprimierte Proteine als 'inclusion bodies' unlöslich bleiben. Zudem lassen sich mit dieser Methode Zellen bis zu einer wesentlich höheren OD<sub>600</sub> kultivieren, was letztlich eine erhöhte Ausbeute an Protein liefern kann. Auch wird eine ständige Überprüfung der OD<sub>600</sub> hinfällig. Für die Expression von Igni\_0008 wurde AI-Medium mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen mit einer üN-Kultur von transformierten Rosetta 2 (DE3) Zellen (gewachsen in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen) beimpft. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen in Lysepuffer (á la Invitrogen; siehe 5.2) aufgeschlossen und unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert und verworfen.

### 9.3 Hitzefällung

Aus der Tatsache, dass hitzestabile Proteine von einem hyperthermophilen Organismus exprimiert wurden, bot sich ein weiterer Vorteil bei der Aufreinigung: Ein Großteil der *E. coli*-Proteine der Lysate konnte durch eine Hitzefällung entfernt werden. Die Lysate wurden hierzu bei 85°C (Igni\_1431) bzw. 90°C (Igni\_0008) im Wasserbad für 15 min inkubiert und anschließend für 15 min auf Eis gestellt. Ausgefällene Proteine wurden bei maximaler Drehzahl für 15 min (Himac CT15RE; Hitachi, Tokyo, JP) abzentrifugiert. Die exprimierten Proteine blieben im Überstand gelöst erhalten.

### 9.4 'Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography' (IMAC)

Da die Zielproteine mit zusätzlichem N-Terminalen His-Tag (6x Histidin) exprimiert wurden, konnte zur weiteren Aufreinigung eine Affinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup> angeschlossen werden. Hierzu wurden die Überstände aus 9.3 entweder auf 'Protino® Ni-TED 2000'- oder auf 'Protino® Ni-TED 150'-Säulchen aufgetragen (beide Machery-Nagel, Düren). Als Lysepuffer wurde entweder Lysepuffer á la Invitrogen verwendet oder der vorgeschlagene LEW-Puffer. Abgesehen vom Lysepuffer wurde jeweils das Protokoll des Herstellers zur Aufreinigung unter nativen Bedingungen verwendet.

## 10 Proteinbiochemische Methoden und Massenspektroskopie

### 10.1 Konzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden colorimetrisch basierend auf der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mittels Regressionsgerade bestimmt. Hierzu wurde eine kommerziell erhältliche Coomassie Brilliant Blue-G250 Lösung (Roti®-Quant; Roth, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet.

## 10.2 SDS-PAGE

### 10.2.1 Herstellung der Gele, verwendete Puffer und Elektrophoresebedingungen

In der Regel wurden 10%ige Acrylamid-Trenngele verwendet (Lämmli, 1970; Schägger & von Jagow, 1987). Die fertig polymerisierten Gele konnten sofort verwendet werden oder wurden in feuchte Papiertücher und Frischhaltefolie gewickelt und bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

<b>Sammelgel (4%)</b>		<b>Trenngel (10%)</b>	
Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg. (37.5:1)	0.3 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg. (37.5:1)	2 ml
Tris/HCl (0.5 M, pH 6.8)	0.5 ml	Tris/HCl (1.5 M, pH 8.8)	1.5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	1.2 ml	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	2.5 ml
APS (10%) (w/v in H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub> )	15 µl	APS (10%) (w/v in H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub> )	30 µl
TEMED	3 µl	TEMED	5 µl

<b>2x Probenpuffer</b>		<b>Kathodenpuffer</b>	
Glycerin	10% (v/v)	Tris/HCl (pH 8.3)	100 mM
SDS	5% (w/v)	Tricin	100 mM
Tris/HCl (pH 7.5)	50 mM	SDS	0.1 % (w/v)
Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM		
Bromphenolblau	0.01% (w/v)		
DTT	5 mM		

<b>Anodenpuffer</b>	
Tris/HCl (pH 8.8)	200 mM

DTT wurde in Aliquots als 0,1 M Lösung bei -20°C aufbewahrt und erst unmittelbar vor Gebrauch zum restlichen 2x Probenpuffer zugegeben (1 µl 0.1 M DTT pro 19 µl 2x Probenpuffer). Der vervollständigte 2x Probenpuffer wurde mit den Proben im Volumenverhältnis 1:1 gemischt und bei 95°C für 10-20 min im Wasserbad inkubiert. Die Gele wurden in Elektrophorese-Kammern montiert (Eigenbau der Biologie-Werkstatt der Universität Regensburg) und nach Hitzedenaturierung der Proteine wurden die Proben auf die Gele aufgetragen. Zum Durchlauf durch das Sammelgel wurden für ca. 15 min 10 mA angelegt, anschließend wurde die Stromstärke zur Trennung der Proteine im Trenngel auf 30 mA erhöht (MBP 3000 EP, IBI, Powersupplies, Kodak Int. Biotech, New Haven, USA). Als Puffer für die Kammern an der Kathode bzw. an der Anode wurde ein diskontinuierliches Tris-Tricin-Laufpuffersystem verwendet (Schägger & von Jagow, 1987).

## 10.2.2 Coomassie-Färbung

Fixierungslösung		Färbelösung		Entfärber	
Methanol	50%	Essigsäure	50%	Ethanol	30%
Essigsäure	10%	Coomassie Brilliant Blue R o. G 250	0.025%(w/v)	Essigsäure	10%

Zur Färbung mit Coomassie wurden die Gele nach der Elektrophorese zunächst für 30 min in Fixierungslösung auf den Schüttler gestellt. Anschließend wurde der Fixierer gegen die Färbelösung ausgetauscht und weitere 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Zuletzt wurde Entfärber auf das Gel gegeben und so lange entfärbt, bis Banden sichtbar wurden bzw. der Hintergrund genug entfärbt war. Gegebenenfalls wurde die Entfärberlösung ein- bis zweimal ausgewechselt. In der Regel wurde Coomassie Brilliant Blue R 250 verwendet, selten aber auch Coomassie Brilliant Blue G 250.

## 10.2.3 Silberfärbung

Alternativ dazu (insbesondere für geringe Proteinmengen) wurde ein Verfahren zur Silberfärbung der Gele nach Blum *et al.* (1987) verwendet. Bei allen Schritten erfolgte die Inkubation unter Schütteln.

Silberfärbung			
Fixieren	Methanol	50% (v/v)	30 min
	Essigsäure	10% (v/v)	
Waschen	Ethanol	50% (v/v)	10 min
Waschen	Ethanol	10% (v/v)	10 min
Blockieren	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.02% (w/v)	1 min
Waschen	H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>		3 x
Färbung	AgNO <sub>3</sub>	0.1 % (w/v)	20 min
	Formaldehyd	0.028 % (v/v)	
Waschen	H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>		3 x
Entwicklung	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6% (w/v)	bis Banden erscheinen
	Formaldehyd	0.019 % (v/v)	
Stoppen	Essigsäure	10% (v/v)	15 min

## 10.2.4 Gel Trocknung

Geltrocknungslösung	
Ethanol	22%
Glycerin	2%
2-Propanol	1%

Zur Dokumentation der Gele wurden diese zwischen zwei Cellophanfolien in einer Trocknungslösung über Nacht getrocknet. Das Gel war dabei in ein spezielles Rahmensystem zwischen den Folien eingespannt. Die getrockneten Gele wurden dann mittels Scanners digitalisiert.

## 10.3 Massenspektroskopie

## 10.3.1 'Matrix-assisted laser desorption/ionization' (MALDI)

Für den 'In-Gel'-Trypsinverdau wurden Proben mit dem Zielprotein elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Mit einem Skalpell wurden Banden von Interesse ausgeschnitten, in 1 mm<sup>3</sup> Würfel zerteilt und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. In folgender Reihenfolge wurden die Würfel für jeweils 30 min unter leichtem Schütteln mit je 200 µl der entsprechenden Lösungen inkubiert (1):

In-Gel-Trypsin-Verdau (1)		
1.	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	50 mM
2.	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	50 mM
	Acetonitril	25%
3.	Acetonitril	25%
4.	Acetonitril	50%

In-Gel-Trypsin-Verdau (2)		
1.	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	100 mM
2.	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	100 mM
3.	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	100 mM
	Acetonitril	50%

Im Anschluss wurden die Proben in einer Gefriertrocknungsanlage (Univapo 150H und Unijet II, Uniequip Laborgerätebau, Martinsried) innerhalb etwa 1 h lyophilisiert und danach in 0.5 ml Safe-Lock-Tubes (Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Die getrockneten Würfel wurden dann mit dem 1.5-fachen ihres anfänglichen Volumens mit aktivierter Trypsinlösung (2 µg/100 µl) versetzt. Dies geschah in zwei Schritten: In einem ersten Schritt wurde die Hälfte des benötigten Volumens mit der Gesamtmenge an benötigtem Trypsin zugegeben. Hierfür wurde das entsprechende Volumen aus einer 0.1 mg/ml (in HCl) Trypsin-Stammlösung pipettiert und der Rest des halben benötigten Gesamtvolumens mit 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde in einem zweiten Schritt für die zweite Hälfte des benötigten Gesamtvolumens nur noch 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand verworfen. Die Extraktion der Peptide



geschah dann in drei Schritten, wobei die Probe mit jeweils 30 µl der oben stehenden Lösungen (2) für jeweils 1.5 h inkubiert wurde und die Überstände wieder in einem 0.5 ml Safe-Lock Tube vereinigt wurden. Die vereinigten Überstände wurden dann erneut lyophilisiert. Dies geschah am Lehrstuhl Deutzmann (Universität Regensburg), wo letztlich auch die MALDI-Analyse an einem '4700 Proteomics Analyzer' (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) von Eduard Hochmuth durchgeführt wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Mascot (Matrix Science Ltd., London; Perkins *et al.*, 1999).

### 10.3.2 'Electrospray Ionization' (ESI)

Alle für diese Arbeit relevanten ESI LC-MS/MS-Analysen ('liquid chromatography/tandem mass spectroscopy') wurden von PhD Richard Giannone am Oak Ridge National Laboratory (Tennessee, USA) durchgeführt. Ein Vorversuch zum erweiterten Protokoll für die 'Time-Course'-Proben wurde unter seiner Anleitung durchgeführt. Jeweils wurde wie folgt vorgegangen:

Zunächst wurden Zellen wie beschrieben lysiert (siehe 5.1). Die Lysate wurden 5 min aufgekocht und bei 21 000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Danach erfolgte eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) über Nacht bei -20°C. Die präzipitierten Proteine wurden mit eiskaltem Aceton gewaschen, luftgetrocknet und in 100 mM Tris/HCl (pH 8) mit 8 M Harnstoff resuspendiert. Um die Proteine besser zu lösen, wurden die Proben kurz mit Ultraschall behandelt (10 s) und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde 10 mM DTT zur Lösung gegeben und weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um Cysteine zu blockieren und Disulfid-Brückenbildung zu verhindern, wurde 10 mM Iodacetamid zum Ansatz gegeben und für weitere 10 min bei Raumtemperatur (im Dunkeln) stehen gelassen. Die Proben wurden danach mit 100 mM Tris/HCl (pH 8) 1:1 verdünnt und Aliquots mit 1-2 mg Protein wurden mit Trypsin über Nacht bei Raumtemperatur im Verhältnis 1:75 (w/w; Trypsin zu Proteine) verdaut; zusätzlich wurde 20 mM CaCl<sub>2</sub> zum Ansatz gegeben, um Trypsin zu stabilisieren und Selbstverdau des Trypsins zu verhindern. Am nächsten Tag wurde erneut mit 100 mM Tris/HCl (pH 8) 1:1 verdünnt und erneut mit Trypsin abermals im Verhältnis 1:75 für weitere 4 h verdaut. Zu jeder 1 ml-Probe wurden 50 µl einer Lösung mit 3 M NaCl und 2% Ameisensäure gegeben. Die Proben wurden anschließend mit einem 'spin-column'-Filter mit MWCO 10 kDa (Vivaspin 2; GE Healthcare; Chalfont St. Giles, UK) gefiltert. Die Proteinkonzentration des Durchlaufs wurde bestimmt und die Proben bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Für die 'Time-Course'-Proben wurden zusätzlich die abgefilterten un(ter)verdauten Proteine aus dem letzten Schritt in 125 µl einer 0.5%igen SDS-Lösung mit 8 M Harnstoff resuspendiert und für 5 min aufgekocht. Die Probe wurde dann wieder mit 100 mM Tris/HCl (pH 8) 1:1 verdünnt und 10 mM CaCl<sub>2</sub> zugegeben. Zum Ansatz wurde α-Chymotrypsin im Verhältnis 1:5 (w/w; Enzym zu Proteine) gegeben und für 4 h bei Raumtemperatur verdaut. Anschließend wurde die Probe erneut 1:1 mit 100 mM Tris/HCl (pH 8) verdünnt und eine zweite Portion α-Chymotrypsin abermals im Verhältnis 1:5 zugegeben und diesmal über Nacht bei Raumtemperatur verdaut. Die Proben wurden danach (wie die tryptischen Peptide) mit 150 mM NaCl Lösung versetzt, mit 0.1% Ameisensäure angesäuert und mit einem 'spin-column'-Filter gefiltert. Ebenso wurde die Proteinkonzentration bestimmt und die Proben bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Lösung A		Lösung B	
Acetonitril	5%	Acetonitril	70%
Ameisensäure	0.1%	Ameisensäure	0.1%
in H <sub>2</sub> O ('HPLC-grade')		in H <sub>2</sub> O ('HPLC-grade')	

Für die Analyse wurde zunächst eine MudPIT-"Säule" ('Multidimensional Protein Identification Technology'; McDonald *et al.*, 2002) mit ca. 5 cm Material eines starken Kationenaustauschers (SCX) und mit ca. 3 cm C18 'reverse-phase'-Material (RP) beladen (jeweils Phenomenex, Torrance, CA, USA). Anschließend wurden die Proben aufgetragen (50 µg bzw. 100 µg Peptide) und für 15 min mit Lösung A gewaschen, um Harnstoffreste und NaCl zu entfernen. Anschließend erfolgte innerhalb von 30 min eine sukzessive Erhöhung der Lösung B auf 100%, um einerseits weiter zu waschen und andererseits die Peptide auf das SCX-Material zu bewegen. Danach wurden die Säulen mit einem Nanospray-Emitter mit weiteren 15 cm RP-Material verbunden. Innerhalb von 24 h fanden dann 11 schrittweise Erhöhungen der Ammoniumacetat-Konzentration statt ('salt pulses'; zum Schluss 500 mM), gefolgt von einem 100 minütigen Gradienten auf 50% Lösung B. Die Proben wurden dabei an einem LTQ XL/Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) analysiert. Von jeder Probe der stationären Phase wurden drei Durchgänge gestartet, von den 'Time-Course'-Proben jeweils zwei.

Die erhaltenen Peptid-Spektren wurden mit SEQUEST (Eng *et al.*, 1994) Peptid-Sequenzen zugeordnet (Abgleich über Kreuzkorrelation mit einem *in silico*-Verdau der annotierten Proteome von *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum* bzw. bekannter Kontaminationen in Proteom-Analysen, wie z.B. Keratin). Die Ergebnisse wurden mit DTASelect (Tabb *et al.*, 2002) gefiltert und Proteinen zugeordnet. Zum Rückschluss auf die Existenz eines Proteins waren mindestens zwei Peptidsequenzen notwendig (Vermeidung von 'One-Hit-Wonders'). Für die semi-quantitative Auswertung wurden die Daten mehrfach korrigiert: Berücksichtigung homologer Proteine/Proteinabschnitte mit gleichen Peptidsequenzen, Normalisieren auf die durchschnittliche Gesamtspektrenzahl und Berücksichtigung des komplexeren Peptidgemischs der Co-Kultur-Proben (genannt RSpC in Proben der stationären Phase bzw. nSpC in den 'Time-Course'-Proben).

## 11 Immunologische Verfahren

### 11.1 Immunisierung

Zur Immunisierung wurden Proben der gereinigten Proteine auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen (siehe 10.2.1) und entsprechende Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten. Hierbei wurde das Gel in einer abgewandelten Form zur beschriebenen Methode in 10.2.2 mit Coomassie gefärbt, nämlich methanolfrei. Als Fixierer und als Entfärbelösung wurde jeweils 30%iger (v/v) Ethanol mit 10% (v/v) Essigsäure verwendet. Die Proteine wurden dann von der Firma Davids Biotechnology (Regensburg-Burgweinting) bzw. Covance Research Products Inc. (Denver, PA, USA) aus dem Gel eluiert und zur Generierung von Antikörpern 'SPL New Zealand White Rabbits' nach jeweiligem Firmenprotokoll injiziert.

<b> Davids </b> ( <a href="http://www.davids-bio.de/">http://www.davids-bio.de/</a> )	
Tag 0	1. Immunisierung
Tag 14	2. Immunisierung
Tag 21	3. Immunisierung
Tag 28	Testserum + ELISA
Tag 35	Antiserum

<b> Covance </b> ( <a href="http://www.covance.com/">http://www.covance.com/</a> )	
Tag 0	1. Immunisierung
Tag 21	2. Immunisierung
Tag 31	Production bleed
Tag 32-38	ELISA
Tag 49	3. Immunisierung
Tag 59	Antiserum

## 11.2 Western Blots

### 11.2.1 'SemiDry'-Elektrotransfer

<b>Transferpuffer</b>	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20% (v/v)

Vor dem Transfer wurden sowohl das zu 'blottende' Polyacrylamid-Gel (siehe 10.2.1) als auch zurecht geschnittene Whatman-Papiere (sechs pro Gel; Whatman® Chromatography Paper, 3 mm; GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, England) für ca. 10 min in Transferpuffer eingelegt. Die Membran, auf die geblottet wurde (PVDF, 0,45 µm; Immobilon-P; Merck Millipore, Billerica, MA, USA), wurde zur Aktivierung in reinem Methanol für mind. 1 min eingelegt. In einer 'SemiDry'-Western-Blot-Apparatur (TransBlot® SD SemiDry Transfer Cell; Biorad, München) erfolgte der eigentliche Proteintransfer. Dazu wurde das Gel auf die Membran zwischen je drei Puffer getränkte Whatman-Papiere gelegt. Der Transfer erfolgte bei 11 V für 30 min.

## 11.2.2 Immunreaktion

	TBS	TBS-T	TBS-TT
Tris/HCl	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	150 mM	150 mM	150 mM
Tween 20	/	0.1 %	0.05%
TritonX 100	/	/	0.5%
	pH 7.5-8	pH 7.5-8	pH 7.5-8

**Western Blot**

Waschen	TBS-T	10 min
Blockieren	TBS-T + 5% Magermilchpulver	1h - üN
Waschen	TBS-T	2x
primärer AK	TBS-T + 3% Magermilchpulver + prim. AK	1h - üN
Waschen	TBS-TT	3x
Waschen	TBS	2x
sekundärer AK	TBS-T + 1% Magermilchpulver + sek. AK	1-2 h
Waschen	TBS-TT	3x
Waschen	TBS	2x

Nach dem Blotten wurde die Membran nach oben genanntem Protokoll mit entsprechenden Puffern jeweils unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Blockierungsschritt sowie die Antikörperbindungsschritte wurden jeweils im Kühlraum bei 4°C (ebenfalls unter leichtem Schütteln) durchgeführt, die Waschschrte bei Raumtemperatur. Primäre Antikörper wurden in Verdünnungen von 1:2500 bis 1:100 000 eingesetzt, sekundäre Antikörper von 1:5000 bis 1:25 000.

## 11.2.3 Detektion durch Chemolumineszenz

Als sekundäre Antikörper wurden HRP-gekoppelte IgGs ( $\alpha$ -rabbit,  $\alpha$ -mouse und  $\alpha$ -goat) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem 'Western Lightning Chemoluminescent Reagent' (Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers. Das Chemolumineszenz-Signal wurde dann an einem 'Fusion FX 7'-Imager (Vilber Lourmat, Eberhardzell) ausgelesen.

### 11.3 Immunmarkierung an Ultradünnschnitten

#### 11.3.1 Immunmarkierung

PBS	
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.76 mM
@pH	7.4

Wie bei der Kontrastierung von Schnitten (siehe 7.1.3) wurden die Grids in Tropfen der jeweiligen Lösungen gelegt, welche mit einem Stück Filter abgesaugt wurden, bevor das Grid in einen neuen Tropfen gelegt wurde. Den genauen Ablauf zeigt folgendes Schema:

Immunmarkierung an Ultradünnschnitten		
Aldehyd-Absättigung	PBS-Glycin 0.1% (w/v)	10 min
Blockierung	PBS-BSA 1% (w/v)	10 min
Primärer AK	PBS-BSA 0.1% (w/v) + primärer AK	60 min
Waschen	PBS-BSA 1% (w/v)	5x
Sekundärer AK	PBS-BSA 0.1% (w/v) + sekundärer AK/Protein A	60 - 90 min
Waschen	PBS-BSA 1% (w/v)	5x
Waschen	PBS	2x
Fixieren	PBS-Glutardialdehyd 2% (v/v)	5 min
Waschen	PBS	2x
Waschen	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	3x

Bei jedem Immunmarkierungsversuch wurde außerdem eine Kontrolle mitgeführt: Statt dem primären Antikörper wurde mit PBS-BSA 1% (w/v) inkubiert, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers bzw. Protein A ausschließen zu können. Der Einsatz primärer Antikörper erfolgte in Verdünnungen zwischen 1:20 und 1:100 000. Sekundäre Antikörper (bzw. Protein A-6 nm-Gold) wurden stets 1:20 oder 1:50 eingesetzt.

## 11.3.2 Silberverstärkung

Lösung 1		Stammlösungen		
Silberlaktat	150 µl	Silberlaktat	0.11 g	37 mM
		ad H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	15 ml	
Lösung 2		Gummi arabicum	4.95 g	33% (w/v)
Gummi arabicum	600 µl	ad H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	15 ml	
Hydrochinon	150 µl	Hydrochinon	0.85 g	0.51 M
Citratpuffer (pH 3.8)	100 µl	ad H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	15 ml	
		Citratpuffer (pH 3.8)		
		Zitronensäure	2.55 g	1.33 M
		Trinatriumcitrat	2.35 g	0.8 M
		ad H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	10 ml	

Eine Silberverstärkung wurde stets durchgeführt, wenn für die Immunmarkierung an Ultradünnschnitten 'ultramall-gold' Sekundärantikörper verwendet worden waren. Hierfür wurden zwei Lösungen benötigt, die aus einer Reihe von Stammlösungen erstellt wurde (siehe oben). Aliquots beider Lösungen (zu je 150 µl bzw. 850 µl) wurden bei -20°C unter Lichtausschluss gelagert. Vor dem Gebrauch wurde je ein Aliquot beider Lösungen (ebenfalls unter Lichtausschluss) aufgetaut und beide Lösungen vereinigt. Grids mit Ultradünnschnitten wurden auf je einen Tropfen der Lösung gelegt, ca. 10 min inkubiert und im Anschluss fünfmal mit H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gewaschen. Nach diesen Schritten wurde meistens eine zusätzliche Schnittkontrastierung mit Uranylacetat durchgeführt (siehe 7.1.3).

## 11.3.3 Quantifizierung

Für die Quantifizierung von Markierungsmustern wurde das Plugin 'Cell Counter' für ImageJ zweckentfremdet (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>). Mit dessen Hilfe konnten die Goldpartikel gezählt und einzelnen Strukturen zugeordnet werden. Außerdem wurden Goldpartikel außerhalb der Zelle gezählt und auf die entsprechende Fläche der Zelle im jeweiligen Bild umgerechnet. Aus der Differenz der Gesamtpartikel in der Zelle und des Hintergrundsignals (bezogen auf die Zellfläche) konnte somit das eigentliche Signal in der Zelle berechnet werden und aus einem Quotienten dieser Differenz und dem Hintergrundsignal wurde so die 'Signal to Noise Ratio' (SNR) berechnet.

11.4 'Freeze Fracture Labeling'

Für die Gefrierätzung wurde eine 20 ml-Übernachtskultur wie beschrieben gefiltert (siehe 7.1.2). Die Zellsuspension wurde dann auf Goldträger aufgebracht (Bal-Tec, Witten, Ruhr; 1.4 µl pro Goldträger) und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Goldträger mit den Proben wurden dann in eine vorgekühlte (-175°C), evakuierte Bedampfungsanlage (Cressington Ltd., Watford, UK) eingeschleust. Die Temperatur der Proben wurde auf -97°C erhöht und die Proben mit einem integrierten Messer geschnitten/gebrosen. Durch den Temperaturunterschied von Probe (-97°C) und Messerblock (-175°C) wurde Wasser an der Oberfläche der gebrochenen Probe absublimiert (durch Schwenken des Messerblocks über die Probe für 4 min). Die Oberfläche der Proben wurde nun aus einem 45°-Winkel mit einer 1 nm-Schicht Pt/C bedampft. Im Anschluss wurde eine 15 nm-Schicht Kohlenstoff aus einem Winkel von 90°C aufgedampft. Die so entstandenen Replika konnten nach Entnahme der Proben aus der Anlage abflotiert werden (zum Zweck der Immunmarkierung in SDS-Lösung zum Erhalt von Antigenen, siehe unten) und wurden nach unten stehendem Schema zur Immunmarkierung weiter behandelt. Zum Schluss wurden die Replika auf unbefilmte '700 mesh'-Grids (Agar, Hex 700; Plano, Wetzlar) aufgenommen.

PBS		PBG		SDS-Lösung	
NaCl	137 mM	PBS	50 ml	SDS	2.5%
KCl	2.7 mM	Gelatine	0.2%	Tris	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	BSA	0.5%	Saccharose	30 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.76 mM				
@pH	7.4				

**Immunmarkierung an Replika**

Ablösen der Replika	SDS-Lösung	1 h
Entfernen von SDS	PBS	4x
Blockieren	PBG	30 min
Primärer AK	PBG + primärer AK	60 min
Waschen	PBG	3x
Sekundärer AK	PBG + sekundärer AK	60 min
Waschen	PBG	3x
Waschen	PBS	3x
Fixieren	PBS-Glutardialdehyd 0.5% (v/v)	5 min
Waschen	H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	2x

### 11.5 Fluoreszenzmarkierung

Fixierungslösung	
Paraformaldehyd	3.3 g
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	6.6 ml
NaOH (5 M)	30 µl
3x PBS	3.3 ml
@pH	7.2

Für die benötigte Fixierungslösung wurde Paraformaldehyd mit Wasser und NaOH vermennt. Zum Lösen des Paraformaldehydes wurde der Ansatz auf einer Wärmeplatte mit Magnetrührer unter dem Abzug erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde PBS-Puffer zugegeben und der pH-Wert eingestellt. Mit einem Faltenfilter wurde die Lösung in ein 15 ml-Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nürnberg) gefiltert. Jeder Ansatz (je 1 ml frische Kultur) wurde mit 100 µl Fixierungslösung versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach unten stehendem Protokoll wurde weiter verfahren:

Immunmarkierung für Fluoreszenzmikroskopie		
Fixieren/Sedimentieren	0.1 ml Fixierungslösung	1 h
Resuspendieren/Sedimentieren	1 ml PBS-Glycin (50 mM)	
Resuspendieren/Sedimentieren	1 ml PBS	
AK-Bindung/Sedimentieren	1 ml PBS-BSA 2% + 0.02% Tween 20 + 1°AK	2 h
Sekundärer AK /Sedimentieren	0.5 ml PBS + 2°AK	1 h
Resuspendieren/Sedimentieren	0.5 ml PBS	
Resuspendieren/Sedimentieren	80 µl PBS	

Das Sedimentieren der Zellen nach jedem Schritt erfolgte in einer Tischzentrifuge (Himac CT15RE; Hitachi, Tokyo, JP) bei 13 000 rpm und 4°C für je 15 min. Nach dem letzten Schritt wurden die Proben bei 4°C bis zur Analyse gelagert.

### 11.6 Co-Immunpräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitation wurde ein 'Dynabeads® Protein A Immunoprecipitation Kit' verwendet (Life Technologies, Darmstadt). 0.5 g Zellen aus der spät-logarithmischen Phase einer *Ignicoccus hospitalis*-Reinkultur wurden mit 1.5 ml Lysepuffer versetzt (siehe 5.1). Prinzipiell wurde das Protokoll basierend auf den Empfehlungen des Herstellers aufgebaut. Um aber Banden in einer Coomassie-Färbung zu sehen, musste entsprechend hochskaliert werden. Letztlich wurden 200 µl des Lysats (in 800 µl PBS) eingesetzt, zusammen mit 120 µl Antiserum (in 50%igem Glycerin) und 150 µl



'beads'. Außerdem wurde der Inkubationsschritt des 'bead'-Protein A-AK-Komplexes mit dem Lysat über Nacht bei 4°C ausgeführt. Die 'bead'-Protein A-AK-Protein-Komplexe wurden durch Aufkochen in Auftragspuffer denaturiert und für die SDS-PAGE auf ein entsprechendes Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und sichtbare Banden ausgeschnitten. Diese wurden abermals von PhD Richard Giannone am Oak Ridge National Laboratory (Tennessee, USA) massenspektrometrisch bestimmt.

## 12 Bildbearbeitung, Datenverarbeitung, Bioinformatik und Datenbanken

Folgende 'Tools' und Datenbanken wurden eingesetzt:

Software & Datenbanken	
AMIRA	FEI, Eindhoven, NL
Cell Counter	<a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html">http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html</a>
DTASelect	Tabb <i>et al.</i> , 2002
EMMenu 4.0	TVIPS, Gauting
Esprit/Quantax1.8.5	Bruker AXS, Billerica, MA, USA
FIJI	Schneider <i>et al.</i> , 2012
Geneious	Biomatters, Auckland, NZ
ImageJ	Abramoff <i>et al.</i> , 2004; Schneider <i>et al.</i> , 2012
IMG JGI	<a href="http://img.jgi.doe.gov/">http://img.jgi.doe.gov/</a>
IMOD	Kremer <i>et al.</i> , 1996
JMP Genomics 3.0	SAS Institute, Cary, NC, USA
KEGG	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
Ligation Calculator	<a href="http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html">http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html</a>
Mascot	Matrix Science Ltd.; Perkins <i>et al.</i> , 1999
MS Office 2007 & 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
NimbleScan 2.6	Roche Nimblegen, Indianapolis, IN, USA
Photoshop CS4	Adobe, San José, CA, USA
PHYRE2	Kelley & Sternberg, 2009
ProtParam	Gasteiger <i>et al.</i> , 2005
SEQUEST	Eng <i>et al.</i> , 1994
SerialEM	Mastrorade, 2005
StackReg /TurboReg	Thévenaz <i>et al.</i> , 1998
Stitching	Preibsch <i>et al.</i> , 2009
UniProt	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>



## III Ergebnisse

### 1 Vorarbeiten und Methodik

#### 1.1 Filtermethode

Für FIB/SEM-Analysen sind hohe Zelldichten in den Proben erforderlich. Das bestehende Anzucht- und Einbettungsverfahren für *Ignicoccus* war jedoch dahingehend unzureichend. Eine Zentrifugation kam aber unter dem Aspekt der Strukturhaltung ebenfalls nicht in Frage. Mit den beiden verwendeten Filtermethoden (siehe II/7.1.2) konnte ein Verfahren zur schonenden Konzentrierung von Zellen gefunden werden. Zwar wurde diese Art der Probenvorbereitung im Rahmen dieser Arbeit ursprünglich für die FIB/SEM-Analysen konzipiert und etabliert, zeigte sich aber praktisch von Vorteil für sämtliche elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Zunächst wurden gewachsene Zellkulturen unmittelbar nach ihrer Entnahme aus dem 90°C Inkubator im Abzug bzw. der Anaerobenkammer gefiltert. Die erhaltenen konzentrierten Zellsuspensionen wurden unter dem Aspekt bestmöglicher Strukturhaltung weiterhin hochdruckgefroren, gefriersubstituiert und in Epon eingebettet. Wie in den Übersichtsaufnahmen in Abbildung 5 ersichtlich, konnten - in Hinblick auf die FIB/SEM-Analysen - in Ultradünnschnitten der Proben ausreichend große Bereiche hoher Zelldichte gefunden werden. Weiterhin zeigt Abbildung 6, dass die Ultrastrukturhaltung der gefilterten Zellen in keiner Weise Zellen nachsteht, die in vorangegangenen Arbeiten (z.B. Wasserburger, 2008) in Cellulosekapillaren gezüchtet und eingebettet worden waren. Der Vergleich zwischen Zellen, die unter dem Abzug, also aerob und Zellen, die in der Anaerobenkammer gefiltert wurden, zeigte keine auffälligen ultrastrukturellen Unterschiede. Infolgedessen wurde für Einbettungen weiterer Zellen standardmäßig unter dem Abzug gefiltert, aufgrund der wesentlich vereinfachten Handhabung.

Alle gezeigten gefilterten Zellen unter Punkt III/2 wurden mit dem ersten Verfahren gefiltert. Unter Punkt III/4 sind Zellen beider Methoden zu sehen.

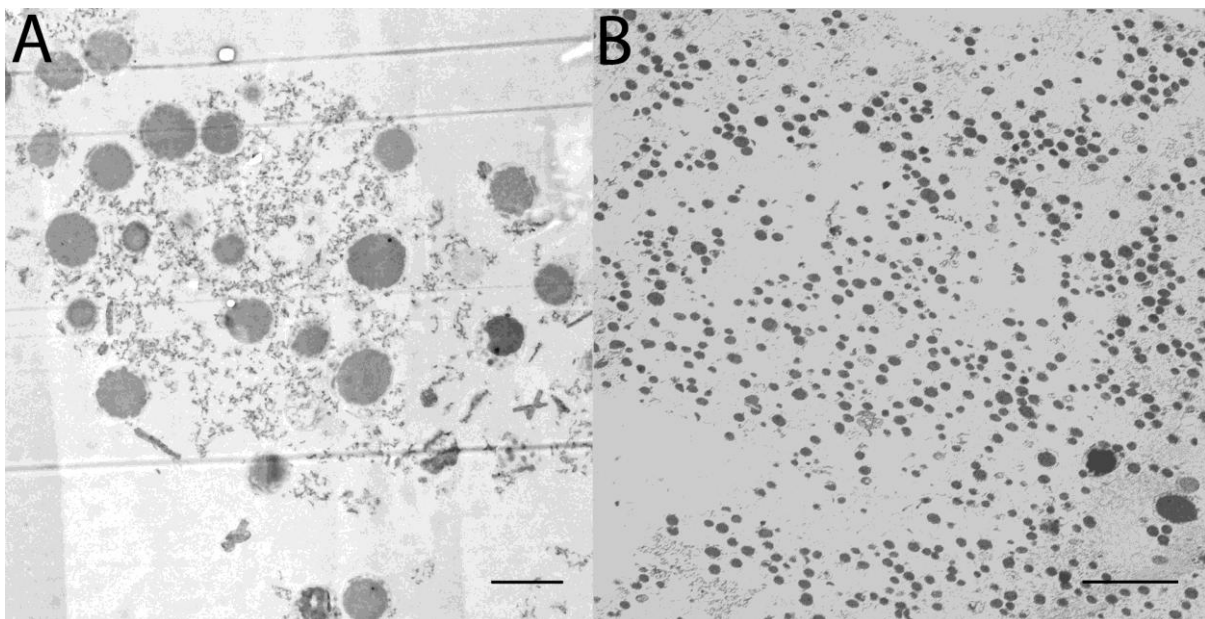


Abbildung 5 50 nm-Ultradünnschnitte; TEM (A) *Ignicoccus hospitalis*, gefiltert durch eine PVDF-Membran mit 0.45  $\mu\text{m}$  Porengröße (Methode 1), eingebettet in Epon; Balken 2  $\mu\text{m}$  (B, aus Foith, 2013) *Ignicoccus islandicus* in Lowicryl eingebettet, gefiltert durch eine PC-Membran mit Porengröße 0.2  $\mu\text{m}$  (Methode 2); Balken 10  $\mu\text{m}$

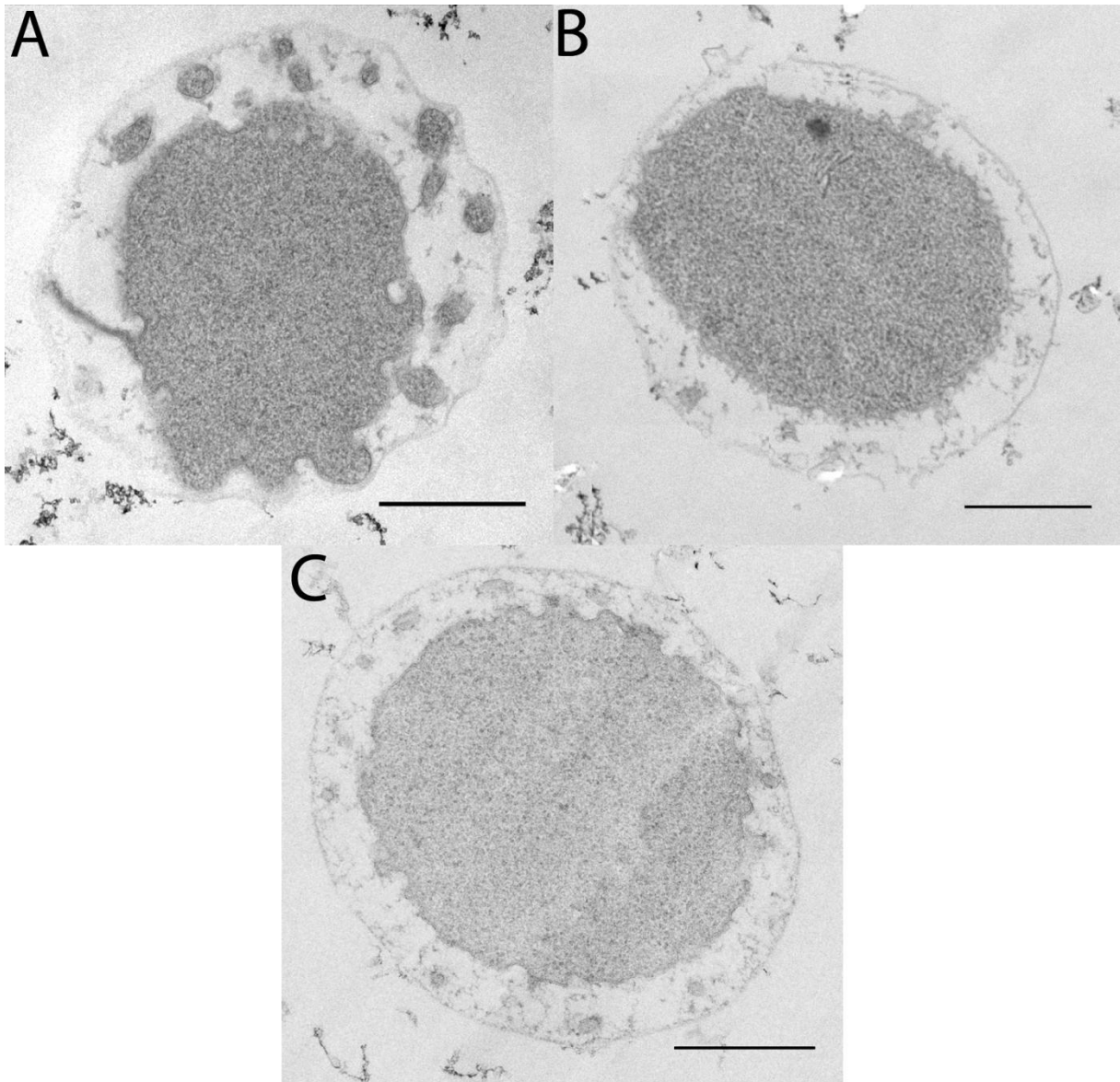


Abbildung 6 50 nm-Ultradünnschnitte; TEM (A) *I. hospitalis* (B) MEX13A (C) *I. pacificus*, jeweils gefiltert durch eine PVDF Membran mit Porengröße 0.45 nm; Balken jeweils 0.5  $\mu\text{m}$ ; (B und C, Jennifer Flechsler)

### 1.2 FIB/SEM

FIB/SEM-Technik im biologischen Bereich ist eine vergleichsweise junge Methode zur 3D-Analyse von Objekten, erfreut sich aber immer größerer Beliebtheit (genauere Erläuterungen hierzu finden sich in der Diskussion). Daher konnte auch nicht auf ein "Standard"-Protokoll zur Probenvorbereitung zurückgegriffen werden, sondern musste individuell an das bestehende Präparationsverfahren für *Ignicoccus* im TEM angepasst werden. Wie erwähnt, erforderte dies u.a., zumindest lokal in den eingebetteten Proben eine ausreichend hohe Zell-Konzentration zu erzielen; einerseits, um Stellen im SEM überhaupt zu finden und eine gewisse Zuversicht zu haben, dass die Zellen auch in z-Richtung vorhanden sind, andererseits wird zur Justierung des  $\text{Ga}^{2+}$ -Ionenstrahls bereits einiges an Proben-Material abgetragen, bis die konsekutive Abtragung und Bildgebung im SEM überhaupt stabil läuft.

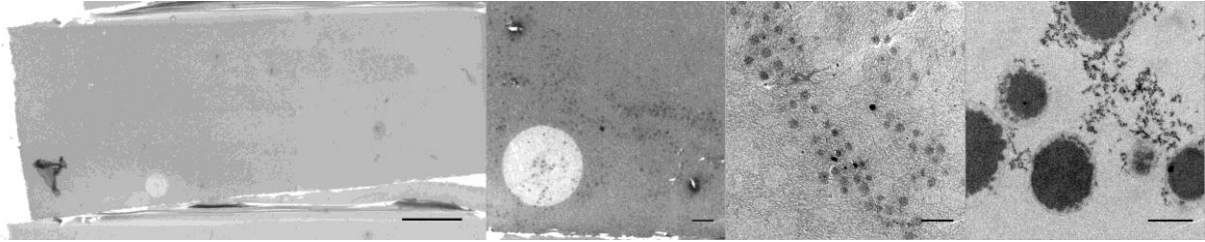


Abbildung 7 Vor-'Screening' der Blöckchen mit gefilterten Zellen für die FIB/SEM-Analysen im TEM; 200 nm-Schnitt eines Blöckchens in verschiedenen Vergrößerungen; Balken (von links nach rechts) 100 µm, 10 µm, 5 µm, 2 µm

Um Stellen mit ausreichend hoher Zelldichte zu finden, wurde ein Vor-'Screening' anhand von 200 nm-Schnitten durchgeführt. Nach diesen Untersuchungen in Frage kommende Blöckchen wurden in der Folge für die FIB/SEM-Methode vorbereitet: Es wurde jeweils der obere Teil der Blöckchen abgesägt (ca. 2 mm) und auf Stubs, wie sie für SEM-Präparate verwendet werden, mit handelsüblichem Klebstoff aufgeklebt. Dabei musste sowohl beim Absägen als auch beim Aufkleben darauf geachtet werden, dass die Schnittfläche letzten Endes möglichst parallel zur Stubebene verlaufen sollte. Eventuelle Unebenheiten wurden mit dem Klebstoff ausgeglichen. Auf den abfotografierten Präparaten wurden dann (mit Adobe Photoshop) die Stellen der höchsten Zellkonzentration markiert, wie sie im Vor-'Screening' gefunden wurden. Auf den Präparaten selbst wurde rund um die Nahtstelle Leitsilber aufgetragen.

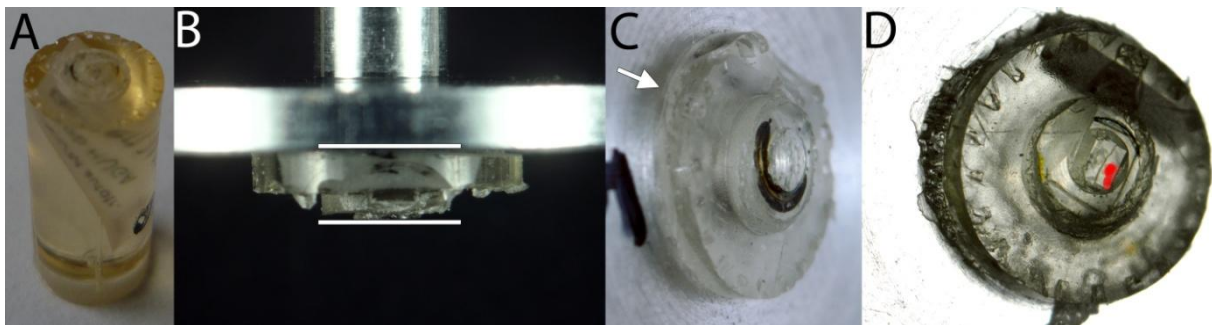


Abbildung 8 Die Blöckchen (A), wurden abgeschnitten und möglichst eben auf Stubs befestigt (B), sowie an der Nahtstelle (Pfeil) mit Leitsilber behandelt (C), in einem Bildbearbeitungsprogramm wurden Stellen markiert, wo anhand des Vor-Screenings hohe Zelldichten zu finden waren (D)

Unmittelbar vor Aufzeichnung der Schnittserie wurde ein letzter Schnitt abgenommen, um eine saubere Oberfläche zu bekommen. Hierzu war ein spezieller Adapter nötig, um die Stubs am Ultramikrotom montieren zu können (AG Wanner, LMU München bzw. Biologie-Werkstatt, Uni Regensburg). Anschließend wurde noch eine ca. 10 nm "dicke" Schicht Kohlenstoff zur besseren Leitfähigkeit aufgedampft. Letztlich wurden zwei Tomogramme aufgezeichnet. Abbildung 9 zeigt eine SEM-Aufnahme der Stelle, an der 'gefibbed' wurde. An der Oberfläche sind zahlreiche Zellen zu erkennen.

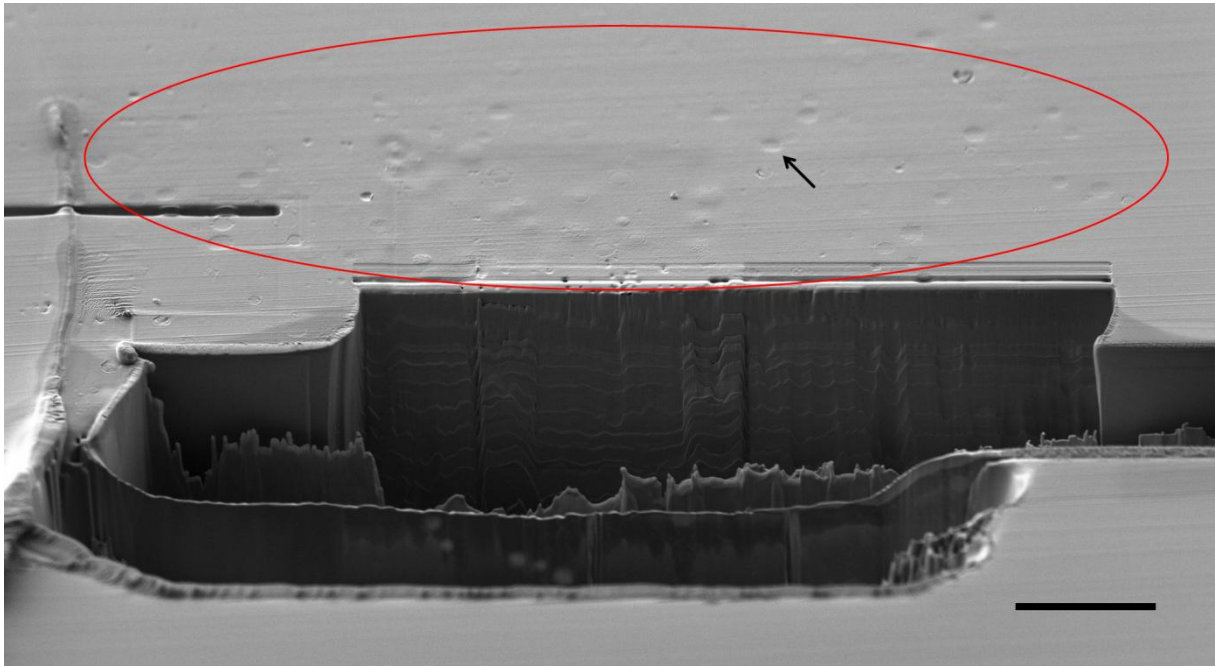


Abbildung 9 SEM-Aufnahme; Stelle hoher Zelldichte, von der die Daten generiert wurden; im markierten Bereich sind die Zellen zu sehen, darunter die Stelle der Abtragung; Pfeil zeigt exemplarisch auf eine Zelle; Balken 10 µm

Ein Tomogramm wurde erhalten mit 2048x1536x586 Voxeln bei 5x5x10 nm Voxelgröße. Es zeigte sich aber, dass in den ersten 190 Schichten des Datenstapels die Auflösung in  $z$  *de facto* höher als 10 nm war. Dies hatte allerdings den Nebeneffekt, dass in diesem Bereich die Strukturen lang gezogen erschienen. Deshalb wurde für die Darstellung des gezeigten 3D-Modells (Abbildung 10 A) in den Schichten 1-190 jedes zweite Bild entfernt (sowohl aus den Original-Daten als auch aus den segmentierten Daten), die Auflösung in  $z$  in diesem Bereich quasi künstlich verkleinert und an das restliche Tomogramm angepasst. So ergab sich ein Volumen von  $10.24 \times 7.68 \times 4.91 \mu\text{m}^3$  (2048x1536x491 Voxel bei 5x5x10 nm Voxelgröße). Die entsprechenden Datenstapel sind in beiden Versionen auf der beiliegenden 'Supplemental Blu-ray Disc' zu finden. In diesem Tomogramm wurden drei *Ignicoccus*-Zellen und eine *Nanoarchaeum*-Zelle komplett bzw. 23 weitere *Ignicoccus*-Zellen teilweise abgedeckt (3D-Modell in Abbildung 10 A). Nicht zuletzt, um einen Eindruck der erhaltenen Datenmengen zu geben, zeigt Abbildung 11 beispielhaft die Rohdaten anhand einer kompletten Zelle (Ausschnitt aus dem Gesamt-Tomogramm).

Daneben wurde ein weiteres Tomogramm mit 1024x768x299 Voxeln bei 5x5x5 nm Voxelgröße (und daraus resultierend ein Volumen von  $5.12 \times 3.84 \times 1.5 \mu\text{m}^3$ ) generiert. In diesem Tomogramm waren drei Zellen in etwa halb abgedeckt. Das entsprechende 3D-Modell zeigt Abbildung 10 B.

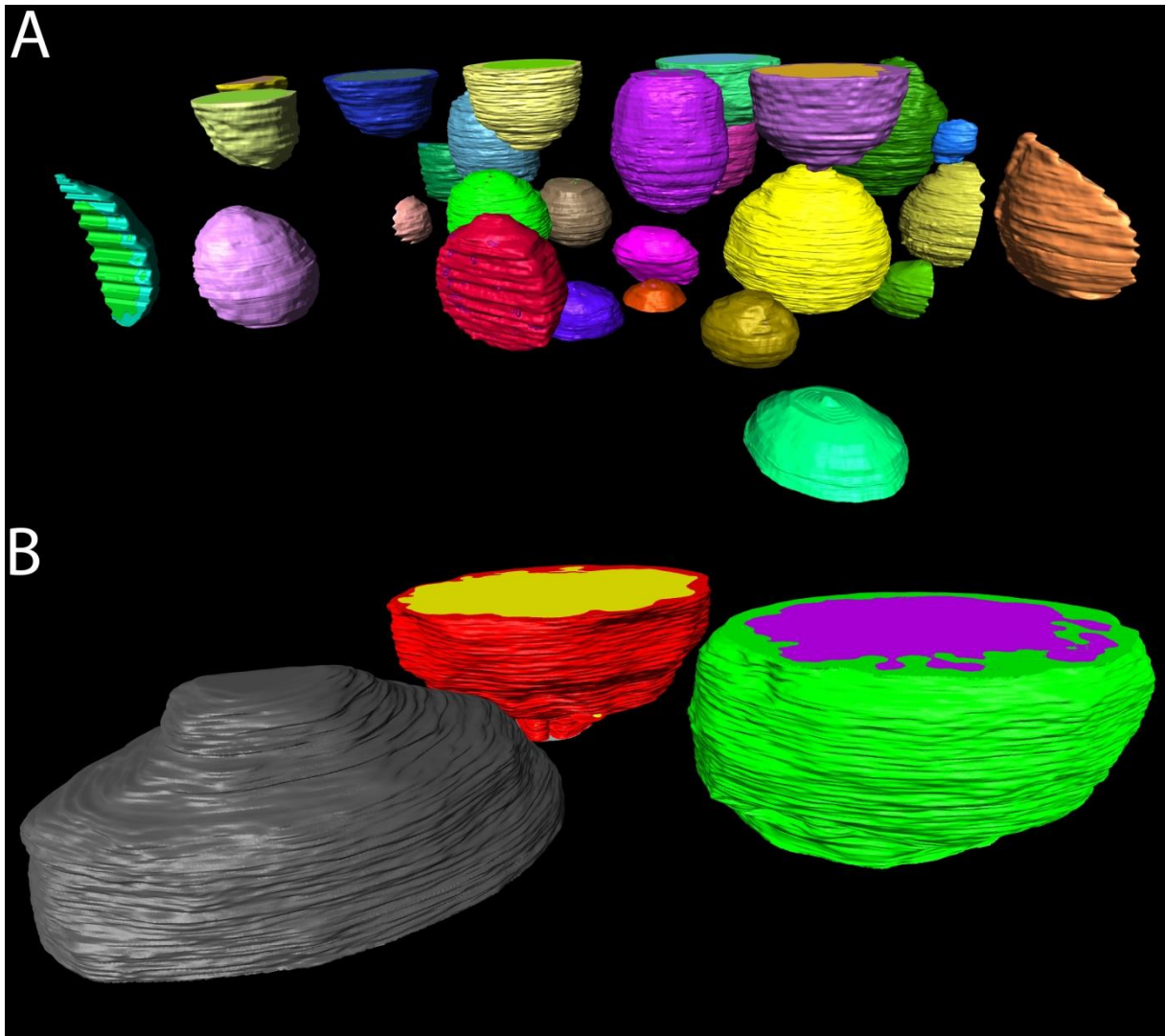


Abbildung 10 3D-Modelle basierend auf den FIB/SEM-Tomogrammen (A) Volumen von  $10.24 \times 7.68 \times 4.91 \mu\text{m}^3$  bei  $5 \times 5 \times 10 \text{ nm}$  Voxelgröße (B) Volumen von  $5.12 \times 3.84 \times 1.5 \mu\text{m}^3$  bei  $5 \times 5 \times 5 \text{ nm}$  Voxelgröße

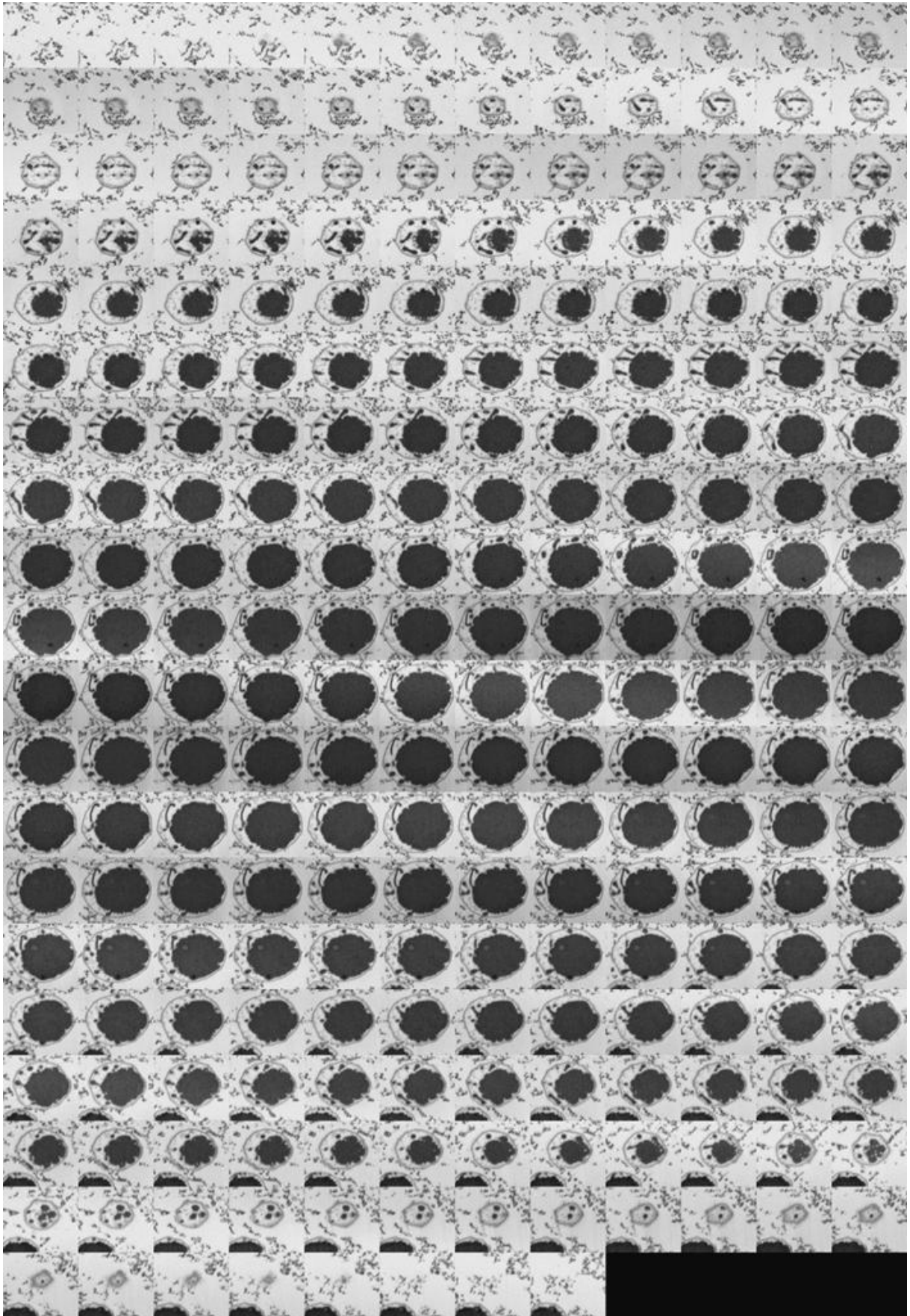


Abbildung 11 Ausschnitt aus dem 5x5x10 nm FIB/SEM-Tomogramm; Bildserie einer kompletten Zelle (236 Einzelbilder)



### 1.3 (Serien-)Elektronentomographie

Als weitere Methode zur Generierung von dreidimensionalen Modellen wurde die Elektronentomographie verwendet. Hierbei kann über die Aufzeichnung sog. Kippserien von (meist) 200 nm-Schnitten im TEM mittels verschiedener Algorithmen ein Volumen berechnet werden.

#### 1.3.1 Einfluss verschiedener Parameter auf den visuellen Eindruck der Tomogramme

Die gängigsten Algorithmen zur Volumenberechnung sind 'weighted back projection' (WBP) und das iterative Verfahren 'simultaneous iterative reconstruction technique' (SIRT). Diese beiden Möglichkeiten der Rekonstruktion bietet auch die verwendete Software IMOD. Im Folgenden wurde ein Vergleich zwischen beiden Algorithmen angestellt: Da die Grauwertverteilung in den errechneten Volumina bei beiden Methoden sehr unterschiedlich ausfällt, wurden die Tomogramme bzw. Einzelbilder zunächst mit ImageJ mittels der Optionen 'normalize' und 'equalize histogram' vergleichbar gemacht. Um die Unterschiede der beiden Methoden bestmöglich in den Abbildungen 12-14 zur Geltung zu bringen, erwies es sich als beste Methode, zu vergleichende Bilder nebeneinander in ImageJ zu öffnen und davon 'Screenshots' zu machen. Obwohl die Bilder bereits die wesentlichen Aspekte zeigen, empfiehlt sich darüber hinaus ein Blick auf die einzelnen Tomogramme der beiden verglichenen Objekte (siehe beigelegte 'Supplemental Blu-ray Disc'). In Abbildung 12 fällt auf, dass im SIRT-Tomogramm (links) der Kontrast gegenüber dem WBP-Tomogramm (rechts) verstärkt ist. Dies hat jedoch den Nebeneffekt, dass der Hintergrund wesentlich unruhiger wirkt. Das WBP-Tomogramm dagegen ist insgesamt wesentlich homogener. An einem Detailausschnitt einer membranumschlossenen Struktur im IMC bei voller Auflösung (Abbildung 13) zeigt sich, dass diese Homogenität in erster Linie von einer feineren Körnung der Bildtextur herrührt, das Bild im Vergleich zum SIRT-Tomogramm deshalb aber auch verrauschter wirkt. Zudem zeigt sich in Abbildung 13 der erhöhte Kontrast der SIRT-Tomogramme vor allem an kleinen/dünnen Strukturen noch deutlicher.

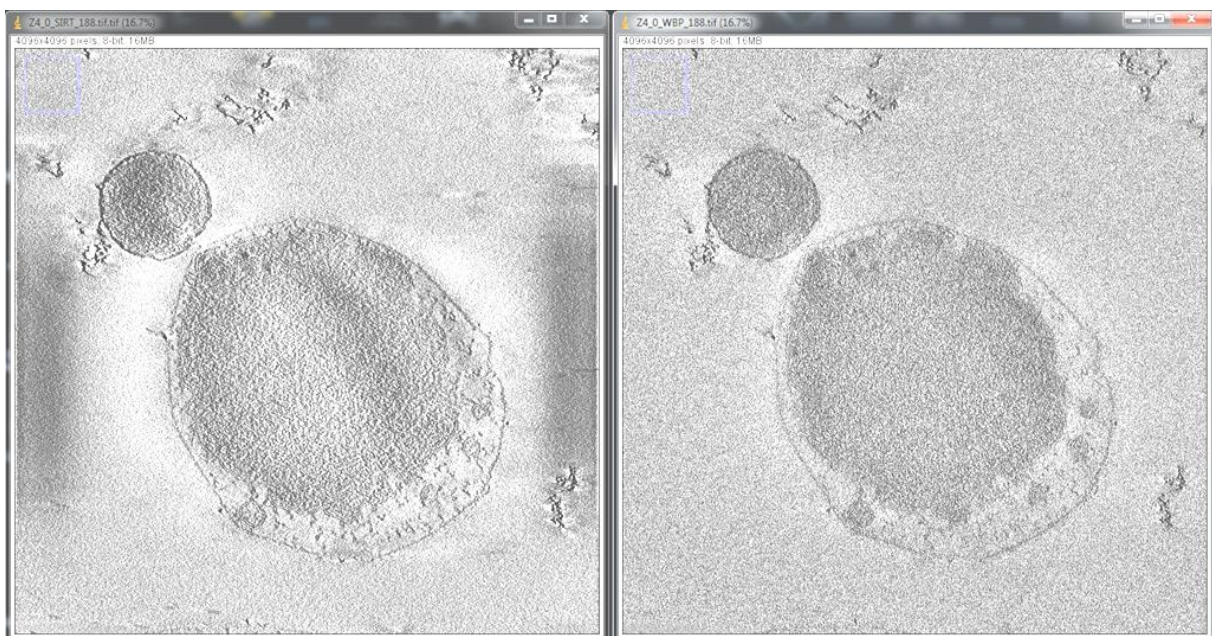


Abbildung 12 'Screenshots' der gleichen Ebenen zweier Tomogramme aus ImageJ; SIRT-Tomogramm (links) vs. WBP-Tomogramm (rechts); Erläuterung im Text (1.3.1)

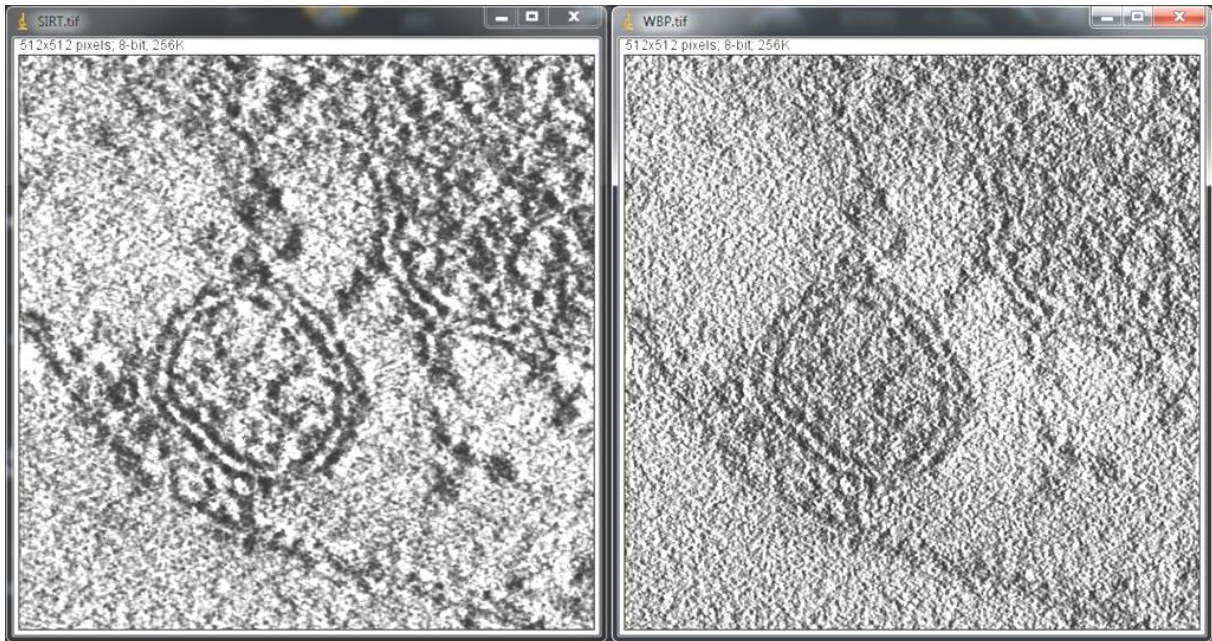


Abbildung 13 'Screenshots' der gleichen Detailausschnitte der gleichen Ebenen zweier Tomogramme aus ImageJ; SIRT-Tomogramm (links) vs. WBP-Tomogramm (rechts); Erläuterung im Text (1.3.1)

Für die Veranschaulichung der Auswirkung der Anzahl der Iterationen auf SIRT-Tomogramme wurden Sub-Volumina mit je 1200x1200 Pixeln berechnet. Abbildung 14 zeigt Ausschnitte aus diesen Sub-Volumina bei voller Auflösung, die mit 5, 10, 15, 20 und 25 Iterationen (von links) berechnet wurden. Zudem wurde das gleiche Sub-Volumen ebenfalls mit WBP berechnet (rechts). Wie vor allem am S-Layer von *Nanoarchaeum equitans* zu sehen ist, nimmt der Kontrast mit steigender Anzahl der Iterationen ab, wobei ein nennenswerter Detailverlust hierdurch nur bei der geringsten verwendeten Anzahl von 5 Iterationen festzustellen ist. Das Bildrauschen nimmt dagegen leicht zu mit steigender Iterations-Anzahl. Insgesamt jedoch nehmen die Unterschiede mit steigender Anzahl der Iterationen ab. Während Iteration 5 und 10 noch deutliche Unterschiede zeigen, sind zwischen Iteration 20 und 25 kaum welche - und faktisch keine erwähnenswerten - zu finden.

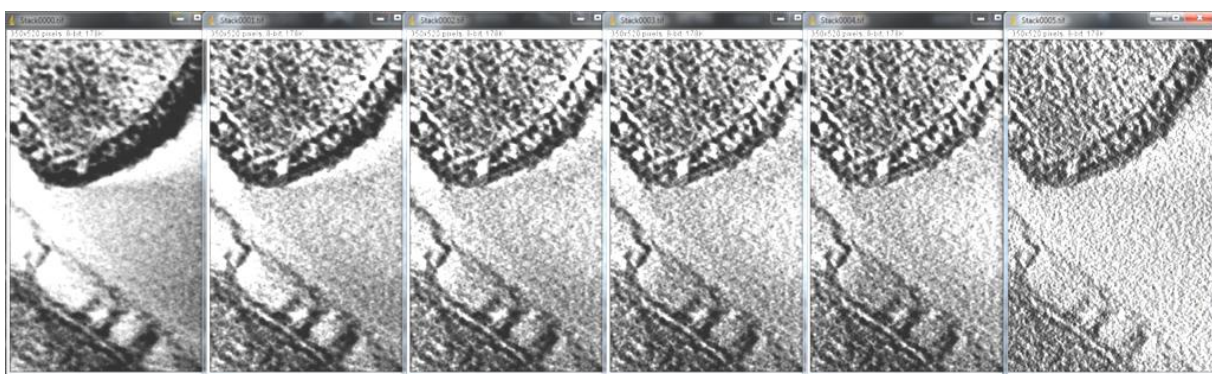


Abbildung 14 Vergleich der Rekonstruktionsalgorithmen anhand eines Sub-Volumens der Kontaktstelle von *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*; von links nach rechts 5, 10, 15, 20, 25 Iterationen mit SIRT, WBP (rechts)

Für einen weiteren Vergleich wurden von einem Schnitt zwei Kippserien mit verschiedenen Defokus-Werten aufgenommen ( $-5\ \mu\text{m}$  bzw.  $-3\ \mu\text{m}$ ). Dabei wurde jeweils das Alignment in IMOD einmal um die CTF ('contrast transfer function') korrigiert, einmal nicht. Als Parameter zur CTF-Korrektur wurde neben dem jeweiligen Defokus eine Beschleunigungsspannung von 200 kV angegeben sowie als Koeffizient für die 'spherical aberration' ein Wert von 2 mm (JEOL JEM-2100F mit 'Cryo'-Polschuh).

Aus diesen vier korrigierten bzw. unkorrigierten Datensätzen wurden dann jeweils mit WBP und SIRT Tomogramme berechnet. Die acht Tomogramme finden sich ebenfalls auf der beiliegenden 'Supplemental Blu-ray Disc'. Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass die näher im Fokus aufgenommene Kippserie ein minimal detailreicheres, schärferes Tomogramm liefert. Kontrastunterschiede lassen sich nicht feststellen. Darüber hinaus zeigt sich kaum ein Unterschied in den Tomogrammen mit bzw. ohne CTF-Korrektur für beide Defocus-Einstellungen, sowohl mit SIRT als auch WBP. Die Unterschiede zwischen den Tomogrammen sind marginal und nur an sehr kleinen Details auszumachen.

Eine Bewertung all dieser Vergleiche, insbesondere in Bezug auf die verwendeten Visualisierungsmethoden, findet sich in der unter IV/1.3 und IV/1.4 (Diskussion).

### 1.3.2 Tomographie von Serienschritten

An sich ist bei der Elektronentomographie die Größe der einzelnen Volumina in z-Richtung begrenzt und wird bestimmt durch die Schnittdicke (in der Regel 200 nm). Um größere Bereiche in z-Richtung zu rekonstruieren, können Serienschritte angefertigt und die errechneten, einzelnen Tomogramme sozusagen aufeinander gestapelt werden. Die Vorgehensweise ist im Folgenden genauer erläutert und in Abbildung 15 schematisch dargestellt (das zugehörige 3D-Modell sowie biologische Aspekte des Beispiels finden sich unter 2.2/Abbildungen 22 & 23 und unter 2.4/Abbildungen 29 & 30).

Zunächst wurden 200 nm-Serienschritte eines Blöckchens angefertigt. Idealerweise kam dabei ein Schnittband zahlreicher Serienschritte auf einem Grid zum Liegen. Zur späteren Alignierung der Kippserien wurden die Grids mit den Serienschritten für einige Sekunden in kolloidaler Goldlösung (15 nm Partikelgröße) inkubiert - von beiden Seiten. Zusätzlich wurde auf die Grids eine etwa 10 nm "dicke" Kohlenstoffschicht aufgedampft. Im TEM wurde danach auf einem der Schnitte eine favorisierte Zelle gesucht und eine Kippserie aufgezeichnet. Die entsprechende Zelle wurde dann auf dem Folgeschnitt gesucht und erneut eine Kippserie aufgezeichnet usw. Dabei erwies es sich als ratsam, auf einem der mittleren Schnitte auf dem Grid mit einer Zelle anzufangen, die mehr oder weniger einen Schnitt aus der "Mitte" darstellte und diese Zelle dann erst nach "oben" hin bzw. anschließend nach "unten" hin zu verfolgen. Die so erhaltenen einzelnen Kippserien wurden im Anschluss mit Hilfe der 15 nm Goldpartikel mit dem Softwarepaket IMOD aligniert und die einzelnen Tomogramme berechnet. Hierfür wurde zumeist der SIRT Algorithmus mit 10 oder 15 Iterationen verwendet. Ebenfalls mit IMOD wurden die einzelnen Tomogramme jeder Serie zusammengesetzt. Gegebenenfalls mussten die einzelnen Tomogramme vor dem Zusammensetzen um die x- bzw. y-Achse so gedreht werden, dass das Objekt möglichst eben im Raum lag. Hierfür wurde das 'Slicer-Tool' aus 3dmod zusammen mit der xyz-Ansicht verwendet (jeweils im IMOD-Softwarepaket enthalten). Aus dem 'Slicer' wurden die entsprechenden Winkel zur Rotation entnommen und die Tomogramme in neuer Orientierung erneut berechnet. Das Zusammensetzen der Einzeltomogramme wurde mit dem 'Join Tomograms Interface' (ebenfalls IMOD) bewerkstelligt. Beim Zusammenführungsvorgang wurden die Randbereiche einzelner Tomogramme, die wenig bis gar keine Information enthielten, entfernt. Die Alignierung der einzelnen Tomogramme erfolgte manuell anhand von Einzelbildern nahe der Grenzregionen zweier benachbarter Tomogramme. Hierbei konnten die Einzeltomogramme ggf. zusätzlich manipuliert werden (Drehen, Strecken, Vergrößern, etc.). Letztlich wurden Gesamttomogramme anhand der erstellten Alignments errechnet.

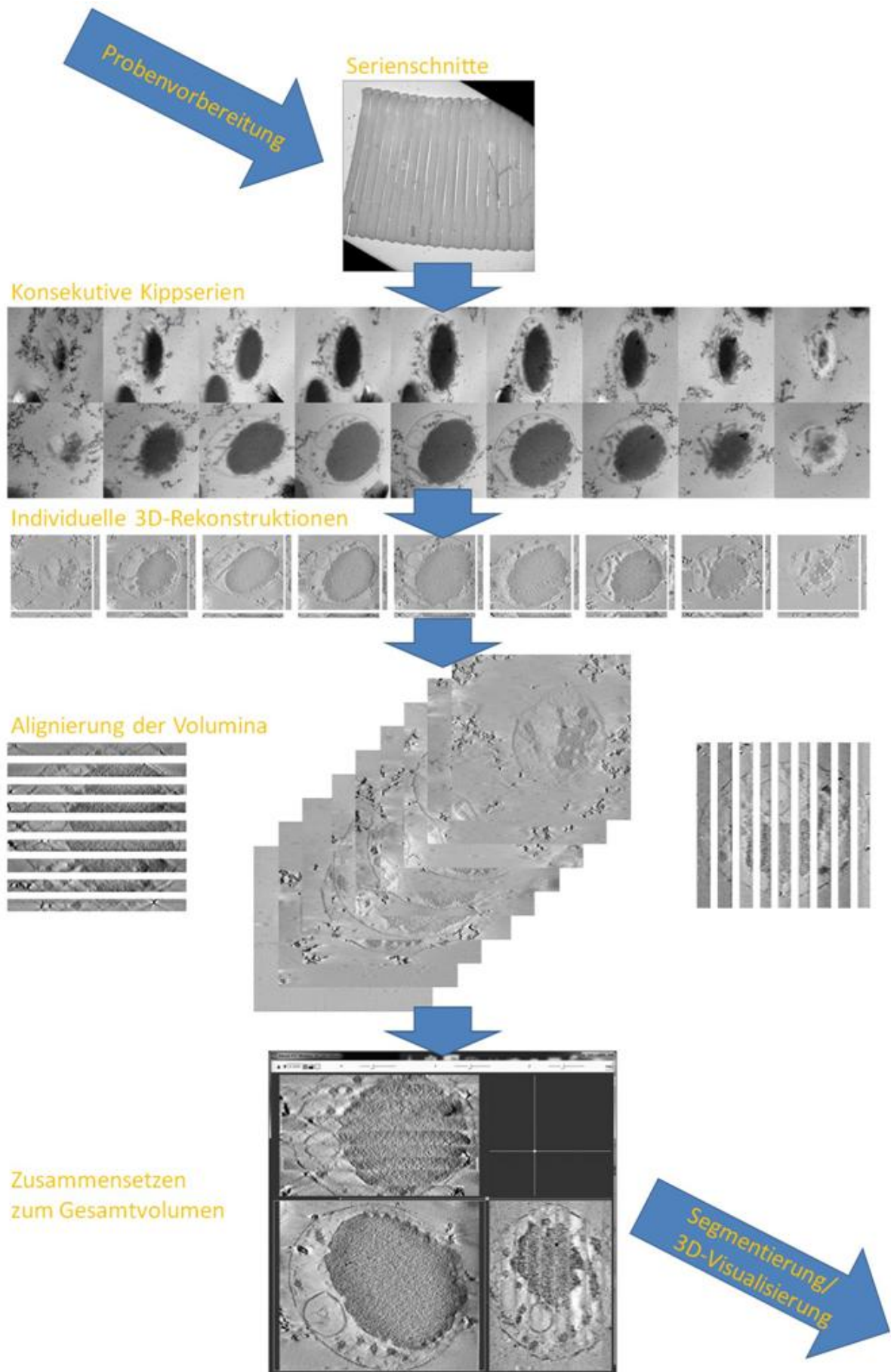


Abbildung 15 'Workflow' zur Erstellung von Serientomogrammen am Beispiel des Datensatzes B2

Erste Tomogramme wurden bereits für die Diplomarbeit generiert (Heimerl, 2009) und in der Folge stetig verbessert. Auch wenn die ersten Rekonstruktionen primär eine Annäherung an die Technik der Elektronentomographie *per se* darstellen, lassen sich dennoch auch aus diesen Tomogrammen strukturelle Eigenheiten von *Ignicoccus* ableiten. Ein Tomogramm (2.195 nm Pixel Size) aus vier 200 nm-Schnitten einer Zelle aus einer Cellulosekapillare wurde in Bayreuth aufgenommen. Zusätzlich wurde ein Tomogramm erstellt aus neun Einzeltomogrammen einer PVDF-gefilterten Zelle (1.06 nm Pixelgröße), ebenfalls in Bayreuth. Vom selben Grid wurden weitere Kippserien am JEM2100F in Regensburg angefertigt (je 0.531 nm Pixelgröße). Davon sind ebenfalls 2 x 9 Schnitte von kompletten *Ignicoccus*-Zellen und weitere kleinere Serien, die teilweise auch nur kleinere Ausschnitte zeigen, da hier insbesondere die Kontaktstellen zu *Nanoarchaeum* im Fokus lag. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit gezeigten Datensätze:

Übersicht über die aufgezeichneten Tomogramme							
TEM, Kathode, Kamera	Name	Anzahl der Einzeltomogramme	Pixelgröße [nm]	Präparation	Algorithmus	Kippwinkel	Inkrement
CM12, LaB <sub>6</sub> , 1k (Regensburg)	RF_1	2	2.5156	Cellulosekap.	WBP	-55° bis 55° (dual axis)	2°
JEM2100, LaB <sub>6</sub> , 1k+ (Bayreuth)	B1	4	2.195	Cellulosekap.	WBP	-65° bis 65°	2°
	B2	9	1.06	PVDF-Filter	SIRT10	-66° bis 64°	2°
JEM2100F, FEG, 4k (Regensburg)	RJ_1	9	0.531	PVDF-Filter	SIRT15	-65° bis 65°	1°
	RJ_2	2	0.531	PVDF-Filter	SIRT15	-65° bis 65°	1°
	RJ_3	3	0.531	PVDF-Filter	SIRT15	-65° bis 65°	1°
	RJ_4	9	0.531	PVDF-Filter	SIRT15	-65° bis 65°	1°
	RJ_5	3	0.531	PVDF-Filter	SIRT15	-65° bis 65°	1°
	RJ_6	5	0.531	PVDF-Filter	SIRT15	-65° bis 65°	1°

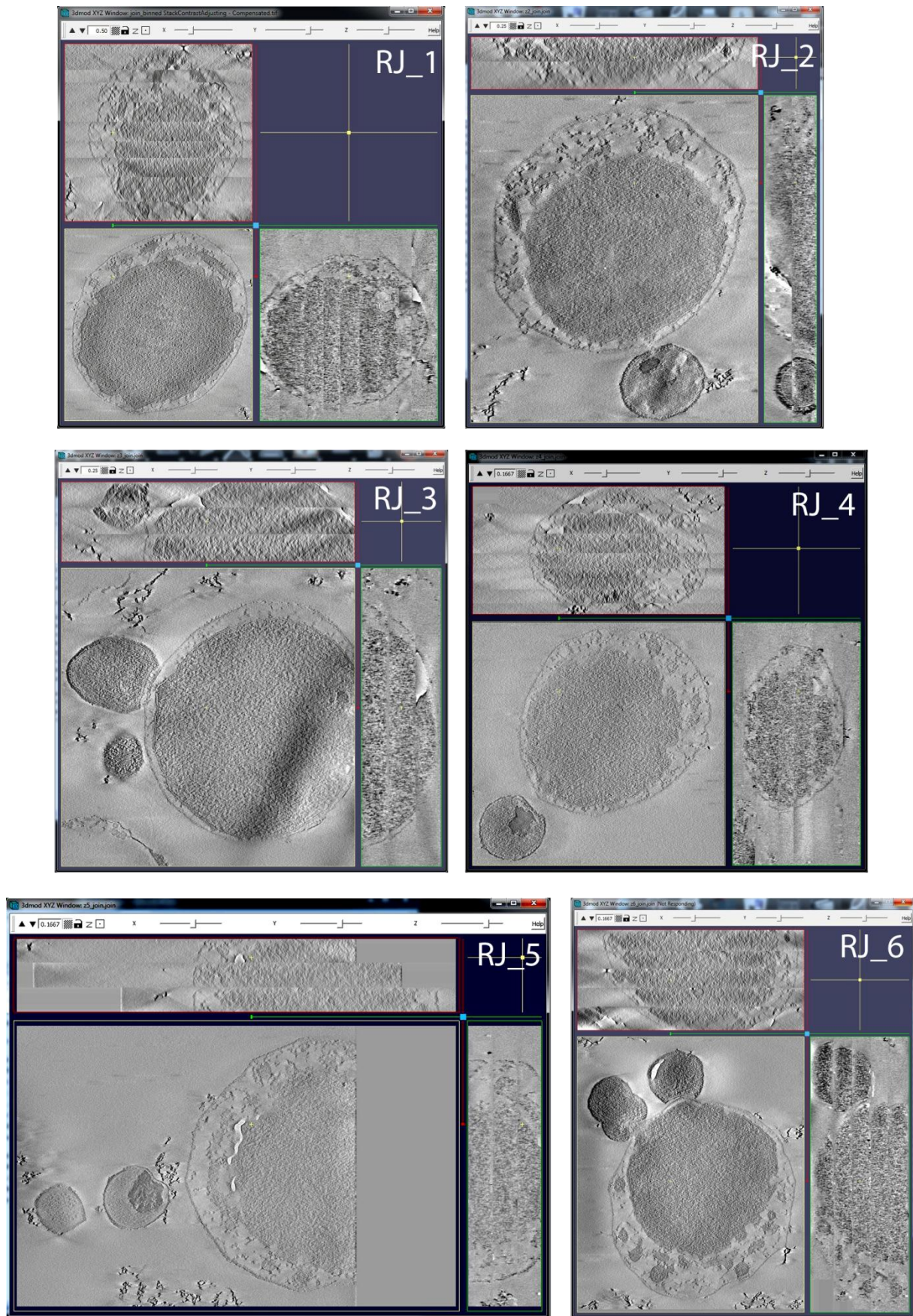


Abbildung 16 Übersicht über die zusammengesetzten Tomogramme, die am JEM2100F generiert wurden (RJ-Datensätze); 'Screenshots' aus 3dmod mit Schnitten durch alle drei Ebenen (xy, xz, yz)

## 2 Strukturelle Aspekte

Zahlreiche strukturelle Besonderheiten von *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum* wurden bereits mehrfach an Ultradünnschnitten bzw. daraus resultierenden 3D-Modellen beschrieben (u.a. in Junglas, 2006; Wasserburger, 2008; Heimerl, 2009; Flechsler, 2010). Erkenntnisse zu diesen Strukturen werden im Folgenden u.a. anhand von Elektronentomographie und FIB/SEM revidiert bzw. um weitere strukturelle Aspekte ergänzt. Neben erhöhter Detailtreue konnten zum ersten Mal auch komplette Zellen rekonstruiert werden.

### 2.1 Allgemeiner Zellaufbau

Zunächst fällt bei Betrachtung der FIB/SEM-Daten auf, dass die Cytoplasmen der Zellen unterschiedliche Kontrastierung aufweisen (Abbildung 17). Die beiden Extremfälle sind ein äußerst dunkel kontrastiertes Inneres der Zelle, wobei die Textur sehr feinkörnig wirkt (1), und eine sehr helle Kontrastierung mit grober Textur (4). Daneben können Zwischenformen gefunden werden, die etwas heller kontrastiert sind als Zelle 1 (1) und entweder ähnlich feine (2) oder gröbere (3) Struktur besitzen. Die Zwischenformen können am häufigsten gefunden werden.

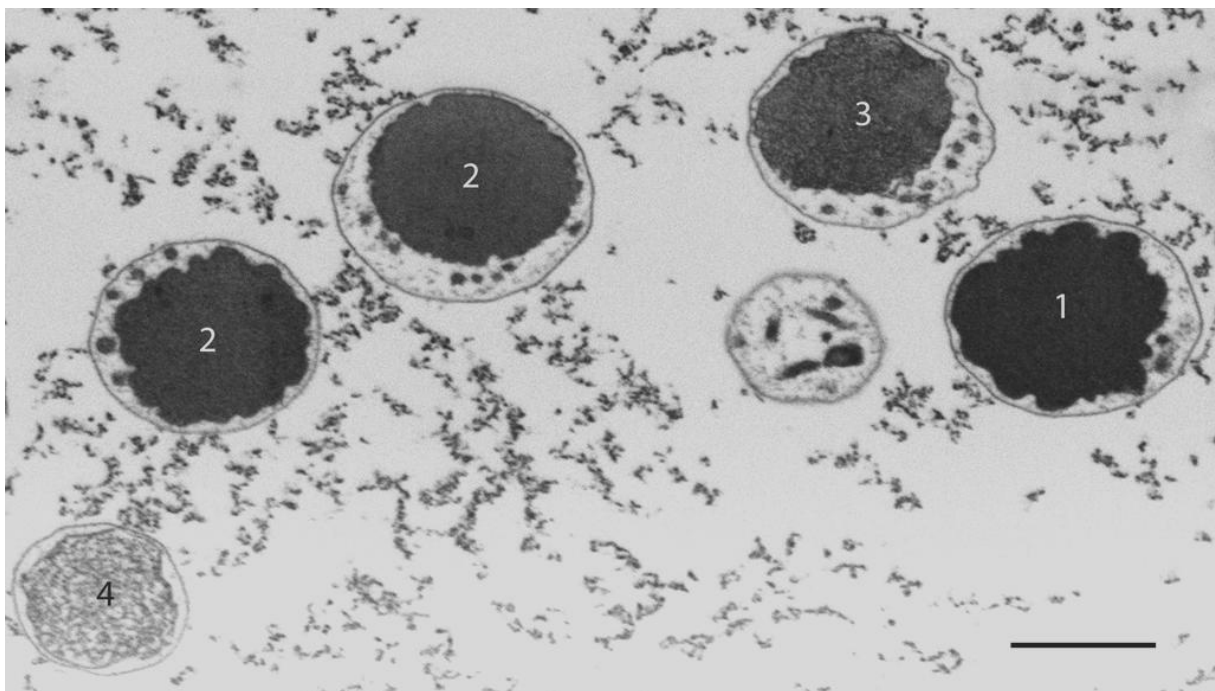


Abbildung 17 Unterschiedliche Kontrastierung des Cytoplasmas im 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz (1) dunkel und feine Textur; (4) hell und grobe Textur; (2) und (3) Zwischenformen; Balken 1 µm

An einer Gegenüberstellung der FIB/SEM-Daten gegenüber Tomogrammen aus den Kippserien resultierend wird deutlich, dass die (xy-)Auflösung im FIB/SEM-Verfahren (Pixelgröße 5 x 5 nm) nicht ausreichte, um sowohl die äußere als auch die innere Membran als Bilayer darzustellen (Abbildung 18 A). Deutlich hingegen zeigte sich der Bilayer-Charakter beider Membranen in Tomogrammen der Kippserien (Abbildung 18 B): Zwei elektronendichte Schichten umgeben eine elektronendurchlässige Schicht. Für alle drei Schichten kann eine Dicke von je 2-3 nm angegeben werden. Zusätzlich zeigt sich der äußere Layer der äußeren Membran weit stärker kontrastiert als der innere. Trotz adäquater Auflösung und der Verwendung von H<sub>2</sub>O im Gefriersubstitutions-"Cocktail" (Walther & Ziegler, 2002)

ist der Bilayer-Charakter der äußeren Membran vergleichsweise selten bzw. nur stellenweise zu sehen. Ähnliches kann auch für Ultradünnschnitte (50 nm) beobachtet werden. Neben einer geringeren Auflösung der FIB/SEM-Daten zeigt Abbildung 18 aber auch deutlich den erhöhten Kontrast gegenüber der Elektronentomographie, der mit FIB/SEM erzielt werden kann.

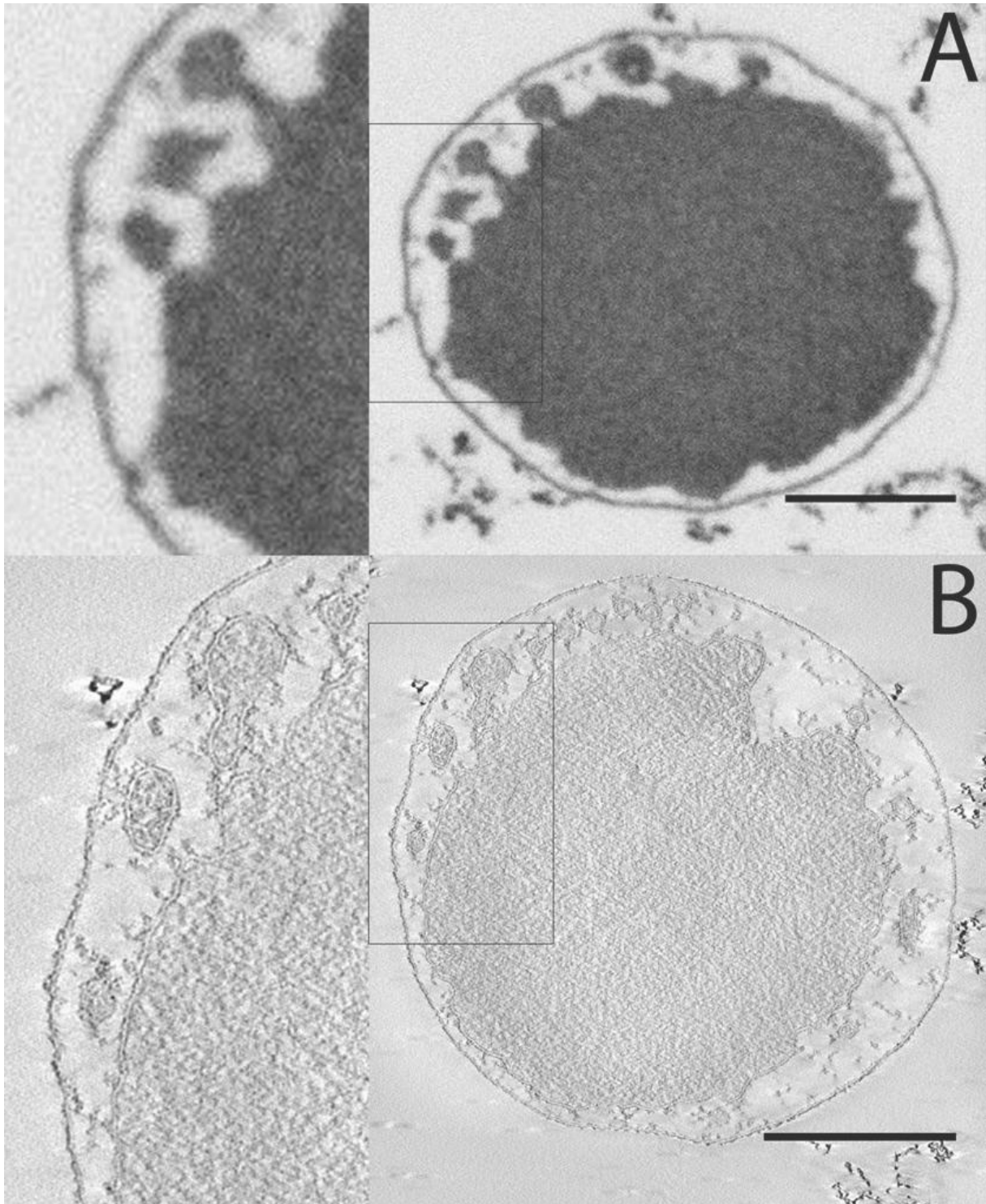


Abbildung 18 (A) "Schnitt" und Detail aus dem 5x5x5 nm FIB/SEM Datensatz, (B) "Schnitt" und Detail aus einem Tomogramm (RJ\_5); Balken jeweils 0.5 µm

Zwischen beiden Membranen liegt das sogenannte 'Intermembrane Compartment' (IMC). In manchen Fällen suggerieren einzelne Ultradünnschnitte für das IMC ein mehrfaches des Volumens



des Cytoplasmas (Rachel *et al.*, 2002). In Abbildung 19 sind dieselben FIB/SEM-Modelle aus derselben Perspektive wie in Abbildung 10, diesmal mit transparenter äußerer Membran dargestellt. Diese Darstellung gewährt einen Einblick in die Zellen und eine erste Abschätzung der Volumenverhältnisse: Für keine der Zellen kann die These vom Vielfachen des IMCs gegenüber des Cytoplasmas geltend gemacht werden.

Neben dieser visuellen Abschätzung wurde mit AMIRA das Volumen der einzelnen Strukturen bestimmt. Dabei wurden mit dem 'MaterialStatistics'-Tool die einzelnen Voxel gezählt und mit der Voxelgröße verrechnet. Zunächst wurde eine Statistik über die beiden kompletten FIB/SEM-Volumina und einer manuell segmentierten Elektronentomographie-Zelle (also insgesamt 30 Zellen; davon 4 komplett bzw. 26 mehr oder weniger große Volumenfragmente) erhoben. Diese lieferte Durchschnittswerte von 62.5% für das Cytoplasma bzw. 37.5% für das IMC (Anteil jeweils am Gesamtzellvolumen).

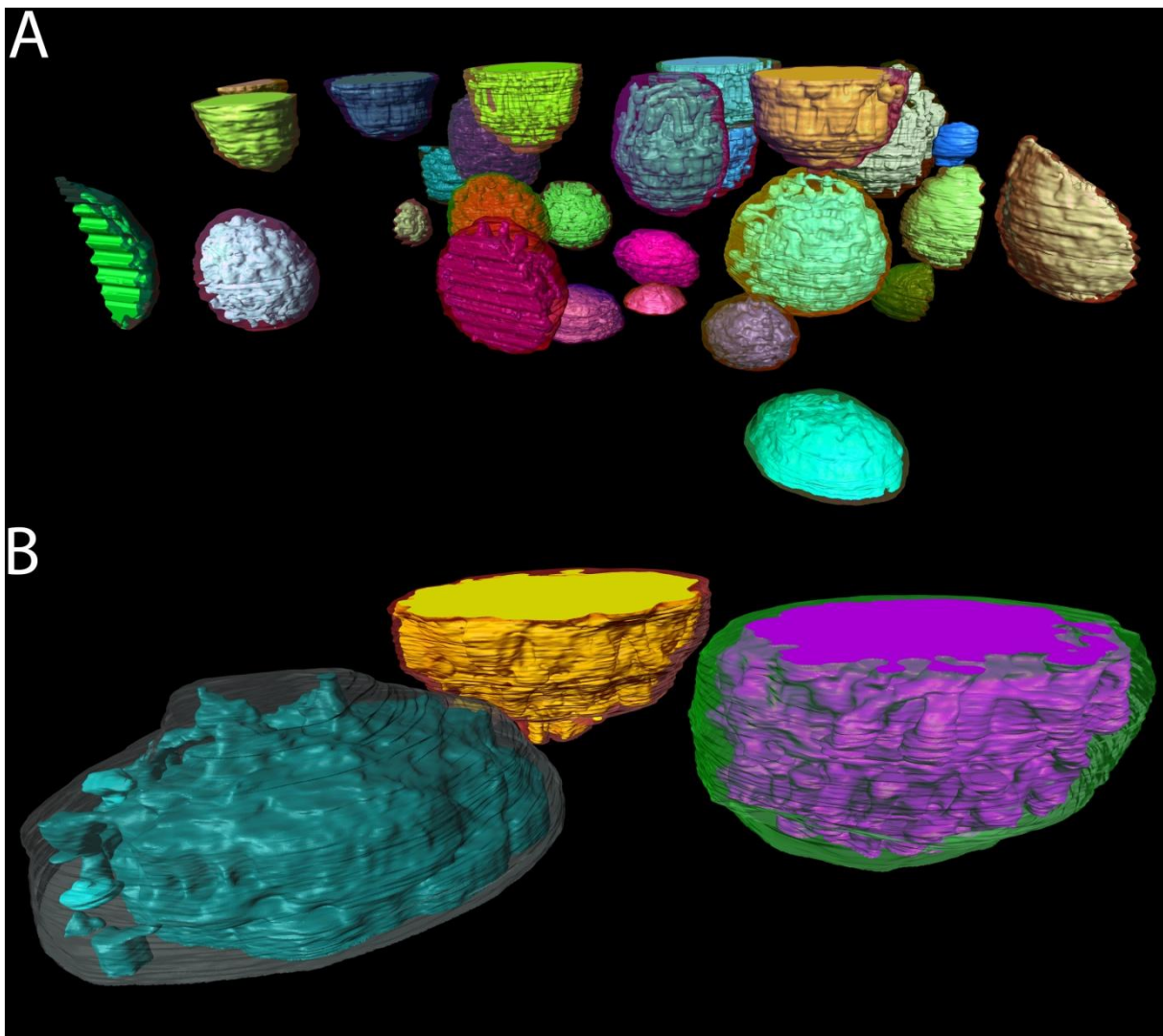


Abbildung 19 3D-Modelle basierend auf den FIB/SEM-Tomogrammen (A) Volumen von  $10.24 \times 7.68 \times 4.91 \mu\text{m}^3$  bei  $5 \times 5 \times 10 \text{ nm}$  Voxelgröße (B) Volumen von  $5.12 \times 3.84 \times 1.5 \mu\text{m}^3$  bei  $5 \times 5 \times 5 \text{ nm}$  Voxelgröße

Gesamtstatistik über alle manuell segmentierten Zellen					
	Cytoplasma [ $\mu\text{m}^3$ ]	IMC [ $\mu\text{m}^3$ ]	Gesamtvolumen [ $\mu\text{m}^3$ ]	Anteil CP	Anteil IMC
5x5x5 nm FIB/SEM-Datensatz	2.33	1.08	3.41	68%	32%
5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz	24.40	14.61	39.01	62.5%	37.5%
Tomographie-Datensatz B2	1.37	1.15	2.52	55%	45%
Gesamt	28.10	16.84	44.94	62.5%	37.5%

Zusätzlich wurde für alle komplett erhaltenen Zellen, die manuell segmentiert wurden (aus FIB/SEM und Elektronentomographie; Abbildung 20 bzw. Abbildung 32), eine gesonderte Statistik erhoben. Aus den gemessenen Werten konnte (ähnlich wie in der Gesamtstatistik) ein durchschnittlicher Volumenanteil von rund 60% für das Cytoplasma bzw. 40% für das IMC am Gesamtvolumen bestimmt werden. Die Ergebnisse im Einzelnen sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

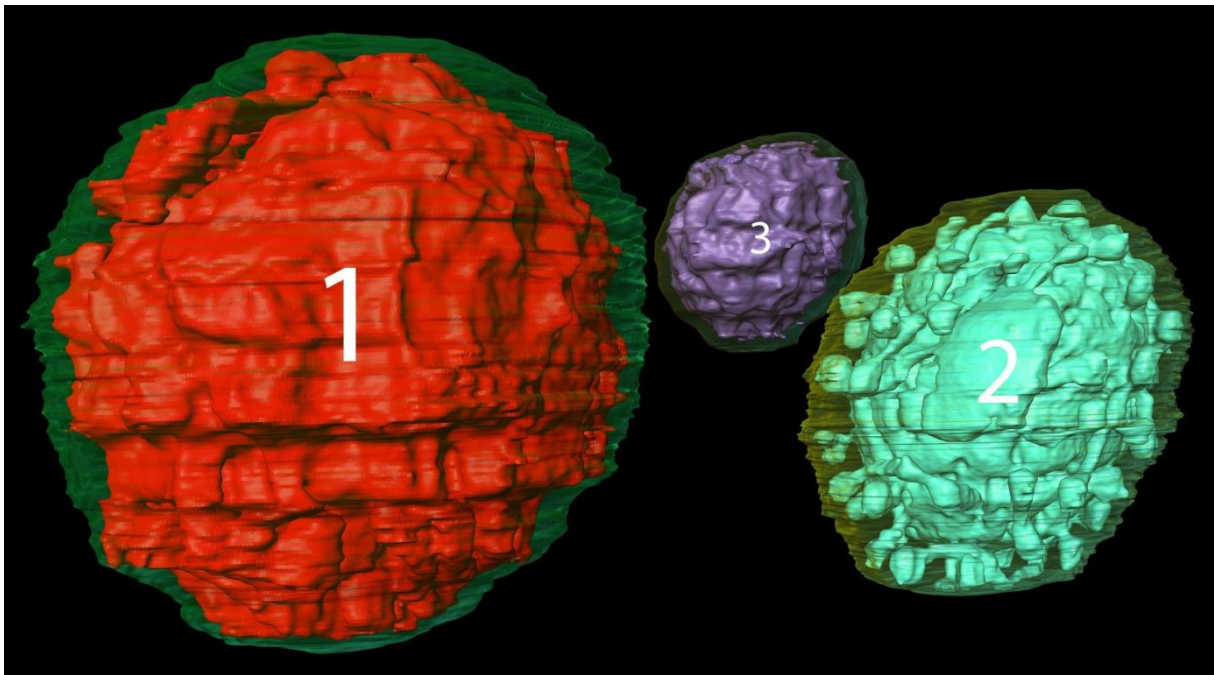


Abbildung 20 Die drei komplett erhaltenen Zellen aus dem 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz; selektive Ansicht des 3D-Modells

Gesamtstatistik über alle vollständigen, manuell segmentierten Zellen					
	Cytoplasma [ $\mu\text{m}^3$ ]	IMC [ $\mu\text{m}^3$ ]	Gesamtvolumen [ $\mu\text{m}^3$ ]	Anteil CP	Anteil IMC
Zelle 1 (Abbildung 20) aus 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz	1.80	0.94	2.74	66%	34%
Zelle 2 (Abbildung 20) aus 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz	2.83	2.14	4.97	57%	43%
Zelle 3 (Abbildung 20) aus 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz	0.51	0.36	0.87	59%	41%
Tomographie-Datensatz B2 (Abbildung 32)	1.37	1.15	2.52	55%	45%
Gesamt	6.51	4.59	11.1	59%	41%

Zusätzlich wurden theoretische Volumina anhand des gemessenen Zelldurchmessers am Äquator der Zelle bzw. anhand des Durchmessers des Cytoplasmas bestimmt und mit den tatsächlichen Werten verglichen. Dabei wurden sowohl die gesamte Zelle als auch das Cytoplasma zur Kugel idealisiert und das Volumen jeweils nach  $V = \frac{4}{3}\pi r^3$  errechnet. Die Ergebnisse zeigen ähnliche Werte wie die tatsächlich gemessenen Volumenverhältnisse. Die größte Abweichung war in Zelle 2 zu finden, mit 48% theoretischem Volumenanteil gegenüber einem gemessenen von 57% (für das Cytoplasma).

Theoretisch ermittelte Volumenverhältnisse anhand des Durchmessers der Zelle und des Cytoplasmas						
	$d_{\text{Zelle}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$V_{\text{theoretisch(Zelle)}}$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	$d_{\text{Cytoplasma}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$V_{\text{theoretisch(CP)}}$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	Anteil CP	Anteil IMC
Zelle 1 (Abbildung 20) aus 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz	1.86	3.36	1.6	2.14	63%	37%
Zelle 2 (Abbildung 20) aus 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz	2.1	4.85	1.65	2.35	48%	52%
Zelle 3 (Abbildung 20) aus 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz	1.3	1.15	1.13	0.75	65%	35%
Tomographie- Datensatz B2 (Abbildung 32)	1.95	3.88	1.65	2.35	60%	40%
Gesamt		13.24		7.59	57%	43%

Daneben können Zellen gefunden werden, für die tatsächlich ein weit größeres IMC-Volumen als das Cytoplasmavolumen angenommen werden kann. Da solche Zellen nicht komplett vorlagen, konnten die Volumenverhältnisse nur näherungsweise (wie oben beschrieben) aus Schnitten vom Äquator der Zellen bestimmt werden. Für die Zelle aus Abbildung 23 zeigte sich so beispielsweise ein Gesamtvolumen von  $14.7 \mu\text{m}^3$  (Durchmesser  $3.04 \mu\text{m}$ ) und ein Cytoplasmavolumen von  $2.14 \mu\text{m}^3$  (Durchmesser  $1.6 \mu\text{m}$ ). Auch unter Berücksichtigung der oben ermittelten Ungenauigkeit bei dieser Abschätz-Methode bleibt das Resultat mit gerade 15% Volumenanteil für das Cytoplasma

offensichtlich. In Zellen mit solch großem IMC kann auch eine Polarisation der Zellen (Heimerl, 2009) deutlicher nachvollzogen werden.

Ebenso variabel wie das Volumenverhältnis von Cytoplasma und IMC ist der Durchmesser der Zellen. Obwohl die meisten Zellen aller bekannten *Ignicoccus*-Spezies durchschnittlich 1-2  $\mu\text{m}$  im Durchmesser haben, können Zellen mit bis zu 6  $\mu\text{m}$  (*Ignicoccus hospitalis*) Durchmesser gefunden werden. Für das Isolat MEX13A liegt die Obergrenze sogar bei etwa 20  $\mu\text{m}$  (Lange, 2008). Dennoch ist die allgemeine Zellstruktur aller Spezies in der Regel gleich; in Ultradünnschnitte lassen sie sich nicht ohne weiteres unterscheiden (siehe Abbildungen 5 & 6).

### 2.2 Ausläufer des Cytoplasmas und Vesikel

Die 3D-Analysen zeigen (unabhängig von der verwendeten Technik), dass ein Großteil der vermeintlichen Vesikel im IMC in Wirklichkeit röhrenförmige Gebilde darstellen, die dem Cytoplasma entspringen. Abbildung 21 A zeigt dies anhand einer Aufsicht auf ein manuell segmentiertes 3D-Modell einer kompletten Zelle des FIB/SEM-Datensatzes (Zelle 3 aus Abbildung 20). In einer weiteren Zelle aus dem selben FIB/SEM-Datensatz (Abbildung 21 B) wird bei eingefügtem Rohdatenschnitt ersichtlich, dass die Röhren komplexe Netzwerke an einem Pol der Zelle ausbilden. In Abbildung 21 C wird der Sachverhalt noch einmal verdeutlicht anhand einer 'Vortex'-Darstellung (Zelle 2 aus Abbildung 20). Insbesondere an den Enden dieser Röhren (zuweilen auch mittendrin), sind häufig Verdickungen zu sehen (siehe Pfeile). Im vorliegenden Beispiel kann der Durchmesser der Röhren mit 50-100 nm angegeben werden, der der Verdickungen mit 130-180 nm. Durch den eingefügten Originalschnitt ist nur das obere Drittel des 3D-Modells zu sehen; einerseits um die Strukturen besser verfolgen zu können, andererseits verdeutlicht Abbildung 21 C so noch einmal die angesprochene Polarisation der Zellen. Diese kann bei Vollansicht der Modelle (aufgrund der Fülle von Strukturen) in der Regel nur schwer nachvollzogen werden.

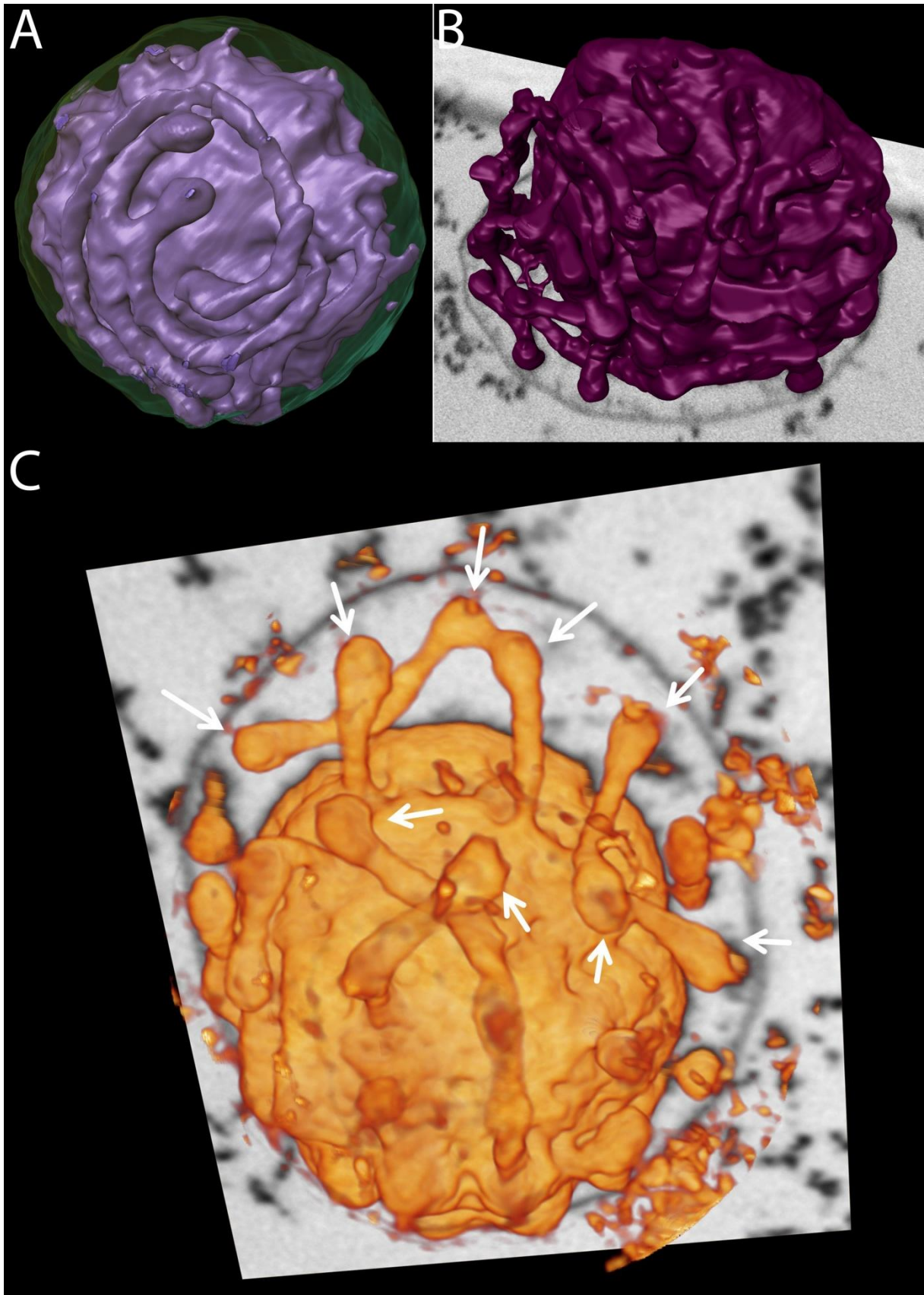
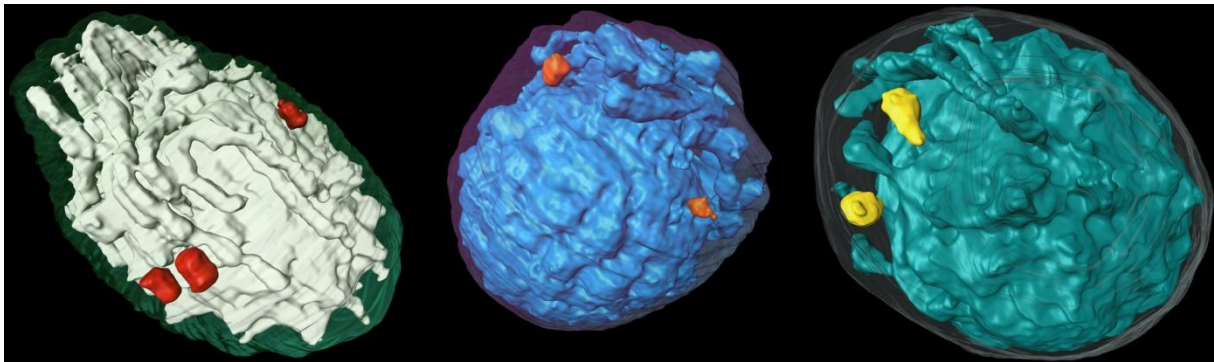


Abbildung 21 3D-Modelle von drei Zellen aus dem 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz; Röhrenförmige Ausläufer des Cytoplasmas, teils netzwerkartig und/oder mit kugelförmigen Verdickungen (Pfeile); (A) und (B) manuell segmentiert; (C) 'Vortex'-Darstellung

Daneben sind in den meisten Datensätzen nur sehr vereinzelt Strukturen ohne Bezug zum Cytoplasma zu finden, die als Vesikel im "klassischen" Sinn gedeutet werden können. Abbildung 22 zeigt alle (!) Beispiele für derartige "freie" Vesikel, die in den beiden FIB/SEM-Datensätzen gefunden werden konnten. Auch in den Elektronentomographie-Datensätzen können nur sehr wenige Beispiele für "freie" Vesikel gefunden werden. Eine Ausnahme hiervon zeigt Abbildung 23. In diesem Tomogramm (bestehend aus 4 Einzeltomogrammen) sind vergleichsweise viele vermeintlich "freie" Vesikel zu finden. Dennoch sind es auch in diesem Beispiel weit weniger, als es auf den ersten Blick den Anschein hat. Bei genauerer Betrachtung ist festzustellen, dass eine Vielzahl von kugelförmigen Strukturen (je 50-150 nm im Durchmesser) miteinander in Kontakt stehen und größere traubenartige bzw. ebenfalls röhrenartige Gebilde formieren. Ob die einzelnen "Vesikel" über Membranfusionen oder anderweitig in Kontakt stehen, kann weder aus dem 3D-Modell noch aus dem Tomogramm geklärt werden (siehe hierzu auch IV/1.2.3 und IV/2.3); ebenso wenig wie mögliche Verbindungen zum Cytoplasma.



**Abbildung 22 "freie" Vesikel; Strukturen, die nicht mit dem Cytoplasma in Verbindung stehen, weder direkt noch indirekt über das Röhrensystem; 3D-Modelle von drei Zellen aus dem 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz; manuelle Segmentierung**

Daneben zeigt ein Tomogramm eine besondere Art von einem "freien" Vesikel (Abbildung 24 B). Eine entsprechende Struktur wurde bereits anhand eines 50 nm-Ultradünnschnittes beschrieben (Heimerl, 2009; Abbildung 24 A) und ist vergleichsweise selten zu finden. (Die beiden gezeigten Zellen zeigen die bislang einzigen dokumentierten Beispiele dieser Strukturen.) Anders als die Vesikel in Abbildung 22 und 23 sind diese Strukturen mit etwa 300-400 nm Durchmesser ungleich größer. Als zusätzliche Besonderheit zeigt die Membran eine trilamellare Struktur. Das entsprechende 3D-Modell zu Abbildung 24 B (Abbildung 24 C) zeigt die Lage dieses Vesikels (rot) knapp unterhalb der äußeren Membran (blau), umgeben von mehreren Cytoplasmaausläufern (orange). Hierin wird zudem die Polarisierung der Zelle besonders deutlich. Außerdem ist eine dem Cytoplasma ähnliche Textur im Inneren, wie sie bei anderen Vesikeln zu finden ist, hier nicht vorhanden. Lediglich ein paar wenige filamentöse Strukturen (ähnlich denen, die in 2.4 beschrieben werden) können gefunden werden. Diese wurden ebenfalls segmentiert. In Abbildung 25 ist das "große Vesikel" transparent dargestellt und erlaubt so einen Blick auf die angesprochenen, inneren Strukturen (grün). Aufgrund der strukturellen Befunde ließe sich das "Vesikel" eventuell besser als eine Art Vakuole charakterisieren.

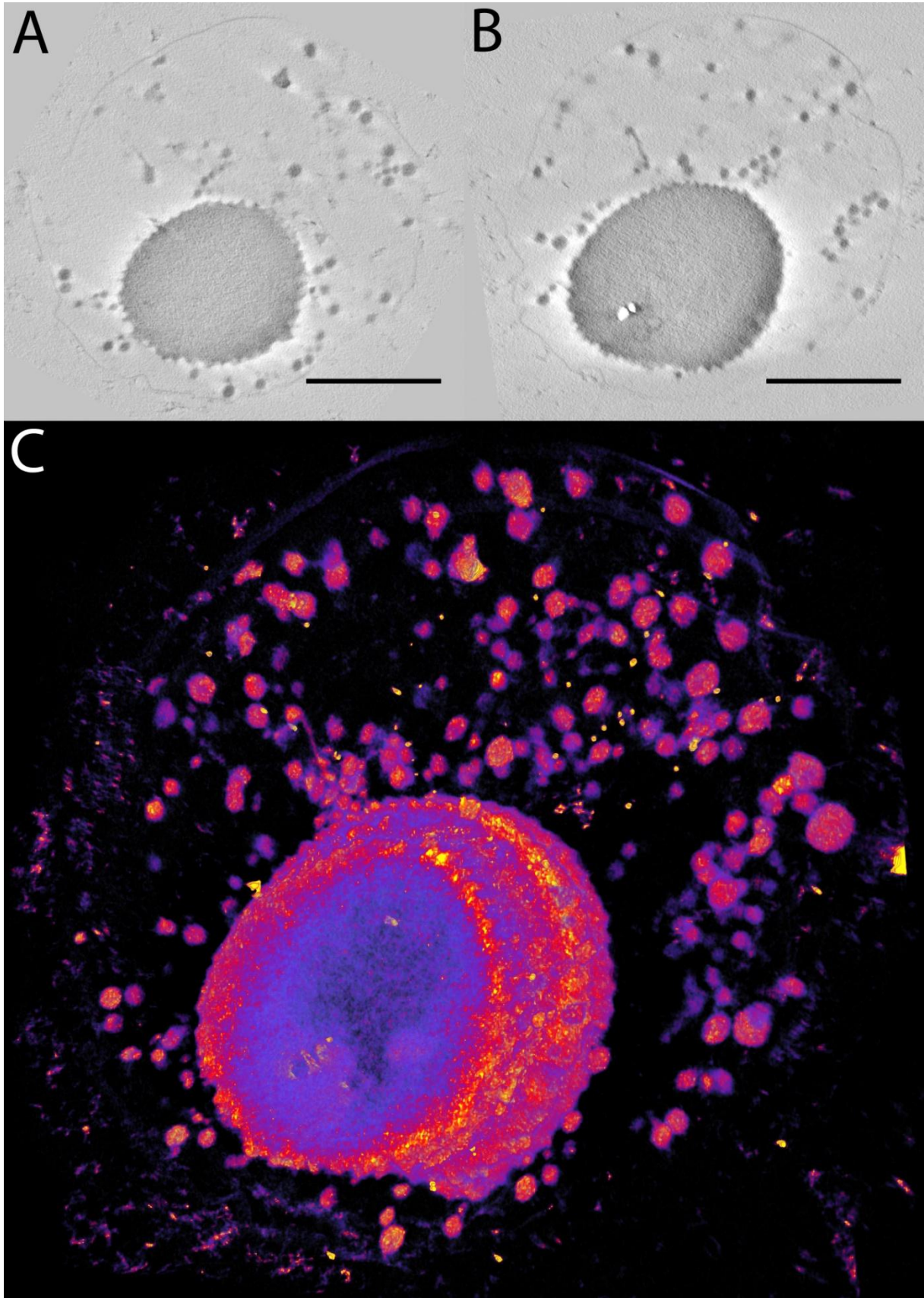


Abbildung 23 Traubenartige Gebilde im IMC, vermutlich auch freie Vesikel; (A) und (B) Schichten aus den Einzel-tomogrammen; Balken jeweils 1  $\mu\text{m}$ ; (C) 'Voltex'-Darstellung des zusammengesetzten Tomogramms (Datensatz B1)

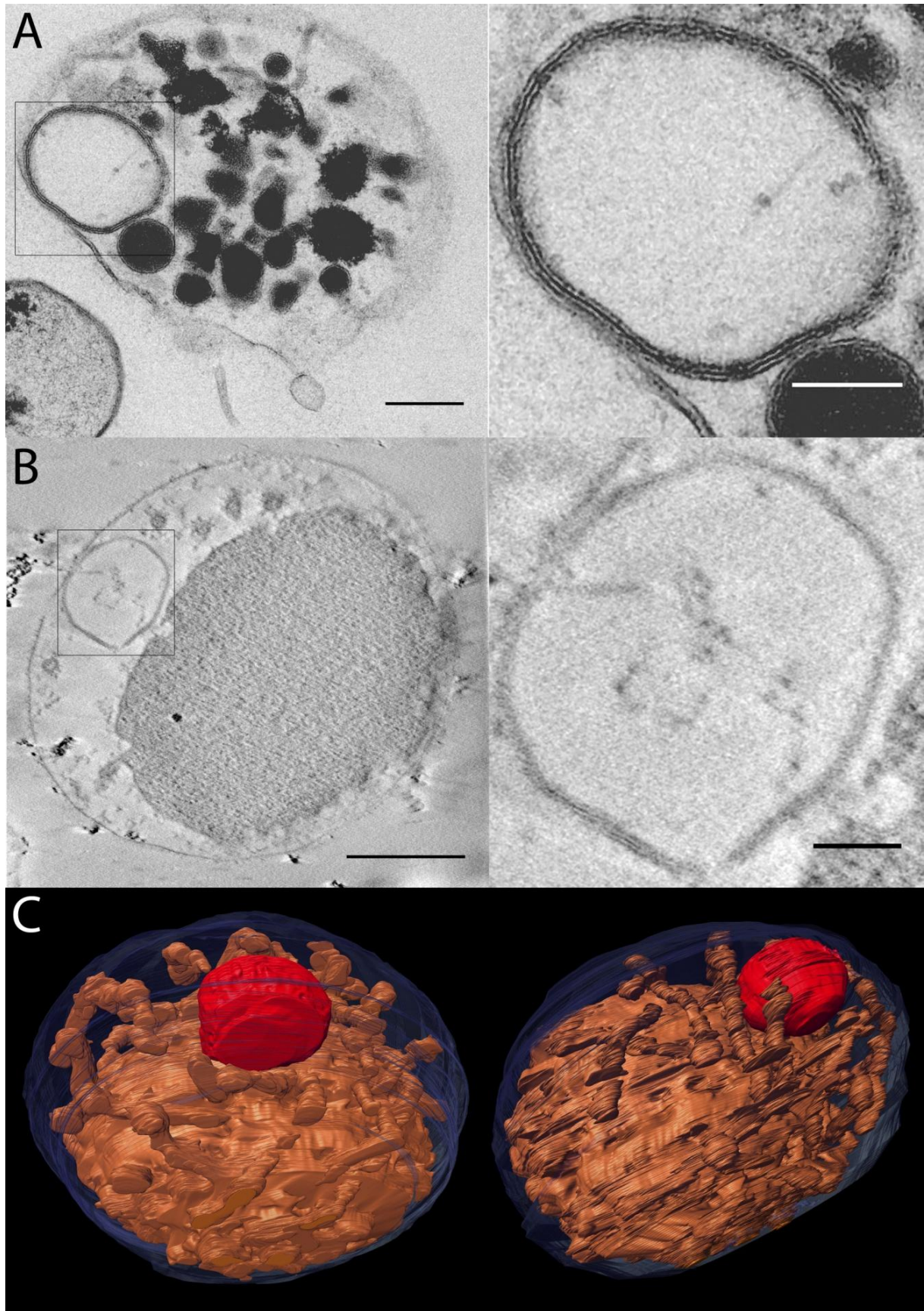


Abbildung 24 Vesikuläre/vakuoläre Struktur in *Ignicoccus hospitalis*; (A) Ultradünnschnitt und Detail (aus Heimerl, 2009); Balken 200 nm bzw. 100 nm; (B) "Schnitt" aus dem Tomogramm B2 und Detail; Balken 0.5  $\mu\text{m}$  bzw. 100 nm; (C) manuell segmentiertes 3D-Modell zu B aus zwei Perspektiven



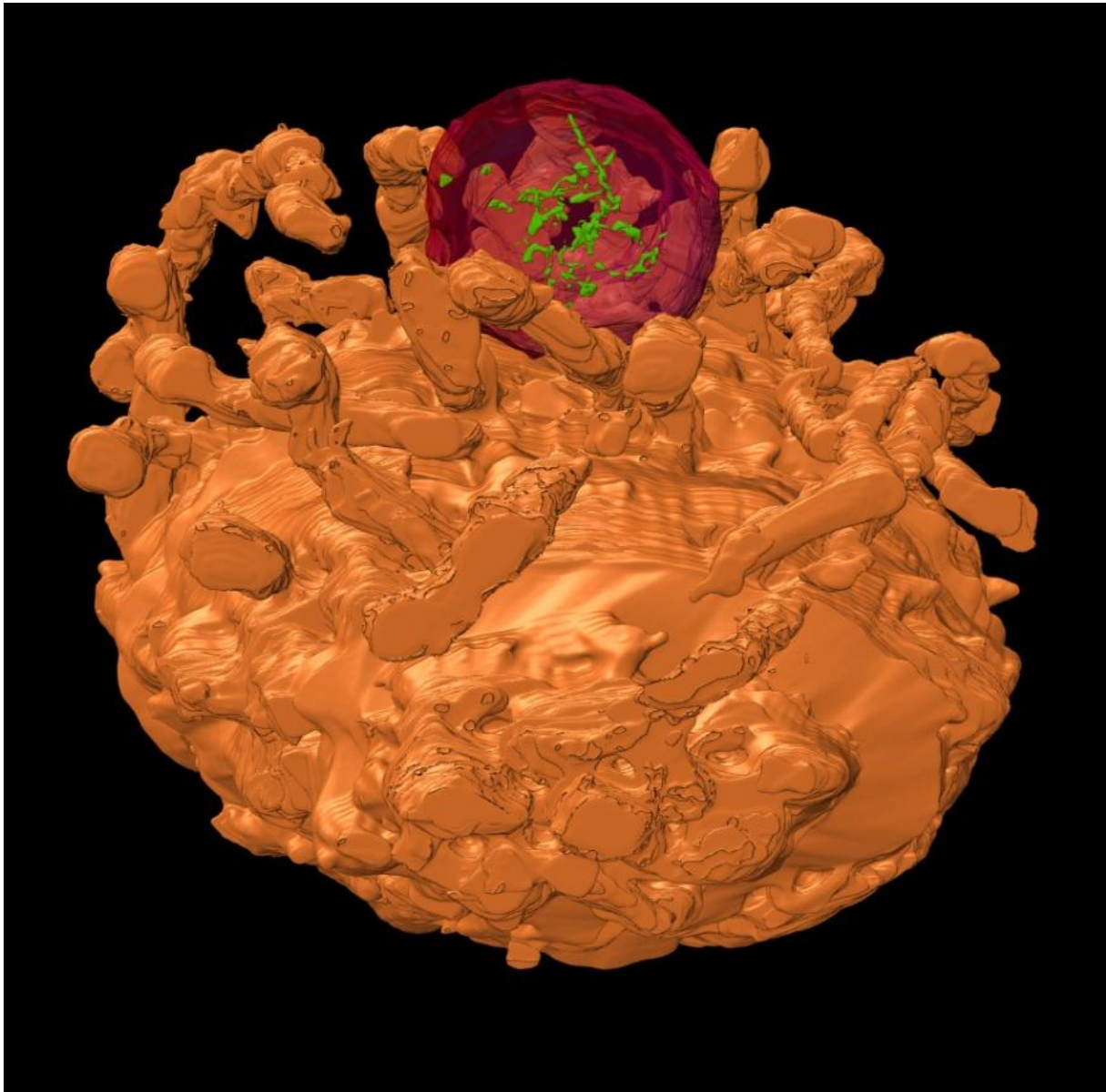


Abbildung 25 Filamentartige Strukturen innerhalb des vesikulären/vakuolären membranumschlossenen Kompartimentes (manuell segmentiertes 3D-Modell von Datensatz B2)

### 2.3 Die Dynamik des endogenen Membransystems

Da, wie erwähnt, Zellen zuweilen bis zu 5  $\mu\text{m}$  bzw. im Fall von MEX13A sogar bis zu 20  $\mu\text{m}$  groß werden können, lässt sich ein Eindruck über die Dynamik in den Zellen im Phasenkontrastmikroskop gewinnen. Dafür ist prinzipiell kein Thermomikroskop nötig, solange die Zellen zeitnah nach der Entnahme aus dem Inkubator mikroskopiert werden. Zwei Videos des Isolats MEX13A, die die Vorgänge in den Zellen zeigen, wurden von Martina Lange im Rahmen ihrer Diplomarbeit angefertigt (Lange, 2009); eines bei Raumtemperatur (Video A) und eines bei 90°C (Video B). Zur genaueren Analyse beider Videos wurden diese vergrößert unter Verwendung der Option 'cubic interpolation' und mit einem 'Median'-Filter bearbeitet und im Falle von Video B die entsprechende Zelle ausgeschnitten. Zudem wurden die Videos (die faktisch nichts anderes sind als Bildstapel mit Zeitachse  $t$  in  $z$ -Richtung) aligniert, um etwaiges Auswandern der Zellen zu kompensieren und so statische und dynamische Strukturen innerhalb der Zellen besser differenzieren zu können. Da das

menschliche Auge Farben besser unterscheiden kann als Grauwerte, wurden beide Videos unter Verwendung der LUT ('lookup table') 'blue orange icb' aus ImageJ neu erstellt (siehe Abbildung 26). Insbesondere für Video B erwies sich dies als sinnvoll. Während in Video A fast ausschließlich sehr stark kontrastierte Strukturen die Dynamik ausmachen, sind in Video B auch hellere Strukturen an der Dynamik beteiligt und durch die Farben leichter zu erfassen. In Video A dagegen sind auch ohne LUT die Vorgänge gut nachzuvollziehen. Video A und B sind jeweils mit und ohne LUT auf der beiliegenden 'Supplemental Blu-ray Disc' vorhanden. Bei der Ansicht der Videos fällt auf, dass die dynamischen Strukturen im Video A tendenziell eher als Vesikel interpretiert werden können, während in Video B vermehrt lange Strukturen miteinander interagieren.

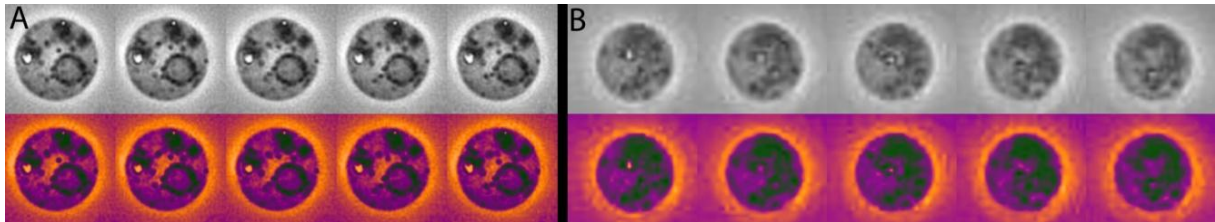


Abbildung 26 Dynamik im IMC; die ersten fünf 'frames' aus Video A (A) bzw. Video B (B) in Graustufen und in Falschfarbendarstellung mittels LUT ('blue orange icb')

Zunächst wurde versucht, einzelne Strukturen mittels 'Trackingtools', wie sie beispielsweise auch für das Schwimmverhalten von Mikroorganismen verwendet werden können (Herzog & Wirth, 2012), zu verfolgen. Da die dynamischen Strukturen aber teilweise miteinander bzw. mit elongierten Strukturen und größeren Strukturen verschmelzen, war eine Verfolgung meist nur über wenige 'Frames' hinweg möglich. Daher wurde zur Visualisierung ein alternativer Ansatz gewählt: Wie erwähnt sind Videos im Prinzip nichts anderes als Bildstapel (im vorliegenden Fall 280 bzw. 300 Einzelbilder bei 10 fps, also 0.1 s pro Bild) und können demzufolge mit denselben Methoden wie Volumina dargestellt werden. Dabei wird die t-Achse (Zeit) sozusagen als z-Achse dargestellt. Abbildung 27 zeigt eine 'OrthoSlice'-Darstellung der Videos mit Schnitten durch die 3 Ebenen. In dieser Darstellung lassen sich einzelne Spuren verfolgen und zeigen beispielsweise, zwischen welchen unveränderlichen Strukturen Austausch stattfindet (z.B. wo Transporte zur äußeren Membran stattfinden). Zudem zeigt vor allem Abbildung 27 B, dass die einzelnen Spuren an einigen Stellen zusammenlaufen bzw. sich wieder aufspalten. An diesen Stellen verschmelzen dynamische Strukturen miteinander bzw. schnüren gesonderte Kompartimente ab. Repetitive Transportrouten-Muster lassen sich jedoch in keinem der beiden Videos erkennen (auch nicht in den weiteren nicht gezeigten Schnitten durch die Ebenen und auch nicht im Pseudo-3D-Modell aus Abbildung 28). Zwar lässt sich vor allem in Abbildung 27 A reger Austausch zwischen einzelnen fixen Strukturen nachvollziehen, insgesamt zeigen sich aber in beiden Videos äußerst diffuse dynamische Verhältnisse.

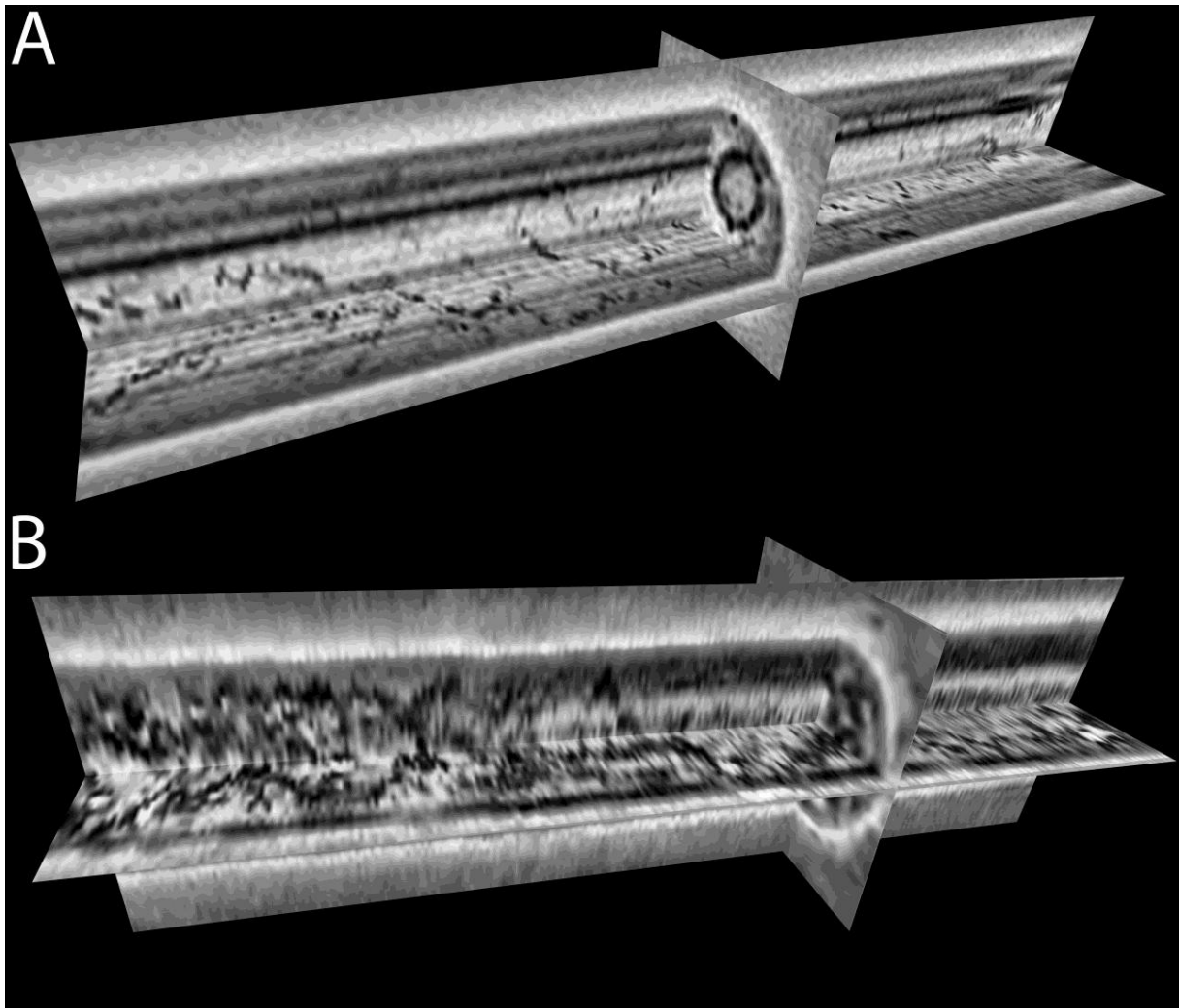


Abbildung 27 Dynamik im IMC; 'OrthoSlice' Darstellung der Videos (bzw. Bildstapel) A und B; Schnitte durch die drei Ebenen x, y und z (bzw. t)

In Abbildung 28 wurden die Videos mit einer 'Vortex'-Darstellung veranschaulicht. Zur kompakteren Darstellung wurde ein Zehntel des ursprünglichen z-Wertes für die Voxelgröße verwendet. Durch diese Visualisierungsart sieht man quasi auf einen Blick die Dynamik, die sich innerhalb der 28 s des ersten Videos bzw. der 30 s des zweiten Videos in den Zellen abspielt. Unveränderte Strukturen über die Zeit erscheinen als längliche Gebilde, flache Strukturen sind die beweglichen Anteile. Es ist ersichtlich, dass in Video A mehr statische Strukturen zu finden sind als in Video B, was sich eventuell dadurch erklären lässt, dass Video B bei 90°C aufgenommen wurde, Video A hingegen bei Raumtemperatur. Zudem zeigen beide Beispiele, dass der vermeintlich leere Platz innerhalb der Zellen beinahe vollständig mittels dynamischer Strukturen überbrückt wird.

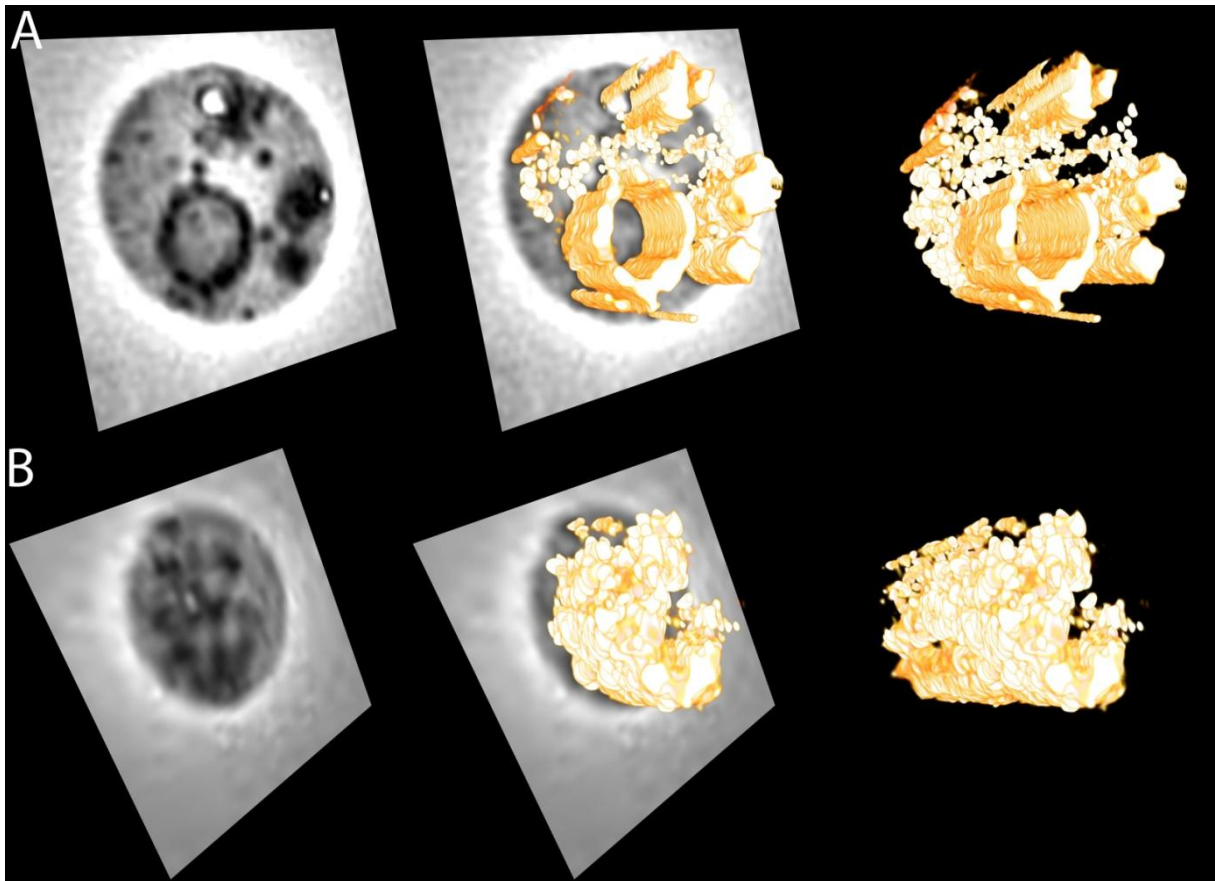


Abbildung 28 "Dynamik im IMC auf einen Blick"; Pseudo-3D-Modelle in 'Voltex'-Darstellung der Videos A und B

#### 2.4 Intrazelluläre Matrix

Im IMC können Filament-Strukturen gefunden werden, die die einzelnen Vesikel und Cytoplasma-Ausläufer verbinden. Zudem zeigen sich Verbindungen zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran, d.h. das Cytoplasma, deren Ausläufer und Vesikel schwimmen nicht frei im IMC, sondern sind sozusagen in eine Art Matrix eingebettet. In Anbetracht der dynamischen Verhältnisse des endogenen Membransystems ist davon auszugehen, dass diese Filamente am dynamischen Prozess beteiligt sind und somit funktionell ein Cytoskelett darstellen. In Ultradünnschnitten sind diese zwar fast immer sichtbar, oftmals erscheinen diese Filamente aber eher unscheinbar und wurden deshalb bisher nur ansatzweise beschrieben (Heimerl, 2009). In Abbildung 29 A, einem 50 nm-Schnitt, sind die angesprochenen Strukturen deutlich zu erkennen. Zur weiteren Verdeutlichung sind die Strukturen in 29 B, dem selben Ultradünnschnitt, zusätzlich farbig markiert.

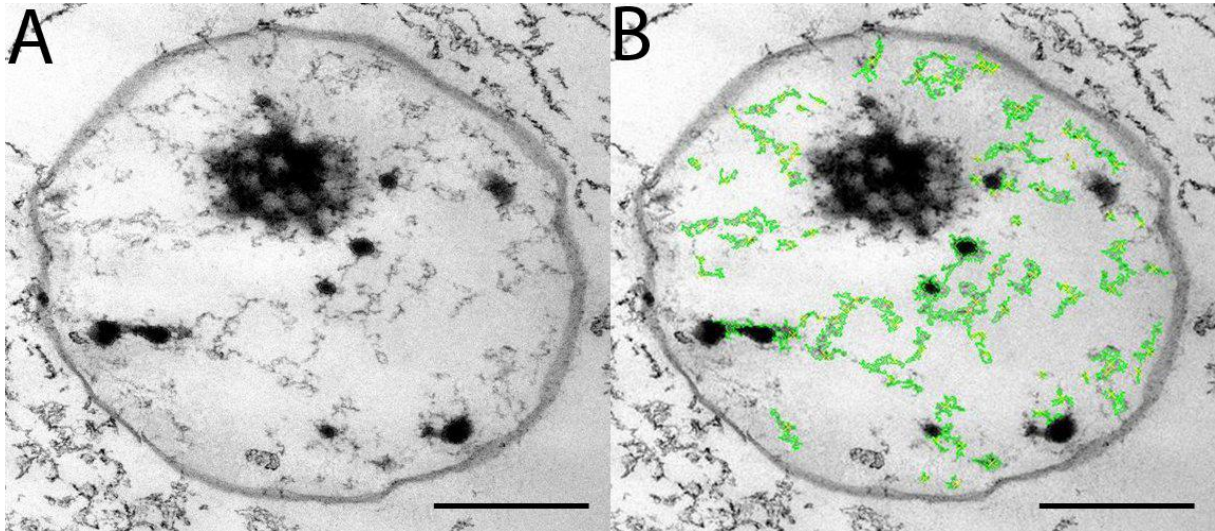


Abbildung 29 Filament-Strukturen im IMC im 50 nm-Ultradünnschnitt; farbig markiert in (B); Balken 0.5 µm

Sowohl für eine Zelle aus den FIB/SEM-Analysen als auch für eine Zelle der Elektronentomographiedaten wurde versucht, diese Strukturen über die ganze Zelle zu verfolgen.

Analog zu Abbildung 29 zeigen die Abbildungen 30 A und B wie die Filament-Strukturen sich in den FIB/SEM-Daten zeigen bzw. welche Strukturen markiert wurden. Als Beispiel dient eine Schicht aus dem verwendeten FIB/SEM-Datenstapel (=Zelle 2 aus Abbildung 20). Zwar sind in den FIB/SEM-Daten entsprechende Strukturen stark kontrastiert, aber aufgrund ihres Durchmessers (3-6 nm) wird nur ein Bruchteil der vorhandenen Strukturen aufgelöst bzw. interpretierbar (Voxelgröße 5x5x5 nm). Trotz der hierfür unzureichenden Auflösung zeigt das zugehörige 3D-Modell ein Ausmaß dieser Filamente, welches anhand einzelner Ultradünnschnitte bisher nur vermutet werden konnte. Ebenso deutet sich ein Netzwerk dieser Strukturen an (Abbildung 30 C).

Ein noch massiveres Ausmaß bzw. ein noch deutlicherer Netzwerkcharakter zeigt sich in den Elektronentomographie-Daten. Abbildungen 31 A und B zeigen wieder, wie sich die entsprechenden Strukturen mit der verwendeten Technik darstellen lassen bzw. welche Strukturen markiert wurden. Abbildungen 31 C und D zeigen das resultierende 3D-Modell aus der gleichen Perspektive mit bzw. ohne Filamente. Bei eingeblendeten Filamenten "verschwindet" ein Großteil des Cytoplasmas und seiner Ausläufer hinter dem massiven Netzwerk. Abbildungen 31 E und F zeigen einen Querschnitt durch das 3D-Modell, wobei in E noch ein Originalschnitt aus dem Tomogramm eingeblendet wird. Auf diese Weise ist nicht die komplette "Tiefe" des Modells sichtbar, und so lassen sich einzelne Verbindungen zwischen Cytoplasmaausläufern untereinander bzw. mit der Cytoplasmamembran oder der äußeren Membran besser visualisieren und verfolgen.

Nachdem der Datensatz B2 bereits in Abbildung 15 den 'Workflow' anhand der Einzel-Tomogramme zeigt bzw. in Abbildungen 24, 25 und 31 Teile des 3D-Modells zu sehen sind, soll mit Abbildung 32 letztlich noch einmal das komplette Modell dieser Zelle gezeigt werden. Es besteht aus neun Einzeltomogrammen mit 1278 Schichten, bei einer Pixelgröße von 1.06 nm.

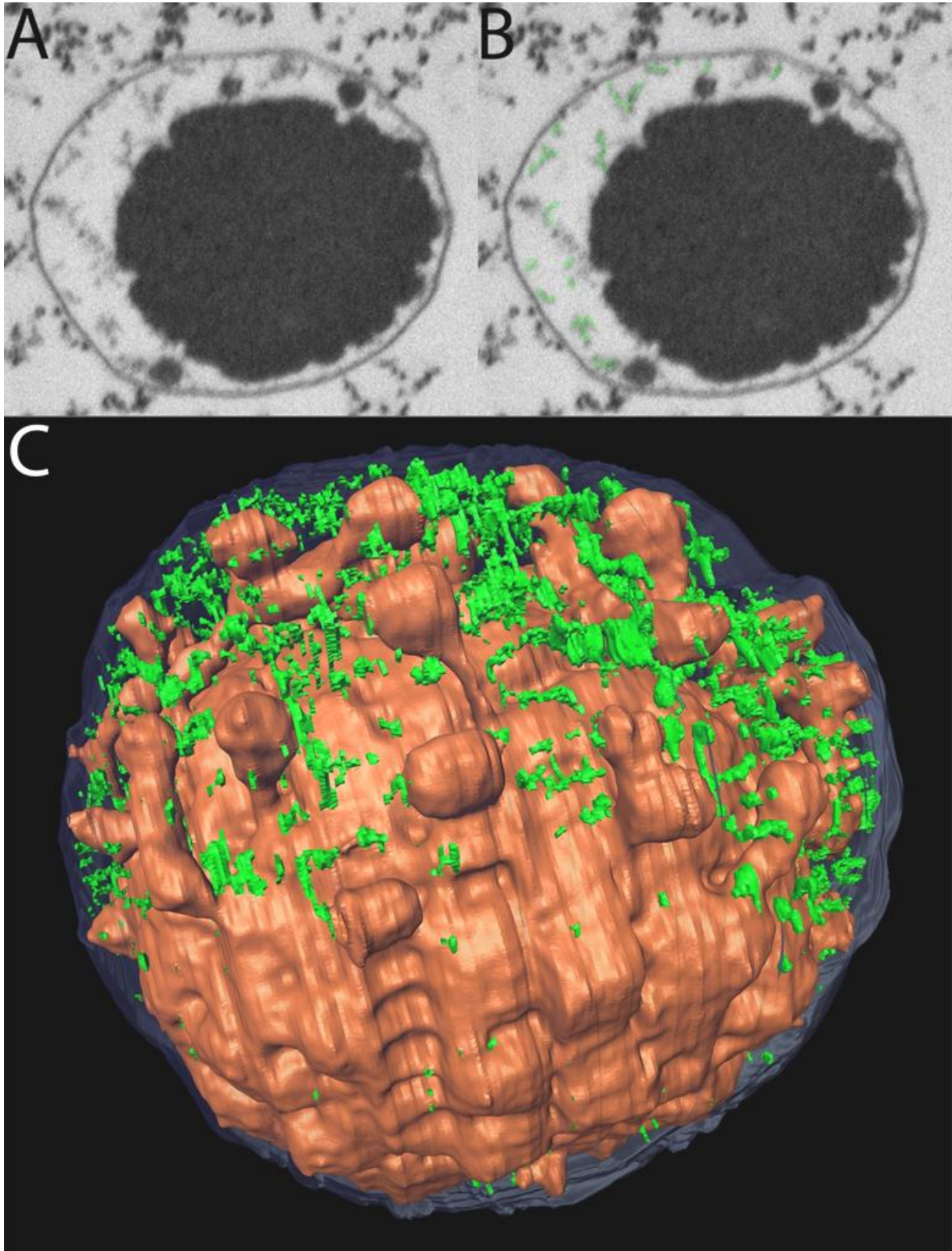


Abbildung 30 Erscheinungsbild der IMC-Filamente in den FIB/SEM-Daten in (A) und markiert in (B); (C) entsprechendes 3D-Modell (aus dem 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz)

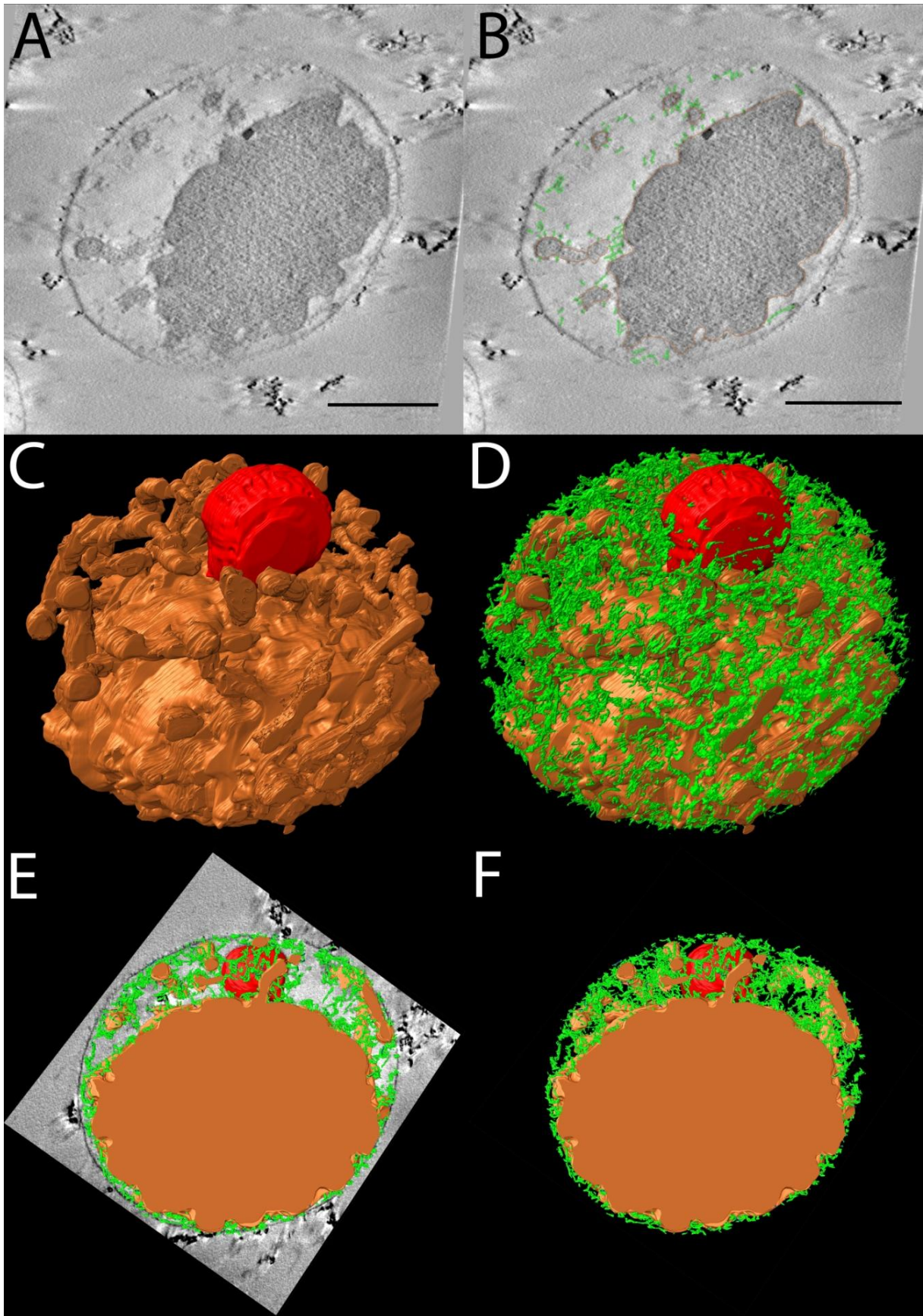


Abbildung 31 Erscheinungsbild der IMC-Filamente in den Elektronentomographie-Daten in (A) und markiert in (B); Balken jeweils 0,5 µm; entsprechende 3D-Modelle ohne Filamente (C), mit Filamenten (D); (E) Querschnitt durch das Modell mit eingeblendetem Originalschnitt und (F) ohne

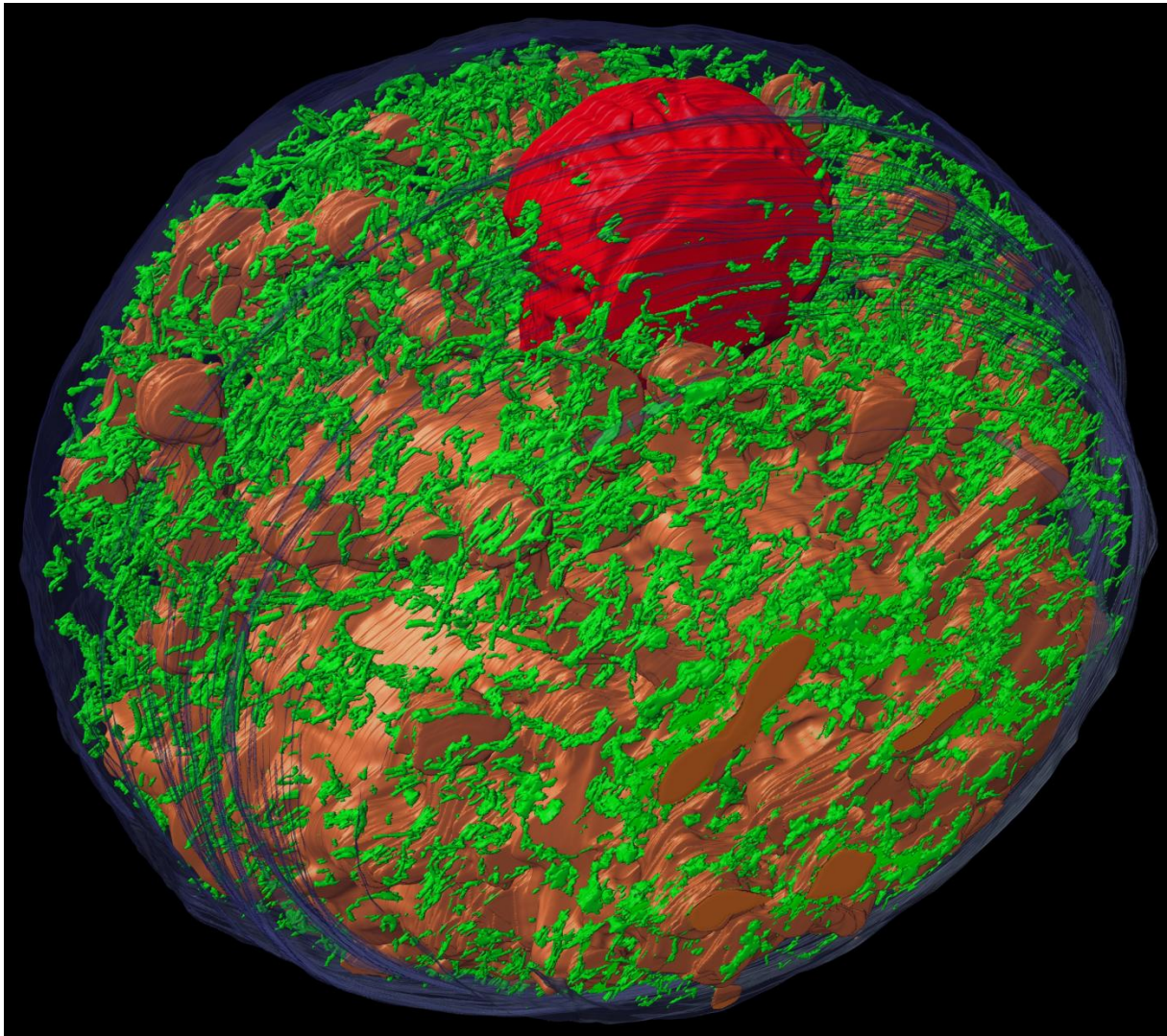


Abbildung 32 Manuell segmentiertes Gesamt-3D-Modell des Elektronentomographie-Datensatzes B2 (1278 Einzelbilder)

Für die Elektronentomographie zeigte sich, dass die Sichtbarkeit der Filamente in den Tomogrammen mit höherer Auflösung (0.531 nm) nochmals verbessert werden konnte. Daher wurden zusätzlich zwei Ausschnitte aus diesen weiteren Tomogrammen segmentiert. Aufgrund der besseren Kontrastverhältnisse in diesen Tomogrammen konnte für die Segmentierung dieser Ausschnitte das 'magic wand'-Werkzeug verwendet werden. Für das 3D-Modell aus Abbildung 32 war dies nur begrenzt einsetzbar und es wurde daher fast ausschließlich manuell segmentiert.

Beide Beispiele (Abbildung 33 und 34) zeigen noch einmal neben je einem kompletten Schnitt aus den jeweiligen Tomogrammen, den Ausschnitt sowie das 3D-Modell mit und ohne eingblendeten Original-Ausschnitt. Beide Modelle unterstreichen noch einmal den netzwerkartigen Charakter der Filamente und zeigen deren Relation zu Cytoplasmaausläufern, Cytoplasmamembran und äußerer Membran.



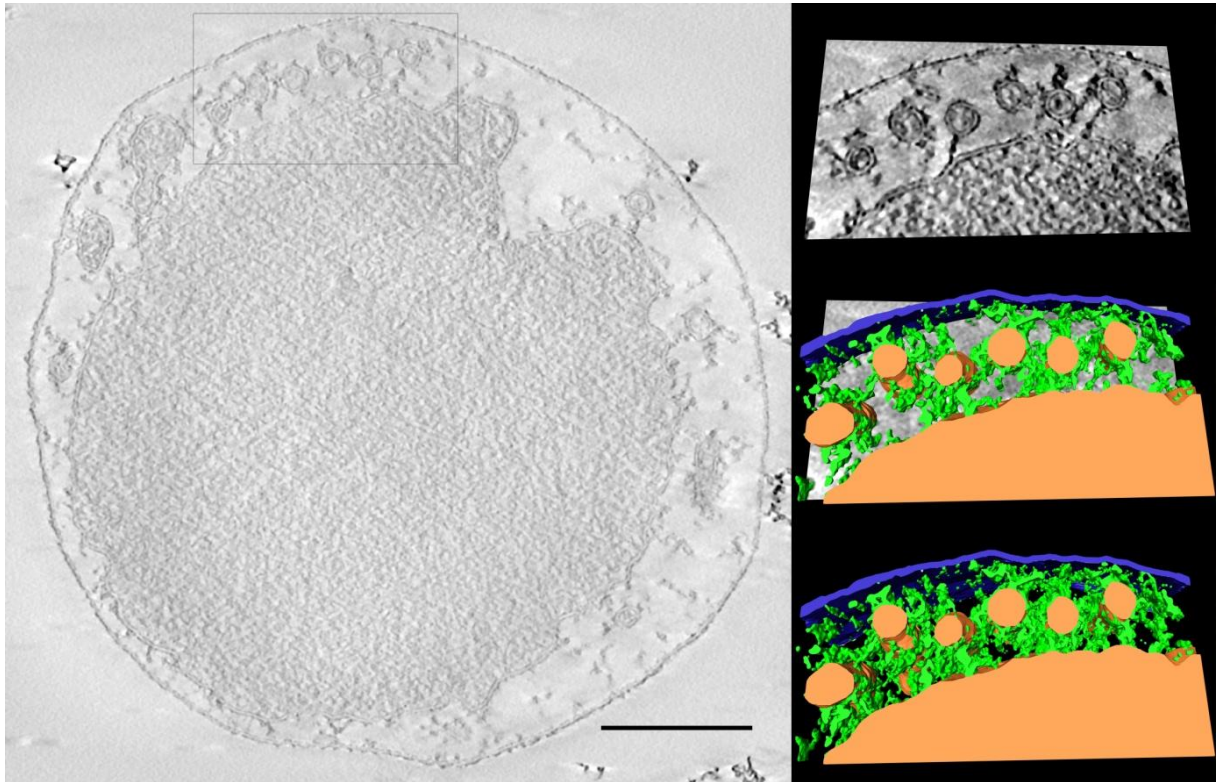


Abbildung 33 Filamente im IMC (siehe Text); Datensatz RF\_5; Balken 300 nm

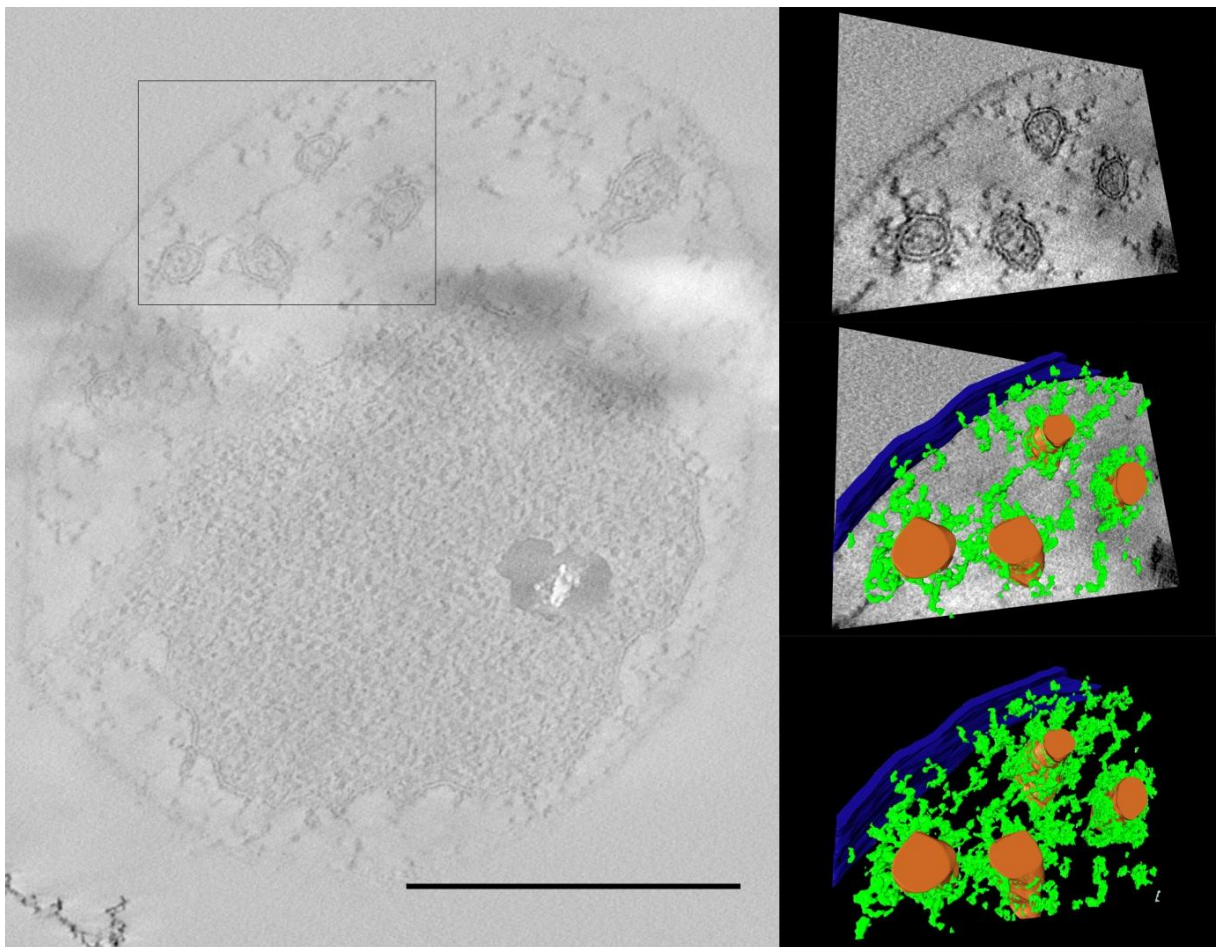


Abbildung 34 Filamente im IMC (siehe Text); Datensatz RF\_1; Balken 500 nm

Neben den 3D-Ansätzen wurde versucht, diese Filamente mit Hilfe einer 'On-Grid'-Lyse zu präparieren und zu visualisieren. Die 'On-Grid'-Lyse ist ein Verfahren, das für eukaryotische Zellen herangezogen werden kann, um das Cytoskelett zu präparieren/visualisieren. Im vorliegenden Beispiel (Abbildung 35) konnten an 200-300 nm großen vesikulären Strukturen Filamente mit einem Durchmesser von ca. 10 nm gefunden werden, was über dem Durchmesser in den Tomogrammen liegt (3-6 nm). Auch ob es sich bei den Vesikeln tatsächlich um solche handelt, ist nicht zu klären. Zwar besteht eine gewisse Ähnlichkeit zu den traubenartigen Gebilden aus Abbildung 23, denkbar ist aber auch ein Zerfall der Cytoplasmen in Vesikel aufgrund des vorhandenen Detergens zur Lyse (Triton X-100; 1%). Für Vesikel sind die Strukturen hinsichtlich ihres Durchmessers an der Obergrenze und wie erwähnt sind auch die Filamente dicker als in den Tomogrammen. Es müsste sich daher um eine sehr große Zelle handeln, was wiederum auch für *I. hospitalis* (bis zu 6  $\mu\text{m}$ ) bereits beschrieben wurde und daher nicht auszuschließen ist. Darüber hinaus scheinen die Filamente umeinander gewunden zu sein (Detail oben rechts) und Netze auszubilden (Detail unten rechts), was auch in den Tomogrammen vorzufinden ist. Mit letzter Gewissheit lässt sich aber freilich nicht sagen, ob es sich tatsächlich um die gleichen Strukturen handelt.

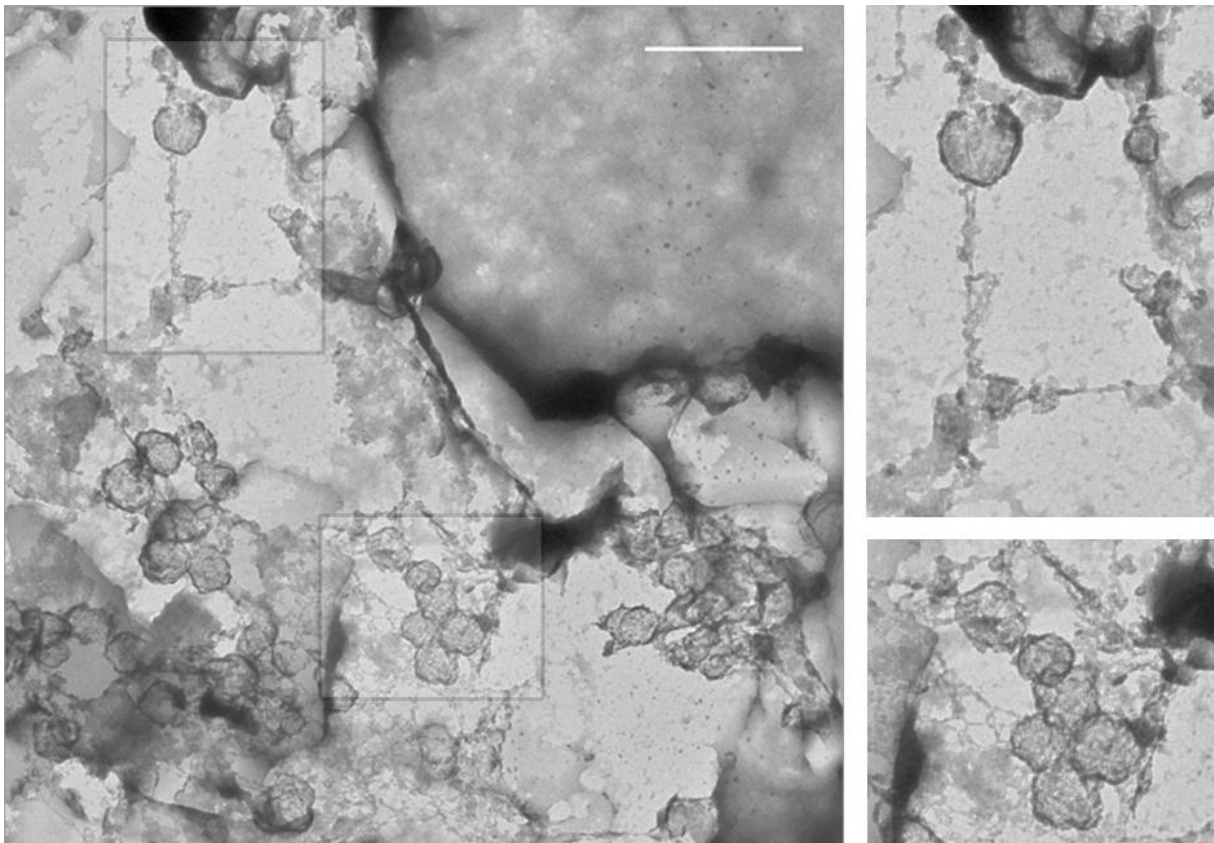


Abbildung 35 Potentielle Vesikel und filamentartige Strukturen von *Ignicoccus hospitalis* nach 'On-Grid'-Lyse; Balken 1  $\mu\text{m}$

### 2.5 Kontaktstellen der Ausläufer/Vesikel untereinander und mit der Cytoplasmamembran

Zahlreiche Beispiele können gefunden werden, an denen zwei Strukturen nur über sehr kleine Kontaktflächen interagieren. Abbildung 36 zeigt drei Vesikel/Röhrenverdickungen, die nur über den gezeigten Kontakt mit der Cytoplasmamembran in Verbindung stehen. Eine Verbindung zu weiteren Strukturen besteht nicht (zumindest nicht über Membranen; siehe hierzu auch 2.4). In Abbildung

36 D (3D-Modell zu A) ist diese kleine Kontaktfläche rot dargestellt. Abbildung 36 E zeigt das Modell mit eingeblendeten Filamenten (siehe 2.4), die augenscheinlich am Fusions- bzw. Abschnürungsprozess beteiligt sind.

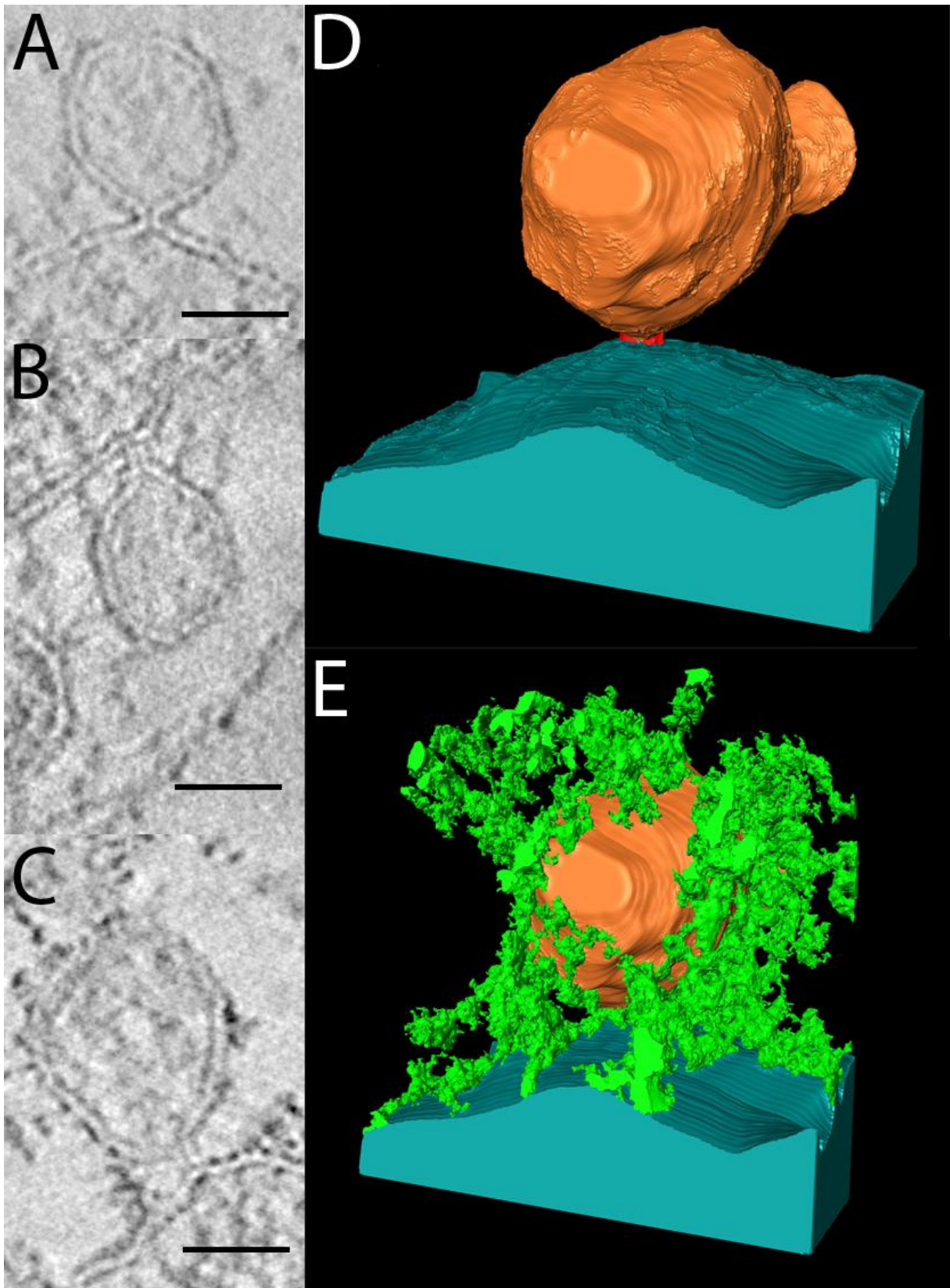


Abbildung 36 Vesikel/Röhrenverdickungen-Kontakt zur Cytoplasmamembran; Ausschnitte aus den Tomogrammen RJ\_3 (A, B) und RJ\_5 (C); (D) 3D-Modell zu A; (E) 3D-Modell zu A mit eingeblendeten Filamenten; Balken jeweils 50 nm

Weiterhin fällt auf, dass Kontakte einerseits von Vesikeln/Röhrenverdickungen auszugehen scheinen, andererseits von der Cytoplasmamembran. Die Beispiele in Abbildung 36 B und C zeigen, dass die Cytoplasmamembran nicht unterbrochen ist, sich aber die "Vesikel"-Membran in Richtung Cytoplasmamembran "zuspitzt". Umgekehrt zeigt Abbildung 37 A, dass sich hier die Cytoplasmamembran in Richtung der "Vesikel"-Membran vorwölbt. Diese zwei Arten des Kontakts können auch an einigen Ultradünnschnitten nachvollzogen werden (siehe hierzu Abbildung 11 aus Heimerl, 2009), lassen sich aber nicht in allen Fällen erkennen. Daneben lassen sich auch kleinflächige Kontakte von endständigen Strukturen der Röhren selbst bzw. untereinander erkennen (Abbildung 37 B und C) und eventuell zusätzlich mit der Cytoplasmamembran (Abbildung 37 D).

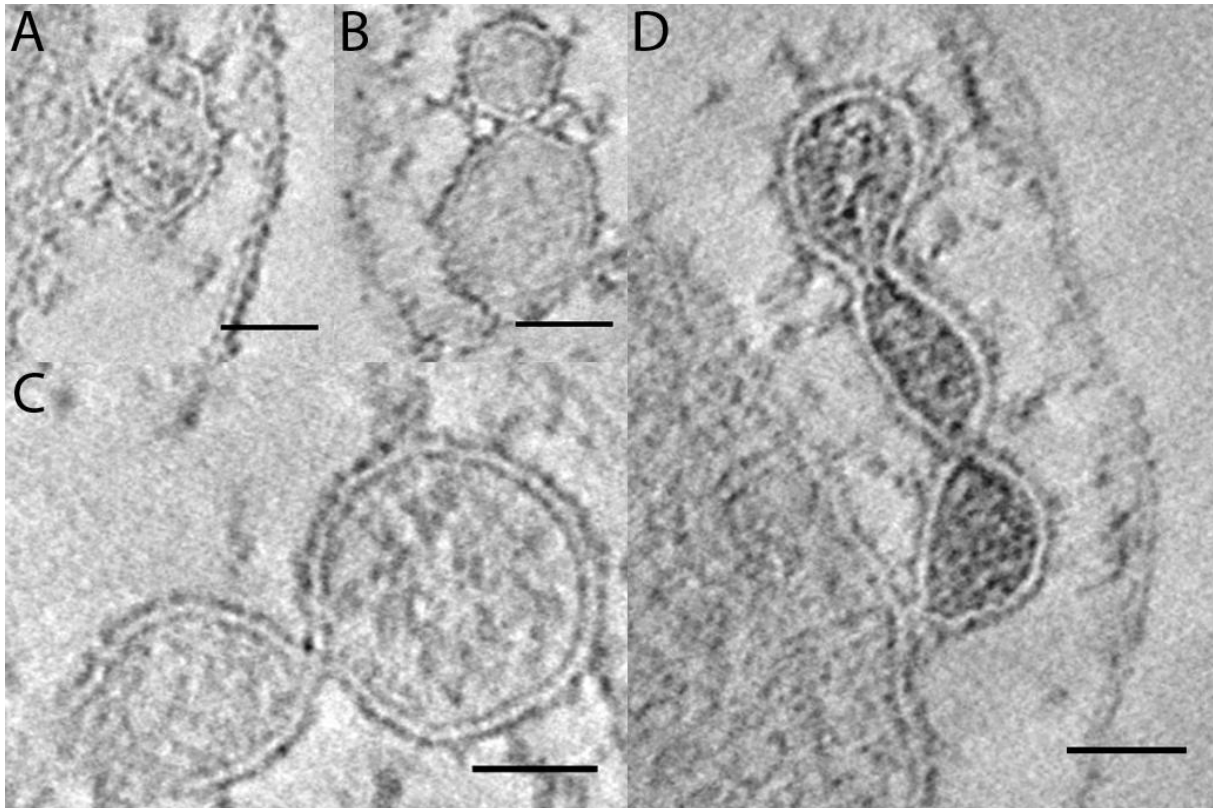


Abbildung 37 Beispiele für potentielle Abschnürungs- und Fusionsstellen des endogenen Membransystems in *Ignicoccus hospitalis*; Details aus Schichten der Datensätze RJ\_2 (B, D), RJ\_5 (A) und RJ\_6 (C); Balken je 50 nm

## 2.6 Kontakte des endogenen Membransystems zur äußeren Membran

Neben Verbindungen von Strukturen des endogenen Membransystems untereinander können auch "Andockstellen" an die äußere Membran gefunden werden. In Ultradünnschnitten (Abbildung 38) zeigen sich diese Strukturen als stark kontrastiert, 50-100 nm lang und wenige Nanometer dick. Sie verlaufen parallel zur äußeren Membran in einem Abstand von 10-20 nm. Überall dort, wo sie zu finden sind, sind in 10-30 nm Abstand Strukturen des endogenen Membransystems zu finden. Dabei ist ferner zu sehen, dass weitere (weniger stark kontrastierte) Strukturen senkrecht zwischen Andockstelle und Zielmembran verlaufen und die beiden Strukturen verbinden. In einigen Fällen kann an der Ansatzstelle eine Unterbrechung der Membran beobachtet werden.

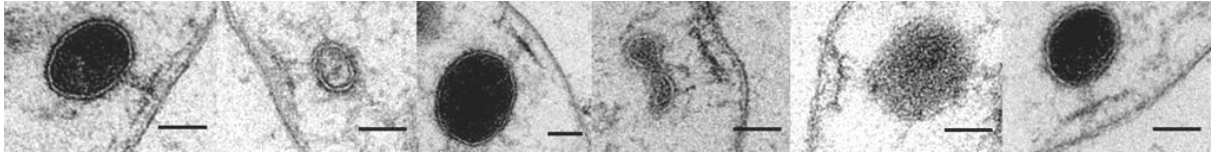


Abbildung 38 Kontakte des endogenen Membransystems zur äußeren Membran; aus Heimerl, 2009 (neu arrangiert); Balken jeweils 50 nm

Derartig beschriebene Strukturen konnten ebenfalls in den Tomogrammen gefunden werden und wurden in 3D visualisiert und analysiert (Abbildung 39): Für drei Beispiele (1, 2 und 3) wurden die entsprechenden Stellen aus den Gesamtvolumina herausgeschnitten. (1) und (2) zeigen Stellen, wie oben beschrieben zwischen Ausläufern des Cytoplasmas und der äußeren Membran. Mit Beispiel (3) konnte erstmals eine derartige Verbindung auch zwischen der Cytoplasmamembran selbst und der äußeren Membran gefunden werden. In jedem Fall unterstreicht die Darstellung dieser drei Subvolumina in 3D einmal mehr den Mehrwert der räumlichen Darstellung gegenüber 2D-Projektionen. Die verschiedenen Darstellungsweisen in Abbildung 39: Zunächst ist je eine Schicht aus den jeweiligen Tomogrammen gezeigt (A). Bereits hier wird ersichtlich, dass die oben beschriebenen Strukturen "durchbrochen" sind, was in 2D-Projektionen über 50 nm nicht ersichtlich ist. Die "durchbrechenden" Strukturen reichen dabei bis zur äußeren Membran. Diese wiederum scheint nicht "durchbrochen" zu sein. Durch Manipulation der Schnittachse ('ObliqueSlice' in AMIRA) konnte ein Querschnitt durch (bzw. sozusagen eine Aufsicht auf) die entsprechende Struktur realisiert werden (B). Dabei zeigte sich, dass es sich um ringförmige, porenartige Strukturen handelt. Aus dieser Ansicht konnten Innendurchmesser von 15-20 nm und Gesamtdurchmesser von 40-50 nm für die Ringe ermittelt werden. Die Ringstrukturen zeigten sich auch bereits in der automatischen 'Vortex'-Darstellung (bei entsprechender Kontrastanpassung) (C). Daneben wurden die Poren auch manuell segmentiert (D-F). In diesen Darstellungen sind Strukturen, die parallel zur äußeren Membran verlaufen, blau dargestellt, senkrecht dazu verlaufende Strukturen gelb. In erster Linie geschah dies zur besseren Visualisierung, tatsächlich lassen sich die Strukturen nicht klar abgrenzen. Neben einer Aufsicht auf die Poren (D) wurde eine kombinierte Darstellung aus Modell und Vortex gewählt (E) sowie die Darstellung einer kompletten Segmentierung (F). Es ist ersichtlich, dass von den Ringen selbst weitere Verästelungen ausgehen. Diese scheinen als Verankerung in der äußeren Membran zu dienen; die einzelnen Komplexe sind in der Seitenansicht leicht konvex. Ebenso scheinen sie Ansatzpunkt für weitere Strukturen zu sein, die von den Zielmembranen ausgehen. Diese sind in Grün dargestellt. Zur Ermittlung der Anzahl der Strukturen pro Zelle wurden die drei Tomogramme von ganzen Zellen (basierend auf den Kippserien) herangezogen. Es lässt sich feststellen, dass die Anzahl sehr unterschiedlich ist. So können in 'RJ\_1' 13, in 'RJ\_4' 5 und in Zelle 'B2' gar keine entsprechenden Strukturen detektiert/interpretiert werden.

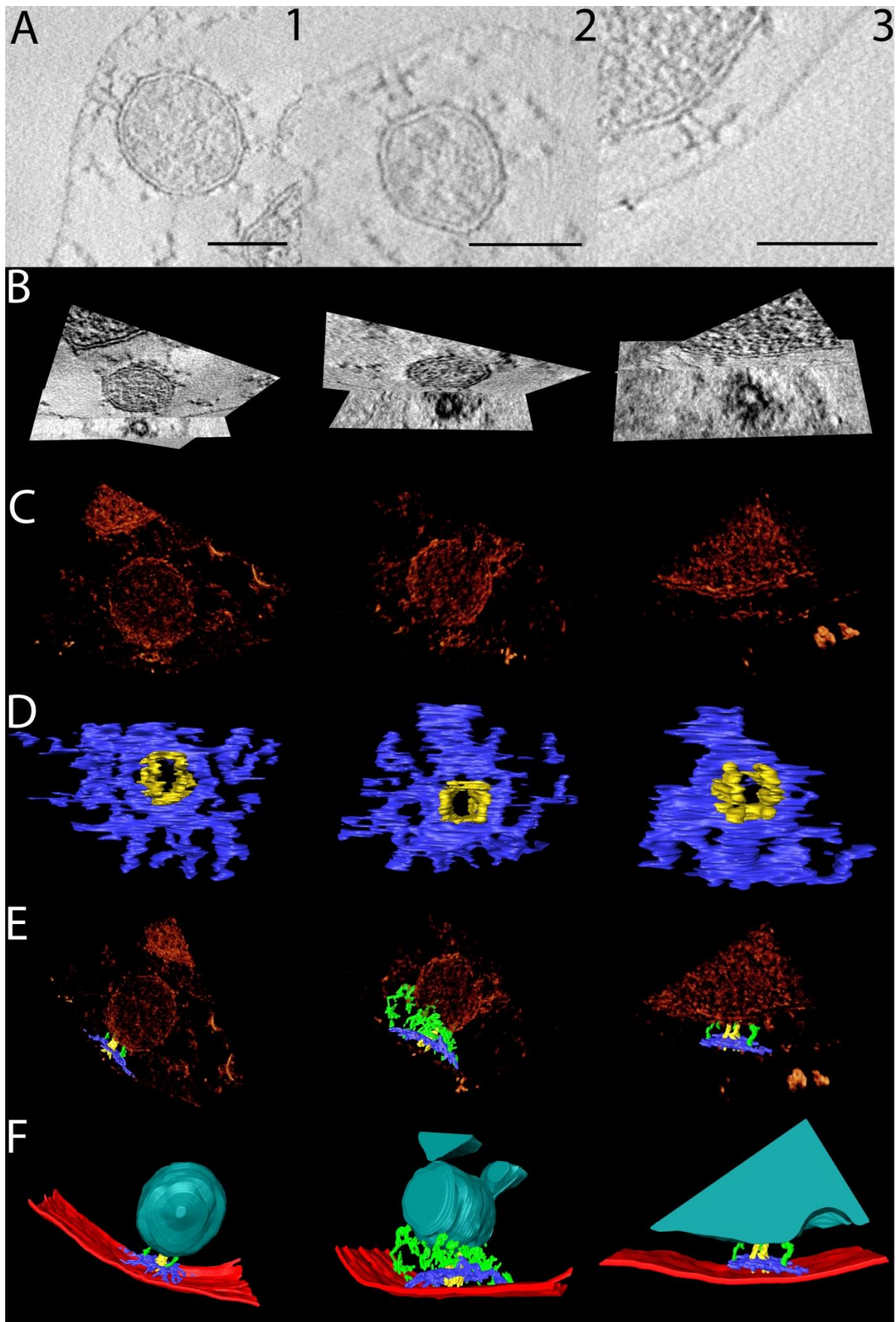


Abbildung 39 Kontakt zwischen innerer und äußerer Membran über ringförmige Komplexe; (A) 0.5 nm-Schichten aus Tomogrammen, (B) 'ObliqueSlice', (C) 'Voltex', (D) manuelle Segmentierung, Detail; (E) kombiniert mit 'Voltex' Darstellung; (F) manuell segmentiertes Modell; Details im Text

### 2.7 Potentieller Phosphatspeicher und weitere Strukturen im Cytoplasma

Bereits in Heimerl, 2009, wurden elektronendichte Strukturen im Cytoplasma beschrieben. Diese Strukturen besitzen einen Durchmesser von ca. 80-250 nm und befinden sich immer in geringem Abstand zur Cytoplasmamembran. Hierzu gibt z.B. die unter 1.1 gezeigte Übersicht der gefilterten Zellen Aufschluss. Zuweilen finden sich auch mehrere solcher Strukturen in einer Zelle.

Um weitere Erkenntnisse über diese Strukturen zu gewinnen, wurde zunächst zur Veranschaulichung das 3D-Modell der Zelle (basierend auf dem Tomogramm des 200 nm-Schnittes aus Heimerl, 2009; hier RF\_1) um die entsprechende Struktur ergänzt. Weiterhin wurde diese Zelle im TEM einer EDX-Analyse unterzogen. Hierbei zeigten sich im Gesamtspektrum der zu untersuchenden Struktur vor allem auffällige 'Peaks' bei den K-Linien von Nickel und Uran. Erstes ist auf die Verwendung von Nickelgrids zurückzuführen, zweites auf die Verwendung von Uranylacetat als Kontrastmittel, welches mit hoher Affinität an Phosphat-Gruppen bindet.

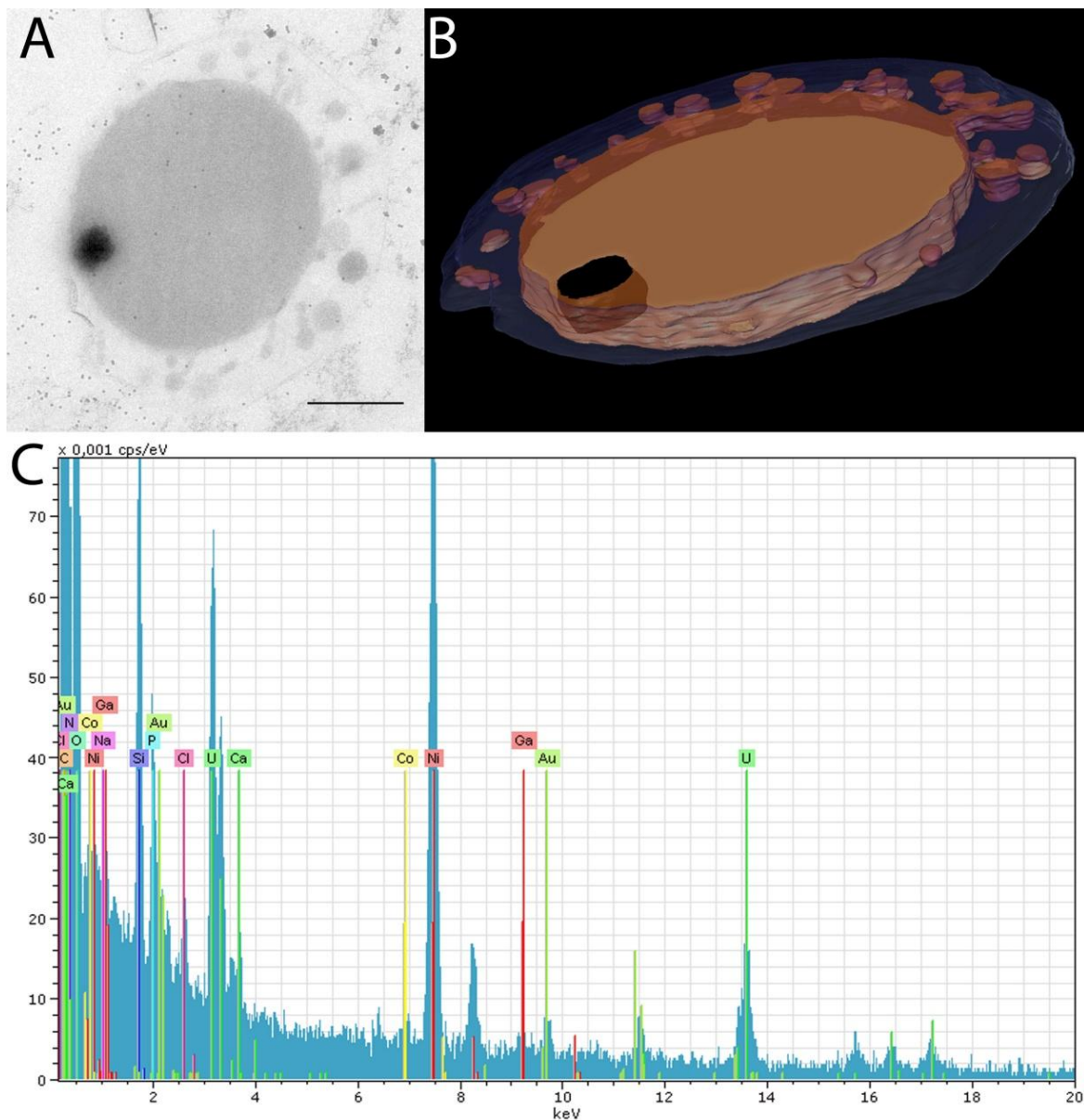


Abbildung 40 (A) Schicht aus einem Tomogramm eines 200 nm-Schnittes; Datensatz RF\_1; Balken 0,5  $\mu\text{m}$  (B) 3D-Modell zu A (aus Heimerl, 2009, ergänzt um eine schwarz gezeichnete, kontrastierte Struktur im Cytoplasma); (C) Gesamtspektrum der Struktur mittels TEM-EDX-Analyse

In der Tat wurde mit einem sogenannten 'Linescan' (Analyse entlang einer Linie) über die Struktur ein erhöhter Phosphor-Gehalt gemessen. Das Silicium in der Analyse diente sozusagen als Kontrolle, da es *de facto* bei den Analysen immer vorhanden ist und ein gleichmäßiges Hintergrundsignal abgibt. Zudem zeigte sich am Rand der Struktur ein Schwefel-'Peak'. Dieses Vorkommen von Schwefel wurde durch eine 'Mapping'-Analyse (Analyse einer/s Fläche/Volumens hinsichtlich ausgewählter Elemente) bestätigt und darüber hinaus Eisen im selben Areal wie Schwefel detektiert, während Phosphor über die ganze Fläche der Struktur zu finden war.

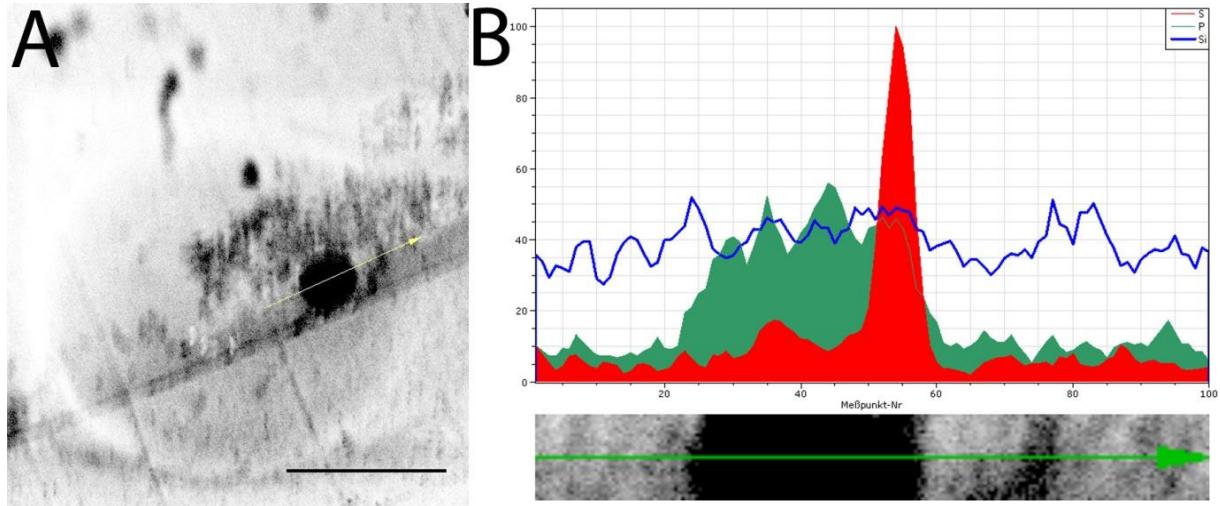


Abbildung 41 EDX/TEM 'Linescan' über die kontrastierte Struktur; Balken 0.5  $\mu\text{m}$

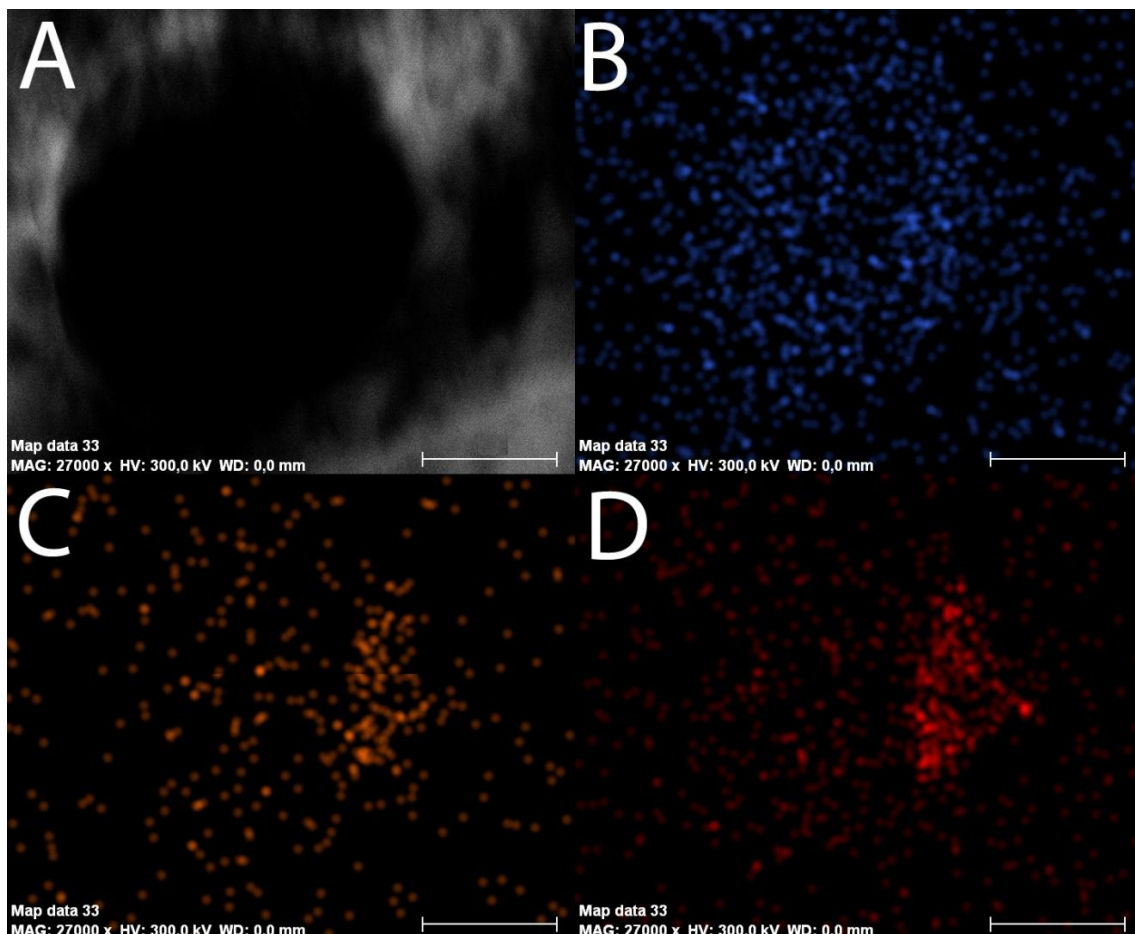


Abbildung 42 EDX/TEM 'Mapping'-Analyse (A) Bright Field; (B) Phosphor; (C) Eisen; (D) Schwefel; Balken 70 nm



Zusätzlich zu diesen Strukturen konnten in den FIB/SEM-Datensätzen zwei weitere cytoplasmatische Strukturen unterschieden werden, die jedoch seltener auftraten. Eine dieser beiden Strukturen ähnelt in Größe und Form den dunkel kontrastierten Strukturen, erscheint aber statt dessen grau in Datensätzen und wurde maximal einmal pro Zelle gefunden. Bei der zweiten Struktur handelt es sich wieder um stark kontrastierte Strukturen. Diese haben jedoch einen geringeren Durchmesser (ca. 25-40 nm) und erscheinen elongiert (ca. 500 nm lang). Im Unterschied zu den beiden anderen Strukturen waren diese eher mittig im Cytoplasma zu finden. Für ein Beispiel konnten zwei dieser Strukturen pro Zelle gefunden werden, ansonsten nur jeweils eine. Wie alle drei Strukturen sich in den FIB/SEM-Daten darstellten zeigt Abbildung 43. Abschließend zeigt Abbildung 44 eine Übersicht aller 3D-Modelle aus dem FIB/SEM-Datensatz, die eine oder mehrere der beschriebenen Strukturen enthielten. Um einen Einblick in das Cytoplasma geben zu können, sind jeweils Querschnitte durch das Cytoplasma gezeigt, wobei das Äußere und das Innere der Membranoberfläche in verschiedenen Farben dargestellt wird. Potentielle Phosphatspeicher sind schwarz, helle Einschlüsse grau dargestellt. Die länger gezogenen, kleineren, stark kontrastierten Strukturen sind gelb gezeichnet. (Eventuelle weitere Farben sind Darstellungsartefakte.)

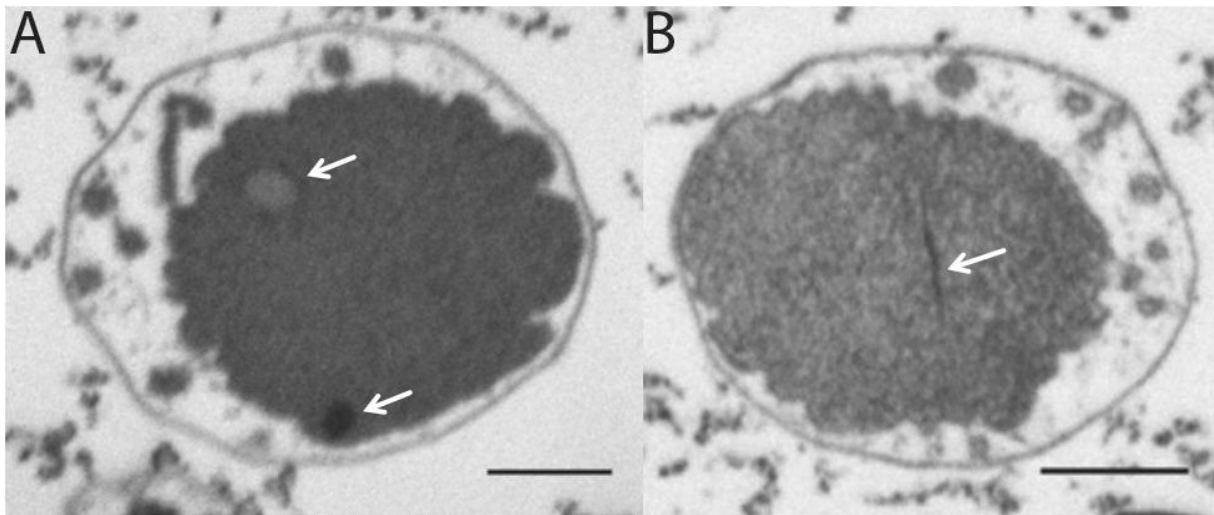


Abbildung 43 5x5x10 nm FIB/SEM-Datensatz; (A) Dunkle und heller kontrastierte Struktur im Cytoplasma; (B) elongierte dunkel kontrastierte Struktur; Balken jeweils 0.5  $\mu\text{m}$

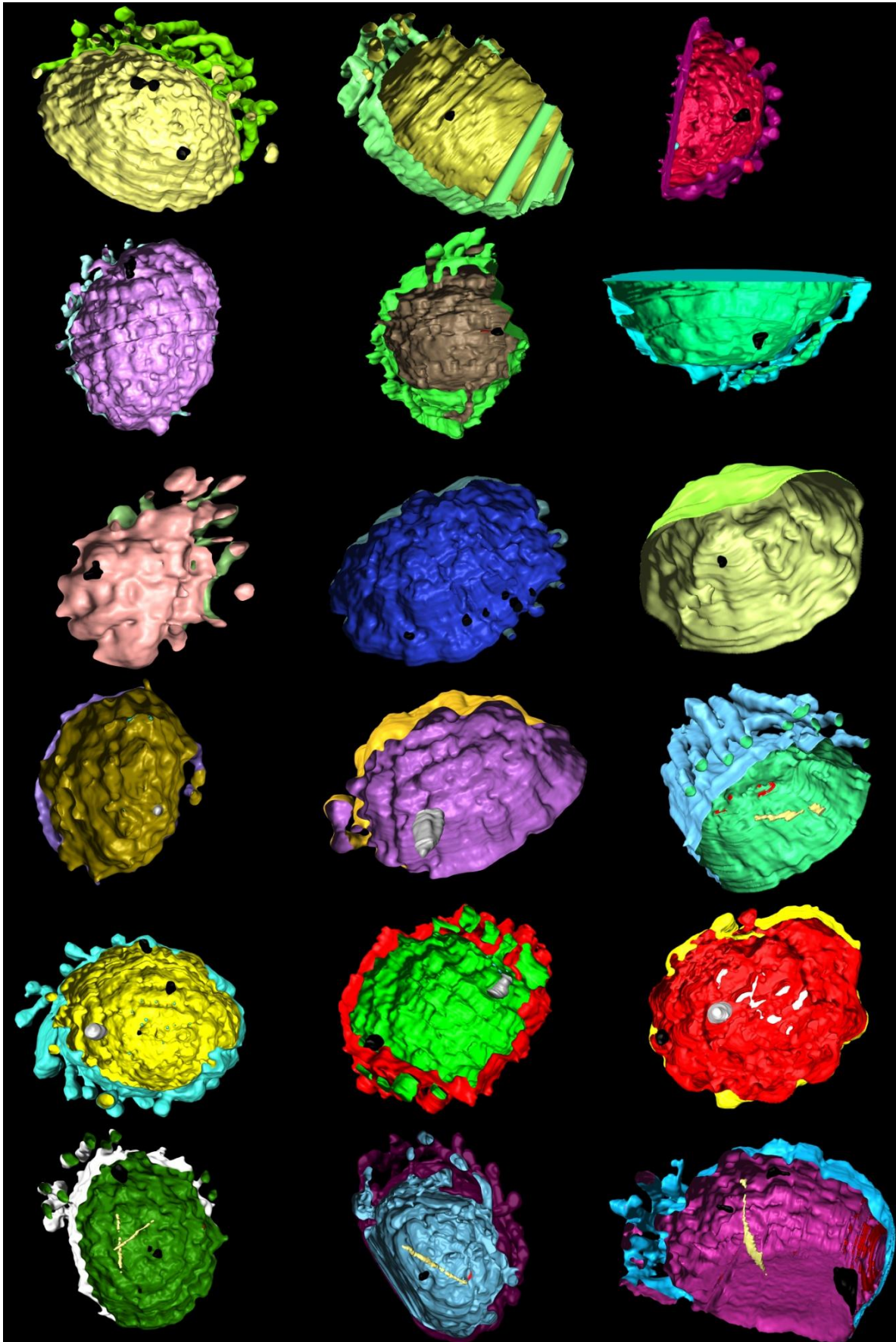


Abbildung 44 Querschnitte durch 3D-Modelle der FIB/SEM-Daten; Ein bis mehrere potentielle Phosphatspeicher pro Zelle (Reihe 1-3); hell kontrastierte Strukturen im Cytoplasma (Reihe 4 links und Mitte); elongierte Struktur (Reihe 4 rechts); dunkle und helle Strukturen in derselben Zelle (Reihe 5); dunkle und elongierte Strukturen in derselben Zelle (Reihe 6)

### 2.8 *Nanoarchaeum equitans* und die Kontaktstelle zu *Ignicoccus hospitalis*

Bisher wurden *Nanoarchaeum*-Zellen in eingebetteten Proben vergleichsweise selten gefunden und noch seltener Kontaktstellen zu *Ignicoccus*. Die in dieser Arbeit erstmalig angewandte Filtermethode zur Anreicherung der Zellen konnte die "Ausbeute" an Kontaktstellen deutlich erhöhen. Zwar wurde in den FIB/SEM-Daten dennoch nur eine Kontaktstelle gefunden, jedoch ist der Bereich, der 'gefibbed' wurde, relativ klein und gezieltes Suchen ist aufgrund der Methode ebenfalls nicht möglich. Abbildung 45 zeigt diese eine *Nanoarchaeum*-Zelle, die in den FIB/SEM-Daten gefunden werden konnte. Diese steht im Kontakt mit einer *Ignicoccus*-Zelle, in einem Bereich, der als Cytoplasma-Pol beschrieben werden kann (siehe Einleitung). Das wellige Erscheinungsbild (in der yz-Seitenansicht, sowie in den 3D-Modellen) ist der Alignierung geschuldet bzw. der Tatsache, dass sich diese Zelle am Rand des Datensatzes befand und somit auch nicht komplett erhalten war. Zudem weist die *Nanoarchaeum*-Zelle einen stärker ausgeprägten Kontrast auf als das Cytoplasma der *Ignicoccus*-Zelle.

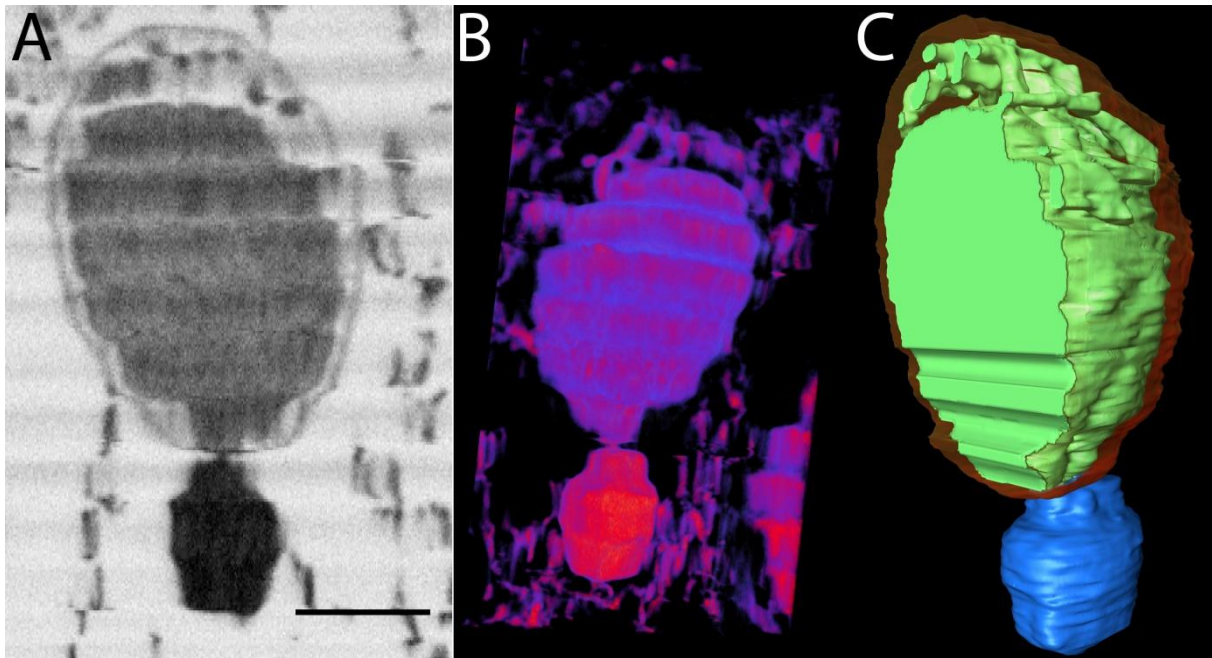


Abbildung 45 Kontaktstelle von *I. hospitalis* und *N. equitans* in den 5x5x10 nm FIB/SEM-Daten (A) Schnitt aus der yz-Ebene des Datensatzes; (B) 3D-Modell in der 'Vortex'-Darstellung; (C) manuell segmentiertes 3D-Modell

Im Vergleich zu Abbildung 45 zeigt Abbildung 46, um wieviel detaillierter sich die Zellen in den Elektronentomographie-Daten darstellten. In Abbildung 46 A ist der Bilayer-Charakter der Cytoplasmamembran von *Nanoarchaeum* deutlich zu erkennen. Ebenfalls deutlich zu erkennen ist der auf die Cytoplasmamembran aufgelagerte S-Layer. Dieser besitzt eine Dicke von etwa 20 nm. In Abbildung 46 B ist eine *Nanoarchaeum*-Zelle im Randbereich "geschnitten", so dass nur Strukturen des S-Layers zu sehen sind. Abbildungen 46 C und D zeigen anhand von 3D-Modellen die strukturelle Beschaffenheit durch eine Außen- bzw. Innenansicht des S-Layers. Trotz des Detailreichtums lässt sich eine beschriebene p6-Symmetrie des S-Layers (Huber *et al.*, 2002) allenfalls stellenweise erahnen. Darüber hinaus zeigt Abbildung 46 E einen kleinen Ausschnitt des 3D-Modells des S-Layers mit geringer Tiefe; zum Vergleich zeigt Abbildung 40 F die hypothetische Molekülstruktur des S-Layer Proteins NEQ300, wie sie mittels PHYRE2 ermittelt wurde. Aufgrund fehlender vergleichbarer Strukturen in der Datenbank fällt die von PHYRE2 ermittelte Zuversicht jedoch sehr gering aus ("0% of residues modelled at > 90%. confidence").

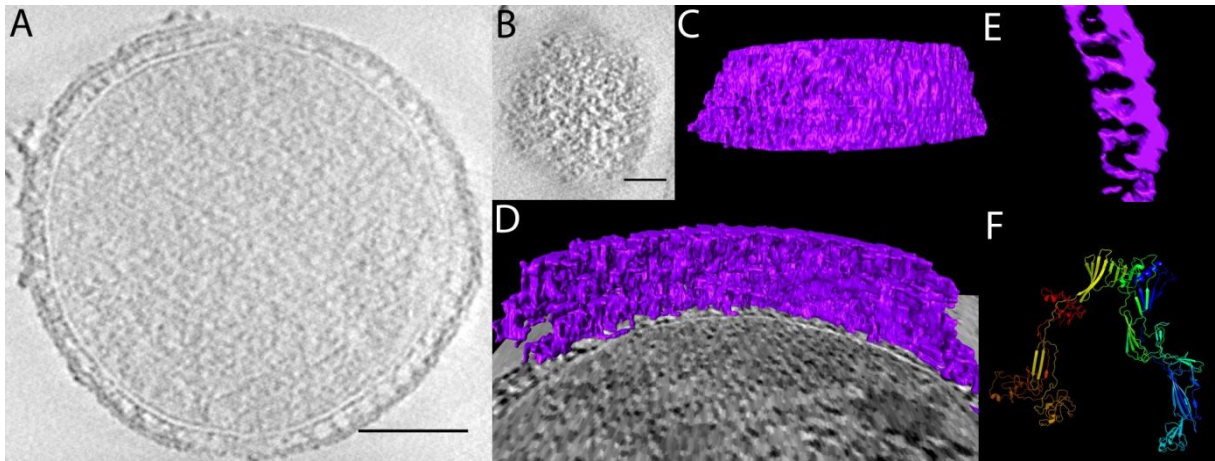


Abbildung 46 *Nanoarchaeum equitans*, Elektronentomographie-Daten; (A) Schicht aus RJ\_3-Tomogramm, Balken 100 nm (B) "Aufsicht" auf den S-Layer; Balken 50 nm; (C)-(E) segmentierter S-Layer; (F) hypothetische Molekülstruktur des S-Layer Proteins NEQ300, ermittelt mit PHYRE2

Aber auch hinsichtlich der Interaktion der beiden Organismen konnten neue Details gefunden werden: Wie im FIB/SEM-Modell liegt die Kontaktstelle im Beispiel aus Abbildung 47 am Cytoplasmapol. Das Cytoplasma von *Ignicoccus hospitalis* bildet dabei einen Ausläufer in Richtung *Nanoarchaeum equitans*. Zu erkennen ist auch, dass dieser Ausläufer (neben zwei anderen Ausläufern) dunkler kontrastiert erscheint als der Rest des Cytoplasmas. Zurückzuführen ist dies auf eine erhöhte Konzentration von Proteinen und/oder phosphatgruppenhaltigen Metaboliten, da das Kontrastmittel Uranylacetat (wie bereits erwähnt) bevorzugt an Carboxy- und Phosphatgruppen bindet. Der S-Layer von *N. equitans* ist an der Kontaktstelle degeneriert oder gar absent. Die *N. equitans* Zelle ist zudem nach innen gewölbt, eine Art Hohlraum bildend und umschließt so den Ausläufer von *I. hospitalis*. Weiterhin sind filamentöse Strukturen (rot gezeichnet in den Modellen) an der Kontaktstelle zu erkennen, deren Zuordnung nicht klar definiert werden kann; vermutlich eine Mischung aus degeneriertem S-Layer und den oben beschriebenen "Cytoskelettelementen", ausgehend von der Cytoplasmamembran von *I. hospitalis*. Ein Kontakt zwischen den Cytoplasmen beider Zellen, der bereits in vorangegangenen Arbeiten anhand von wenigen Ultradünnschnitten vermutet wurde (Wasserburger, 2008; Heimerl, 2009), kann hier deutlich, wie in keinem bisherigen Beispiel, nachvollzogen werden. Eine weitere Verdeutlichung erfährt der Sachverhalt in den 3D-Modellen (D und E). Insbesondere im Querschnitt des Modells wird die nur wenige Nanometer breite Verbindung ersichtlich. Hingegen lässt sich der Verlauf der äußeren Membran an der Kontaktstelle in den Tomogrammen nur bis zu einem bestimmten Punkt verfolgen, im unmittelbaren Fusionsbereich ist sie nicht zu erkennen.

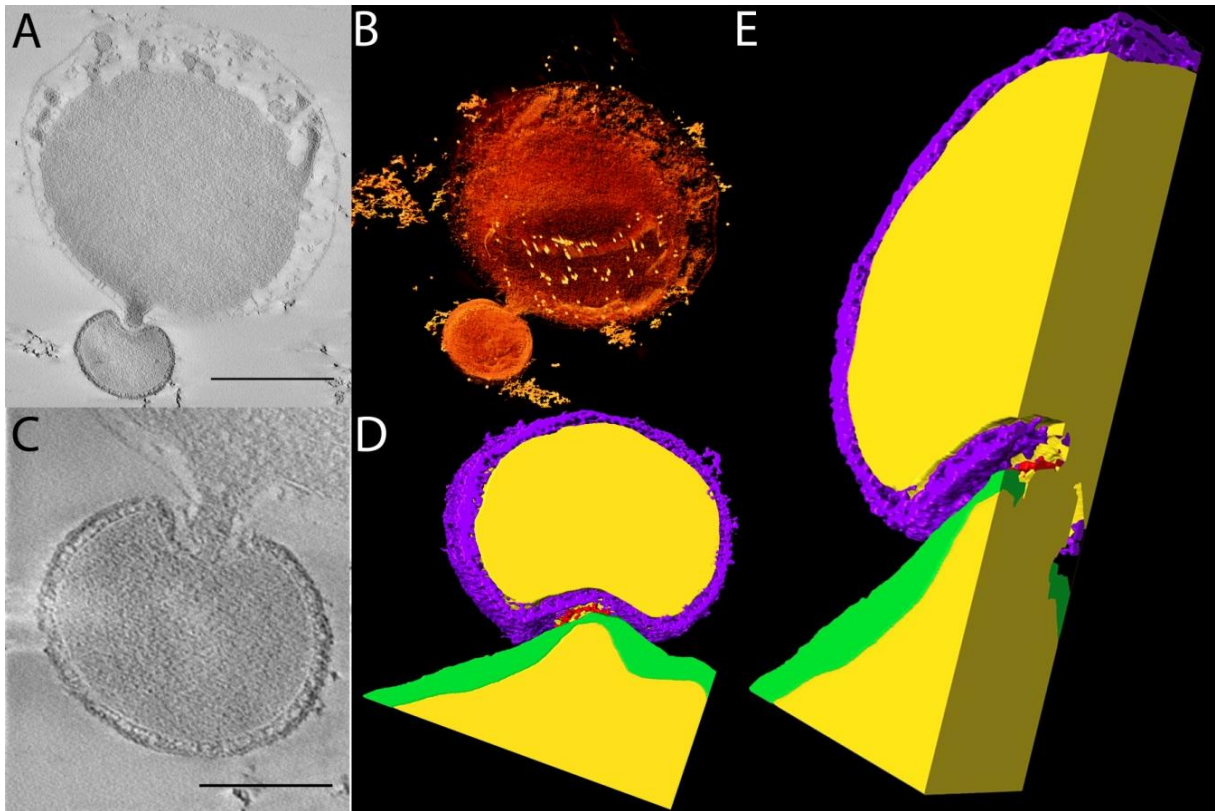


Abbildung 47 Kontaktstellen zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*, Datensatz RJ\_2; (A) Schicht aus Tomogramm, Balken 0.5 µm; (B) 'Voltex'-Darstellung des Datensatzes; (C) Detail aus A, Balken 200 nm; (D) manuell segmentierter Ausschnitt aus dem Datensatz; (E) Längsschnitt durch D

Aufgrund des extrem hohen Zeitaufwandes wurde lediglich das Beispiel aus Abbildung 47 manuell segmentiert. Weitere Kontaktstellen sind anhand von 'Voltex'-Darstellungen in Übersicht 48 aufgeführt. Zusammen mit einzelnen Schichten aus den Tomogrammen zeigen auch diese Daten deutlich Kontakte zwischen den Cytoplasmen beider Zellen. Dabei zeigt sich die Kontaktstelle, wie in den beiden vorangegangenen Beispielen, jeweils am Cytoplasmapol. Eine Ausnahme in der Übersicht stellt C dar. Hier konnte zwar kein Kontakt zwischen *Nanoarchaeum* und *Ignicoccus* gefunden werden, jedoch wurde ein bisher nicht beschriebener Kontakt zwischen zwei *Nanoarchaeum*-Zellen gefunden. An dieser Kontaktausbildung scheint der S-Layer der beiden Zellen entscheidend beteiligt zu sein; er bildet eine Art Brücke. Ebenfalls in C kann eine bisher nicht beschriebene dunkel kontrastierte Struktur im Cytoplasma der *Nanoarchaeum*-Zelle gefunden. Ähnliche dunkle Flecken sind auch in Abbildung 48 A und in B zu sehen, in B sogar direkt an der Kontaktstelle zu *Ignicoccus*. Weiterhin interessant zeigt sich die *Nanoarchaeum*-Zelle in D (rechtes Detailbild). Hier ist deutlich eine Taillierung der *Nanoarchaeum*-Zelle zu erkennen. Hier kann gemutmaßt werden, dass es sich um eine in Teilung befindliche *Nanoarchaeum equitans*-Zelle handelt.

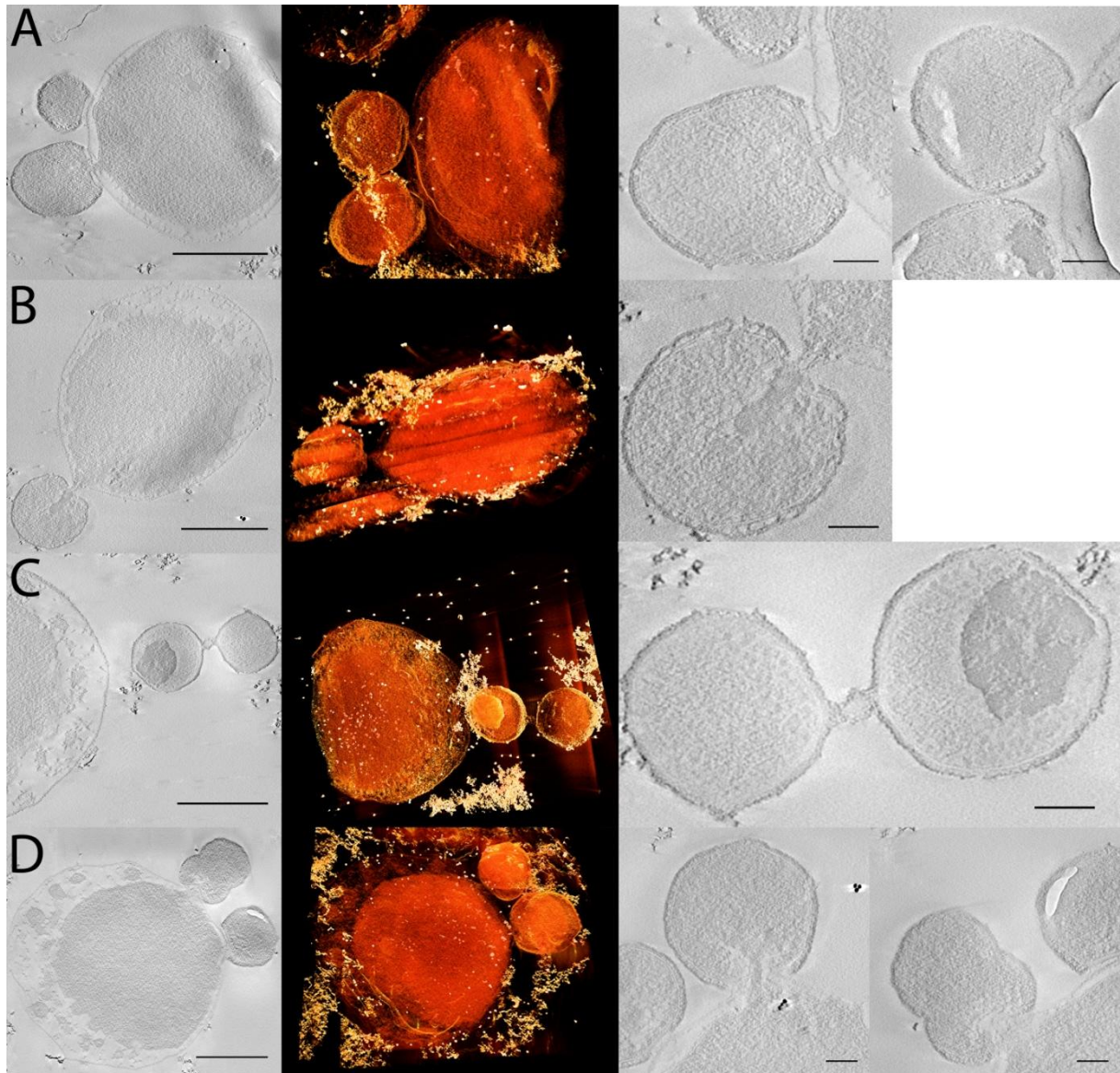


Abbildung 48 Kontaktstellen zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*; jeweils Schichten aus den Tomogrammen, 'Voltex'-Darstellung und Detailausschnitt(e) aus den Datensätzen (A) RJ\_3; (B) RJ\_4; (C) RJ\_5; (D) RJ\_6; Balken jeweils 0,5 µm (in den Übersichten links) bzw. 100 nm (in den Details rechts)

### 3 Proteomanalysen

#### 3.1 Untersuchung des Proteoms in der stationären Phase

Sowohl die Reinkultur von *Ignicoccus hospitalis* als auch die Co-Kultur mit *Nanoarchaeum equitans* wurden mittels 2D-LC-MS/MS analysiert. Zellmassen von beiden Kulturen wurden aus der Anzucht in 300 l Fermentern (250 l Medium, 50 l Gasphase) erhalten. Die relativen Häufigkeiten der detektierten Proteine (gemessen in 're-normalized spectral counts' = RSpC) aus Reinkultur und Co-Kultur wurden miteinander verglichen. Daneben wurden *N. equitans*-Zellen aus der Co-Kultur aufgereinigt und ebenfalls analysiert. Für jeden Ansatz wurden jeweils drei Läufe durchgeführt. Die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe wurden 2011 veröffentlicht (Giannone *et al.*, 2011). Im Folgenden werden die Ergebnisse aus dieser Veröffentlichung zusammengefasst.

### 3.1.1 'Proteome Coverage'

Von 1444 annotierten 'open reading frames' (ORFs) für *Ignicoccus hospitalis* konnten 1058 Proteine detektiert werden. Für *Nanoarchaeum equitans* konnten 476 Proteine der 556 bekannten ORFs werden. Für *Ignicoccus hospitalis* macht dies einen Wert von ca. 73% Proteom-Abdeckung aus, für *Nanoarchaeum* ca. 85%. Von den "fehlenden" Proteinen stellen jeweils Proteine mit Transmembrandomänen (TMDs) den größten Teil dar. Auch kleine Proteine (aufgrund potentiell fehlender Trypsin-Schnittstellen) sind unterrepräsentiert. Zusammengenommen (*Ignicoccus* und *Nanoarchaeum*) wurden 48.2% der vorhergesagten Membranproteine bzw. 82.5% der annotierten löslichen Proteine detektiert. Die Anzahl an Genen/Proteinen, von denen keine Homologe in anderen Organismen gefunden werden können und daher als "hypothetisch" gehandelt werden, ist in beiden Organismen sehr hoch (*Ignicoccus* 300 Gene, 20% des Genoms bzw. *Nanoarchaeum* 169, 30% des Genoms). Dennoch war etwa die Hälfte dieser Gene exprimiert. Daher handelt es sich folglich nicht um 'hypothetische Gene/Proteine', sondern vielmehr um 'Proteine mit unbekannter Funktion'.

### 3.1.2 Überblick über detektierte Proteinfamilien

Der Einteilung von orthologen Genen/Proteinen in arCOGs ('archaeal clusters of orthologous groups') folgend (Makarova *et al.*, 2007), konnte für beide Organismen ein Großteil der vorhergesagten Proteine (70-90%) in den Kategorien Zellzyklus-Kontrolle und genetische Informationsprozessierung detektiert werden (letzteres für *Nanoarchaeum* zu nahezu 100%). Für *Ignicoccus* konnten zudem mehr als 90% der vorhergesagten Proteine der Kategorien Energiegewinnung, Aminosäure- und Nukleotid-Metabolismus und Transport gefunden werden. Für *Nanoarchaeum* konnte ebenfalls eine hohe Abdeckung der metabolischen arCOGs erreicht werden, jedoch muss hinzugefügt werden, dass all diese Kategorien in *Nanoarchaeum equitans* mit weniger als 10 vorhergesagten Genen deutlich unterrepräsentiert sind. Es konnten hierbei aber Enzyme gefunden werden, die dem Aminosäure- und Nukleotid-Metabolismus zugeschrieben werden können; somit zeigt sich ein (wenn auch geringes) physiologisches Potential von *N. equitans*. Auch die Untereinheiten A (NEQ103) und B (NEQ263) der ATP-Synthase sind in nennenswerter Häufigkeit vorhanden. Bis auf die Untereinheit c (NEQ217), ein Transmembran-Protein, konnten auch die anderen annotierten Untereinheiten detektiert werden.

### 3.1.3 *I. hospitalis*-Proteom - die häufigsten Proteine

Eine Kategorie mit hoher Häufigkeit beinhaltet Chaperone und Faktoren zur Antwort auf oxidativen Stress. Darunter befinden sich u.a. Peroxiredoxin (Igni\_0459), ein Protein aus der Hsp20-Familie (Igni\_1363), die Thermosom-Untereinheiten (Igni\_0096 und Igni\_0897) und ein Protein mit einer Rubrerythrin-Domäne (Igni\_0095). (Letzteres ist für *Pyrococcus* als Schutz vor Peroxiden bekannt; Strand *et al.*, 2010.) Weiterhin wurde ein hohes Level von UspA festgestellt (ein 'universal stress family protein', Igni\_0144) und zwei anderen Genen aus demselben Operon, jedoch ohne bekannte Homologe (Igni\_0142 und Igni\_0143). Zudem wurden beträchtliche Mengen von zwei FAD-abhängigen Pyridin Nukleotid-Disulfid Oxidoreduktasen gefunden (Igni\_0693 und Igni\_0899). Von erstem (Igni\_0693) konnte in der Co-Kultur etwa die fünffache Menge gefunden werden. Von einem weiteren Protein aus demselben vorhergesagten Operon (Igni\_0672; ein konserviertes Protein

unbekannter Funktion) konnte sogar eine zehnfache Erhöhung in der Co-Kultur gefunden werden. Das dritte Protein aus diesem Operon (Igni\_0671; eine Schwefel-Oxidoreduktase) war in gleicher Menge in Reinkultur und Co-Kultur vorhanden. Die zweite Oxidoreduktase (Igni\_0899) besitzt eine Signalsequenz und wurde bereits als potentieller Kandidat für horizontalen Gentransfer mit *N. equitans* vorgeschlagen (Podar *et al.*, 2008<sup>1</sup>). Es ist das häufigste Protein, das in der Co-Kultur gefunden werden konnte; das homologe Pendant aus *N. equitans* (NEQ024) ist ebenfalls in hoher Menge zu finden.

Ebenfalls in hoher Menge vorhanden waren zahlreiche Proteine bzw. Komplexe, die an der Energiegewinnung beteiligt sind. Von den Untereinheiten der ATP-Synthase konnten alle bis auf das Transmembranprotein c (Igni\_0682) gefunden werden; zudem ist dieses Protein sehr klein (113 AS) und die vorhergesagten Peptide beim Trypsin-Verdau fielen unter die Detektionsgrenze. Da die gefundenen Mengen der Untereinheiten A (Igni\_1305) und B (Igni\_0679) hoch und etwa gleich groß waren, spiegeln sich hierin die äquimolaren Anteile dieser beiden Untereinheiten im Gesamtkomplex wider. Mit Ausnahme von Untereinheit a (Igni\_0609), ein Membranprotein, konnten alle anderen Untereinheiten ebenfalls in moderater bis hoher Menge gefunden werden. Untereinheit F (Igni\_1081) wurde in der Co-Kultur nur in etwa halb so großer Menge wie in der Reinkultur gefunden. Weiterhin konnte in der Kategorie Energiegewinnung ein Ni-Hydrogenase-Komplex in hohen Mengen gefunden werden. Dieser besteht aus einer großen und kleinen Hydrogenase-Untereinheit, einem 4Fe-4S-Ferredoxin und einem Transmembran-Protein (Igni\_1366-1369). Letzteres wurde aus genannten Gründen wieder nur in geringer Menge gefunden. Anders als die ATP-Synthase und der Ni-Hydrogenase-Komplex war die Schwefel-Reduktase weniger häufig in den Proben vorhanden. Die Zusammensetzung der Schwefelreduktase ist unklar, jedoch scheinen Untereinheiten des Komplexes aus zwei Operons hervorzugehen (Igni\_0801-0803 und Igni\_0528-0530). Genprodukte des ersten der beiden Operons waren in geringer bis mittlerer Menge vorhanden (und sogar noch geringer in der Co-Kultur; ca. fünffach). Proteine des zweiten Operons waren demgegenüber etwas häufiger vorhanden und konnten in etwa doppelter Anzahl in der Co-Kultur detektiert werden.

Das porenbildende Hauptprotein der äußeren Membran Ihomp1 (Igni\_1266; Burghardt *et al.*, 2007; Burghardt, 2008) war ebenfalls in hoher Menge zu finden. In der Co-Kultur war die Häufigkeit des Proteins um etwa das 1.5-fache geringer.

Unter den Proteinen, die an der genetischen Informationsprozessierung beteiligt sind, stellte sich die große Untereinheit des ribosomalen Proteins L7AE (beteiligt an RNA-Modifikationen) als häufigstes Protein in der *Ignicoccus*-Reinkultur heraus (Igni\_0230). In der Co-Kultur war die gefundene Menge etwa halb so groß. Außerdem konnten weitere RNA-Synthese- und Regulierungsproteine ebenfalls in deutlich geringerer Menge in Anwesenheit von *N. equitans* detektiert werden. Hinsichtlich Transkription und Translation wurden die Elongationsfaktoren 1A (Igni\_1150) und 2 (Igni\_1383) in hoher Anzahl gefunden sowie ein Transkriptionsfaktor aus der AsnC Familie. Diese waren alle in Rein- und Co-Kultur in etwa auf dem gleichen Niveau. An Chromosomenstruktur- und Zellteilungsproteinen konnte die höchste Zahl für das Nucleoid-Protein Alba (Igni\_0174) gefunden werden. Ein weiteres um das dreifache hochreguliertes Protein (Igni\_0929) gehört zur 'roadblock/LC7 superfamily', welches möglicherweise eine Rolle bei der Regulierung der GTPase-Aktivität spielt.

In der Gruppe der metabolismusrelevanten Proteine konnte die Acetyl-CoA-Synthetase (Igni\_0256; aufgrund eines Sequenzierungsfehlers früher als zwei ORFs Igni\_0256 und Igni\_0257 annotiert) mit hohem Vorkommen gefunden werden. Weitere zentrale Metabolismusproteine mit hoher Häufigkeit



waren: Phosphoglycerat Kinase (Igني\_0274), Fructose-1,6-Bisphosphatase (Igني\_0363), Proteine der Thiamin- und Riboflavin-Biosynthese (Igني\_0560 und Igني\_0936) und auch zwei Proteine der Aminosäurebiosynthese (Igني\_0747 und Igني\_0748). Hinsichtlich der CO<sub>2</sub>-Fixierung sind außerdem zu nennen: 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Igني\_0595), PEP-Synthase (Igني\_1113), PEP-Carboxylase (Igني\_0341) und ein Ferredoxin Oxidoreduktase-Komplex (1256-1259). Bis auf das erstgenannte Protein sind alle in etwa doppelter Häufigkeit in der Co-Kultur vorhanden.

#### 3.1.4 *N. equitans*-Proteom - die häufigsten Proteine

Zu den 30 häufigsten Proteinen in *N. equitans* gehören zahlreiche Proteine, die in Struktur, Regulation und Prozessierung von genetischem Material involviert sind. Hierzu gehören: ein Histon-Protein (NEQ348), das Nucleoid-Protein Alba (NEQ363), Komponenten der Replikations-, Rekombinations- und Reparatur-Systeme (NEQ537, NEQ426, NEQ368), FtsZ (NEQ133), MinD (NEQ119), der Translations-Elongationsfaktor EF-1A (NEQ082), ribosomale Proteine (NEQ319, NEQ207, NEQ446) und zwei Transkriptionsfaktoren (NEQ098, NEQ534). Weiterhin sind eine anorganische Pyrophosphatase (NEQ461), eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase (NEQ535), Glutamat-Dehydrogenase (NEQ077) und eine Nucleosid Diphosphat Kinase (NEQ307) zu finden.

Zusätzlich können Chaperone (NEQ141, NEQ344), Proteasom (NEQ203) und weitere Peptidasen sowie die S-Layer-Proteine NEQ300 und NEQ236 gefunden werden. Daneben sind auch zahlreiche Proteine präsent ohne bekannte Homologe (NEQ035, NEQ099, NEQ222, NEQ492) bzw. Proteine ohne bekannte Funktion, die jedoch Proteinfamilien zugeordnet werden können. Darunter befinden sich eine ATPase mit KaiC-Domäne aus der 'RecA-superfamily' (NEQ174) mit möglicher Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen sowie zwei FliP Pilus-Proteine (NEQ267 und NEQ268).

#### 3.1.5 Einfluss von *N. equitans* auf das Proteom von *I. hospitalis*

Um überhaupt einen Überblick über Veränderungen der Expressionslevel zu bekommen, wurde eine 'Gene Set Enrichment Analysis' (GSEA) durchgeführt (Subramanian *et al.*, 2005; Cha *et al.*, 2010), bei der die Änderung in den jeweiligen arCOG-Kategorien in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von *N. equitans* untersucht wurde. Abbildung 49 zeigt eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse. Positive NES-Werte ('normalized enrichment score') zeigen an, inwieweit die jeweiligen arCOGs in der Co-Kultur überrepräsentiert sind (relativ zur Reinkultur), wohingegen negative NES-Werte eine Überrepräsentation in der Reinkultur anzeigen (relativ zur Co-Kultur). Im Wesentlichen finden sich also Proteine der Zellzykluskontrolle, der Energiegewinnung, des Lipidtransportes, der Proteinprozessierung und der Membranbiogenese "überexprimiert" in der Co-Kultur, wohingegen vor allem Transkriptions- und Replikationsproteine weniger häufig als in der Reinkultur vorkommen.

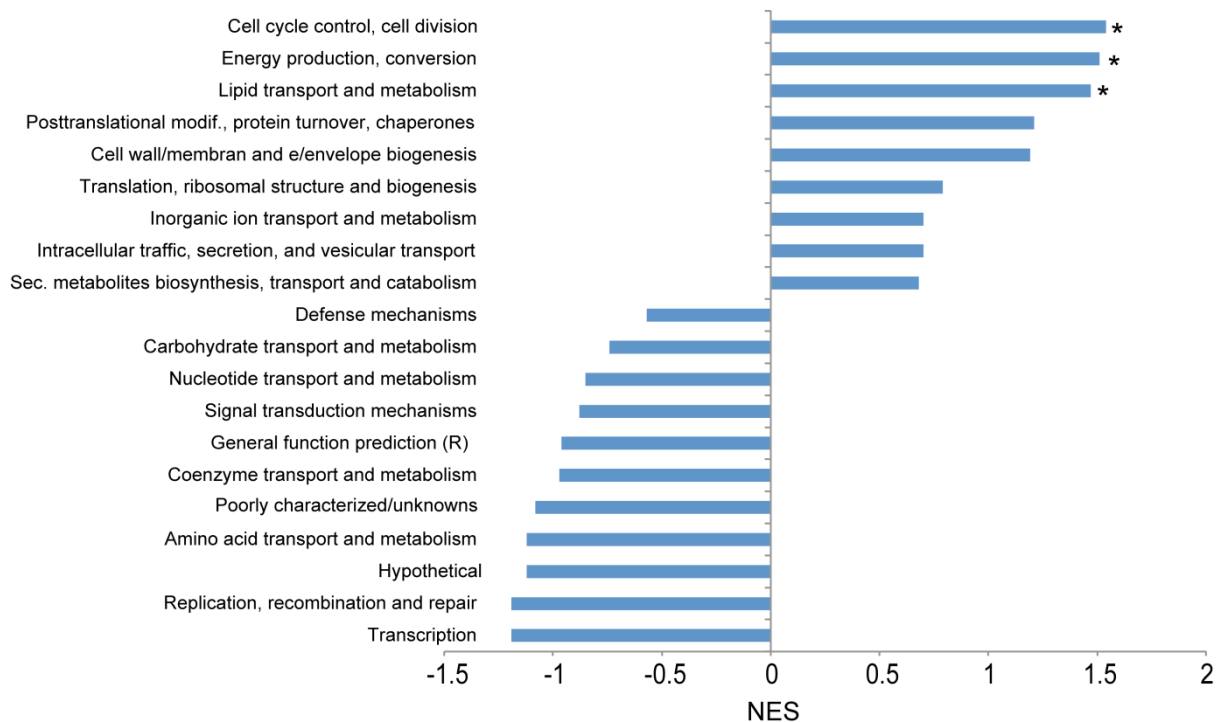


Abbildung 49 GSEA-Analyse; Vergleich der Reinkultur von *Ignicoccus* und der Co-Kultur mit *Nanaoarchaeum equitans* (aus Giannone *et al.*, 2011)

Insgesamt gesehen war bei 106 *I. hospitalis*-Proteinen ein Unterschied in der relativen Häufigkeit zwischen Rein- und Co-Kultur um einen Faktor von mindestens 2 festzustellen. Hinsichtlich generell häufig vorkommender Proteine waren beispielsweise (wie erwähnt) Untereinheiten der ATP-Synthase oder der Ni-Hydrogenase in erhöhten Leveln in der Co-Kultur zu finden, ebenso zahlreiche Enzyme, die zentrale Substrate für Biosynthesewege und CO<sub>2</sub>-Fixierung liefern, darunter die Acetyl-CoA-Synthetase (Igني\_0256), der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase Komplex (Igني\_1256-1259), PEP-Synthase (Igني\_0113), PEP-Carboxylase (Igني\_0341) und die Fructose-1,6-Bisphosphatase (Igني\_0363). Am meisten negativ beeinflusst wurde die Expression von transkriptionsbeteiligten Proteinen. Hierunter zu finden waren mehrere RNA-Polymerase-Untereinheiten sowie Transkriptions-initiationsfaktoren und -elongationsfaktoren (TFIIB, E, S). Ebenso waren fast alle Transkriptionsfaktoren geringer exprimiert, wie beispielsweise Igني\_0308 aus der AsnC Familie, der sogar unter die Detektionsgrenze fiel in der Co-Kultur (moderates Level in der Reinkultur). Umgekehrt konnte ein weiterer Faktor aus der AsnC Familie (Igني\_0122) nur in der Co-Kultur und nicht in der Reinkultur nachgewiesen werden (jedoch nur in geringer Menge).

Weitere bemerkenswerte Unterschiede zwischen Co-Kultur und Reinkultur zeigen sich durch eine Erhöhung von CstA ('carbon starvation protein'; Igني\_1324) um das Doppelte und durch ein häufiges Protein aus der 'roadblock/LC7 superfamily' (Igني\_0929) um das Dreifache in der Co-Kultur. Bei diesem Protein handelt es sich möglicherweise um einen Regulator für GTPasen. Ein weiterer wichtiger Regulator (u.a. für den Stickstoffmetabolismus) war in der Co-Kultur nur halb so oft zu finden: GlnK (Igني\_1294). Möglicherweise damit in Zusammenhang stehend, wurden auch Enzyme aus dem Stickstoff- und Aminosäure-Metabolismus in geringeren Mengen in der Co-Kultur detektiert: Carbamoyl-Phosphat-Synthase (Igني\_1399, Igني\_1400), eine Aminotransferase (Igني\_0496), zwei Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktasen (Igني\_0025, Igني\_1032).

Hinsichtlich der Stressantwort ergab sich ein gemischtes Bild: Während die meisten Chaperone (z.B. Hsp20, Igni\_1363 und ein Prefoldin, Igni\_1176) unverändert oder leicht vermindert in der Co-Kultur detektiert wurden, wurde ein weiteres Prefoldin (Igni\_0087) in etwa 2.5-facher Menge gefunden. Ebenso waren die Werte für Proteasom-Untereinheiten (Igni\_0453, Igni\_0616) und auch einige Proteasen (Igni\_0100, Igni\_0533) leicht erhöht. Der größte Unterschied zeigte sich bei einer FAD-abhängigen Nukleotid-Disulfid-Reduktase (Igni\_0673) sowie einem Protein mit unbekannter Funktion aus dem gleichen Operon (Igni\_0672) mit einer Erhöhung um das fünf- bzw. zehnfache des Wertes der Reinkultur.

Im Genom von *Ignicoccus hospitalis* sind neun Proteine mit CRISPR-Wiederholungssequenzen annotiert sowie 37 CAS-Gene, von denen einige in unterschiedlichen Operons zu finden sind (Igni\_0326-0329, Igni\_0460-0464, Igni\_1139-1141). Die meisten dieser Proteine konnten auf mittlerem Expressionslevel detektiert werden. In der Co-Kultur zeigte sich jedoch kein Unterschied. Erwähnenswert ist letztlich noch Sec61 $\beta$  (Igni\_1061), eine Untereinheit des SecYE $\beta$ -Translokase-Komplexes. Diese Untereinheit war ausschließlich in der Co-Kultur zu detektieren.

### 3.1.6 Korrelation zwischen Proteomdaten und genomischer Operonstruktur

Eine Gemeinsamkeit von *I. hospitalis* und *N. equitans* ist die Abwesenheit bzw. die Fragmentierung relativ langer und konservierter Operons, wie sie in anderen Archaeen und Bakterien zu finden sind (z.B. ribosomale Proteine). Dennoch gibt es eine ausreichende Anzahl an mehr oder minder konservierten Operons, deren Ansprechen (anhand der Expressionslevel) auf die Anwesenheit von *Nanoarchaeum equitans* untersucht werden kann. Erneut wurde hierfür eine GSE-Analyse verwendet. Da insgesamt gesehen nur ein Einfluss auf eine geringe Anzahl von einzelnen Proteinen gefunden werden konnte, war es wenig überraschend, dass auch nur wenige Operons signifikante Änderungen aufzeigten; diese beinhalteten dann auch die stark vermehrten/verminderten Proteine der Co-Kultur (Igni\_0672-0673; Igni\_0169-0170; Igni\_1087-1088). Darüber hinaus gab es aber auch Operons und/oder Cluster, die still gelegt waren (keine Genprodukte konnten gefunden werden). Darunter befindet sich ein vorhergesagter Daunorubicin-Resistenz-ABC-Transporter (Igni\_0146-0147), ein Operon mit Proteinen des Typ II-Sekretionssystems (Igni\_1009-1016) und ein Operon mit fünf CRISPR-assoziierten Proteinen (Igni\_1132-1135). Ebenso wurde eine Reihe von Operons mit zahlreichen hypothetischen Proteinen ohne bekannte Funktion nicht exprimiert (u.a. Igni\_0262-0264; Igni\_0432-0437; Igni\_0806-0811; Igni\_0893-0896; Igni\_1023-1026; Igni\_1312-1316).

### 3.1.7 *Ignicoccus hospitalis*-Proteine in *Nanoarchaeum equitans*

Um der Frage nachzugehen, ob und inwieweit Proteine aus *Ignicoccus* von *Nanoarchaeum* aufgenommen werden, wurde eine Probe aus aufgereinigten (aus der Co-Kultur) *N. equitans*-Zellen untersucht. Mittels qPCR und FISH wurde eine Verunreinigung mit *I. hospitalis*-Zellen von weniger als 1% (relativ zu *Nanoarchaeum*) ermittelt. Aus den drei MS-Durchläufen konnten insgesamt etwa 12 000 Spektren von *I. hospitalis*-Peptiden aufgezeichnet werden bzw. 120 000 für *Nanoarchaeum*. 464 *I. hospitalis*-Proteine wurden in der Probe detektiert, von denen alle jedoch eine geringe, allenfalls moderate relative Häufigkeit aufwiesen.

Verglichen mit der Co-Kultur zeigten sich keine Unterschiede in den relativen Häufigkeiten der detektierten Proteine (auf arCOG-Basis). Es konnte keine Anreicherung von Proteinen einer bestimmten funktionellen Gruppe gefunden werden.

Unter Bestimmung von "Anreicherungsfaktoren" ( $w$ ) und mittels der relativen Häufigkeiten der detektierten *Ignicoccus*-Proteine in der *Nanoarchaeum equitans*-Probe wurde der Versuch unternommen, potentiell spezifisch transportierte Proteine zu ermitteln. Der Anreicherungsfaktor jedes Proteins wurde folgendermaßen berechnet:  $w = \frac{P_N/T_N}{P_C/T_C}$  ( $P_N$  ist die Häufigkeit eines *Ignicoccus*-Proteins in der Probe mit aufgereinigten *Nanoarchaeum*-Zellen;  $T_N$  ist die Gesamtheit der *Ignicoccus*-Proteine in der Probe mit aufgereinigten *Nanoarchaeum*-Zellen; mit Index C gilt entsprechendes für die Co-Kultur-Probe). Gesucht wurden Proteine deren Anreicherungsfaktor  $w \geq 2$  war und die zugleich einen *RSpC* – Wert  $\geq 20$  aufwiesen. Einen Auszug aus der Liste gefundener mutmaßlich spezifisch transportierter Proteine zeigt Abbildung 50.

Gene	Product Name	arCOG	class	SigP	PredS	TMD	Size (aa)	Igni_Nano	Nano	Ø
Iho_0801	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain	437	C				219	5	46	55.7
Iho_0802	molybdopterin oxidoreductase (putative sulfur reductase subunit A)	243	C				834	5	24	28.7
Iho_0670	cell surface appendage protein			Yes	Yes	Yes	310	133	190	9.0
Iho_0731	amino acid/amide ABC transporter ATP-binding protein	411	E				254	57	76	8.4
Iho_0740	protein with unknown function						108	78	88	7.1
Iho_0066	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	1252	C	Yes			357	86	90	6.6
Iho_0609	H(+)-transporting two-sector ATPase	1269	C			Yes	654	61	50	5.2
Iho_0249	SSU ribosomal protein S7P	49	J				195	93	68	4.6
Iho_1145	4Fe-4S ferredoxin, Fe-S binding dom.	1143	C	Yes			189	101	72	4.5
Iho_0988	protein with unknown function						117	71	51	4.5
Iho_0180	SSU ribosomal protein S13P	99	J				152	45	31	4.3
Iho_0914	ABC-type metal ion transporter periplasmic component/surface adhesin-like protein	803	P	Yes	Yes		277	31	21	4.3
Iho_1080	H+-transporting ATPase, E subunit	1390	C				208	76	48	4.0
Iho_1027	transcriptional regulator, AsnC family	1522	K				79	43	27	4.0
Iho_0680	H+-ATPase subunit D	1394	C				214	121	71	3.7
Iho_0529	sulfide reductase, subunit B	437	C				353	196	111	3.6
Iho_1369	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain protein	247	C				479	308	172	3.5
Iho_0472	ABC-type tungstate transport system permease component-like protein	2998	H	Yes	Yes	Yes	287	41	23	3.5
Iho_1214	H+-ATPase subunit C	1527	C			Yes	341	198	101	3.2
Iho_0118	ABC transporter related	1121	P				247	53	26	3.2
Iho_1366	Nickel-dependent hydrogenase small subunit, N-terminal domain protein	1740	C	Yes	Yes		422	575	268	3.0
Iho_1378	putative nitrate reductase, subunit G	437	C	Yes			320	57	26	2.9
Iho_0732	amino acid/amide ABC transporter ATP-binding protein 2	410	E				246	112	48	2.7
Iho_0926	phosphoribosylanthranilate isomerase	135	E				194	49	21	2.7
Iho_0963	TBP-interacting protein TIP49	1224	K				450	58	24	2.6
Iho_0542	NADH dehydrogenase subunit C/D	649	C C				540	71	29	2.6
Iho_0759	protein with unknown function			Yes	Yes		202	142	58	2.6
Iho_1413	SSU ribosomal protein S8P	96	J				133	96	38	2.5
Iho_0635	argininosuccinate synthase	137	E				396	106	41	2.4
Iho_1266	Outer membrane pore protein					Yes	85	335	121	2.3
Iho_0981	protein with unknown function			Yes	Yes		1051	73	26	2.3
Iho_1367	Ni-dependent hydrogenase, large sub.	374	C				664	938	337	2.3
Iho_0747	methionine synthase (B12-independent)	620	E				341	473	165	2.2
Iho_0679	Sodium-transporting two-sector ATPase	1156	C				471	1008	348	2.2
Iho_0524	protein with unknown function						159	103	36	2.2
Iho_0590	SSU ribosomal protein S3P	92	J				241	159	54	2.2
Iho_0157	Small nuclear ribonucleoprotein, LSM family	1958	K				91	164	55	2.1
Iho_0363	D-fructose 1,6-bisphosphatase	1980	G				387	1390	465	2.1
Iho_1435	aspartyl-tRNA synthetase	17	J				453	122	40	2.1
Iho_1243	protein with unknown function						182	282	93	2.1
Iho_1305	H+-transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit	1155	C				596	687	220	2.0

Abbildung 50 Potentiell spezifisch transportierte *Ignicoccus hospitalis*-Proteine ('Supplemental', Giannone et al., 2011)

### 3.2 'Time-Course Proteomics' und Microarrays

In einer zweiten Versuchsreihe wurden Proben aus verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphase mit 2D-LC-MS/MS analysiert und darüber hinaus mit Genexpressions-Microarrays das Transkriptom untersucht. Für die Proteom-Analysen wurde zudem das Verfahren geändert und zunächst un(ter)verdaute Proteine wurden zusätzlich mit Chymotrypsin behandelt. Hierdurch konnten einerseits mehr Membranproteine als zuvor detektiert werden und andererseits gibt eine höhere Anzahl an verschiedenen Peptiden eine höhere Zuversicht für die Voraussage der Existenz von Proteinen.

#### 3.2.1 Kultivierung der Zellen

Beide Kulturen (Reinkultur und Co-Kultur) wurden jeweils wieder in einem 300 l Fermenter angezüchtet (250 l Medium, 50 l Gasphase). Zu je fünf Zeitpunkten (siehe Abbildung 51) wurden Proben entnommen (A 30 l; B, C, und D 15 l; E die restlichen 175 l). Für die letztlichen Analysen (und unter dem Gesichtspunkt der Vergleichbarkeit) wurden Proben der Zeitpunkte B, C, D und E für die Reinkultur bzw. A, B, C und D für die Co-Kultur verwendet. Im Folgenden werden diese analysierten vier Zeitpunkte jeweils als L1, L2, S1 und S2 bezeichnet.

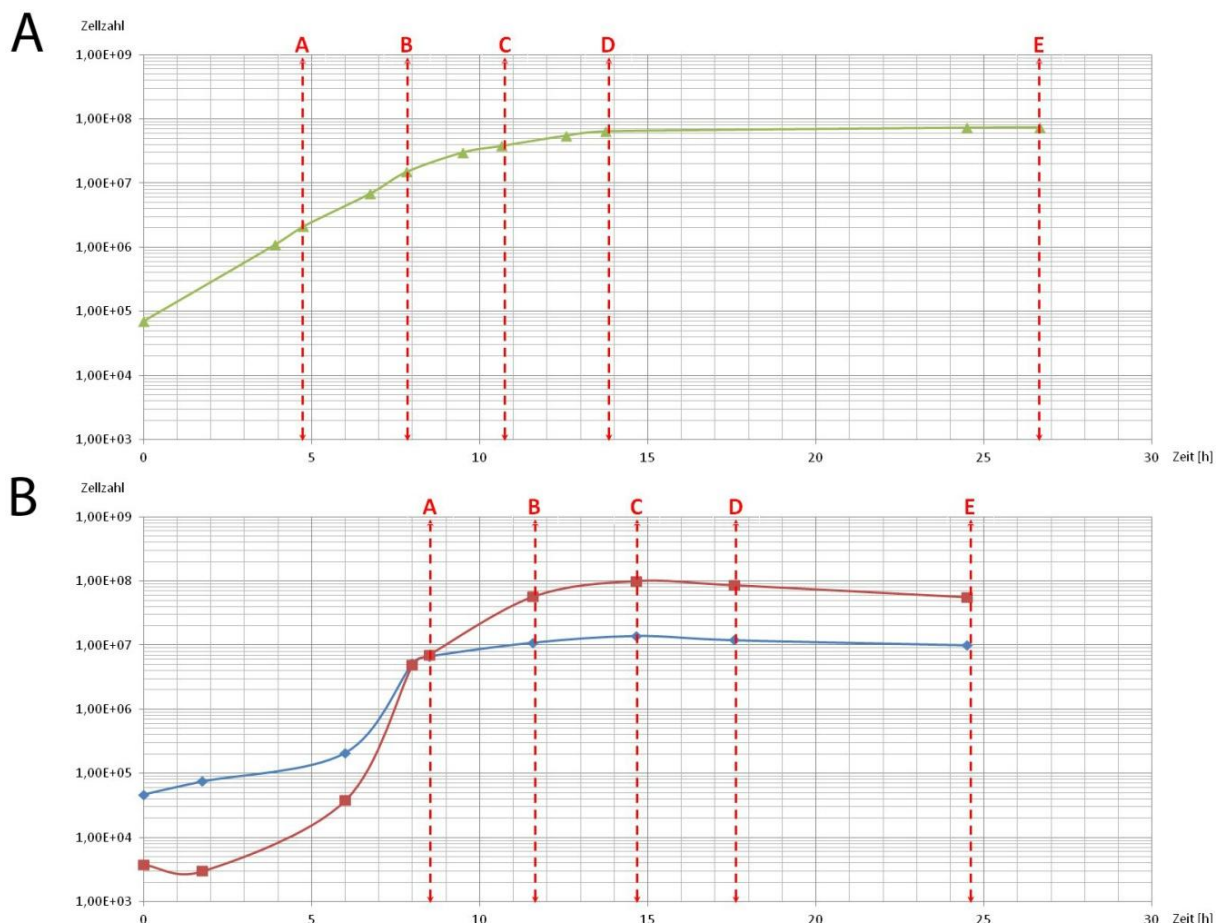


Abbildung 51 Wachstumskurven der 'Time-Course'-Proben der Fermenter-Anzucht; (A) Reinkultur (B) Co-Kultur

Insgesamt konnten 1404 Gentranskripte und 1154 Genprodukte gefunden werden, was entsprechend ~97% bzw. 80% der vorhergesagten ORFs aus den Genomanalysen (Podar *et al.*, 2008<sup>1</sup>) entspricht. Es ist anzumerken, dass Ergebnisse auf mRNA-Ebene nicht zwangsläufig mit Ergebnissen

auf Proteom-Ebene korrelieren. Grund hierfür sind die unterschiedlichen Regulationsmechanismen auf beiden Ebenen.

### 3.2.2 Proteomics der *Ignicoccus-Nanoarchaeum*-Interaktion

Für zentrale Biosynthese-Wege (Aminosäuren, Nukleotide, Lipide) konnte kein Einfluss seitens *Nanoarchaeum* festgestellt werden. Die relativen Häufigkeiten (hier nSpC genannt) entsprechender Proteine bewegten sich sowohl im Laufe der Zeit als auch in Rein- und Co-Kultur auf etwa gleichbleibenden Niveaus. Für beteiligte Enzyme am CO<sub>2</sub>-Fixierungs-Weg in *Ignicoccus* konnte eine erhöhte Expression beteiligter Proteine, mit steigender *Nanoarchaeum equitans*-Zahl festgestellt werden. Ebenso waren einige Proteine, die an der Stickstoff-Assimilierung und am Aminosäure-Umsatz beteiligt sind (wie die Glutamin- oder Asparaginsynthase), in erhöhten Mengen in der Co-Kultur zu finden.

Einige der 40 vorhergesagten Transkriptionsregulatoren waren um mindestens das Zehnfache verringert in der Co-Kultur zu finden (Igني\_0840, Igني\_0882, Igني\_0701), während andere vermehrt exprimiert wurden (Igني\_0122, Igني\_0839). Ähnliches konnte für post-transkriptionelle Regulatoren gefunden werden: während SixA (Phosphohistidin Phosphatase, Igني\_1231), ein PII 'signaling protein' (Igني\_1217) und ein Protein mit CBS-Domäne (Igني\_0648) im Zeitverlauf in der Reinkultur stark anstiegen und in der Co-Kultur vermindert bzw. gleichbleibend vorzufinden waren, verhielt es sich für ein Phosphat- und Kohlenstoff 'starvation'-Protein (Igني\_0872, Igني\_1324) genau umgekehrt. Einige vorhergesagte Regulatoren waren auch nur in der Co-Kultur zu finden und zwar mit den höchsten Häufigkeitswerten zu Beginn der Kolonisierung von *Ignicoccus* (Igني\_0099, Igني\_0702, Igني\_0971).

Hinsichtlich einer Stressantwort sowie dem "prokaryotischen Immunsystem" (CRISPR-CAS) konnten kaum Veränderungen zwischen Rein- und Co-Kultur festgestellt werden.

### 3.2.3 Membranproteine

Interessanterweise stieg die Anzahl an Membranproteinen in der Co-Kultur um etwa 50%, während der Wert in der Reinkultur mehr oder minder gleich blieb. Von einem derartigen Anstieg betroffen waren generell Proteine mit Beteiligung an Membranaufbau, Energiegewinnung und -umsatz sowie Transporter (u.a. ATP-Synthase, H<sub>2</sub>:Schwefel-Oxidoreduktase, ein potentieller NADH-Dehydrogenase-Komplex). Für einen Membrankomplex konnte aber auch Gegenteiliges gezeigt werden. Im Falle der potentiellen Nitritreduktase (Igني\_1377-1380) waren um das Fünffache geringere Werte in der Co-Kultur detektierbar.

Zusätzlich waren aber auch einige Membranproteine unbekannter Funktion (z.B. Igني\_0226) sowie das Zellanhang-Protein (Igني\_0670) erhöht. Das häufigste Membranprotein der äußeren Membran Ihomp1 (Igني\_1266) hingegen blieb gleich. Ebenfalls erhöht waren Proteine für Lipid- und Proteinglykosylierung (einige davon mit Membrananker-Regionen) und auch ein mechanosensitiver Ionenkanal (Igني\_0056).

Eine weitere Gruppe von Membranproteinen, die in der Co-Kultur vermehrt zu finden waren, stellten Transporter dar. Z.B. waren Ni<sup>2+</sup>- und Fe<sup>2+</sup>-Transporter um das Zehnfache erhöht in der Co-Kultur. Damit korrelierend waren auch die Vorkommen von Enzymen zur Bildung von Eisen-Clustern und Ni-Fe-Hydrogenase-Komplexen erhöht. Weitere "überexprimierte" Transporter waren Zink/Mangan-Transporter, Wolfram-Transporter, 'major facilitator transporter' und Protein-Translokatoren. Für einige wenige Proteine der Kategorie (z.B. ein Phosphat-Transporter, eine Permease) war wieder Gegenteiliges zu finden.

#### 3.2.4 Genexpressionsanalysen

Auch auf mRNA-Ebene wurde der Einfluss von *N. equitans* auf *I. hospitalis* untersucht. Hierzu wurden die verschiedenen Proben der Co-Kultur jeweils mit der ersten Probe (L1) verglichen. Insgesamt konnten so 163 Gene gefunden werden, die in mindestens einem der Zeitpunkte eine signifikante Änderung (relativ zu L1) zeigten. Da nicht klar war, ob der Einfluss jeder Regulation tatsächlich durch *N. equitans* zu erklären ist oder ob es sich um wachstumsabhängige Regulationen handelt, wurde ebenso die Reinkultur von *Ignicoccus* untersucht. Hier fanden sich Änderungen für 166 Gene. Generell waren Änderungen der mRNA-Level im Laufe der Zeit (sowohl für Rein- als auch Co-Kultur) relativ gering; die meisten Gene erfuhren eine maximale Änderung um den Faktor 1.5. Nachdem Gene "verworfen" wurden, die in beiden Kulturen gleich reguliert wurden, blieb eine Liste von 115 Genen übrig; 46 davon hochreguliert, 69 herunterreguliert mit steigender *Nanoarchaeum*-Anzahl. Unter den hochregulierten Genen codiert etwa die Hälfte für Proteine mit unbekannter Funktion; 11 davon sind mutmaßliche Membranproteine/membranassoziierte Proteine. Ebenso stiegen die Level zweier Transkriptions-Regulatoren mit der Zeit an; einer davon gehört zur XRE-Familie ('xenobiotic response element') und war auch auf Proteinebene mit erhöhten Werten zu finden (Igni\_0486). Den reprimierten Genen gehörten entsprechende Proteine mit einer Vielzahl verschiedener Funktionen an. Beispielsweise waren das hinsichtlich der Replikation und Zellteilung eine DNA-Topoisomerase, eine reverse Gyrase sowie Proteine des ESCRT-Systems.

Einige der Befunde korrelierten gut mit den Daten aus den Proteomanalysen (was aus bereits genannten Gründen nicht zwangsläufig zu erwarten ist). Unter ihnen beispielsweise eine ATPase vom RecA-Typ (Igni\_0064), die mit fortschreitendem Wachstum in der Reinkultur ansteigt und in der Co-Kultur absinkt. Eine weitere AAA-ATPase Vps4 (Igni\_0994) aus dem ESCRT-System wird auf mRNA- und Protein-Ebene stark reprimiert in der Co-Kultur, während in der Reinkultur ein gleichmäßiges Absinken des Levels zu verzeichnen ist.

## 4 Nähere Charakterisierung ausgewählter Proteine

Alle der im Folgenden untersuchten Proteine stellten in erster Linie aufgrund der strukturellen Untersuchungen in *Ignicoccus* potentiell interessante Ziele dar. In vielen Fällen handelt es sich dabei um Homologe zu eukaryotischen Proteinen, die dort auf verschiedene Art und Weise mit dem endogenen Membransystem in Verbindung gebracht werden können. Die vorgelegten Ergebnisse dienen als Grundlage zur Auslotung, ob der Beteiligung dieser Proteine an den dynamischen Prozessen in *Ignicoccus*.

#### 4.1 Proteine mit WD40-Domäne

In den Genom- und Proteomanalysen wurden acht Proteine mit WD40-Domänen gefunden (Podar *et al.*, 2008<sup>1</sup>; Giannone *et al.*, 2011): Igni\_0008, Igni\_0419, Igni\_0434, Igni\_0435, Igni\_0541, Igni\_0561, Igni\_0808, Igni\_1434. Bei all diesen Proteinen handelt es sich um hypothetische Proteine bzw. Proteine unbekannter Funktion. Abbildung 52 zeigt die Proteom- bzw. Microarray-Daten der beiden beschriebenen Versuchsreihen (siehe 3.1 und 3.2).

WD40			stationär		Time Course															
			Proteome (RSpC)		Microarray								Proteome (NSpC)							
			Igni	Igni + Nano	Igni				Igni + Nano				Igni				Igni + Nano			
Gen	SigP	TMD	stationär	stationär	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2
Igni_0008	No	No	23	3	-1,87	-0,31	1,62	0,32	-0,20	-0,29	0,74	0,004	14	14	11	8	27	22	15	22
Igni_0561	No	No	325	298	1,62	-0,20	-0,44	0,04	0,91	0,54	-1,23	-1,24	127	217	222	362	81	83	96	86
Igni_0419	No	No	25	32	-1,76	-0,11	0,54	-0,96	1,27	0,99	0,19	-0,17	6	5	3	11	8	6	6	6
Igni_0434	No	No	/	/	-1,02	0,14	-1,62	-0,13	0,01	1,06	1,47	0,07	5	4	0,2	0,2	4	0,3	0,4	0,4
Igni_0435	No	No	/	/	-1,13	-0,78	-0,83	0,11	-0,51	0,31	1,53	1,30	/	/	/	/	/	/	/	/
Igni_0541	No	No	136	119	-0,97	-0,42	-0,42	0,16	2,19	0,50	-0,31	-0,72	78	40	53	37	58	52	56	42
Igni_0808	Yes	No	/	/	0,04	0,87	0,60	-1,83	-1,06	0,99	0,62	-0,23	0,1	2	0,2	0,2	/	/	/	/
Igni_1434	Yes	No	26	15	1,15	0,57	0,13	-2,15	-0,48	0,68	0,13	-0,03	3	3	3	6	/	/	/	/

Abbildung 52 WD40-Proteine; Proteom- und Transkriptom-Daten basierend auf 3.1 und 3.2

Während auf mRNA-Ebene alle WD40-Transkripte gefunden werden konnten, konnte mit Igni\_0435 lediglich ein WD40-Protein auf Proteinebene nicht detektiert werden. Zwei weitere WD40-Proteine (Igni\_0808, Igni\_1434) waren ebenfalls nicht in der Co-Kultur zu finden, jedoch in der Reinkultur von *Ignicoccus hospitalis*, allerdings auch nur in sehr geringen Mengen. Insgesamt bewegen sich die detektierten Proteinlevel im unteren bis mittleren Bereich. Durch PHYRE2-Analysen aller WD40-Proteine konnten strukturelle Homologien zu eukaryotischen Proteinen aufgedeckt werden. Insbesondere der Bezug dieser Proteine zu eukaryotischen 'Coatomer'-Proteinen bzw. deren Beteiligung am eukaryotischen Vesikeltransportsystem weckte in Anbetracht der strukturellen Untersuchungen unter Punkt 2 ein besonderes Interesse.

Für die beiden WD40-Proteine Igni\_0561 (Abbildung 53) und Igni\_0008 (Abbildung 55) wurden Antikörper generiert und Lokalisierungsversuche anhand von Ultradünnschnitten unternommen bzw. im Falle von Igni\_0008 zusätzlich ein 'Freeze Fracture Labeling' durchgeführt (Abbildung 56). Hierbei zeigte sich eine Lokalisierung des Proteins Igni\_0561 im Cytoplasma der Zellen (Abbildung 53 D und E). An einigen Stellen findet man Markierungen auch nahe der Cytoplasmamembran, so dass eine Membranassoziation ebenfalls nicht ausgeschlossen werden kann. Während in Abbildung 53 D eine Verdünnung für den primären Antikörper von 1:100 verwendet wurde, war die Verdünnung 1:1000 für Abbildung 53 E. In diesem Ultradünnschnitt zeigte sich auch eine schwache Markierung im Cytoplasma von assoziierten *Nanoarchaeum equitans*-Zellen. Im Western Blot (Abbildung 53 C) wurde eine Bande knapp unterhalb der (mit ProtParam) vorhergesagten 41 kDa detektiert sowie eine weitere starke Bande bei knapp über 70 kDa. Es könnte sich daher um ein Dimer handeln.



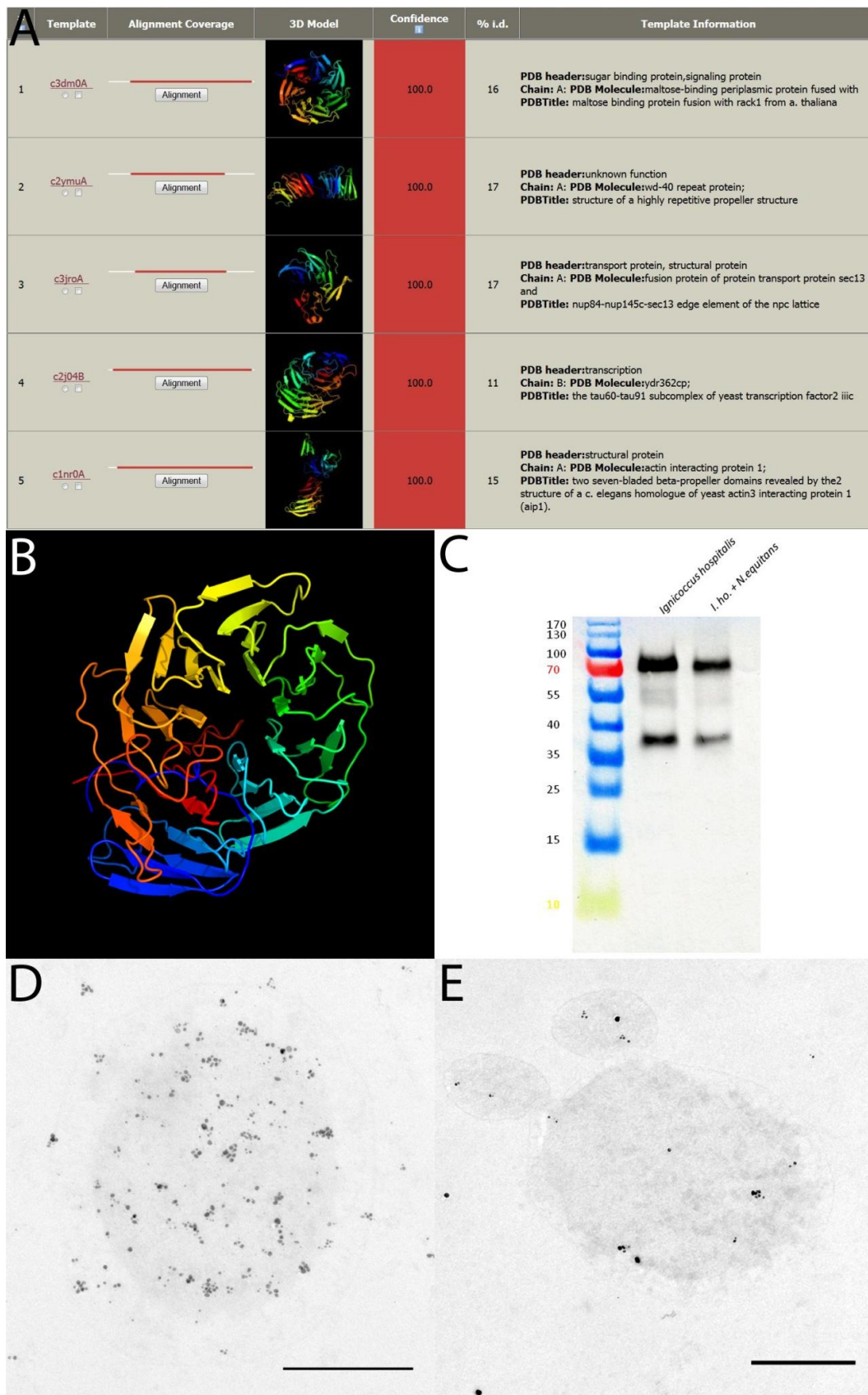


Abbildung 53 WD40-Protein Igni\_0561; (A) PHYRE2 - Top 5 Hits; (B) PHYRE2-Modell der Proteinstruktur; (C) Western Blot (D und E) Immunmarkierung auf Ultradünnschnitt (50nm); AK-Verdünnung 1:100 bzw. 1:1000; Balken jeweils 0.5 µm

Für das WD40-Protein Igni\_0008 konnte ebenfalls eine Markierung im Cytoplasma gefunden werden. Daneben wurde aber, anders als bei Igni\_0561, zusätzlich eine Lokalisation in der äußeren Membran








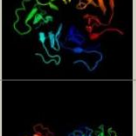


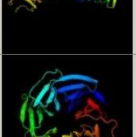




festgestellt. Nebenbei sei erwähnt, dass der verwendete Antikörper nicht nur in den gezeigten Verdünnungen von 1:10 000 eindeutige Ergebnisse lieferte, sondern Verdünnungen von bis zu 1:1 000 000 verwendet werden konnten (Foith, 2013). Für das 'Freeze Fracture Labeling'-Experiment wurde dennoch eine Verdünnung von 1:100 gewählt (Abbildung 56). Mit diesem Experiment konnte die Lokalisierung in der äußeren Membran noch einmal unterstrichen werden.

Ähnlich wie für Igni\_0561 zeigt auch das Protein Igni\_0008 eine Diskrepanz zur Vorhersage (mit ProtParam) von 30 kDa. Das rekombinante Protein besitzt zusätzlich zum His-Tag N-terminal noch eine kurze Sequenz (plasmidbedingt). Laut Hersteller (Life Technologies) beläuft sich dieser Unterschied auf etwa 3 kDa. Für das rekombinante Protein ergibt sich so ein theoretischer Wert von etwa 33 kDa, der gut mit dem Blotsignal korreliert. Die Größe des Proteins in den *Ignicoccus*-Lysaten könnte man als konformationsabhängiges Laufverhalten von Proteinen interpretieren, tatsächlich gibt es aber Hinweise, die eventuell auf anderes hindeuten: In unabhängigen Studien zur Transkription in *Ignicoccus* der Universität Kiel wurde für Igni\_0008 gemutmaßt, dass sich der Transkriptionsstart einige Nukleotide 'downstream' (7743 nt) vom annotierten Translationsstart (7737 nt) befinden könnte (Information von Dominik Jäger, ehemals Universität Kiel). Ein nächstes potentiell Startcodon liegt erst etwa 200 nt 'downstream' vom Transkriptionsstart. Zwar wäre dies für *Ignicoccus* eine relativ lange 5'-untranslatierte Region, jedoch würde die Proteingröße bei "neuem" Translationsstart mit 23 kDa gut mit dem Blotsignal korrelieren. Eine Analyse dieser verkürzten Version von Igni\_0008 (im Folgenden Igni\_0008\_trunc genannt) mit PHYRE2 befindet sich ebenfalls auf dem beigelegten Datenträger. Da der Leserahmen beider Versionen des Proteins gleich bleibt, sind auch die 'TopHits' für strukturelle Homologe ähnlich.

Select	Homolog	T	Product Name	Percent Identity	Alignment On Query Gene	Alignment On Subject Gene	Length	E-value	Bit Score	Domain	Status	Genome Name
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521405941</a>	O	hypothetical protein	38.35			274aa	6.0e-66	206	A	F	<a href="#">Ignicoccus islandicus K018, DSM 13165 (Closed)</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521407869</a>	O	FOG: WD40 repeat	36.98			273aa	1.0e-58	187	A	F	<a href="#">Ignicoccus pacificus LPC 33, DSM 13166 (Closed)</a>

Abbildung 54 Orthologe von Igni\_0008; 'Screenshot' aus IMG/JGI

In den Genomen von *Ignicoccus islandicus* und *Ignicoccus pacificus* (unpublizierte Daten; zur Verfügung gestellt von Mircea Podar) können jeweils Orthologe von Igni\_0008 gefunden werden (Abbildung 54; Iis\_00307, Ipa\_00654). Die vorhergesagten Proteingrößen betragen jedoch ebenfalls ~30 kDa. Ein homologes eukaryotisches WD40-Protein (wie aus den PHYRE2 Daten ersichtlich) stellt Sec13 dar. Für Hefe wird dieses Protein mit 33 kDa angegeben (Salama *et al.*, 1997). Im Blot kann für das Hefelysat ein Signal auf etwa dieser Höhe gefunden werden.

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
1	<a href="#">c3dm0A</a>	 Alignment			100.0	<b>PDB header:</b> sugar binding protein,signaling protein <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> maltose-binding periplasmic protein fused with <b>PDBTitle:</b> maltose binding protein fusion with rack1 from a. thaliana
2	<a href="#">c3jroA</a>	 Alignment			100.0	<b>PDB header:</b> transport protein, structural protein <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> fusion protein of protein transport protein sec13 and <b>PDBTitle:</b> nup84-nup145c-sec13 edge element of the npc lattice
3	<a href="#">c4e54B</a>	 Alignment			100.0	<b>PDB header:</b> dna binding protein/dna <b>Chain:</b> B; <b>PDB Molecule:</b> dna damage-binding protein 2; <b>PDBTitle:</b> damaged dna induced uv-damaged dna-binding protein (uv-ddb)2 dimerization and its roles in chromatinized dna repair
4	<a href="#">c2ymuA</a>	 Alignment			100.0	<b>PDB header:</b> unknown function <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> wd-40 repeat protein; <b>PDBTitle:</b> structure of a highly repetitive propeller structure
5	<a href="#">c3mkqA</a>	 Alignment			100.0	<b>PDB header:</b> transport protein <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> coatomer beta'-subunit; <b>PDBTitle:</b> crystal structure of yeast alpha/betaprime-cop subcomplex of the cop2 vesicular coat

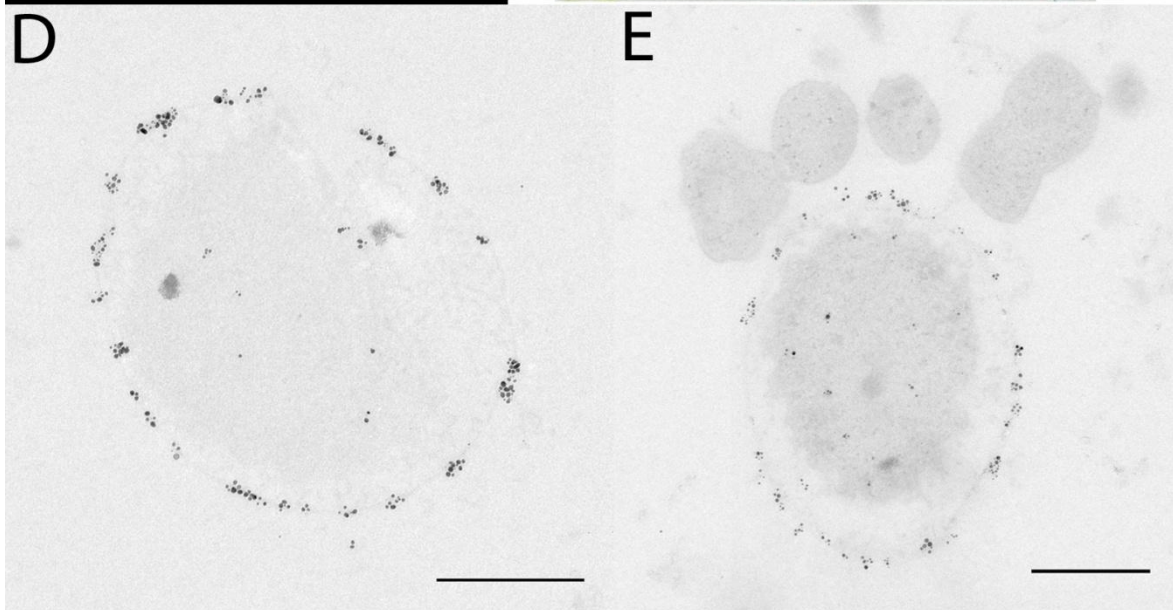
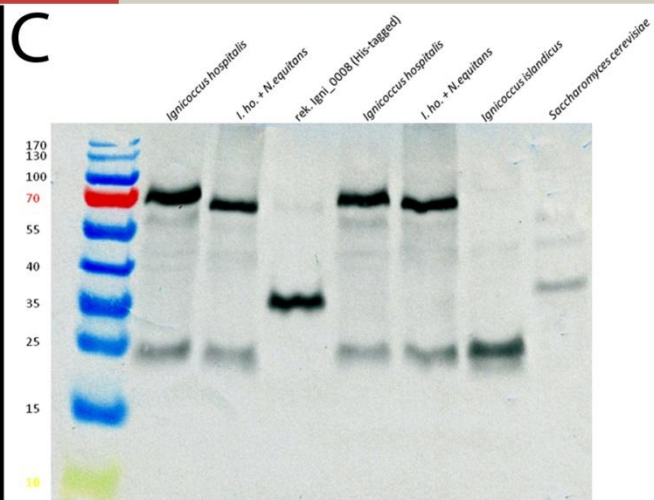
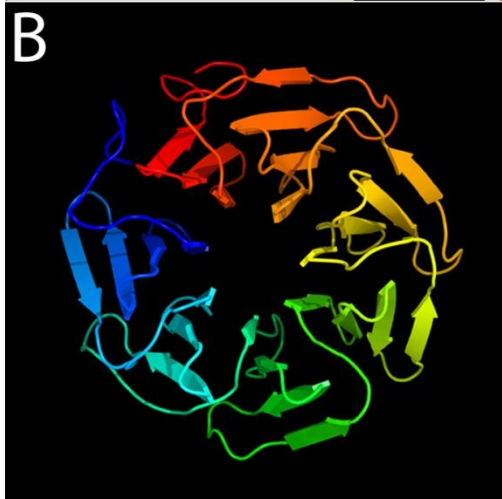


Abbildung 55 WD40-Protein Igni\_0008; (A) PHYRE2 - Top 5 Hits; (B) PHYRE2-Modell der Proteinstruktur; (C) Western Blot (D und E) Immunmarkierung auf Ultradünnschnitt (50nm); AK-Verdünnung jeweils 1:10 000; Balken jeweils 0.5 μm

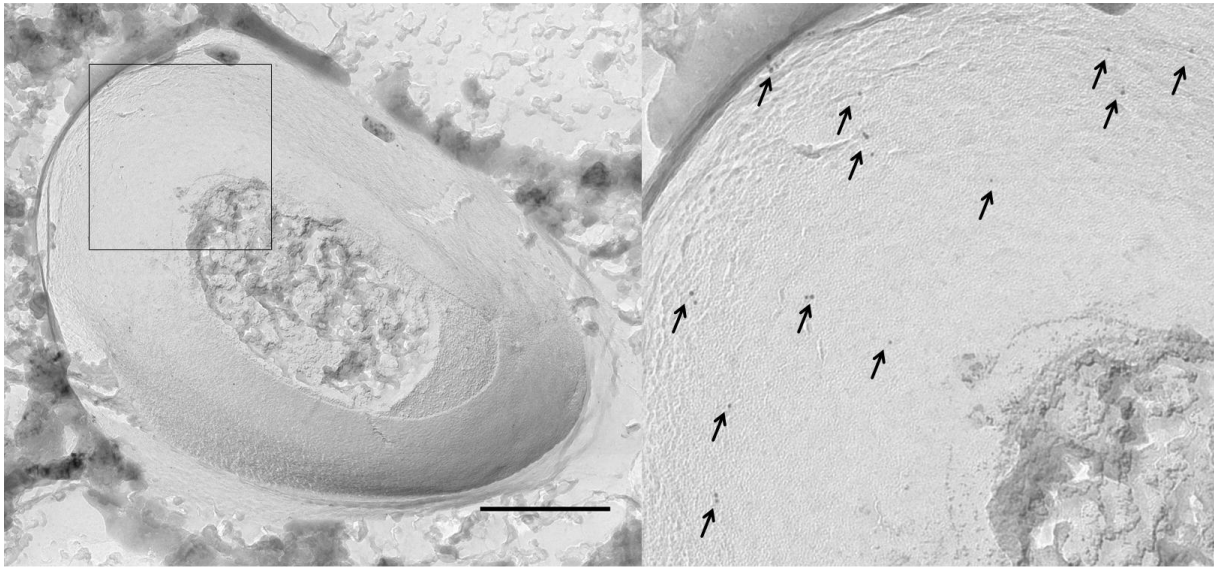


Abbildung 56 Igni\_0008; 'Freeze Fracture Labeling'; AK-Verdünnung 1:100; Balken 0.5 µm

#### 4.2 Proteine mit V4R-Domäne

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die Interesse erweckte, waren Proteine mit 4-Vinylreduktase-Domänen (V4R). Es sind sieben Proteine in *Ignicoccus hospitalis* vorhanden, die eine solche Domäne besitzen. Diese Domäne *per se* ist homolog zu Bet3, eine Untereinheit aus dem eukaryotischen 'TRAPPI vesicle tethering'-Komplex (Podar *et al.*, 2008<sup>2</sup>).

V4R	Gen	SigP	TMD	stationär		Time Course														
				Proteome (RSpC)		Microarray				Proteome (NSpC)										
				Igni	Igni + Nano	Igni		Igni + Nano		Igni		Igni + Nano								
stationär	stationär	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2			
Igni_1332	No	No	96	92	1,02	1,02	0,28	1,13	-1,50	-0,44	-0,62	-0,87	93	40	40	60	51	60	40	16
Igni_0267	No	No	24	/	1,57	0,94	-1,51	-0,05	-0,75	-0,75	0,05	0,50	6	0,3	0,4	10	16	0,6	15	18
Igni_0581	No	No	/	/	-0,24	0,85	-0,25	2,08	-1,12	-0,44	-0,39	-0,49	/	/	/	/	/	/	/	/
Igni_0597	No	No	48	/	1,74	0,94	0,13	-0,21	-1,63	-0,14	-0,35	-0,48	8	10	7	8	22	13	1	1
Igni_0701	No	No	24	10	-0,98	0,92	1,34	-1,51	0,87	0,17	-0,36	-0,44	9	9	10	15	11	0,4	0,5	0,5
Igni_1239	No	No	270	246	0,80	1,00	0,70	0,51	-2,05	-0,17	-0,23	-0,57	203	548	282	140	267	149	145	118
Igni_1243	No	No	868	435	1,32	0,29	-0,04	0,73	-0,26	0,73	-1,04	-1,72	360	490	279	495	234	192	341	192

Abbildung 57 V4R-Proteine; Proteom- und Transkriptom-Daten basierend auf 3.1 und 3.2

Abbildung 57 zeigt die Proteom-/Transkriptom-Daten der beiden Studien (siehe 3.1 und 3.2). Bis auf Igni\_0581 konnten alle V4R-Proteine massenspektroskopisch detektiert werden. Neben den sieben V4R-Proteinen aus *Ignicoccus hospitalis* ist auch eines für *Nanoarchaeum equitans* bekannt (NEQ453) und konnte ebenfalls detektiert werden (Podar *et al.*, 2008<sup>2</sup>, Giannone *et al.*, 2011). Alle V4R-Proteine wurden ebenfalls wieder mit PHYRE2 analysiert (siehe beigelegter Datenträger). Für das Protein Igni\_1332 wurde außerdem ein Antikörper generiert. In Abbildung 58 sind in A und B zunächst Auszüge aus den PHYRE2-Daten zu sehen sowie in C ein Western Blot mit dem Antikörper. Es wurden von den Lysaten jeweils 20 µg Protein eingesetzt bzw. 0.5 µg des affinitätsgereinigten rekombinanten Proteins. Für Co-Kultur, *Ignicoccus hospitalis*-Reinkultur und das gereinigte Protein konnten Signale bei etwa 15 kDa detektiert werden. Die vorhergesagte Größe beträgt ca. 18 kDa. Alle weiteren Banden, die gefunden werden können, deuten auf Homo-Di-/Tri- oder Tetramere hin

(18kDa, 36kDa, 54kDa, 72kDa); Orthologe von Igni\_1332 aus *Ignicoccus islandicus* und *Ignicoccus pacificus* (Iis\_00109, Ipa\_01840; Abbildung 59) werden ebenfalls mit 18 kDa Größe vorhergesagt.

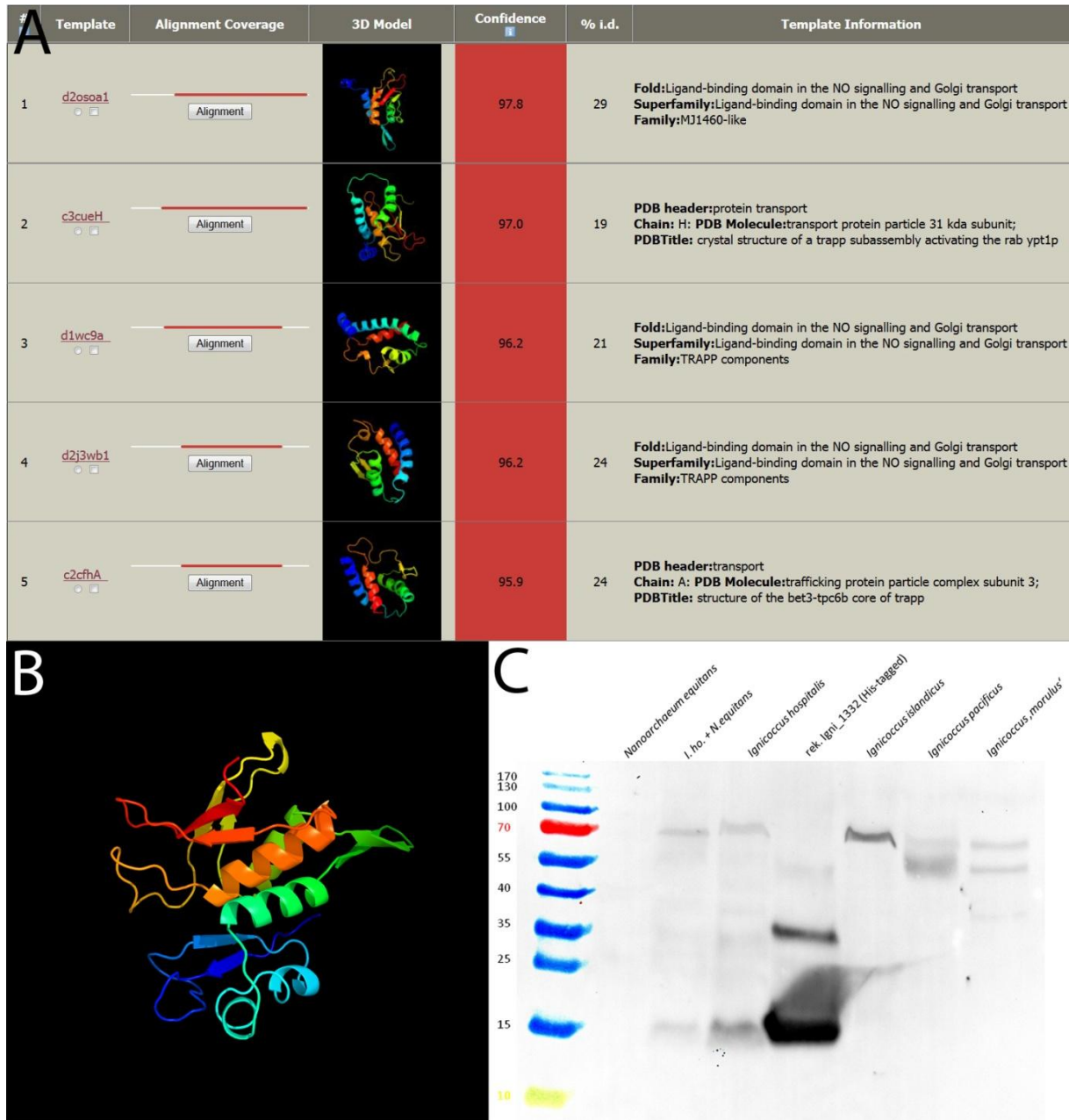


Abbildung 58 V4R-Protein Igni\_1332; (A) PHYRE2 - Top 5 Hits; (B) PHYRE2-Modell der Proteinstruktur; (C) Western Blot

Select	Homolog	T	Product Name	Percent Identity	Alignment On Query Gene	Alignment On Subject Gene	Length	E-value	Bit Score	Domain	Status	Genome Name
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521405743</a>	O	Predicted hydrocarbon binding protein (contains V4R domain)	65.22			163aa	8.0e-76	223	A	F	<a href="#">Ignicoccus islandicus Kol8, DSM 13165 (Closed)</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521409055</a>	O	Predicted hydrocarbon binding protein (contains V4R domain)	51.90			161aa	2.0e-60	184	A	F	<a href="#">Ignicoccus pacificus LPC 33, DSM 13166 (Closed)</a>

Abbildung 59 Orthologe von Igni\_1332; 'Screenshot' aus IMG/JGI

Abbildung 60 A zeigt ein mit Comassie gefärbtes SDS-Gel nach einer Co-Immunpräzipitation mit dem Antikörper  $\alpha$ -Igni\_1332. Die Banden 1-5 wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 53 C). Wie die Tabelle zeigt, waren die Banden 1 und 2 das Igni\_1332-Protein selbst. Der Unterschied der beiden Banden ist vermutlich auf Degradation zurückzuführen: Abbildung B zeigt die verschiedenen tryptischen Peptide der Banden 1 und 2, mit denen das Protein Igni\_1332 identifiziert wurde. Während für Bande 2 15 verschiedene Peptide gefunden wurden, waren es für Bande 1 lediglich 11 verschiedene. Der wichtigste Unterschied findet sich in der obersten Zeile der Tabelle. Dieses Peptid (CLIHVKPME) ist die C-terminale Sequenz des Proteins und war in Bande 1 nicht zu detektieren. Diese Sequenz entspricht etwa 1 kDa. Die N-terminale Sequenz (GSETYSLYVDESGSLR) hingegen war in beiden Banden in reichlichen Mengen zu finden. Weiterhin lieferte Bande 3 ein eindeutiges Ergebnis: Es handelte sich um eine Untereinheit eines Phosphat-ABC-Transporters (Igni\_0975). Die Banden 4 und 5 sind aufgrund der relativ geringen 'Spectral Counts' (SpC) und der geringen Anzahl spezifischer Peptide weniger eindeutig: Bei Bande 4 handelt es sich vermutlich um eines der beiden CDC48-Proteine (Igni\_1431, Igni\_0693) bzw. für Bande 5 legt das Ergebnis die Phosphoenolpyruvatsynthetase (Igni\_1113) nahe, ein Protein aus dem CO<sub>2</sub>-Fixierungs-Weg.

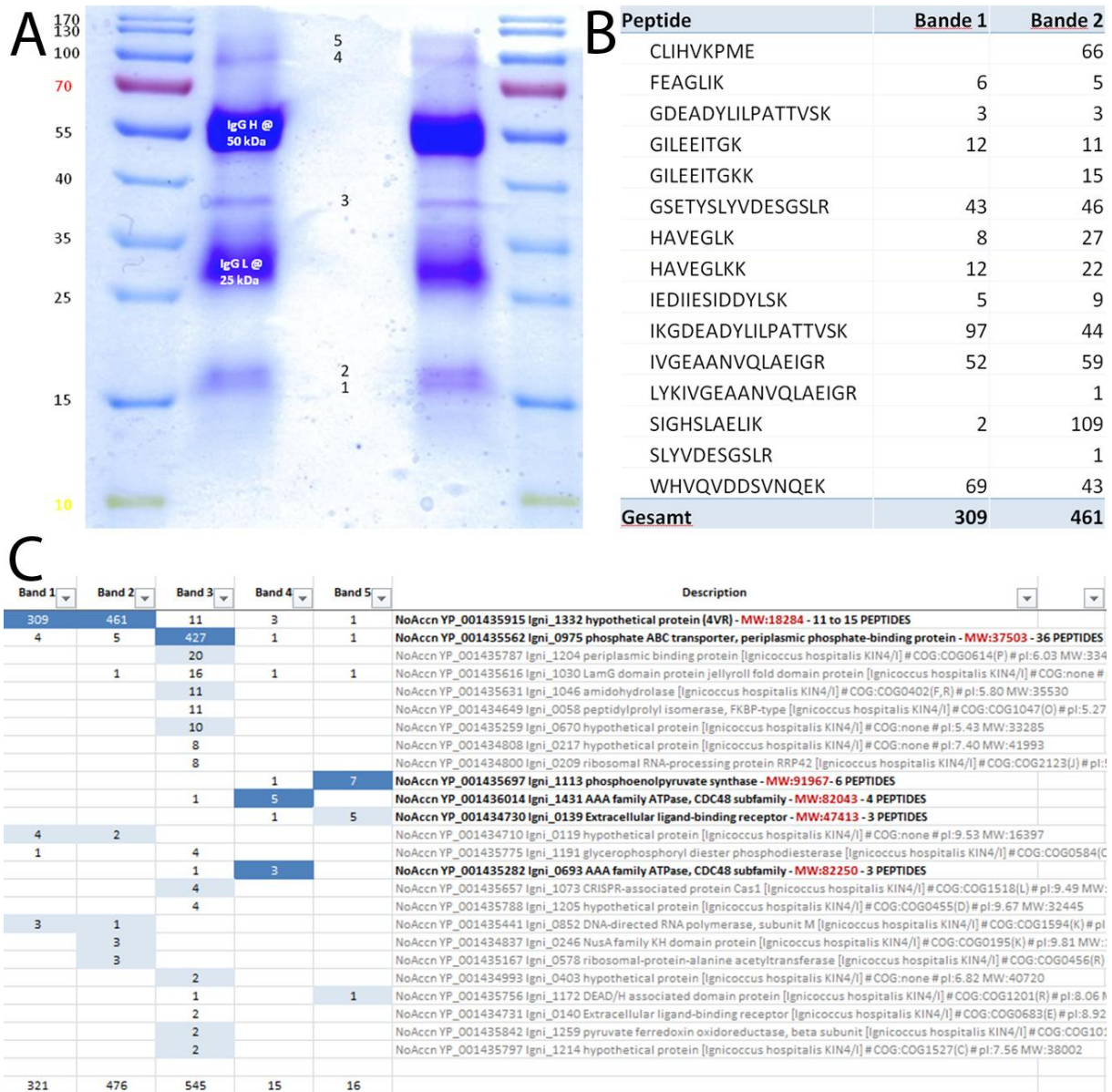


Abbildung 60 Igni\_1332; Co-Immunpräzipitation; (A) analysiertes SDS-Gel; (B) analysierte tryptische Peptide der Banden 1 und 2; (C) Analyse der 5 Banden; die besten Treffer aufgrund von SpC und Molekülgröße sind blau hinterlegt

Neben Western Blot und Co-Immunpräzipitation wurde der  $\alpha$ -Igni\_1332-Antikörper ebenfalls für Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten verwendet. Für die gezeigten 50 nm-Ultradünnschnitte in Abbildung 61 wurde eine Verdünnung des primären Antikörpers von 1:1000 verwendet. Wie die Beispiele in der Abbildung nahe legen, waren Markierungen nicht nur im Cytoplasma zu finden. Häufig zeigten sich Markierungen nahe der Cytoplasmamembran. Weitere Detailanschnitte zeigen, dass Markierungen auch gehäuft an potentiellen Abschnürungs- oder Fusionierungsstellen von Membranen zu finden waren, entweder als Markierung in der Membran selbst, oder assoziiert mit den unter 2.4 beschriebenen Filament-Strukturen.

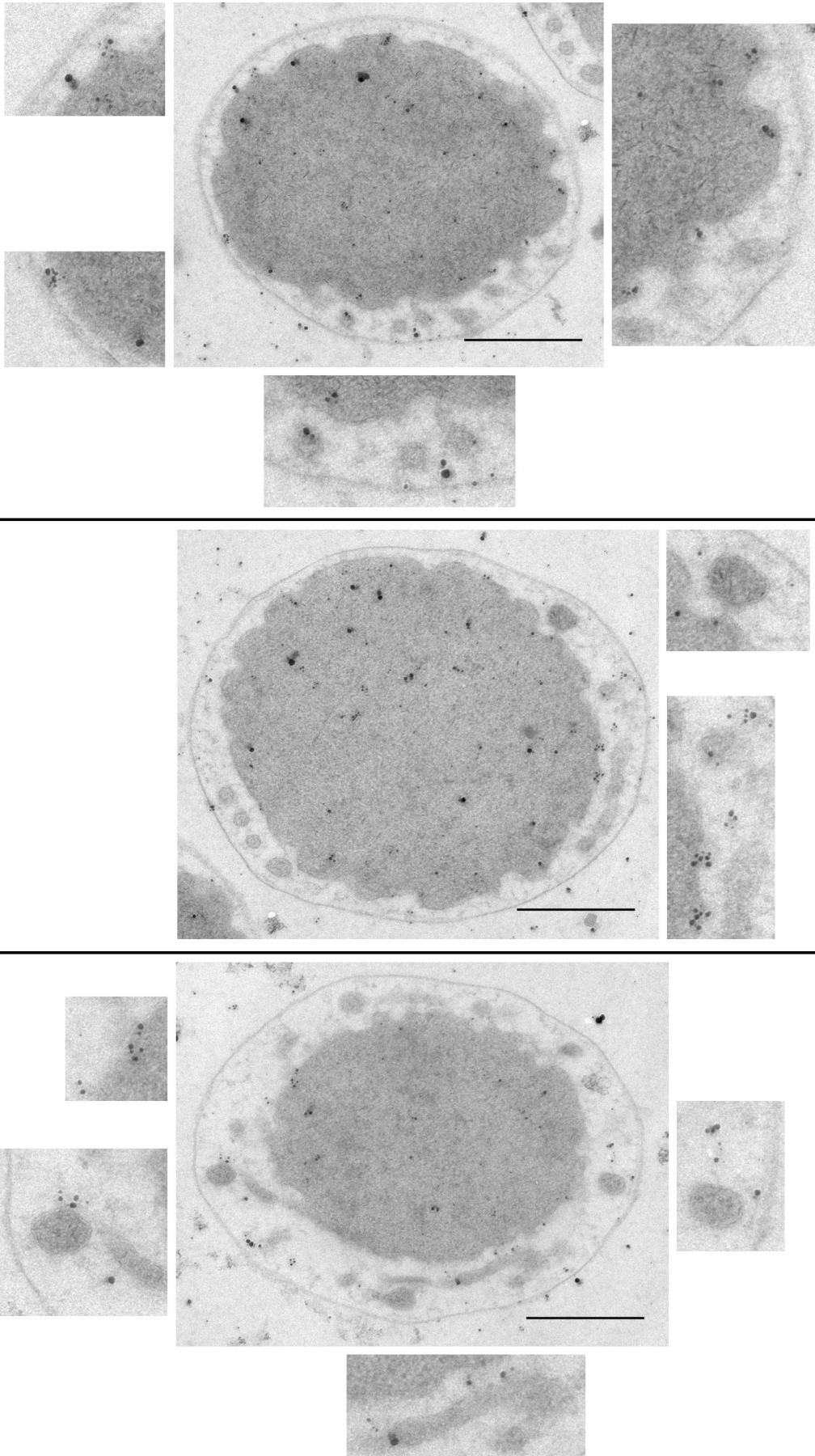


Abbildung 61 V4R-Protein Ig<sub>n</sub>i\_1332; Immunmarkierung auf Ultradünnschnitten; AK-Verdünnung jeweils 1:1000; Balken jeweils 0.5 μm



#### 4.3 AAA-ATPase CDC48/p97

Im Genom/Proteom von *Ignicoccus hospitalis* finden sich zwei ATPasen, die sequenzielle und strukturelle Homologien zu CDC48 aufweisen (Igني\_1431, Igني\_0693). Mit den Proteomanalysen (Abbildung 62) konnte gezeigt werden, dass zumindest eines der beiden CDC48-Proteine (Igني\_1431) in vergleichsweise hohen Mengen in den Zellen vorkommt. Beim Vergleich zwischen Co-Kultur und Reinkultur zeigte sich, dass das Protein in etwa doppelter Menge in der Co-Kultur zu finden war. Im 'Time-Course'-Experiment wurde ein Anstieg von Igني\_1431 sowohl in der Co- als auch der Reinkultur verzeichnet. Weniger auffällig hingegen war Igني\_0693.

CDC48/p97			stationär		Time Course															
			Proteome (RSpC)		Microarray								Proteome (NSpC)							
			Igني	Igني + Nano	Igني				Igني + Nano				Igني				Igني + Nano			
Gen	SigP	TMD	stationär	stationär	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2
Igني_1431	Yes	No	781	1814	1,94	-0,63	-0,10	0,24	0,16	0,59	-1,08	-1,12	398	627	796	813	424	546	653	703
Igني_0693	No	No	46	43	0,68	-1,22	-1,31	-0,82	0,32	0,48	0,41	1,46	35	26	31	21	34	46	41	29

Abbildung 62 CDC48/p97; Proteom- und Transkriptom-Daten basierend auf 3.1 und 3.2

Für Igني\_1431 wurde ein Antikörper generiert, dabei wurde zur Immunisierung die N-terminale Sequenz des Proteins von etwa 25 kDa eingesetzt (220 Aminosäuren). Dies diente dem Zweck, die Spezifität des Antikörpers zu gewährleisten, da beide CDC48-Proteine sehr starke Homologien aufweisen. Zudem sind weitere AAA-ATPasen in *Ignicoccus* zu finden, welche im Allgemeinen stark konserviert sind. Das Blotsignal in den Lysaten korreliert sehr gut mit den vorhergesagten 82 kDa des Proteins, ebenso die rekombinante, verkürzte Version des Proteins (Igني\_1431\_trunc) mit den vorhergesagten 25 kDa (Abbildung 56 C). In einem weiteren Blot wurden alle bekannten *Ignicoccus*-Spezies getestet (Abbildung 64 D). Für alle zeigte sich ein Signal auf etwa gleicher Höhe. Die Suche in den Genomen von *Ignicoccus islandicus* und *Ignicoccus pacificus* zeigte eine sehr starke Konservierung des Proteins (Abbildung 64).

Mittels Fluoreszenzmarkierungsversuche (Abbildung 65) konnte gezeigt werden, dass das CDC48/p97-Protein Igني\_1431 (bzw. Orthologe) in der äußeren Membran der *Ignicoccus*-Zellen zu finden ist. Dieser Befund konnte durch Immunmarkierungen an 50 nm-Ultradünnschnitten von *Ignicoccus hospitalis* bestätigt werden (Abbildung 66). Zusätzlich zur Markierung in der äußeren Membran kann eine Markierung stellenweise auch in der Cytoplasmamembran gefunden werden sowie in der Membran von Vesikeln bzw. Ausläufern des Cytoplasmas. Wie (bisher) jedes Protein ist auch Igني\_1431 im Cytoplasma nachzuweisen.

Zusätzlich zum verwendeten Antikörper gegen Igني\_1431 wurde ein Antikörper gegen CDC48 aus der Hefe getestet, der freundlicherweise von Prof. Buchberger (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt wurde. Dieser lieferte sowohl im Western Blot als auch auf den Ultradünnschnitten negative Ergebnisse (nicht gezeigt). Ebenso war eine Kreuzreaktion des  $\alpha$ -Igني\_1431-Antikörpers mit einem Hefelysate eines Wildtyp-Stamms nicht gegeben (ebenfalls nicht gezeigt).

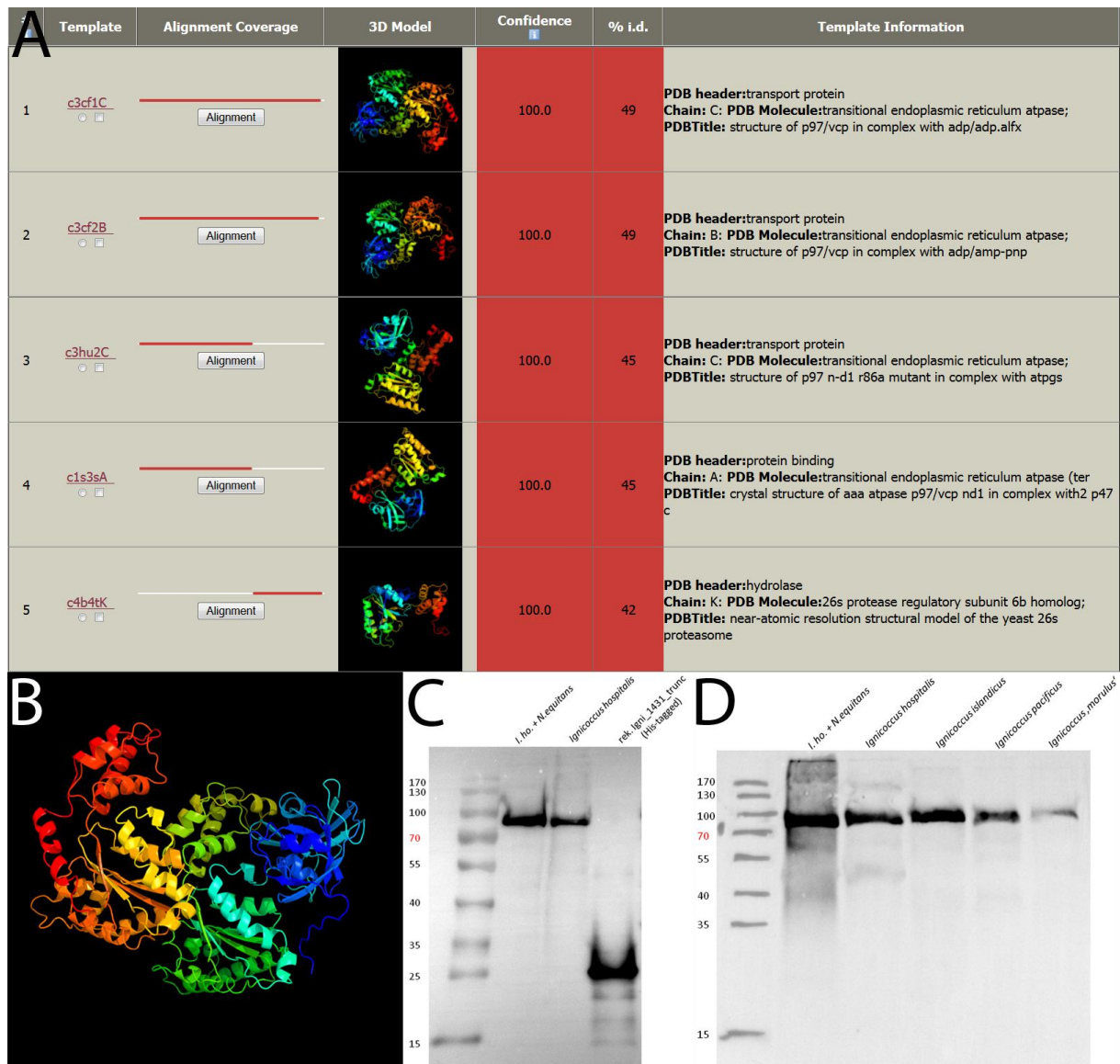


Abbildung 63 CDC48-Homolog Igni\_1431; (A) PHYRE2 - Top 5 Hits; (B) PHYRE2-Modell der Proteinstruktur; (C) und (D) Western Blots

Select	Homolog	T	Product Name	Percent Identity	Alignment On Query Gene	Alignment On Subject Gene	Length	E-value	Bit Score	Domain	Status	Genome Name
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521409025</a>	O	AAA family ATPase, CDC48 subfamily	92.08			722aa	0.0e+00	1351	A	F	<a href="#">Ignicoccus pacificus LPC 33, DSM 13166 (Closed)</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521406974</a>	O	AAA family ATPase, CDC48 subfamily	90.82			757aa	0.0e+00	1332	A	F	<a href="#">Ignicoccus islandicus Kol8, DSM 13165 (Closed)</a>

Abbildung 64 Orthologe von Igni\_1431; 'Screenshot' aus IMG/JGI

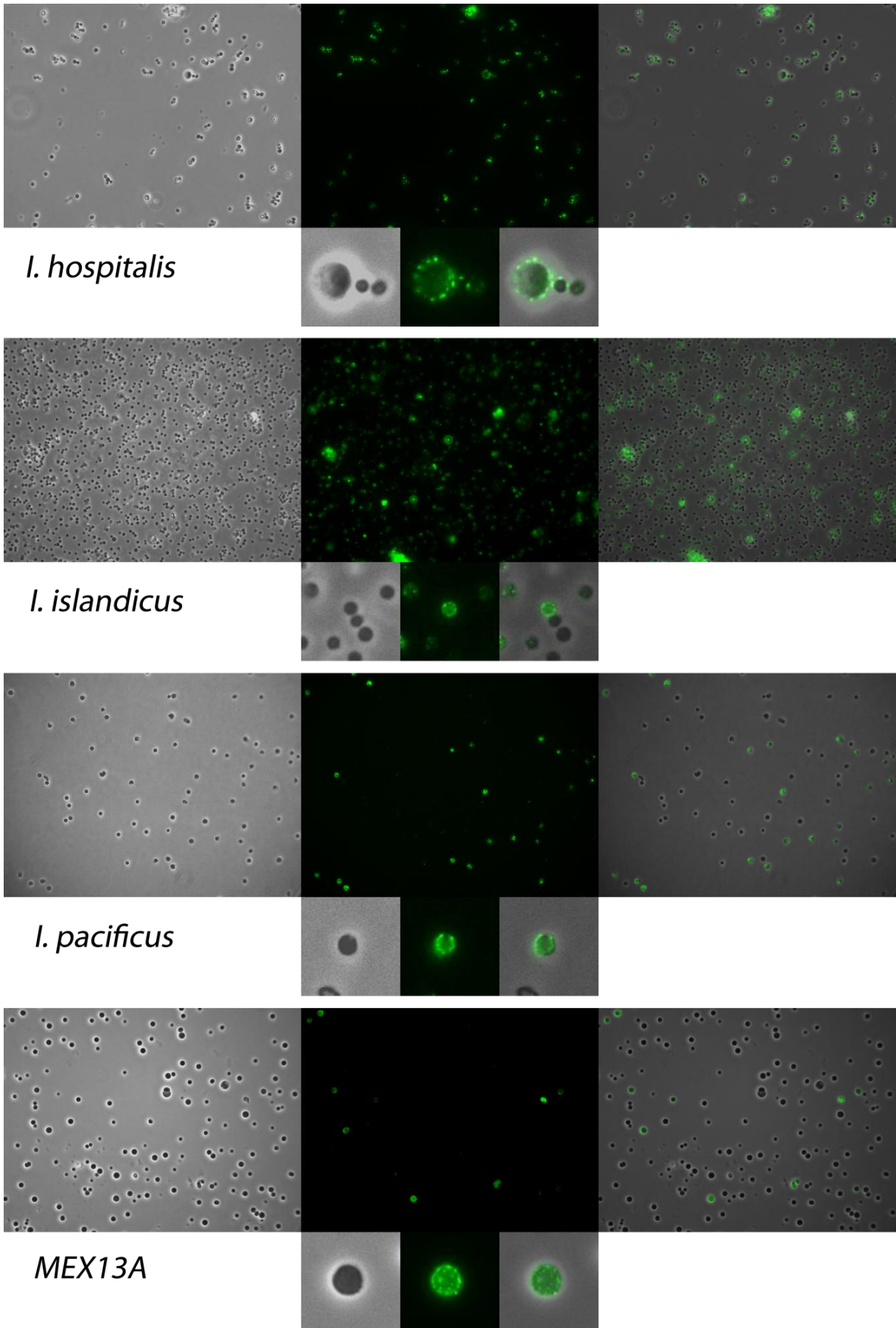


Abbildung 65 CDC48-Homolog Igni\_1332; Fluoreszenzmarkierung; AK-Verdünnung jeweils 1:250

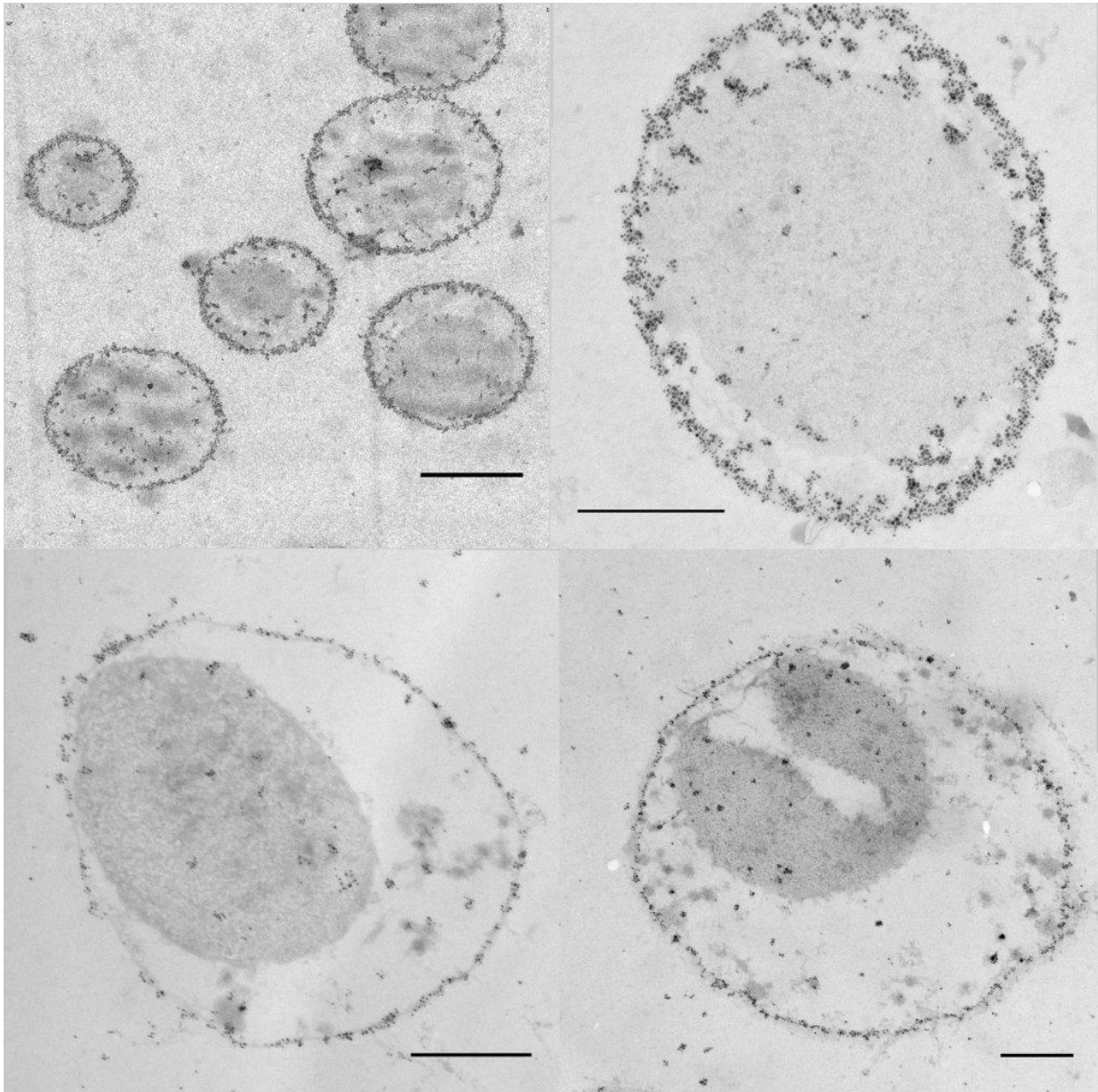


Abbildung 66 CDC48-Homolog Igni\_1332; Immunmarkierung auf Ultradünnschnitten; AK-Verdünnung jeweils 1:200; Balken 1  $\mu\text{m}$  (oben links) sonst jeweils 0.5  $\mu\text{m}$

#### 4.4 ESCRT-III-System

In Eukaryoten dient das ESCRT-System der Manipulation von Membranen bei zahlreichen zellulären Prozessen. Beispielsweise spielt das ESCRT-III-System bei der Ausbildung von MVBs ('multivesicular bodies') eine entscheidende Rolle. Für *Sulfolobus* wurde eine Beteiligung der ESCRT-III-Komponenten an der Zellteilung gezeigt (Lindås *et al.*, 2008; Samson *et al.*, 2008). Bei den Crenarchaeota können auf Genomebene homologe Komponenten des ESCRT-III-Systems innerhalb der Sulfolobales und der Desulfurococcales gefunden werden (Makarova *et al.*, 2010). Hierzu gehört ein Operon, bestehend aus den 'coiled-coil'-Proteinen CdvA und CdvB (=Snf7/Vps32) sowie einer AAA-ATPase CdvC (=Vps4). Daneben existieren verteilt im Genom weitere 'Snf7-like'-Proteine. Im Genom von *Ignicoccus hospitalis* findet man ebenfalls ein entsprechendes Operon (Igni\_0996, Igni\_0995, Igni\_0994). Neben dem nur entfernt zu Snf7 verwandten Igni\_0995 aus dem Operon (Lindås *et al.*, 2008) finden sich

zwei weitere 'Snf7-like'-Proteine (Igni\_0101, Igni\_1156). Interessanterweise konnten die wenigsten dieser annotierten Proteine in den Proteomanalysen gefunden werden.

ESCRT			stationär		Time Course															
			Proteome (RSpC)		Microarray								Proteome (NSpC)							
			Igni	Igni + Nano	Igni				Igni + Nano				Igni				Igni + Nano			
Gen	SigP	TMD	stationär	stationär	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2
Igni_0994	No	No	/	/	-0,35	0,07	0,07	-0,67	2,28	0,14	-0,7	-0,9	7	6	4	0,1	7,5	0,3	0,4	0,4
Igni_0995	No	No	/	/	-0,01	-0,70	-0,05	-1,82	1,5	0,95	0,18	-0,1	/	/	/	/	/	/	/	/
Igni_0996	No	No	/	22	0,13	-1,01	-0,71	-1,51	0,68	1,34	0,15	0,93	/	/	/	/	/	/	/	/
Igni_0101	No	No	/	/	-0,28	1,41	-0,48	1,64	0,11	-0,98	-0,58	-0,84	/	/	/	/	/	/	/	/
Igni_1156	No	No	/	/	-0,09	-0,91	0,23	-0,66	2,25	0,24	-0,46	-0,59	/	/	/	/	/	/	/	/

Abbildung 67 Proteine des ESCRT-Systems; Proteom- und Transkriptom-Daten basierend auf 3.1 und 3.2

#### 4.4.1 Vps4

Die ATPase Vps4 (Igni\_0994) konnte erst in der zweiten Proteom-Analyse detektiert werden. Die relative Häufigkeit gemessen in 'Spectral Counts' ist jedoch sehr gering. Während in der *Ignicoccus hospitalis*-Reinkultur die Werte im Laufe der Zeit allmählich absinken, ist in der Co-Kultur eine scharfe Zäsur ab dem Zeitpunkt L2 zu verzeichnen. Diese Zäsur kann auch im Western Blot (Abbildung 68 C) bei gleich aufgetragenen Proteilmengen von Zell-Lysaten der jeweiligen Zeitpunkte nachvollzogen werden (S3; nicht verwendeter Zeitpunkt der Proteomanalysen; entspricht E aus Abbildung 51). Für die Reinkultur sowie Zeitpunkt L1 der Co-Kultur zeigt sich, dass eine Bande auf Höhe der vorhergesagten 41 kDa detektiert werden kann. Da ATPasen stark konserviert sind, wird aus den PHYRE2-Analysen ersichtlich, dass strukturelle Ähnlichkeiten zur bereits angesprochenen AAA-ATPase CDC48/p97/VCP bestehen. Ähnliche Ergebnisse konnten für die orthologen Proteine aus *Ignicoccus islandicus* und *Ignicoccus pacificus* erhalten werden (siehe beiliegende 'Supplemental Blu-ray Disc') und erklären evtl. die zusätzlichen Banden in Abbildung 68 E.

Ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das entsprechende Protein aus *Sulfolobus acidocaldarius* (Saci1372) lieferte zwar ein gutes Ergebnis für *Sulfolobus solfataricus*, jedoch nur sehr schwache Banden für alle *Ignicoccus*-Spezies auf der zu erwartenden Höhe. Ein Immunmarkierungsversuch mit diesem Antikörper (+ goat anti rabbit ultrasmall) an Ultradünnschnitten von *Ignicoccus hospitalis*-Zellen lieferte erwartungsgemäß keine Markierungen (nicht gezeigt). Hingegen zeigten die Antikörper gegen das eigentliche Vps4-Protein Igni\_0994 aus *Ignicoccus hospitalis* eine deutliche Markierung im Cytoplasma und in der Cytoplasmamembran der Zellen. Bei vorhandenen *Nanoarchaeum equitans*-Zellen wurden diese ebenfalls im Cytoplasma markiert. (Abbildung 70)

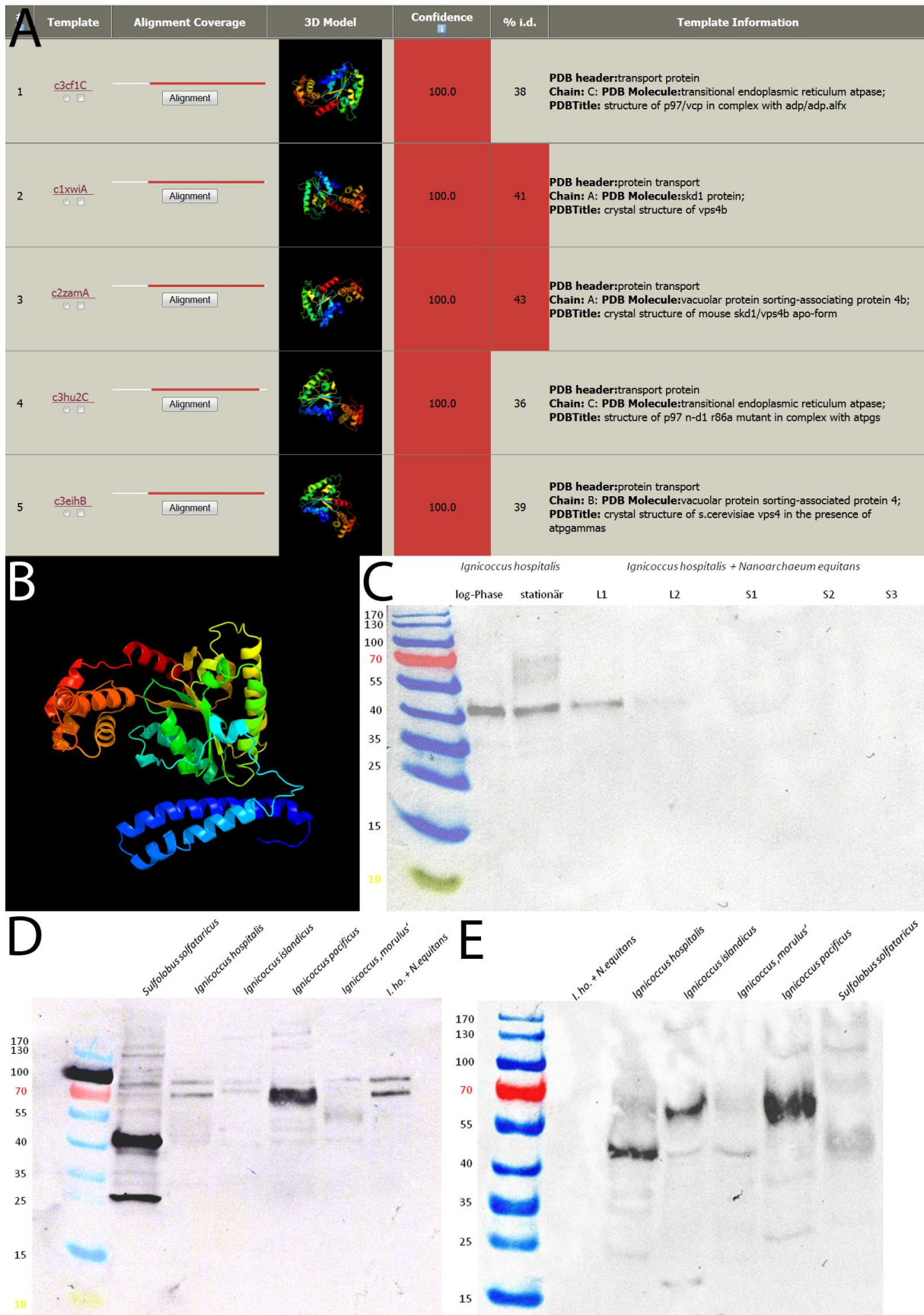


Abbildung 68 Vps4 *Igni\_0994*; (A) PHYRE2 - Top 5 Hits; (B) PHYRE2-Modell der Proteinstruktur; (C) Western Blot mit 'Time-Course'-Proben der Co-Kultur; (D) Western Blot mit AK gegen entsprechendes Protein aus *Sulfolobus acidocaldarius* (Saci1372); (E) Western Blot mit AK gegen *Igni\_0994*





<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521408771</a>	○	ATPases of the AAA+ class	69.48			366aa	0.0e+00	546	A	F	<a href="#">Ignicoccus pacificus LPC 33_DSM 13166 (Closed)</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521405932</a>	○	ATPases of the AAA+ class	67.67			364aa	0.0e+00	508	A	F	<a href="#">Ignicoccus islandicus Kol8_DSM 13165 (Closed)</a>

Abbildung 69 Orthologe von Igni\_0994; Screenshot aus IMG/JGI

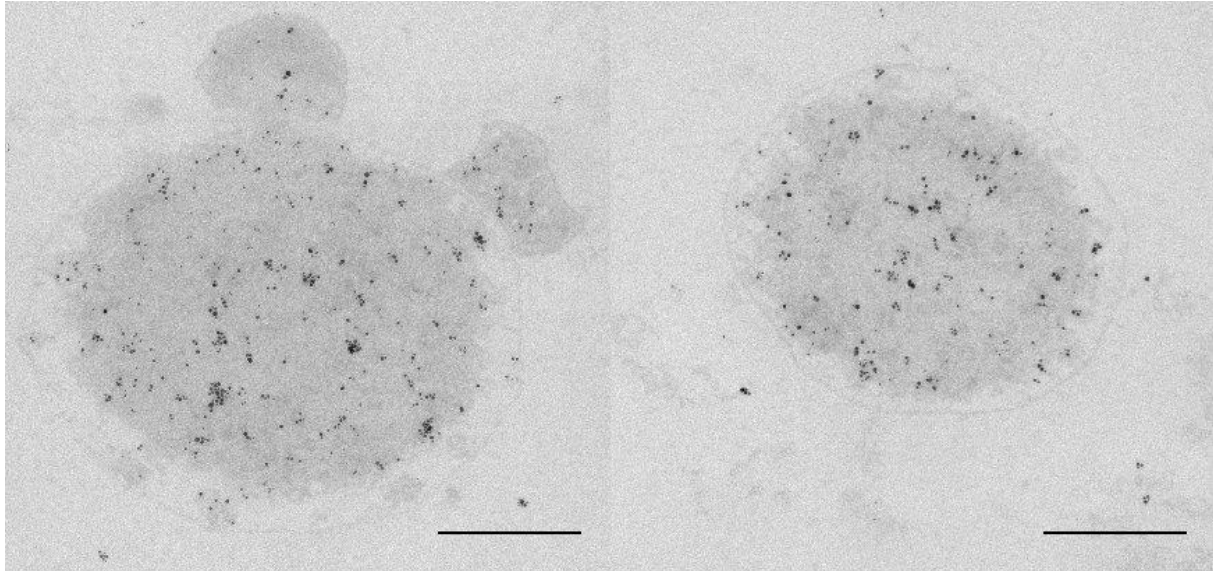


Abbildung 70 Vps4 (Igni\_0994); Immunmarkierung auf Ultradünnschnitten; AK-Verdünnung jeweils 1:100; Balken 0.5 µm

#### 4.4.2 CdvB

Wie erwähnt besitzt das Protein Igni\_0995 nur entfernte Homologie zu Snf7-Proteinen. PHYRE2-Analysen legen einen Transkriptionsfaktor nahe für dieses Protein. (Nebenbei bemerkt wurde eine Rolle von Snf7 als Transkriptionsfaktor ebenfalls nachgewiesen; Weiss *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde auch kein Antikörper gegen dieses Protein generiert. Dennoch standen zwei Antikörper gegen entsprechende Proteine aus dem Operon zweier *Sulfolobus* Spezies zur Verfügung: *Sulfolobus acidocaldarius* (Saci1373) und *Sulfolobus solfataricus* (Sso0910). Im Western Blot mit dem Saci1373-Antikörper konnten für *Ignicoccus hospitalis* neben zahlreichen schwachen Banden zwei stärkere Banden ähnlich denen von *Sulfolobus solfataricus* gefunden werden. In den Ultradünnschnitten zeigten beide Antikörper ein ähnliches Bindungsverhalten (siehe Quantifizierung). Als sekundärer Antikörper wurde für Saci1373 ein Rabbit-anti-goat Antikörper gekoppelt mit 10 nm Goldpartikeln verwendet (Verdünnung 1:20). Im Falle von Sso0910 wurde auf Protein A gekoppelt mit 6 nm Gold zurückgegriffen (ebenfalls Verdünnung 1:20). Die primären Antikörper wurden dabei 1:20 (Saci1373) bzw. 1:200 (Sso0910) eingesetzt.

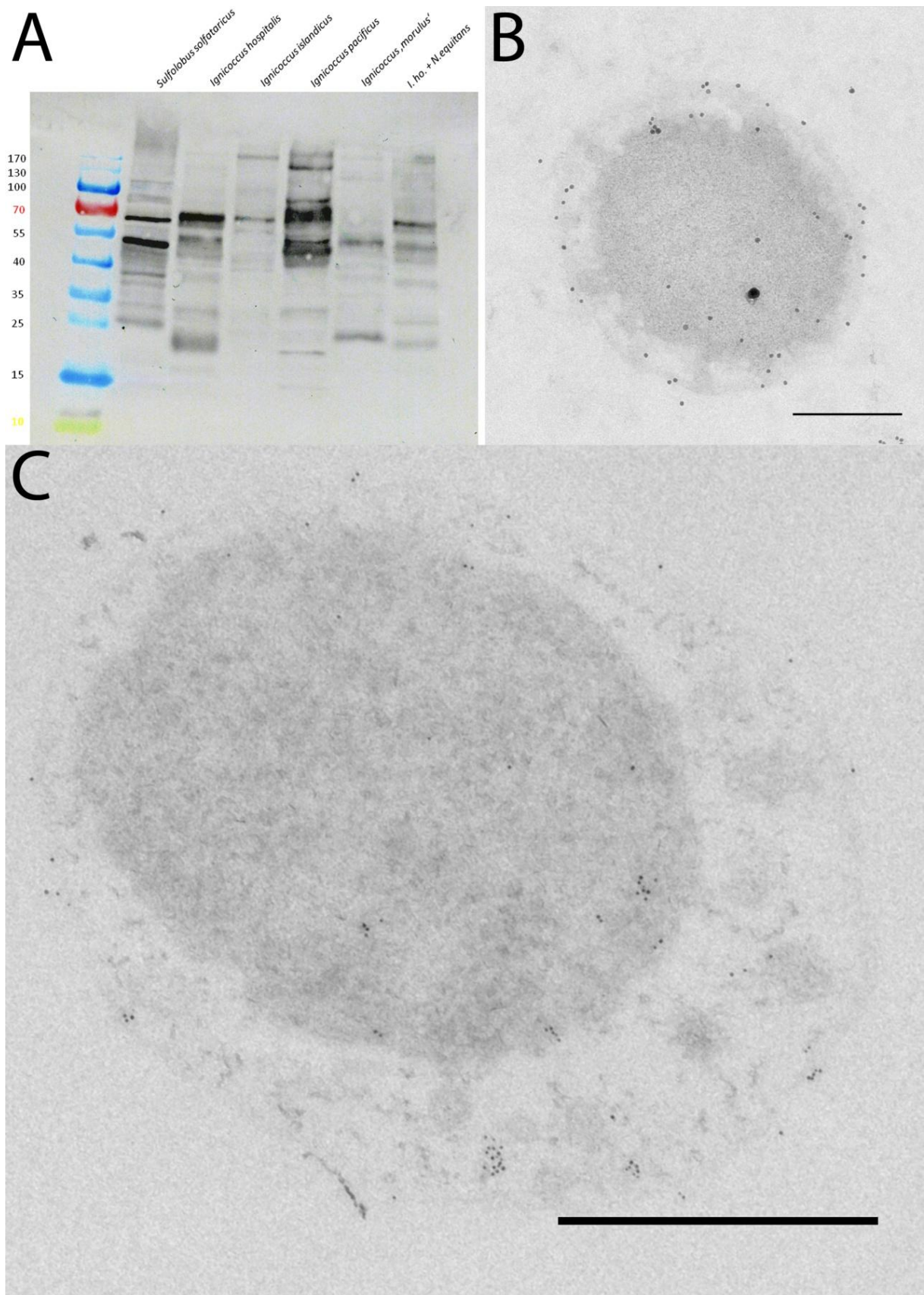


Abbildung 71 (A) Western Blot mit  $\alpha$ -Saci1373; (B) Markierung auf dem Ultradünnschnitt mit  $\alpha$ -Saci1373 (+ RAG-10 nm); (C) Markierung auf dem Ultradünnschnitt mit  $\alpha$ -Sso0910 (+ Protein A-6 nm); Balken jeweils 0.5  $\mu$ m



### Quantifizierung der Markierungen der *Sulfolobus* ESCRT-III-Antikörper

Antikörper	äußere Membran	Cytoplasma-membran	IMC	Cytoplasma + Vesikel/CP-Ausläufer	SNR
$\alpha$ -Sso0910	22%	7%	16%	55% (51%+4%)	8
$\alpha$ -Saci1373	27%	16%	12%	45% (34%+11%)	3
$\alpha$ -Sso0619	1%	4%	18%	75% (73%+4%)	1,2

#### 4.4.3 CdvA

Mit  $\alpha$ -Saci1374 und  $\alpha$ -Igni\_0996 standen zwei Antikörper gegen das 'coiled-coil' Protein CdvA aus *Sulfolobus acidocaldarius* bzw. *Ignicoccus hospitalis* zur Verfügung. Während  $\alpha$ -Saci1374 im Blot eine gute intraspezifische Kreuzreaktivität gegen *Sulfolobus solfataricus* zeigte (Abbildung 72 A), lieferte der Antikörper gegen *Ignicoccus*-Lysate keine brauchbaren Signale (nicht gezeigt). Mit  $\alpha$ -Igni\_0996 konnte ein Signal im Western Blot im Bereich der vorhergesagten 26 kDa für das Lysat der *Ignicoccus hospitalis* Reinkultur detektiert werden (Abbildung 72 B). Die Detektion war jedoch nur mit relativ langer Belichtungszeit erfolgreich, was eine geringe Menge des Proteins in den Zellen nahe legt; bis auf eine Ausnahme war das Protein in den verschiedenen Proben der Proteom-Analysen auch nicht nachzuweisen (Abbildung 67).

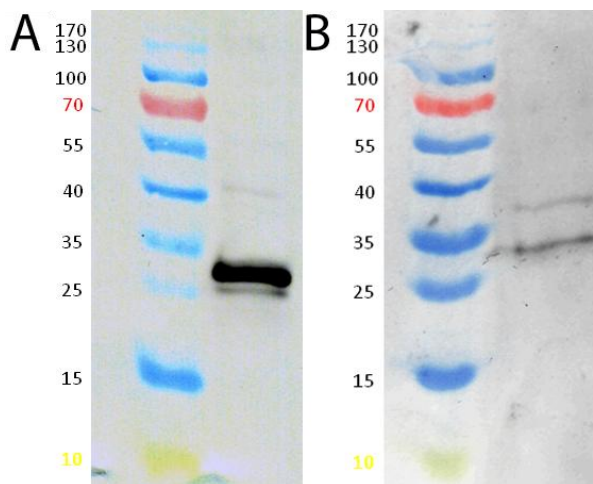


Abbildung 72 Western Blots; (A)  $\alpha$ -Saci1374 gegen *Sulfolobus solfataricus*, 1:5000 (B)  $\alpha$ -Igni\_0996 gegen *Ignicoccus hospitalis*, 1:10 000

Trotz der vermutlich geringen Menge an Protein in den Zellen lieferten Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten interessante Ergebnisse:

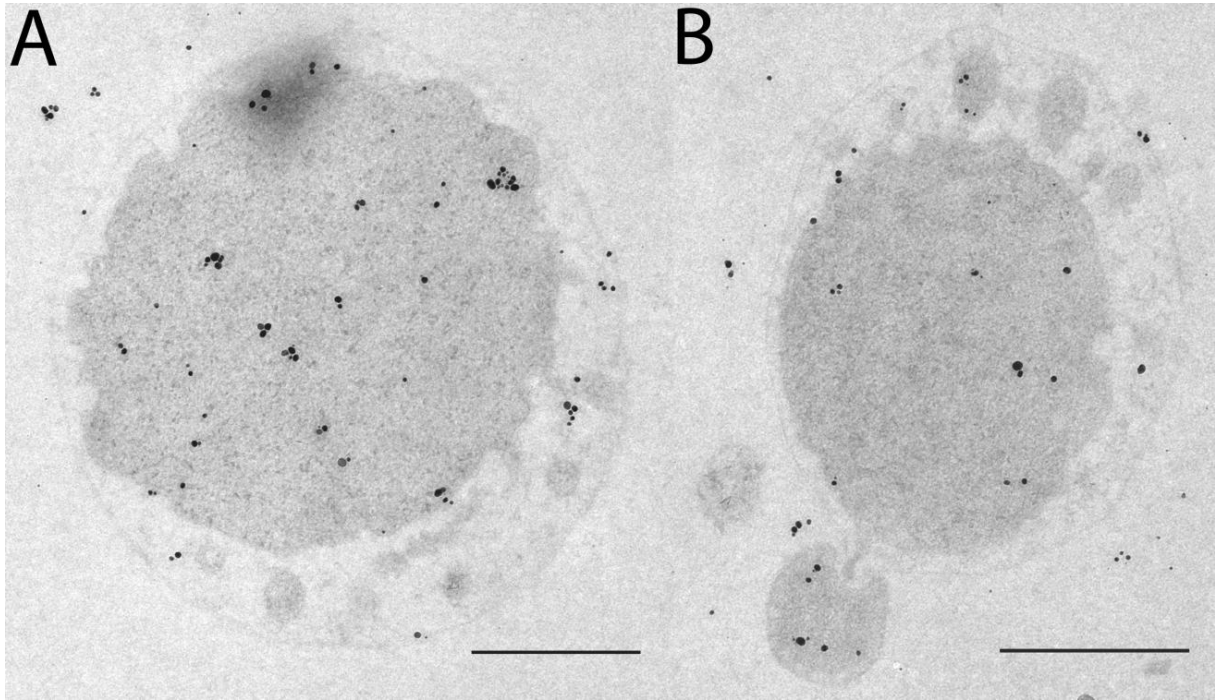


Abbildung 73 CdvA (IgNi\_0996); Immunmarkierung auf Ultradünnschnitten; AK-Verdünnung jeweils 1:100; Balken 0.5 µm

Ein Großteil der immunmarkierten Zellen wies eine mehr oder minder homogene Verteilung im Cytoplasma auf (Abbildung 73). Ebenso konnten im Cytoplasma von *Nanoarchaeum equitans* Markierungen gefunden werden (Abbildung 73 B). Daneben waren aber auch vereinzelt Zellen zu finden, die von diesem Markierungsmuster abwichen. So konnten Zellen gefunden werden, in denen gehäuft Markierungen in der Region des "Cytoplasmapols" auftraten (Abbildung 74 A und B). Mit Abbildung 74 C konnte auch eine Zelle gefunden werden, in der eine gehäufte Markierung durch den Äquator des Cytoplasmas läuft. In dieser Zelle sind Markierungen auch gehäuft am anderen Pol ("Periplasmapol") der Zelle zu finden. Abseits des "Kern"-Cytoplasmas verlaufen hier zahlreiche Ausläufer bzw. Vesikel, mit denen das Protein assoziiert zu sein scheint.

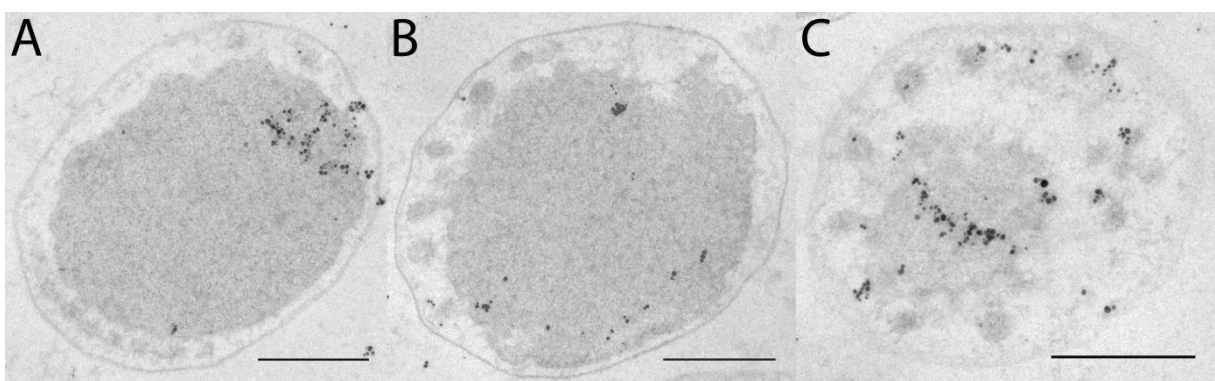


Abbildung 74 CdvA (IgNi\_0996); Immunmarkierung auf Ultradünnschnitten; AK-Verdünnung jeweils 1:1000; Balken 0.5 µm

#### 4.4.4 'Snf7-like'-Proteine

Wie bereits erwähnt besitzt auch *Ignicoccus hospitalis* zwei 'Snf7-like'-Proteine außerhalb des Operons. Für beide Proteine (IgNi\_0101 und IgNi\_1156) konnten Orthologe in den Genomen von

*Ignicoccus islandicus* (Iis\_00545 und Iis\_01576) und *Ignicoccus pacificus* (Ipa\_01416 und Ipa\_00014) gefunden werden (Abbildung 75 und 76).

Select	Homolog	T	Product Name	Percent Identity	Alignment On Query Gene	Alignment On Subject Gene	Length	E-value	Bit Score	Domain	Status	Genome Name
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521408631</a>	O	Conserved protein implicated in secretion	43.96			179aa	2.0e-45	147	A	F	<a href="#">Ignicoccus pacificus LPC 33_DSM 13166 (Closed)</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521406179</a>	O	Conserved protein implicated in secretion	40.57			178aa	2.0e-38	128	A	F	<a href="#">Ignicoccus islandicus Ko8_DSM 13165 (Closed)</a>

Abbildung 75 Orthologe von Igni\_0101; Ipa\_01416 und Iis\_00545

Select	Homolog	T	Product Name	Percent Identity	Alignment On Query Gene	Alignment On Subject Gene	Length	E-value	Bit Score	Domain	Status	Genome Name
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521407229</a>	O	Conserved protein implicated in secretion	66.67			212aa	2.0e-106	305	A	F	<a href="#">Ignicoccus pacificus LPC 33_DSM 13166 (Closed)</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2521407210</a>	O	Conserved protein implicated in secretion	57.77			214aa	5.0e-85	250	A	F	<a href="#">Ignicoccus islandicus Ko8_DSM 13165 (Closed)</a>

Abbildung 76 Orthologe von Igni\_1156; Ipa\_00014 und Iis\_01576

Gegen die entsprechenden *Ignicoccus hospitalis*-Proteine (Igni\_0101 und Igni\_1156) wurden Antikörper generiert. Im Western Blot war für Igni\_0101 (Abbildung 77 A) die stärkste Bande zwischen 55 und 70 kDa zu detektieren. Daneben waren weitere, schwächere Banden bei knapp 25 kDa, bei etwa 40 kDa, zwischen 70 und 100 kDa und zwei über 130 kDa ersichtlich. In der Co-Kultur fehlte davon die unterste sowie die ca. 80 kDa-Bande. Im Western Blot mit  $\alpha$ -Igni\_1156 (Abbildung 77 B) konnte eine Bande im Gesamtzelllysate von *Ignicoccus hospitalis* bei etwas über 70 kDa detektiert werden sowie eine weitere schwächere bei etwa der Hälfte (zwischen 35 kDa und 40 kDa).

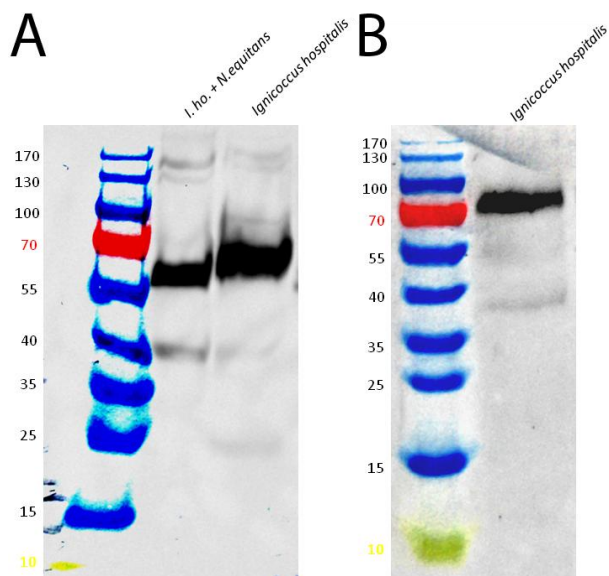


Abbildung 77 Western Blots gegen 'Snf7-like'-Proteine (A) Igni\_0101 (B) Igni\_1156; eingesetzt wurden jeweils 10 $\mu$ g Protein der jeweiligen Lysate, der primäre Antikörper 1:5000, der sekundäre 1:10000

Beide Antikörper wurden auch wieder an Ultradünnschnitten á 50 nm getestet. Mit  $\alpha$ -SSO0619 stand auch ein Antikörper gegen ein 'Snf7-like'-Protein aus *Sulfolobus solfataricus* (ebenfalls außerhalb der

Operon-Struktur) zur Verfügung und konnte ebenfalls an Ultradünnschnitten (von *Ignicoccus hospitalis*) getestet werden. Für alle drei Antikörper zeigt sich eine Bindung im Cytoplasma (siehe auch Quantifizierung für  $\alpha$ -SSO0619 unter 4.4.2). Vereinzelt können auch Markierungen an Cytoplasmaausläufern/Vesikeln gefunden werden. Für den Antikörper  $\alpha$ -Igni\_0101 konnte auch eine Markierung in *Nanoarchaeum equitans* gezeigt werden.

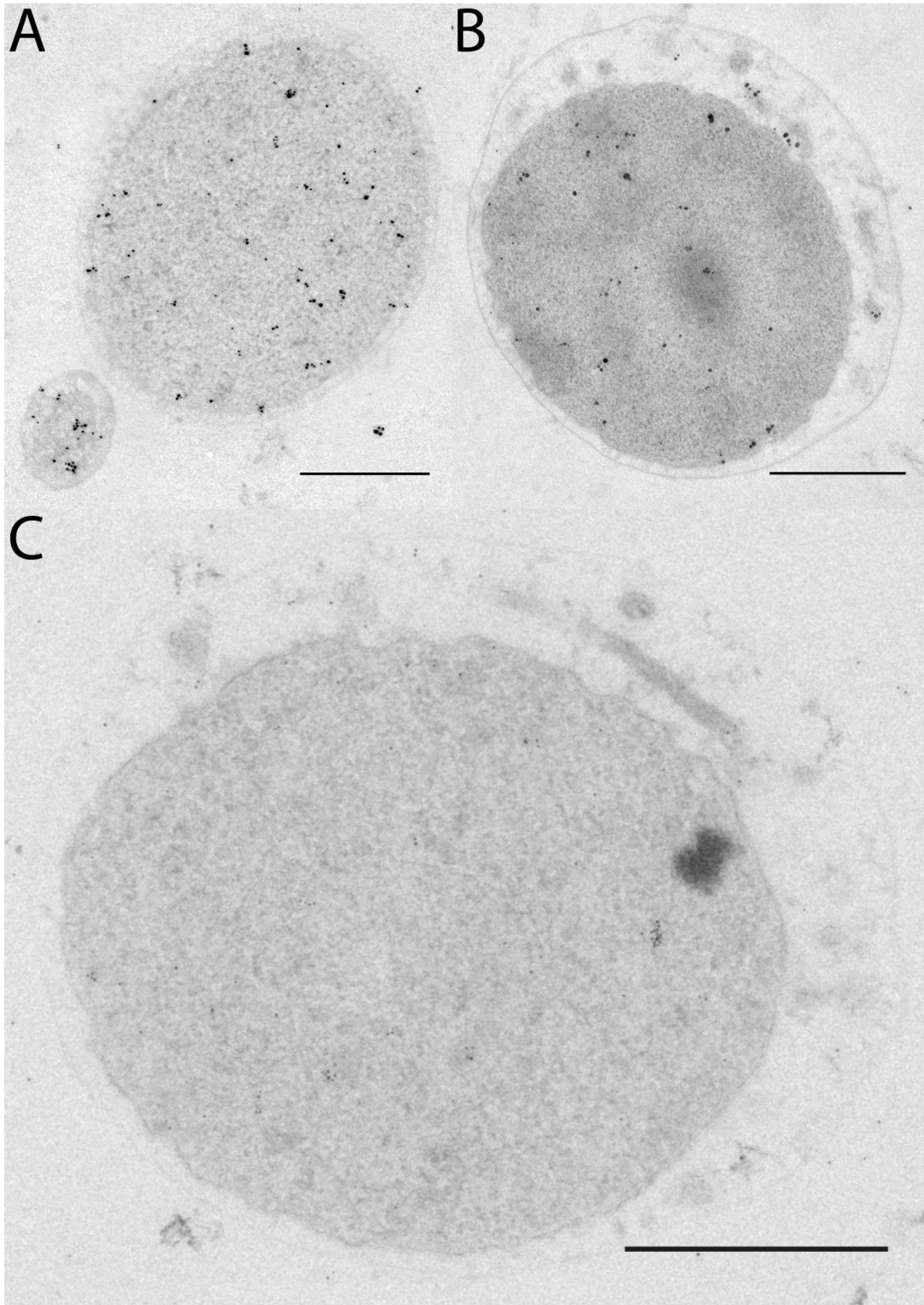


Abbildung 78 Immunmarkierung an *Ignicoccus hospitalis*-Ultradünnschnitten; (A)  $\alpha$ -Igni\_0101 (B)  $\alpha$ -Igni\_1156 (C)  $\alpha$ -SSO0619; Verdünnung in (A) und (B) jeweils 1:100 für den primären und 1:50 für den sekundären goat- $\alpha$ -rabbit ultrasmall Antikörper; (C) 1:200 für den primären Antikörper und 1:20 für 6 nm-Protein A; Balken jeweils 0.5  $\mu$ m

## 4.5 Weitere Proteine

### 4.5.1 Sec61 $\beta$

Sec61 $\beta$  wurde in erster Linie als Ziel ausgewählt aufgrund der ersten Proteomanalyse, in der das Protein ausschließlich in der Co-Kultur zu detektieren war. Die 'Time-Course'-Proben konnten dies jedoch nicht bestätigen.

Sec61 $\beta$			stationär				Time Course								Proteome (NSpC)									
			Proteome (RSpC)				Microarray								Proteome (NSpC)									
			Igni		Igni + Nano		Igni				Igni + Nano				Igni				Igni + Nano					
Gen	SigP	TMD	stationär	stationär	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2	L1	L2	S1	S2
Igni_1061	No	No	0	77	-0,50	0,46	-1,14	-1,12	0,14	1,93	0,44	-0,22	46	30	1	1	22	2	43	2				

Abbildung 79 Sec61 $\beta$ ; Proteom- und Transkriptom-Daten basierend auf 3.1 und 3.2

Als Antikörper stand sowohl  $\alpha$ -Igni\_1061 gegen das entsprechende Protein aus *Ignicoccus hospitalis* gerichtet zur Verfügung als auch ein Antikörper für eukaryotisches Sec61 $\beta$ , generiert gegen ein kleines Peptid dieses Proteins (Lehrstuhl Prof. Witzgall, Universität Regensburg). Derartige Antikörper sind auch kommerziell zu erwerben und dienen hauptsächlich dem Zweck als Marker für das endoplasmatische Reticulum in Eukaryoten. Im Western Blot (Abbildung 80) zeigten sich für  $\alpha$ -Igni\_1061 mehrere Banden: bei ca. 25 kDa, bei 55 kDa und zwischen 70 und 100 kDa. In der Reinkultur war zudem eine Bande bei etwa 70 kDa zu erkennen, auch war hier die 25 kDa Bande wesentlich deutlicher. Im Western Blot mit dem Antikörper gegen das eukaryotische Protein zeigte sich ebenfalls eine massive Bande bei 55 kDa. Weitere Banden waren dagegen nicht zu sehen.

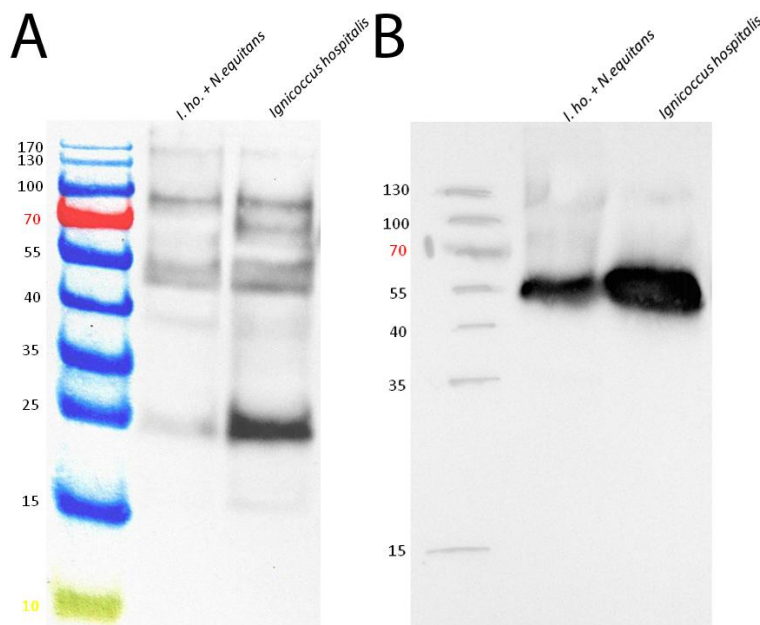


Abbildung 80 Western Blots (A)  $\alpha$ -Igni\_1061; (B)  $\alpha$ -Sec61 $\beta$  (eukaryotisch) 1° 1:5000 2° 1:25 000

Das Bindungsverhalten beider Antikörper auf Ultradünnschnitten war jedoch relativ ähnlich (Abbildung 81): In beiden Fällen konnten Markierungen im Cytoplasma gefunden werden und zu einem gewissen Teil auch in der Cytoplasmamembran. Darüber hinaus zeigten beide Antikörper auch Markierungen in der äußeren Membran in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen.

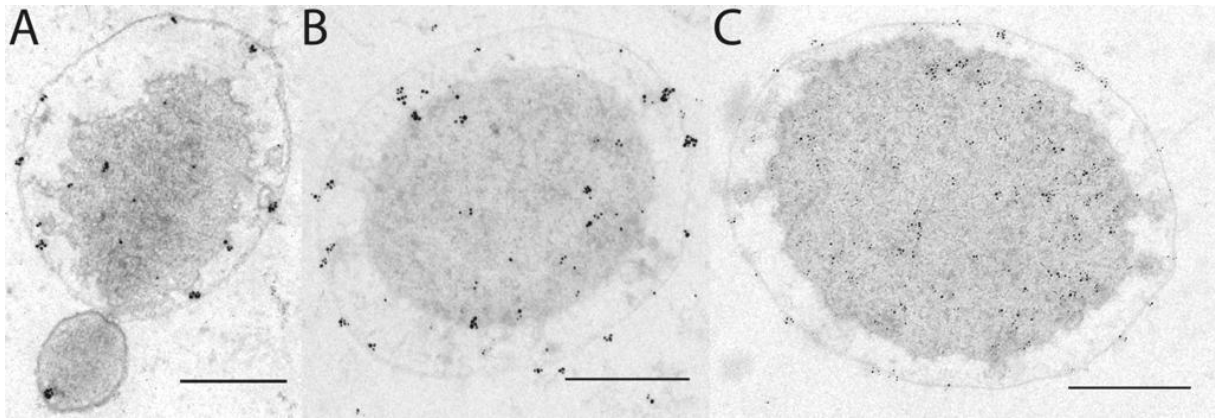


Abbildung 81 Immunmarkierung an *Ignicoccus hospitalis*-Ultradünnschnitten; (A)  $\alpha$ -Igni\_1061, Verdünnung 1:1000, (B)  $\alpha$ -Igni\_1061, Verdünnung 1:100; (C)  $\alpha$ -Sec61 $\beta$  (eukaryotisch) Verdünnung 1:200; sekundärer Antikörper jeweils goat- $\alpha$ -rabbit ultrasmall gold 1:50 verdünnt

#### 4.5.2 SUMO

Ein weiterer Antikörper gegen das eukaryotische Protein SUMO ('small ubiquitin-related modifier') wurde ebenfalls getestet. Im Western Blot (Abbildung 82) zeigten sich, wenn auch etwas unscharf, zahlreiche Banden.

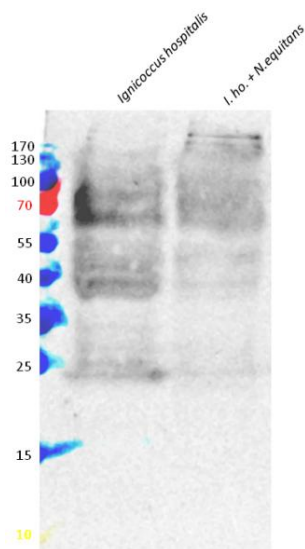


Abbildung 82 Western Blot mit  $\alpha$ -SUMO (eukaryotisch)

Ebenso wurde auch hier eine Immunmarkierung an Ultradünnschnitten durchgeführt. Interessanterweise unterschieden sich die Bindungsmuster. Während die meisten Schnitte eine Markierung im Cytoplasma, der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran zeigten (Abbildung 83 A), gab es vereinzelt auch Schnitte, die (fast) exklusiv im Cytoplasma markiert waren (Abbildung 83 B) bzw. (fast) exklusiv in der äußeren Membran (Abbildung 83 C)

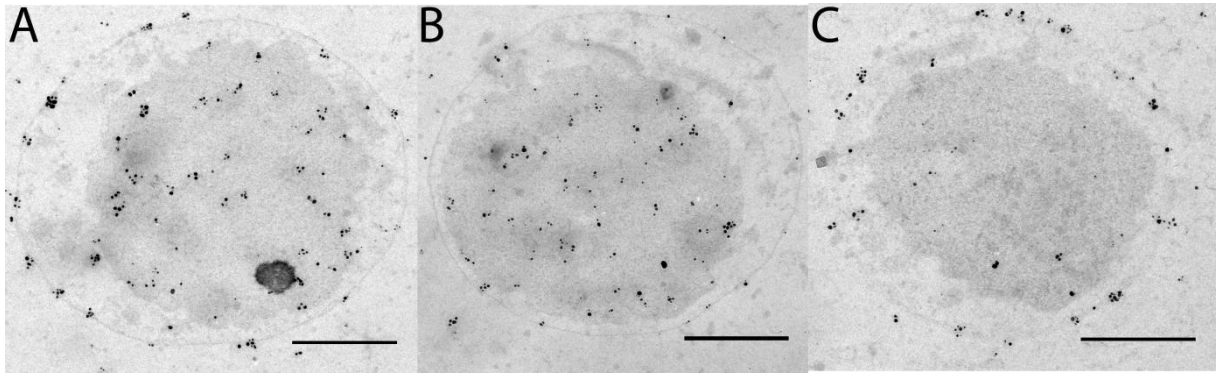


Abbildung 83 Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten mit  $\alpha$ -SUMO (1:100); Balken jeweils 0.5  $\mu$ m





## IV Diskussion

### 1 Methodische Aspekte

#### 1.1 Filtermethode

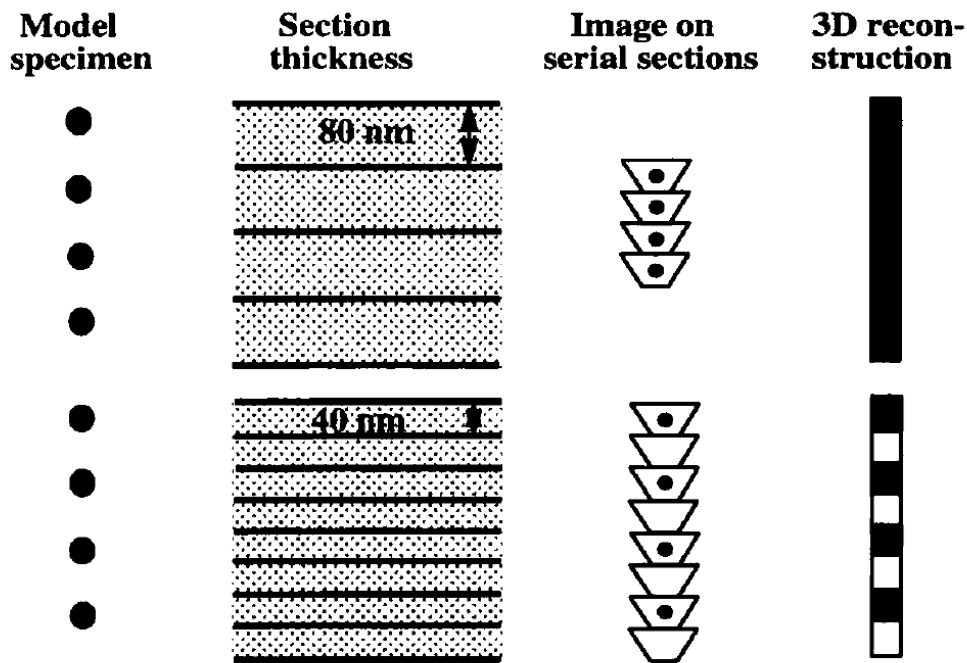
Die gängigste Methode zur Konzentrierung von Zellen ist die Zentrifugation und hat den Vorteil, dass Zellen mit geringem Zeitaufwand im Mikroskop gefunden werden können. Wie jedoch in früheren Arbeiten gezeigt, leidet die Ultrastruktur von *Ignicoccus*-Zellen stark unter mechanisch einwirkenden Kräften, wie sie bei der Zentrifugation auftreten (Gürster, 2007; Meyer, 2007; Flechsler, 2010). In der Folge wurden Zellen in Cellulosekapillaren gezüchtet, hochdruckgefroren und in (meist) Epon eingebettet, mit dem Vorteil einer wesentlich besseren Erhaltung der Zellen sowie einer (zumindest geringfügigen) Anreicherung der Zellen in einem definierten Bereich der Probe, der Cellulosekapillare (Rieger *et al.*, 1997; Rachel *et al.*, 2010). Auf diese Weise konnten bestmöglich erhaltene Zellen in annehmbarem Zeitaufwand im Elektronenmikroskop gefunden werden. Für die FIB/SEM-Analysen kam keine der beiden Methoden in Frage, da die Cellulosekapillaren eine ausreichende Konzentration der Zellen nicht bieten konnten und eine Zentrifugation aufgrund der schlechten Strukturhaltung nicht in Frage kam. Mit der Filtration von Zellen konnte eine Methode etabliert werden, die - wie die Abbildungen 5 und 6 beweisen - beides bietet: ähnlich gute Zellerhaltung wie in den Cellulosekapillaren bzw. annähernd gute Konzentration wie ein Zentrifugationsschritt (zumindest stellenweise). Als Fazit lässt sich sagen, dass beide erprobten Filtermethoden eine effiziente Konzentrierung bei guter Ultrastrukturhaltung der Zellen erlaubten und somit für sämtliche elektronenmikroskopischen Untersuchungen gut geeignet waren. Daher, obwohl primär für die FIB/SEM-Analysen gedacht, wurde die Technik zur Standardmethode in der AG Rachel für die Präparation von *Ignicoccus* und ebenfalls bereits erfolgreich für weitere Organismen (z.B. *Haloplasma*) angewandt. Dabei wird die Technik zunehmend, insbesondere durch Jennifer Flechsler und Veronika Heinz optimiert bzw. weitere Filterverfahren getestet.

#### 1.2 Vor- und Nachteile der einzelnen Tomographie-Methoden

Ein generelles Ziel der 3D-Mikroskopie ist es, möglichst große Volumina möglichst detailliert darzustellen. In dieser sowie vorangegangenen Arbeiten konnten 3D-Modelle von *Ignicoccus*-Zellen mit drei verschiedenen elektronenmikroskopischen Verfahren erfolgreich erstellt werden: Alignierung von Serienschnitten (à 50 nm) (Junglas, 2006; Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008 Heimerl, 2009; Flechsler, 2010), FIB/SEM und (Serien-)Elektronentomographie. Jede dieser Methoden hat ihre eigenen Vorzüge, aber auch Nachteile, welche jeweils im Folgenden erläutert werden. Die zu erreichende Auflösung hängt jedoch nicht alleine von der verwendeten Technik ab, sondern wird ebenso entscheidend durch die Probenvorbereitung bestimmt. Mit 'High-Pressure-Freezing' und anschließender Gefriersubstitution wurde die Referenzmethode für alle drei gezeigten Verfahren angewandt (Moor & Riehle, 1968; Studer *et al.*, 2001; McDonald, 2007; Villinger *et al.*, 2014).

### 1.2.1 Serienschritte

Die Auflösung in x- bzw. y-Richtung einzelner Ultradünnschnitte liegt in der Regel zwischen 1-3 nm. Dabei ist die Untergrenze von 1 nm eher als nomineller Wert anzusehen und wird vermutlich auch bei Pixelgrößen von 0.5 nm nicht erreicht. Denn, der Kontrast wird nicht durch die biologischen Strukturen selbst hervorgerufen, sondern durch strukturbindende Kontrastmittel, wie Uranylacetat, die letztlich die Auflösung limitieren (Villinger *et al.*, 2014). Der größte Nachteil der Methode mit Serienschritten liegt auf der Hand. Die Schnittdicke bestimmt die eigentliche Auflösung in z-Richtung; entgegen einem allgemein vorherrschenden Irrglauben ist dabei die letzliche Auflösung in z maximal das Doppelte (und nicht gleich) der Schnittdicke (gemäß dem Nyquist-Shannon-Abtast-Theorem; zur Veranschaulichung siehe Abbildung 84) (Nyquist, 1928; Shannon, 1949). Für 50 nm-Schnitte ist daher die Auflösung in z-Richtung maximal 100 nm. Theoretisch könnten auch dünnere Schnitte gefertigt werden (bis zu 10 nm), was aber Zeit und Erfahrung voraussetzt (Mastrorade, 1997; McEwen & Marko, 2001). In der Praxis bietet sich aber eine sozusagen künstliche Erhöhung der Auflösung mittels Interpolation zwischen einzelnen Schnitten an um ein realitätsgetreueres (weniger stufiges) 3D-Modell zu erhalten; einen Informationsgewinn bietet diese Methode jedoch nicht (Heimerl, 2009). Neben der geringen Auflösung in z-Richtung gibt es weitere Probleme, die die Alignierung der einzelnen Schnitte betreffen. Beim Anfertigen von Serienschritten lässt es sich nicht vermeiden, dass Material "verloren" geht und somit faktisch kleine Informationslücken zwischen den einzelnen Schnitten entstehen. Zudem besteht insbesondere bei dünnen Schnitten die Gefahr, dass vereinzelt Schnitte gestaucht werden können (Sjöstrand, 1958; Sitte, 1981). Hinzu kommt auch noch, dass Plastikschnitte generell schrumpfen wenn sie Elektronenstrahlen exponiert sind; dabei schrumpfen die Schnitte unterschiedlich in x- bzw. y- und z- Richtung (Braunfeld *et al.*, 1994; Luther, 2006). Dies alles behaftet die Alignierung der einzelnen Bilder einer Schnittserie mit einer gewissen Ungenauigkeit. Dennoch, für *Ignicoccus* hat die Serienschneidmethode den Vorteil, dass zur Präparation die Zellen in Cellulosekapillaren gezüchtet werden können. Da diese Methode weniger invasiv als die Filtermethode ist, liefert sie - zumindest theoretisch - nachwievor die bestmögliche Strukturhaltung für *Ignicoccus*-Zellen (in Verbindung mit 'high pressure freezing'). (Wie gezeigt gibt es aber in der Praxis keine erkennbaren Unterschiede zu gefilterten Zellen.) Auch ist die Serienschneidmethode die einzige der gezeigten Methoden mit der vernünftige 3D-Modelle von immunmarkierten Zellen angefertigt werden können (Heimerl, 2009; Flechsler, 2010). Da der Antikörper nicht in das Epon diffundieren kann und potentiell nur an Epitope an der Schnittoberfläche bindet, wäre auch hierfür eine möglichst geringe Schnittdicke wünschenswert um den Informationsgehalt über das Markierungsmuster zu erhöhen. Theoretisch wäre auch ein 'pre-embedding labeling' möglich, wovon aber insbesondere bei *Ignicoccus* aufgrund der notwendigen Permeabilisierung der Membran (zu Lasten der Strukturhaltung) abzusehen ist.



**Fig. 2** Illustration showing that the limit of depth resolution for a serial section reconstruction is twice the section thickness. For a specimen consisting of a string of globular units spaced 80 nm apart, one must cut sections at 40-nm thickness to see the “gap” between units. Since resolution is defined as the limit of how close two points can come and still be resolved as two, the resolution limit of a serial section reconstruction is twice the section thickness. Note that if the globular units are touching each other, like beads on a string, then even thinner sections may be required to resolve the beads as separate entities.

Abbildung 84 Prinzip des Nyquist-Shannon-Abtast-Theorems anhand der Auflösung in z bei Serienschritten; aus McEwen & Marko, 1998

### 1.2.2 FIB/SEM

Laut Knott & Genoud, 2013 findet sich der erste Bericht zur Anwendung von FIB/SEM im biologischen Bereich 1997 (Ballerini *et al.*, 1997). Dennoch basiert auch diese Methode letztlich auf dem alten Serienschrittprinzip (His, 1870) mit dem entscheidenden Unterschied, dass gegenüber dem mühevollen Anfertigen von Serienschrittbändern das "Schneiden" bzw. der sog. 'slice and view'-Prozess voll automatisiert abläuft. Da bei diesem Prozess in der Regel Schichten von etwa 5-10 nm abgetragen werden, kann die Auflösung in z-Richtung gegenüber den Serienschritten um etwa eine Zehnerpotenz gesteigert werden. Somit liegt die Auflösung in z mit dieser Methode bei etwa 10-20 nm. Für x und y liegen die Werte etwa im selben Bereich. Damit ist die Auflösung in x- und y-Richtung geringer, als bei Ultradünnschnitten. Bei gleicher Auflösung in alle drei Raumrichtungen spricht man von isotropischer Auflösung. Dabei gibt es bereits Datensätze, die der Qualität von TEM-Bildern kaum nachstehen (jedenfalls nach Einschätzung der Autoren; Park *et al.*, 2014). Konkreter wurde darüber hinaus gezeigt, dass eine (xy-)Auflösung nahe der eines Transmissionselektronenmikroskops erreicht werden kann, was sich beispielsweise in der distinkten Darstellung der beiden elektronendichten Schichten eines Membranbilayers äußert. Hierzu werden jedoch Sekundärelektronen zur Bilderzeugung detektiert und nicht (wie bisher gebräuchlich) 'backscattered'-Elektronen (Villinger *et al.*, 2012; Villinger *et al.*, 2014). Auch in z-Richtung gibt es

Fortschritte, mit ersten Berichten zur konsistenten Abtragung und Aufzeichnung von 3 nm-Schichten (Narayan *et al.*, 2014). Ein entscheidender Vorteil von FIB/SEM ist, dass relativ große Volumina dargestellt werden können, was die Methode insbesondere für eukaryotische Zellen und Gewebe attraktiv macht (siehe u.a. Knott *et al.*, 2008; Salecker, 2010; Villinger *et al.*, 2012; Wanner *et al.*, 2013; Earl *et al.*, 2013; Villinger *et al.*, 2014). Dadurch ergab sich in dieser Arbeit für *Ignicoccus* insofern ein Vorteil, als dass mit einem Datensatz (386  $\mu\text{m}^3$  im größeren der beiden Datensätze) mehrere Zellen auf einmal erfasst werden konnten. Dies setzte jedoch voraus, dass die Zellen zunächst entsprechend aufkonzentriert werden mussten bzw. für *Ignicoccus* hierfür zuerst eine geeignete Methode gefunden werden musste. Auch macht die Methode ein Vor-'Screening' einzelner Schnitte im TEM notwendig, um geeignete Stellen in den Proben zu finden, bevor die Proben auf 'Stubs' aufgeklebt werden können. Zusätzlich zur vergleichsweise aufwändigeren Probenvorbereitung ist FIB/SEM auch eine destruktive Methode. D.h. Material, das von der Probe abgetragen wird, geht unwiederbringlich verloren, während Ultra- bzw. Semidünnschnitte für TEM für spätere Begutachtungen gelagert werden können. Auch ist FIB/SEM eine vergleichsweise teure Methode (Villinger *et al.*, 2014). Anzuführen ist jedoch noch ein Vorteil, der sich bei der Segmentierung der *Ignicoccus*-Zellen aus den FIB/SEM-Datensätzen bemerkbar machte: Durch den erhöhten Kontrast gegenüber TEM-Aufnahmen konnten automatische bzw. halbautomatische Werkzeuge zur Markierung der Cytoplasmen benutzt werden, was eine enorme Zeitersparnis für die 3D-Visualisierung mit sich brachte.

### 1.2.3 (Serien-)Elektronentomographie

Für die Elektronentomographie liegt die Auflösung in x- und y- Richtung mit 1-3 nm im selben Bereich wie bei der Serienschchnittmethode. Für kunststoffeingebettete Proben ist die Auflösung durch Verwendung von Kontrastmitteln daher genauso limitiert (siehe oben). In z-Richtung ist die Auflösung durch weitere Parameter begrenzt, wodurch eine isotropische Auflösung bestenfalls annähernd erreicht werden kann: Nach Crowther (Crowther *et al.*, 1970<sup>1</sup>) ist die maximale Auflösung, die erreicht werden kann abhängig von der Objektgröße (und damit auch von der Schnittdicke) und der Anzahl von Bildern in einer Kippserie (also dem Kippinkrement). Zusätzlich spielt der maximale Kippwinkel eine Rolle, dem jedoch technisch Grenzen gesetzt sind. Typischerweise lassen sich Objekte im TEM auf etwa +/- 60° Grad Kippen und etwas weiter mit speziellen Hochkipphalten (etwa +/-70°), als Kippinkrement werden meist 1-2° verwendet. Außerdem nimmt mit steigendem Winkel die zu durchstrahlende Präparatdicke zu ( $D \sim 1/\cos(\text{Kippwinkel})$ ) --> z.B. bei 60° um Faktor 2, bei 70° um Faktor 3) (McEwen & Marko, 1998; Carazo *et al.*, 2006), so dass höhere Beschleunigungsspannungen nötig werden, um die Proben zu durchstrahlen. Die gängigsten Beschleunigungsspannungen sind 200 und 300 kV (McEwen & Marko, 2001; Chen *et al.*, 2008). Die Lücke, die zwischen dem maximalen Kippwinkel und dem (optimalen) 90° Winkel auftritt, äußert sich im Fourier-Raum als fehlendes Stück, das sog. 'missing wedge'. Das 'missing wedge' ist zudem für Rekonstruktionsartefakte verantwortlich, die sich als elongierte Strukturen in den Seitenansichten der rekonstruierten Volumina äußern. Außerdem tendieren Membranen oder filamentöse Objekte, die quer zur Kippachse liegen in den Tomogrammen zu verschwinden (McEwen & Marko, 2001). Eine Verkleinerung dieses fehlenden Stücks Information kann erreicht werden, indem man das Objekt um 90° dreht und eine zweite Kippserie aufzeichnet. Dennoch bleibt auch hier eine Informationslücke. Diese wird bei dieser sog. 'dual-axis' Tomographie als 'missing pyramid' bezeichnet (aufgrund seiner Geometrie im Fourier-Raum) (Penczek *et al.*, 1995; Mastrorade, 1997). Durch Kippungen mit

anschließenden 360°-Drehungen des Objekts kann die fehlende Information theoretisch weiter auf ein 'missing cone' reduziert werden (Lanzavecchia *et al.*, 2005), findet aber in der Praxis kaum Anwendung. Angaben zu Auflösungen, die tatsächlich erreicht werden, schwanken in der Literatur, liegen aber für hochdruckgefrorene, gefriersubstituierte und in Kunstharz eingebettete Proben wohl im Bereich von 4-8 nm (Donohoe *et al.*, 2006; Hoenger & McIntosh, 2009). Für Cryo-Elektronentomographie, die sich vielmehr durch die Betrachtung annähernd nativer Objekte unterscheidet, als im zugrunde liegenden Prinzip, kann die Auflösung (zumindest für dünne Proben) mit 2-8 nm etwas höher liegen (Hoenger & McIntosh, 2009; Fridman *et al.*, 2012). Wie aus den Tomogrammen dieser Arbeit hervorgeht, ist der Bilayer auch in den Seitenansichten (xz und yz) deutlich zu sehen. Da Auflösung *per se* definiert ist durch den Abstand, durch den zwei Punkte getrennt wahrgenommen werden können, gibt der Abstand zwischen den beiden elektronendichten Schichten die Mindestauflösung in z an und liegt zwischen 3-4 nm. Die Auflösung dieser Tomogramme liegt also an der Obergrenze der oben genannten Literaturwerte, evtl. sogar etwas darüber. Relativierend muss man sagen, dass nicht klar ist, welche potentiellen anderen Strukturen durch das Kontrastmittel maskiert werden und die Auflösung ggf. herabsetzen. Doch auch abseits von bloßen Zahlen zeigte sich die Tomographie-Methode als die detailreichste der drei verwendeten Methoden: Strukturelle Besonderheiten konnten besser nachvollzogen werden (Filamente im IMC) bzw. überhaupt erst mit dieser Methode gefunden werden (Poren in der äußeren Membran, Kontakt der Cytoplasmen zwischen *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum*). Um der Volumenbegrenzung in z (also der Schnittdicke) zu entgehen, lassen sich Tomogramme von beispielsweise 200 nm-Serienschnitten anfertigen und aufeinander stapeln (Soto *et al.*, 1994; Höög *et al.*, 2007). Hierdurch war es möglich, komplette *Ignicoccus*-Zellen in hoher Auflösung zu rekonstruieren. Bei dieser Methode können jedoch ähnlich wie bei der Serienschnittmethode einzelne Schnitte schrumpfen (Luther, 2006) bzw. Lücken zwischen den einzelnen Tomogrammen entstehen. Für 250 nm-Schnitte liegen diese Lücken im Bereich von 15-25 nm (Ladinsky *et al.*, 1999). Hinzu kommt bei der Alignierung ein weiteres Problem: Es werden im Endeffekt keine Schnitte aufeinander gestapelt, sondern Volumina. Die Schwierigkeit liegt darin, die einzelnen Volumina annähernd eben im Raum auszurichten (bei der Rekonstruktion bzw. im Anschluss), bevor sie gestapelt werden können. Zu den einzelnen Tomogrammen muss noch gesagt werden, dass bei der Elektronentomographie ein virtuelles Volumen mittels mathematischer Algorithmen (z.B. WBP, SIRT; siehe 1.3) berechnet wird, basierend auf realen Daten (Kippserie), während die Volumina der beiden anderen Methoden reale Daten zur Grundlage haben (ausgenommen eventuelle Interpolationen). Da mit Serien-Elektronentomographie außerdem extrem große Datensätze generiert werden, ist genügend Festplattenkapazität und ein leistungsfähiger PC Voraussetzung. Zudem ist die Segmentierung derart großer Datensätze extrem zeitaufwändig. Zuletzt sei erwähnt, dass *Ignicoccus* die erste archaeelle Zelle unter den komplett bzw. annähernd komplett rekonstruierten Zellen darstellt, die mit einer Kombination aus Serienschnitten und Elektronentomographie angefertigt wurden. Damit gibt es jetzt Vertreter aus jeder Domäne: *Schizosaccharomyces pombe* (Schlauchpilze) aus der Domäne der Eukaryoten (Höög *et al.*, 2007), *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (Cyanobakterien) und *Gemmata obscuriglobus* (Planctomyceten) aus der Domäne der Bakterien (Liberton *et al.*, 2011; Santarella-Mellwig *et al.*, 2013) und *Ignicoccus hospitalis* aus der Domäne der Archaeen. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Cryo-ET-Studien von kompletten archaeellen und bakteriellen Zellen (siehe Milne & Subramaniam, 2009). Der Vorteil dieser Methode ist, dass aufgrund des Verzichts von Fixantien und Kontrastmitteln der (annähernd) native Status der Zellen gewahrt bleibt. Da jedoch in der Regel ganze Zellen auf einmal tomographiert werden, sind Auflösungen < 5 nm nur für dünne Zellen (ca. 300 nm) möglich (z.B. Kürner, 2005; Kürner *et al.*, 2005). Eine Auflösung des Membranbilayers ist zumeist nicht

gegeben (Hoffmann *et al.*, 2008). Daneben ist es auch möglich, sog. 'vitreous sections' zu schneiden und zu tomographieren. Jedoch gehört diese Präparationsmethode momentan zu den aufwändigsten und anspruchsvollsten EM-Techniken (Pierson *et al.*, 2011), was sicherlich der Hauptgrund ist, weswegen sich bisher keine Rekonstruktionen ganzer Zellen mit dieser Methode in der Literatur finden lassen. Somit bleibt (S)TEM-Tomographie von Plastik-Serienschnitten derzeit die einzige Methode, mit der sich große Zellen komplett, mit hoher Auflösung (~5 nm) rekonstruieren lassen.

### 1.3 Vergleich zwischen WBP und SIRT

Elektronentomographie (und auch 'Single Particle Analysis') basiert auf der Tatsache, dass 3D-Rekonstruktionen aus den Projektionen von Objekten gewonnen werden können (Radon, 1917; Lučić *et al.*, 2005). Veranschaulichen lässt sich dies dadurch, dass die Fouriertransformierte einer (2D)-Projektion eines dreidimensionalen Objektes im Winkel  $\alpha$ , im Fourier-Raum einem Schnitt durch das Objekt, gekippt um den Winkel  $\alpha$  entspricht (Crowther *et al.*, 1970<sup>1</sup>; Carazo *et al.*, 2006). Im Fourier-Raum lässt sich so, sozusagen Schnitt für Schnitt das (transformierte) 3D-Objekt aufbauen und zurück in den Realraum (invers) transformieren (Crowther *et al.*, 1970<sup>2</sup>). Während erste Rekonstruktionen von EM-Daten tatsächlich mit fourierraumbasierten Algorithmen erstellt wurden (z.B. DeRosier & Klug, 1968), werden heute vorwiegend realraumbasierte, sog. direkte Algorithmen verwendet (Lučić *et al.*, 2005). Zu letzterem zählen auch iterative Verfahren, wie beispielsweise ART (Gordon *et al.*, 1970) oder SIRT (Gilbert, 1972). WBP stellt einen Sonderfall dar, da hier sowohl der Realraum als auch der Fourier-Raum zur Rekonstruktion benutzt wird (Radermacher, 2006). Neu entwickelte Algorithmen basieren alle auf den oben genannten Möglichkeiten (siehe u.a. Tong & Midgeley, 2006; Penczek *et al.*, 2010; Goris *et al.*, 2012) bzw. kombinieren sie (z.B. 'weighted SIRT'; Wolf *et al.*, 2014). WBP basiert zunächst auf einer einfachen Rückprojektion. Es werden hierbei die einzelnen Projektionen senkrecht zu ihrer Kippachse zurückgestrahlt bzw. zurückprojiziert. Hierbei überlagern sich die Strahlen der einzelnen Projektionen und man bekommt letztlich eine Aufsummierung der Grauwerte und damit eine verschwommene Annäherung an die tatsächliche Struktur (Carazo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2010). Aufgrund der limitierten Datenaufzeichnung ('missing wedge', Kippinkrement) werden bei der einfachen Rückprojektion Frequenzen um die Kippachse (niedrige Frequenzen) überbetont. Durch Einführen einer Gewichtungsfunktion kann dies kompensiert werden - daher der Name 'weighted back projection'. Diese Gewichtung erfolgt individuell für die einzelnen Projektionen im Fourier-Raum, bevor sie rückprojiziert werden (Hoppe *et al.*, 1976; McEwen & Heagle, 1997; Lučić *et al.*, 2005; Radermacher; 2006; Chen *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu verwendet SIRT einen algebraischen, iterativen Ansatz: Zunächst wird mit einer Radontransformation (Radon, 1917) eine anfängliche Rückprojektion berechnet bzw. daraus wiederum entsprechende Projektionen (inverse Radontransformation). Die errechneten Projektionen werden dann mit den experimentell bestimmten Projektionen verglichen und entsprechend korrigiert. Aus diesen neu errechneten Projektionen wird nun wieder eine neue Rekonstruktion errechnet usw. Sukzessive wird so eine Verbesserung der Rekonstruktion erreicht bzw. nähert sich der Fehler einem Minimum (Gilbert, 1972; Fernández *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2014). In der Theorie zumindest können mit SIRT akkuratere Ergebnisse als mit WBP erzielt werden, insbesondere in Hinblick auf die limitierte Datenaufzeichnung (Goris *et al.*, 2012). Für Chen *et al.*, 2008, sind 'single-axis' SIRT-Rekonstruktionen sogar vergleichbar mit 'double-axis'-Tomogrammen (Chen *et al.*, 2008). Auch ist SIRT flexibel, da es unter verschiedensten Experiment-Bedingungen gute Ergebnisse liefert. Gegenüber WBP sind störende Artefakte stark verringert. Neben diesen theoretischen Vorteilen sollte man aber nicht

außer Acht lassen, dass die Limitierungen durch EM-Daten selbst kaum verstanden sind (Penczek *et al.*, 2010). Tatsächlich sind Vergleiche zwischen Rekonstruktionsalgorithmen anhand von realen EM-Daten (nicht simulierten Phantomdaten) in der Literatur bisher eher rar gesät (z.B. Fernández *et al.*, 2010), weswegen im Rahmen dieser Arbeit ein kleiner Vergleich zwischen WBP und SIRT angestellt wurde. Als Fazit des Vergleiches lässt sich festhalten, dass SIRT-Rekonstruktionen einen erhöhten Kontrast haben im Gegensatz zu WBP-Rekonstruktionen. Zum Verlust von Details aufgrund des erhöhten Kontrastes kommt es aber nur bei sehr geringer Anzahl von Iteration. Ab 10 Iterationen ist der Detailreichtum in xy mit WBP annähernd vergleichbar. Für die Seitenansichten zeigt sich, dass bei höheren Iterationen bessere Ergebnisse bzw. weniger Artefakte als bei niedrigen erzielt werden können. Allerdings hat man bei steigenden Iterationen zunehmend mehr Rauschen in den Bildern. Es gilt daher bei SIRT den 'sweet spot' zu finden, der einen guten Kompromiss zwischen (in erster Linie) Kontrast und Rauschen bietet. Im Gegensatz dazu liefert WBP zwar an sich das ausgewogenere Bild, geht aber zudem mit einem erhöhten Bildrauschen einher. Ein Nachteil hinsichtlich Artefaktbildung gegenüber SIRT konnte nicht festgestellt werden. Im Gegenteil, die Artefaktbildung fiel geringer aus gegenüber SIRT mit mittleren Iterationszahlen, die letztlich auch für die Rekonstruktionen verwendet wurden (10, 15). Dennoch fiel die Wahl auf SIRT v.a. im Hinblick auf die anschließende Visualisierung. Tatsächlich sind hierbei der erhöhte Kontrast und das geringere Bildrauschen von SIRT-Rekonstruktionen die entscheidenden Vorteile. Insbesondere gilt dies für automatische Visualisierungstools, wie 'Voltex' oder 'Isosurface' in AMIRA, die auf Basis eines angesetzten 'Thresholds' arbeiten. Aber auch das Verfolgen einzelner Strukturen bei der manuellen Segmentierung wird mit erhöhtem Kontrast und geringerem Rauschen erleichtert. Einen Nachteil haben SIRT-Rekonstruktionen dennoch. Sie benötigen im Vergleich zu WBP selbst bei wenigen Iterationen ein Vielfaches der Zeit zur Berechnung eines Tomogramms.

#### 1.4 Einfluss von Defokus und CTF

Kippserien für Cryo-Elektronentomogramme werden in der Regel mit hohem Defokus aufgenommen, da sich so der Kontrast (für Objektdetails mit niedrigen Ortsfrequenzen) verbessern lässt. Dies geschieht jedoch auf Kosten der erreichbaren Auflösung. Durch Korrektur mit der (defokusabhängigen) CTF ('contrast transfer function') lassen sich dahingehend unter Umständen Verbesserungen erzielen (Koster & Bárcena, 2006; Jonić *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2010; Voortman *et al.*, 2012; Lučić *et al.*, 2013). IMOD bietet daher mit dem Programm CTFPHASEFLIP einen Ansatz für eine solche Korrektur. Um zu sehen, ob sich auch Verbesserungen für kontrastierte, Kunstharz eingebettete Proben ergeben, wurde abermals ein kleiner Vergleich angestellt. Getestet wurden zwei verschiedene Defokus-Werte, jeweils mit und ohne CTF-Korrektur, die jeweils mit SIRT (15 Iterationen) und WBP rekonstruiert wurden. In diesem Vergleich brachte eine CTF-Korrektur keine erkennbaren Vorteile in den Tomogrammen und konnte aufgrund der verschiedenartigen Bildgebung für kontrastierte und nicht-kontrastierte Proben auch nicht unbedingt erwartet werden. Vereinfacht gesagt wird für schwermetallkontrastierte Proben der Kontrast eines EM-Bildes in erster Linie durch den Amplitudenkontrast bestimmt, der durch Streuung der Elektronen an den Schwermetallatomen zu stande kommt. In nicht-kontrastierten Proben ist der Phasenkontrast maßgebend und die Bildgebung wird durch die CTF entscheidend beeinflusst (Lučić *et al.*, 2005; Koster & Bárcena, 2006). (Tatsächlich ist die Situation der Bildgebung im TEM wesentlich komplexer; für Details siehe Hawkes, 2006.) Letztlich machen der geringere Defokus (gegenüber Cryo-ET) sowie die Art der Bildentstehung die CTF-Korrektur für kontrastierte Proben obsolet. Hinsichtlich des

Defokus-Vergleiches lässt sich sagen, dass die näher im Fokus aufgenommene Kippserie ein minimal detailreicheres Tomogramm lieferte. Ein Kontrastabfall in diesem Tomogramm ist nicht ersichtlich. Somit birgt der Parameter Defokus tatsächlich Potential zur Verbesserung der Tomogramme, letztlich bleibt aber vermutlich das (potentiell Strukturen maskierende) Kontrastmittel selbst der limitierende Faktor bei Elektronentomographie an kontrastierten, in Kunstharz eingebetteten Proben. Zuletzt bleibt zu erwähnen, dass der Vergleich zwischen WBP- und SIRT-Tomogrammen unter dem Einfluss der Parameter Defokus und CTF-Korrektur keine weiteren als die unter 1.3 bereits hinreichend erörterten Erkenntnisse zulässt.

## 2 Strukturelle Aspekte

### 2.1 Allgemeiner Zellaufbau

Der allgemeine Zellaufbau von *Ignicoccus* ist auffällig und einzigartig innerhalb der Domäne der Archaeen. Die Zellen besitzen ein komplexes, endogenes Membransystem sowie eine äußere Membran. Beide Membranen unterscheiden sich zudem in ihrer Lipidzusammensetzung (Jahn *et al.*, 2004). Zwischen beiden Membranen liegt das 'Intermembrane Compartment' (IMC), das topologisch dem periplasmatischen Raum von gramnegativen Bakterien entspricht. Neben dieser strukturellen Kompartimentierung zeigen die Zellen auch eine funktionelle Kompartimentierung (Küper *et al.*, 2010). Hinsichtlich der Volumenverhältnisse der Kompartimente kann auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass idealisierte Abschätzungen der Volumenverhältnisse ausreichend genau sind und, dass das Volumen des IMC tatsächlich das Volumen des Cytoplasmas um ein Vielfaches übersteigen kann (Rachel *et al.*, 2002). Für den Großteil der (hier gezeigten) Zellen gilt dies jedoch nicht. Die gemessenen Volumenanteile des IMCs am Gesamtvolumen in den abstrahierten 3D-Modellen (gemittelt und für einzelne Zellen) können mit "nur" ca. 40% angegeben werden, was dennoch einen vergleichsweise großen Volumenanteil darstellt. Zwar finden sich ähnlich hohe Werte in einigen älteren Veröffentlichungen für den periplasmatischen Raum von gramnegativen Bakterien (z.B. Stock *et al.*, 1977), wurden aber zwischenzeitlich auf 7-16 % (unter normalen Wachstumsbedingungen) revidiert (Graham *et al.*, 1991; Koch, 1998; Selmann & Holst, 2002). Eine Ausnahme hiervon stellt *Thermotoga* dar. Schätzungen zufolge kann das Volumen des Periplasmas in *Thermotoga* größer sein als das Volumen des Cytoplasmas (Liebl *et al.*, 2008). Und auch für *Gemmata obscuriglobus* werden immerhin ca. 30% für den Anteil des Periplasmas (in Planctomyceten vormals Paryphoplasma genannt) am Gesamtvolumen angegeben. Letztere gehören zum PVC-Superphylum (*Planctomycetes*, *Verrucomicrobiae*, *Chlamydiae*), dessen Vertreter sich durch ein ähnlich komplexes inneres Membransystem auszeichnen (Lee *et al.*, 2009; Fuerst & Sagulenko, 2011; Santarella-Mellwig *et al.*, 2013). (Kurz sei angemerkt, dass der allgemeine Zellaufbau für PVC-Vertreter umstritten ist; Fuerst, 2013; Devos, 2014.) Neben einer Kompartimentierung von *Ignicoccus*-Zellen kann auch erneut eine Polarisierung der Zellen nachvollzogen werden, wie sie bereits anhand von 50 nm-Serienschnitten beschrieben wurde. Auch scheint die Polarisierung funktionell zu sein: Alle in dieser Arbeit gezeigten Kontaktstellen zwischen *Nanoarchaeum* und *Ignicoccus* finden am Cytoplasmapol der Zelle statt und bestätigen damit frühere Befunde (Heimerl, 2009).



## 2.2 Zelleinschlüsse

Darüber hinaus sind oft, aber nicht ausschließlich, dunkel kontrastierte Einschlüsse im Cytoplasma ebenfalls in der Region des Cytoplasmapols zu finden. In EDX-Analysen dieser Strukturen konnte ein hoher Phosphor-Gehalt festgestellt werden. Aufgrund der hohen Affinität des verwendeten Kontrastmittels Uranylacetat zu Phosphat-Gruppen handelt es sich daher vermutlich um Polyphosphat-Einschlüsse. Polyphosphat-Einschlüsse wurden bereits vor mehr als 100 Jahren in Bakterien und eukaryotischen Zellen entdeckt und zunächst als metachromatische Körperchen (wg. der Rotfärbung mit Toluidin-Blau) bzw. Volutinkörner (leitet sich ab von *Spirillum volutans*) beschrieben (Babes, 1895; Meyer, 1904; Docampo, 2006). Beide Begriffe finden sich nach wie vor gelegentlich in Publikationen. Auch in einigen Archaeen konnten Polyphosphat-Einschlüsse gefunden werden. Darunter sind Spezies von *Methanosarcina* (Scherer & Böhm, 1983; Rudnick *et al.*, 1990) und *Sulfolobus* (Remonsellez *et al.*, 2006) sowie *Methanospirillum hungatei* (Toso *et al.*, 2011). Für *Ignicoccus* trifft die allgemeine Beschreibung dieser Strukturen genau zu: elektronendichte, kugelartige Strukturen mit 15-200 nm Durchmesser, die außerdem oftmals an den Zellpolen auftreten können. Daneben wurden in Röntgenspektren der bisher bekannten Beispiele, wie in *Ignicoccus* u.a. Schwefel, Eisen und Calcium gefunden. Schwefel lässt auf die Präsenz von Proteinen schließen. Eisen und Calcium könnten als Cofaktoren der Proteine agieren. Weiterhin ist möglich, dass Eisen und Calcium als Gegenionen zu Polyphosphat dienen und auf diese Art auch gespeichert werden können (Scherer & Böhm, 1983; Docampo, 2006; Toso *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang werden auch Entgiftungen bzw. Resistenzen gegenüber Schwermetallen (z.B. Kupfer) diskutiert (Remonsellez *et al.*, 2006; Orell *et al.*, 2012). Neben dieser und zahlreicher weiterer beschriebener Funktionen für Polyphosphat (siehe Kornberg *et al.*, 1999 und Kulaev *et al.*, 2004) sind die nahe liegenden die eines Phosphat- und Energiespeichers für die Zelle. Für einige Kinase-Reaktionen kann ATP durch Polyphosphat ersetzt werden (Kornberg *et al.*, 1999). Z.B. wurde für *Pyrococcus horikoshii* eine Aktivität einer NAD-Kinase nicht nur mit NTPs sondern auch mit Polyphosphat gezeigt (Sakuraba *et al.*, 2005). Eine derartige (zumindest so annotierte) 'PolyP/ATP-dependent NAD kinase' findet sich auch im Genom/Proteom von *Ignicoccus hospitalis* (Igni\_0536). Die Beteiligung weiterer Enzyme am Polyphosphat-Metabolismus ist für *Ignicoccus hospitalis* aber ebenso unklar. Eine BLAST-Analyse mit bekannten, potentiell involvierten PPX- (Exopolyphosphatase) bzw. PPK- (Polyphosphatkinase) Proteinen aus extremophilen Organismen lieferte keine Ergebnisse. Letztere wurden bisher überhaupt noch nicht in Crenarchaeoten gefunden (Orell *et al.*, 2012). Doch kann im Genom/Proteom ein 'PPX related protein' (Igni\_0814) gefunden werden. Dieses Protein besitzt eine DHH-Domäne und gehört zur 'DHH phosphohydrolase superfamily'. Auch kann ein zweites Protein aus dieser Familie gefunden werden (Igni\_1306) und darüber hinaus eine anorganische Pyrophosphatase (Igni\_0880). Aufgrund von Struktur und Elementarzusammensetzung wird für Volutinkörner in "Prokaryoten" auch ein evolutionärer Zusammenhang mit den sog. Acidocalcisomen aus Eukaryoten diskutiert. Diese Zellorganelle sind membranumschlossen und sind reich an Calcium und Pyro- bzw. Polyphosphaten (Docampo, 2006; Seufferheld *et al.*, 2011). Eine Membran in diesem Zusammenhang wurde bisher in zwei Bakterien (*Agrobacterium tumefaciens* und *Rhodospirillum rubrum*) beschrieben und zudem konnten protonentranslozierende vakuoläre Pyrophosphatasen (V-H<sup>+</sup>-PPase) in diesen Membranen gefunden werden (Seufferheld *et al.*, 2003; Seufferheld *et al.*, 2004). In den hier gezeigten Polyphosphat-Einschlüssen in *Ignicoccus* konnten keine umgebenden Membranen gefunden werden - und sind auch bisher für Archaeen generell nicht beschrieben. Zwar kann man in den Tomogrammen einen begrenzenden, dunklen Rand um die Einschlüsse sehen, aber es ist unwahrscheinlich, dass es sich dabei um Membranen handelt. Eine

V-H<sup>+</sup>-PPase ist ebenfalls nicht annotiert, doch gibt es Hinweise auf deren Existenz (Daxer, 2011) - diese kann generell in zahlreichen Archaeen gefunden werden (Serrano *et al.*, 2007). Neben stark kontrastierten Polyphosphat-Einschlüssen konnten auch kontrastschwache Einschlüsse in *Ignicoccus* gefunden werden. Ähnliche Erscheinungsbilder sind in der Literatur beschrieben z.B. für Schwefel (Dahl & Prange, 2006), Polyhydroxyalkanoate (z.B. PHB) (Pötter & Steinbüchel, 2006) und neutrale Lipide (z.B. Wachsester & Triacylglyceride) (Wältermann & Steinbüchel, 2006). Da weitere Anhaltspunkte bisher fehlen, muss daher offen bleiben worum es sich dabei in *Ignicoccus* handelt. Nebenbei sei bemerkt, dass es sich bei den dunkel kontrastierten Strukturen auch nicht ausschließlich um Polyphosphat handeln muss und weitere Arten von Einschlüssen nicht auszuschließen sind. Einschlüsse von Metallen (z.B. Eisen) äußern sich beispielsweise als ähnlich elektronendichte Strukturen (Langley, 2006; van Niftrik *et al.*, 2008). Zuletzt zum Thema Einschlüsse fiel im Zuge der Recherche auf, dass eine in Heimerl, 2009, gezeigte Erscheinungsform von Vesikeln in *Ignicoccus* Ähnlichkeiten mit sog. 'R-bodies' ('refractile inclusion bodies'; unlösliche, zylindrisch aufgerollte Proteinbänder) aufweisen (Pond *et al.*, 1989, Sanchez-Amat, 2006; Fiebig *et al.*, 2013). Daher handelt es sich bei diesen Strukturen, die in *Ignicoccus* jedoch bisher nur sehr selten gefunden werden konnten, möglicherweise vielmehr um Einschlüsse als um spezielle Arten von Vesikeln.

### 2.3 Struktur und Dynamik des endogenen Membransystems

Für diverse "Prokaryoten" sind Vesikel mit verschiedensten Funktionen beschrieben (McBroom & Kuehn, 2007; Mashburn-Warren & Whiteley, 2006; Schooling & Beveridge, 2006). Bei vielen davon handelt es sich um Vesikel der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien. Doch auch innerhalb der Archaeen finden sich einige Beispiele für Vesikel: *Aciduliprofundum boonei* (Reysenbach *et al.*, 2006), einige *Sulfolobus*-Spezies (Grimm *et al.*, 1998; Prangishvili *et al.*, 2000; Ellen *et al.*, 2009; Ellen *et al.*, 2011) sowie einige *Thermococcus*- und *Pyrococcus*-Stämme (Prangishvili *et al.*, 2000; Soler *et al.*, 2008; Soler *et al.*, 2011; Marguet *et al.*, 2013; Gaudin *et al.*, 2013; Gaudin *et al.*, 2014). Oftmals sind diese Membran-Vesikel zusätzlich von einem S-Layer umgeben. Die meisten der beschriebenen bakteriellen und archaeellen Vesikel werden von den Zellen an die Umgebung abgegeben und erfüllen so intra- und interspezifische Aufgaben, wie beispielsweise die Freisetzung von Toxinen (Li *et al.*, 1998; Prangishvili *et al.*, 2000) oder 'Quorum sensing' (Mashburn-Warren *et al.*, 2008). Nur wenige Beispiele finden sich für Vesikel, die in den Zellen verbleiben: Gas-Vesikel (die jedoch nicht membranumschlossen sind) (Strunk *et al.*, 2011; Ramsay *et al.*, 2011), Vesikel in *Rhodobaacter sphaeroides* (Nichtschwefelpurpurbakterium) und Vesikel in *Gemmata obscuriglobus* (Planctomyceten). Abgesehen von den Gasvesikeln erfolgt die Bildung dieser intrazellulären Vesikel durch Invaginationen der inneren bzw. äußeren Membran in endocytoseähnlichen Prozessen (Lohienne *et al.*, 2010; Tucker *et al.*, 2010). Für *Gemmata obscuriglobus* wurden darüber hinaus Vesikel beschrieben, die sich (wachstumsphasenabhängig) von einem komplexen endogenen Membransystem ins Periplasma (bzw. Paryphoplasma) abschnüren (Santarella-Mellwig *et al.*, 2010). Aufgrund von neueren 3D-Analysen des Organismus wird dies jedoch von der Autorin selbst in Frage gestellt. Unzweifelhaft bleibt jedoch ein vergleichsweise komplexes Endomembransystem in diesen Organismen. Ob dabei jedoch echte Kompartimente vorliegen (Sagulenko *et al.*, 2014) oder "nur" Invaginationen und Ausstülpungen der Membran ('inner cellular membrane', ICM) (Santarella-Mellwig *et al.*, 2013), ist derzeit in der Diskussion.

Auch in *Ignicoccus* wird die Komplexität des Membransystems in erster Linie durch Einbuchtungen und Ausstülpungen der Cytoplasmamembran bzw. des Cytoplasmas hervorgerufen. Darüber hinaus suggerieren Detailaufnahmen von Ultradünnschnitten und Tomogrammen Abschnürungs- und Fusionsprozesse von Cytoplasmaausläufern und auch Vesikeln. In einigen Fällen zeigt sich dabei deutlich eine Zuspitzung des Vesikels/Cytoplasmaausläufers in Richtung Cytoplasmamembran, während in anderen Fällen eine Zuspitzung des Cytoplasmas in Richtung Vesikel/Cytoplasmaausläufer zu sehen ist, so dass sich sogar darüber spekulieren lässt, ob hieran eventuell Fusions- und Abschnürungsprozesse unterschieden werden können. Eine besondere Form eines Vesikels zeigt Abbildung 24. Derartige Vesikel sind ungleich größer und haben eine trilamellare Struktur und besitzen kaum Struktur in ihrem Inneren. Rein strukturell erinnern sie daher an Vakuolen und stellen ein eigenständiges Kompartiment dar. Abgesehen von diesem Sonderfall fällt eine Unterscheidung zwischen Vesikel und Cytoplasmaausläufer oftmals schwer. Fakt ist, dass membranumschlossene Strukturen mit weiteren membranumschlossenen Strukturen fusionieren bzw. sich abschnüren. 'Echte' Vesikel - unter der Definition als eigenständige, membranumschlossene bläschenartige Strukturen - konnten jedoch in den vorliegenden 3D-Modellen und Rekonstruktionen nur sehr selten eindeutig als solche identifiziert werden. Daneben gibt es eine Vielzahl an Pseudovesikeln, die letztlich nichts anderes sind als Verdickungen der röhrenartigen Cytoplasmaausläufer, v.a. an deren Enden. Diese vermeintlichen Vesikel stehen somit im Kontakt zum Cytoplasma. Auch wenn beispielsweise die Rekonstruktion aus Abbildung 23 eine Vielzahl an Vesikeln suggeriert, gibt die limitierte Auflösung (speziell in dieser Rekonstruktion) und die Lücke zwischen den Einzeltomogrammen (siehe 1.2.3) eine wirklich eindeutige Diagnose diesbezüglich nicht her. Außer Frage steht, dass hier kugelige Strukturen vorliegen, ob und inwieweit diese aber zusammenhängen, kann nicht eindeutig geklärt werden. Eine Beschreibung des komplexen Sachverhaltes auf Basis von 3D-Modellen anhand von 50 nm-Schnitten wurde bereits 2009 gegeben und kann nach wie vor nicht treffender formuliert werden: "Eine Interpretation, ob es sich bei den beobachtbaren Strukturen im Periplasma um Ausläufer des Cytoplasmas oder Vesikel handelt, die im Begriff sind, sich gerade abzuschnüren, ist oft schwierig, da sich Vesikel, wie es scheint, auch von den Ausläufern abschnüren können. Fakt ist jedenfalls, dass freie Vesikel gefunden werden können, welche jedoch vermutlich wiederum mit weiteren Vesikeln, Cytoplasmaausläufern oder der Cytoplasmamembran fusionieren können. Aufgrund all dieser Befunde kann darauf geschlossen werden, dass es sich bei der Cytoplasmamembran um eine extrem dynamische Struktur handelt und daher oft keine wirklich klaren Grenzen zwischen den einzelnen Strukturen, die dem Cytoplasma entspringen, gezogen werden können" (Heimerl, 2009). Ergänzend muss man dieser Beschreibung hinzufügen, dass aus den 3D-Modellen, die in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurden, sich folgern lässt, dass es sich vermutlich weniger um ein Vesikeltransportsystem handelt (wenngleich auch wenige Vesikel gefunden werden können), sondern vielmehr um ein komplexes, sich stetig neu organisierendes System aus membranumschlossenen Röhren. Bereits aufgrund der unterschiedlichen Erscheinungsbilder des inneren Membransystems in den 3D-Modellen kann gefolgert werden, dass das endogene Membransystem in *Ignicoccus* ebenso dynamisch wie komplex ist. Durch Videos aus dem Thermomikroskop kann die Dynamik zweifelsfrei belegt werden. Zudem zeigen sie, dass der vermeintlich freie Platz (IMC) in den Zellen nahezu vollständig aufgrund der Dynamik überbrückt werden kann. Immunmarkierungsversuche mit Antikörpern gegen den A<sub>1</sub>-Subkomplex der archaeellen ATP-Synthase konnten zudem in manchen Ultradünnschnitten eine Anhäufung der Markierung in Cytoplasmaausläufern/Vesikeln zeigen (Flechsler, 2010), wodurch sich über die Funktion eines Proteinsekretionssystems spekulieren lässt. Nicht zuletzt deswegen lohnt ein Blick auf das eukaryotische Proteinsekretionssystem, das auch strukturell und dynamisch gesehen

*Ignicoccus* ähnlicher zu sein scheint als die bekannten "prokaryotischen" Membransysteme bzw. vesikelbildenden Systeme.

Zunächst liegen Gemeinsamkeiten in der Tatsache begründet, dass sowohl in *Ignicoccus* als auch eukaryotischen Zellen dynamische Prozesse von einem (ebenfalls topologisch äquivalenten) membranumschlossenen Kompartiment ausgehen, das die genetische Information enthält (Cytoplasma in *Ignicoccus* bzw. Endoplasmatisches Reticulum in Eukaryoten, das letztlich eine Erweiterung der Kernmembran darstellt). Außerdem gehen die meisten Evolutionstheorien über das eukaryotische endogene Membransystem davon aus, dass das ER von "prokaryotischen" Cytoplasmamembranen abgeleitet ist (Dacks & Field, 2007; Jékely, 2007). Generell ist das Endomembran-System in Eukaryoten natürlich wesentlich komplexer, da sowohl raues als auch glattes ER vorliegen und mit Golgi-Apparat und Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zusätzlich noch spezielle Transport- und Sortierungsorganelle vorhanden sind, die aber vermutlich evolutionär wiederum aus dem Endoplasmatischen Reticulum entstanden (Mironov *et al.*, 2007). Darüber hinaus gibt es mit Endosomen und Lysosomen ein Verdauungs- und Recyclingsystem. Dennoch ist für eine Reihe von Eukaryoten auch ein vergleichsweise primitives Endomembran-System beschrieben. Ob es sich bei diesen Organismen um evolutionäre Frühformen handelt oder ob sekundär reduzierte Organelle vorliegen, ist in der Diskussion (Mowbrey & Dacks, 2009). Z.B. findet sich in Trophozoiten des einzelligen Darmparasiten *Giardia lamblia* (Diplomonaden) ein vergleichsweise einfaches Endomembran-System: Dieses System besteht lediglich aus Endoplasmatischem Reticulum und sog. peripheren Vesikeln (Abodeely *et al.*, 2009). Ein sichtbarer Golgi-Apparat ist nicht vorhanden und seine Existenz bzw. die eines Golgi ähnlichen Apparates umstritten (Benchimol & De Souza, 2011; Hehl, 2011). Da sich das ER als ein Netzwerk aus Röhren, die das Cytoplasma durchziehen darstellt, wird dieses System in *Giardia lamblia* als 'tubular vesicular network' bezeichnet (TVN) (Abodeely *et al.*, 2009); ein Ausdruck, mit dem sich durchaus auch das Membransystem in *Ignicoccus* treffend beschreiben ließe. Doch nicht nur funktionell und strukturell finden sich Ähnlichkeiten zwischen *Ignicoccus* und Eukaryoten. Im Genom/Proteom von *Ignicoccus* können Sequenz- bzw. Strukturhomologe zu eukaryotischen Proteinen mit entscheidender Beteiligung am endogenen Membransystem gefunden werden (basierend auf KEGG, IMG JGI und PHYRE2): kleine GTPasen wie Sar1 oder Arf (Ignc\_0796, Ignc\_1047, Ignc\_1211), 'Coatomer'-Proteine, eine Komponente von 'vesicle tethering'-Komplexen (Bet3), zwei p97 ATPasen, Sec61 $\beta$ , Vps4, ESCRT-III (Snf7) und auch ein 'SNARE-associated-Golgi-protein' (Ignc\_1083) ist annotiert (siehe hierzu auch 4). All dies lädt natürlich ein zur Spekulation, ob es sich beim endogenen Membransystem von *Ignicoccus* möglicherweise um eine Art rudimentäres ER handelt. Die Kompartimentsgrenzen wären jedoch weit weniger ausgeprägt, denn zumeist ähneln Ausläufer und Vesikel in ihrer Textur dem Cytoplasma. Dennoch finden sich Hinweise auf eine unterschiedliche bzw. selektive Zusammensetzung: Gelegentlich finden sich dunkel kontrastierte Ausläufer/Vesikel. Lichtmikroskopische Untersuchungen mit DNA-Färbemethoden (DAPI, Sty09) legen nahe, dass DNA nicht in den Röhrensystemen vorhanden ist (zumindest keine doppelsträngige) (Küper 2010; Daxer, 2011). Immunmarkierungsversuche an Ultradünnschnitten mit  $\alpha$ -DNA-Antikörpern bestätigen dies (persönliche Mitteilung, Jennifer Flechsler). Die oben erwähnten Immunmarkierungsversuche mit  $\alpha$ -A<sub>1</sub>-ATP-Synthase zeigten selektiv eine Anhäufung in einigen Vesikeln/Cytoplasmaausläufern. Interessanterweise korreliert die ansteigende Komplexität innerer Membransysteme mit den phylogenetischen Verhältnissen im 16S-rRNA-Stammbaum, ("einfache" gramnegative Bakterien --> *Gemmata* --> *Ignicoccus* --> *Giardia* --> höhere Eukaryoten). Ob sich hierin auch die tatsächlichen, evolutionären Verhältnisse widerspiegeln, bleibt spekulativ. Insbesondere die diffuse Verteilung von Organismen ohne erkennbaren Golgi innerhalb des

eukaryotischen Stammbaumes ist problematisch an dieser Theorie (Mowbrey & Dacks, 2009). Ebenso reizvoll, aber letztlich mit der gleichen Problematik behaftet wäre auch die 'TACK'-Superphylum-Hypothese (siehe Einleitung). Aber auch analoge Evolution wäre genauso denkbar und mindestens genauso bemerkenswert.

#### 2.4 Cytoskelett

An den dynamischen Prozessen scheinen auch filamentöse Strukturen beteiligt zu sein. Aufgrund der guten Auflösung und des guten Kontrastes in den Tomogrammen konnten diese Strukturen deutlich wie nie zuvor sichtbar gemacht werden. Dies erlaubte es auch, diese Strukturen in einer kompletten Zelle per manueller Segmentierung zu verfolgen. Das Bild, das sich hierbei zeigt, ist ein hochkomplexes Netzwerk aus Filamenten, das sämtliche Membranstrukturen in der Zelle verbindet. Man kann sagen, dass das innere Membransystem in eine Art filamentöse Matrix eingebettet ist und letztlich so auch in der äußeren Membran verankert ist. Diese neuen Befunde stehen in klarem Widerspruch zu früheren Aussagen über die strukturelle Beschaffenheit des IMCs ("...hardly contains any cellular material..."; Huber *et al.*, 2012). Aufgrund der Dynamik in den Zellen kann ferner eine Beteiligung dieses Netzwerkes an Abschnürungs-/Fusions- und Transportprozessen angenommen werden. Somit zeigen sich auch hier potentiell Gemeinsamkeiten mit Eukaryoten: Stabilität und Dynamik sind die klassisch genannten Funktionen des eukaryotischen Cytoskelettes. Darüber hinaus befindet sich dieses "Cytoskelett" in *Ignicoccus* im IMC, einem Kompartiment, das topologisch gesehen als Äquivalent zum eukaryotischen Cytoplasma angesehen werden kann. Das eukaryotische Cytoplasma ist durchzogen von Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten. Nicht verwunderlich ist, dass homologe Proteine zu den eukaryotischen Filamentproteinen in "Prokaryoten" erst relativ spät gefunden wurden. Auf Aminosäuresequenz-Ebene lassen sich kaum Ähnlichkeiten zu "prokaryotischen" Proteinen feststellen. Homologien liegen daher in ähnlichen Faltungsmustern begründet. In Bakterien konnten bisher eine Vielzahl an Homologen zu Tubulin (z.B. FtsZ, BtubA/B) und Aktin (z.B. MreB, ParM, MamK) sowie einige weitere Cytoskelettproteine wie Crescentin (vermutlich nicht homolog, aber zumindest 'intermediate filament-like') und die sog. 'Walker A Cytoskeletal ATPases' (=WACA; z.B. MinD, ParA und ParF) aufgefunden werden (Shih & Rothfield, 2006; Michie & Löwe, 2006; Michie, 2008; Wickstead & Gull, 2011). Für Archaeen sind dagegen weit weniger Cytoskelettelemente beschrieben. Mit Ausnahme der Crenarchaeoten konnte FtsZ in allen Phyla der Archaeen gefunden werden und nimmt eine zentrale Rolle bei der Zellteilung ein. Nebenbei sei erwähnt, dass die in dieser Arbeit bereits mehrfach zu Vergleichen herangezogenen Planctomyten ebenfalls kein FtsZ besitzen. In Crenarchaeoten geschieht Zellteilung FtsZ-unabhängig mittels des ESCRT-III-Systems, ebenso in *Nitrosopumilus maritimus*, obwohl dieser Organismus FtsZ besitzt (Bernander & Ettema, 2010; Wickstead & Gull, 2011; Ng *et al.*, 2013). In weiteren Thaumarchaeen (*Nitrosarchaeum*) wurden mit Artubulinen zusätzliche Tubulin-Homologe gefunden (Yutin & Koonin, 2012). Für stäbchenförmige Crenarchaeoten (Thermoproteales) und 'Candidatus Korarchaeum cryptofilum' konnten bislang die dem eukaryotischen Aktin ähnlichsten Proteine gefunden werden. Dieses sog. Crenactin scheint zusammen mit Arcadin ('coiled-coil' Proteine) verantwortlich zu sein für das stäbchenförmige Erscheinungsbild dieser Zellen. Bei Euryarchaeoten wird die gleiche Rolle MreB für *Methanopyrus kandleri* und *Methanothermobacter thermoautotrophicus* zugeschrieben (Ettema *et al.*, 2011; Lindås *et al.*, 2014). Auch für *Thermoplasma acidophilum* wurde ein Aktin-Homolog gezeigt (Ta0583), das vermutlich ParM-ähnlich ist und daher eine Rolle bei der DNA-Segregation einnimmt (Hara *et al.*, 2007; Ettema *et al.*, 2011).

Auch WACAs, wie MinD kommen vor (z.B. NEQ119 in *Nanoarchaeum equitans*), doch weder ist deren Funktion in Archaeen klar noch die phylogenetische Beziehung zu bakteriellen MinD Proteinen (Wickstead & Gull, 2011; Giannone *et al.*, 2011).

Um welche Filamente es sich im IMC von *Ignicoccus* handelt, ist völlig unklar. Da der Durchmesser mit 3-6 nm angegeben werden kann, kommen allein unter diesem Aspekt eigentlich alle genannten Filamenttypen in Frage: Eukaryotische Aktin-Mikrofilamente haben einen Durchmesser von 3-6 nm (Carballido-López, 2006). Für "prokaryotische" Homologe liegt der Durchmesser mit 4-7 nm etwa im selben Bereich (Carballido-López, 2006; Komeili *et al.*, 2006; Hara *et al.*, 2007). FtsZ-Protofilamente haben ca. 5 nm Durchmesser (Li *et al.*, 2007). Intermediärfilamente (auch Crescentin) haben ca. 10 nm und sind ebenfalls aus Protofilamenten aufgebaut (Godsel *et al.*, 2007; Ausmees *et al.*, 2003). Diese Protofilamente sind Tetramere, die sich aus zwei 'coiled-coil'-Dimeren zusammensetzen (Godsel *et al.*, 2007). Neben Intermediärfilamenten besitzen auch einige (direkt oder indirekt) interagierende Proteine mit Aktin (z.B. Plectin, Myosin, Tropomyosin) lange  $\alpha$ -helikale Regionen und bilden 'coiled-coil'-Dimere (Ettema *et al.*, 2011). In *Ignicoccus hospitalis* können bislang zwei Proteine gefunden werden, die Ähnliches vermuten lassen (Ignc\_0364, Ignc\_1210). In der KEGG-Datenbank finden sich für diese Proteine vorhergesagte Domänen, die darauf hinweisen (u.a. Intermediärfilament, Spectrin, Myosin; allesamt jedoch mit eher schwachen 'e-values'). Darüber hinaus ergab eine PHYRE2-Analyse der beiden Proteine Treffer u.a. für Tropomyosin, einem Aktin-bindenden Stabilisator des Cytoskelettes (Meshcheryakov *et al.*, 2008). Bisher konnten jedoch weder Aktin- noch Tubulin-Homologe im *Ignicoccus*-Genom/Proteom identifiziert werden. Eine mögliche Existenz von WACAs ist aber nicht auszuschließen: Fünf Proteine aus der 'ParA-type/MinD superfamily' sind annotiert (Ignc\_0172, Ignc\_0173, Ignc\_0646, Ignc\_0722, Ignc\_0741), deren Mitglieder jedoch zahlreiche verschiedene Funktionen inne haben können (Koonin, 1993; Pogliano, 2008). Zuletzt können zwei potentielle Struktur-Proteine gefunden werden. Eines davon (Ignc\_1030) besitzt eine LamG-Domäne (Laminin). Laminine (nicht zu verwechseln mit Laminen, einer großen Gruppe von Intermediärfilamentproteinen) sind trimere 'coiled-coil'-Glykoproteine, in Eukaryoten an der Basallamina-Ausbildung beteiligt und in der Extrazellulären Matrix zu finden; sie haben daher in erster Linie strukturgebende Funktion (Hermann & Aebi, 2004; Domogatskaya *et al.*, 2012). Beim zweiten Protein handelt es sich um ein Protein mit einer 'von-Willebrand-Faktor A'-Domäne (vWA; Ignc\_0876). Diese Domänen sind beispielsweise in Collagenen zu finden, also auch an der Ausbildung der Extrazellulären Matrix beteiligt (Tuckwell, 1999). Der eukaryotische 'von Willebrand'-Faktor selbst, ebenfalls ein Glykoprotein, kann Filamente mit  $\sim 2$ -6.5 nm Durchmesser ausbilden (Fowler *et al.*, 1985). Interessanterweise wurden vWA-Proteine auch bereits in *Sulfolobus* Vesikeln identifiziert (Ellen *et al.*, 2009). In Bakterien sind vWA-Gene oft im gleichen Operon wie FtsZ zu finden (Makarova *et al.*, 2010).

Letztlich muss man festhalten, dass bisher nur schwache Hinweise im Genom von *Ignicoccus hospitalis* auf potentielle Cytoskelettelemente bzw. Strukturproteine gefunden werden können. Die relativ geringe Häufigkeit der meisten dieser Proteine in den Proteomanalysen lässt eine Beteiligung darüber hinaus eher fraglich erscheinen, wenngleich es sie nicht ausschließt. Zudem unterscheiden sich die Strukturen im IMC von bisher beschriebenen "prokaryotischen" Strukturen. Aus den Tomogrammen kann oftmals der Eindruck gewonnen werden, dass kleinere Filamente ( $\sim 2$ -3 nm) umeinander gewunden sind und ein verzweigtes Netzwerk ausbilden. Das beste Beispiel für eine strukturell ähnlich aufgebaute Struktur, das in der Literatur gefunden werden konnte, stellt das spektrinbasierte Cytoskelett in Erythrozyten dar (siehe Nans *et al.*, 2011). Daher wären einerseits die

Untersuchung der oben genannten 'coiled-coil' ('IF-like')-Proteine und andererseits ein bioinformatischer Ansatz zur Identifizierung weiterer 'coiled-coil'-Proteine konsequent die nächsten Schritte.

### 2.5 Poren in der äußeren Membran

Eine drängende Frage seit der Entdeckung und ultrastrukturellen Charakterisierung von *Ignicoccus* war stets, wie die innere und die äußere Membran interagieren können und Stoffaustausch stattfinden kann. Fusionen beider Membranen wurden zwar beschrieben bzw. so interpretiert (Näther & Rachel, 2004; Wasserburger, 2008), wurden aber eher aus der unmittelbaren Nähe von einigen Vesikeln/Cytoplasmaausläufern zur äußeren Membran geschlossen als gezeigt. Eine Interaktion beider Membranen war dennoch unstrittig. Doch es gibt bis heute keine TEM-Aufnahmen, die eine Fusion beider Membranen in überzeugender Weise darstellt; dahingehend kann auch die vorliegende Arbeit nicht dienlich sein. Doch konnte gezeigt werden, dass ringförmige Strukturen an der Kontaktvermittlung beider Membransysteme beteiligt sind. Derartige Strukturen wurden bereits zuvor auffällig und zeigten sich in Ultradünnschnitten als dunkel kontrastierte Strukturen, die unterhalb der äußeren Membran verlaufen (Heimerl, 2009). Erstmals konnten diese Strukturen in 3D dargestellt werden. Von entsprechend "andockenden" Vesikeln bzw. Cytoplasmaausläufern ausgehend können Strukturen gefunden werden, die senkrecht über den Ring zur äußeren Membran laufen. Auch scheinen Filamente wie unter 2.4 beschrieben an der Kontaktausbildung beteiligt zu sein. Ähnliche Strukturen wurden bereits anhand von Gefrierätzungen beschrieben und als '24 nm-Poren' bezeichnet. Um diese '24 nm-Poren', die ca. 10-100 mal pro Zelle vorkommen, sind ebenfalls Ringe zu sehen, die mit einem Durchmesser von 130 nm angegeben wurden (Rachel *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2012). Ob es sich um dieselben Strukturen handelt, ist fraglich, da die in dieser Arbeit gezeigten Strukturen mit ca. 15 nm Innendurchmesser bzw. 40-50 nm Außendurchmesser nur etwa halb so groß beschrieben werden können. Selbst unter Berücksichtigung der verschiedenen Präparationstechniken und damit verbundenen Problemen (z.B. Schrumpfen von Plastikschnitten) erscheint die Diskrepanz doch hoch.

Insgesamt ergeben sich aber erneut potentielle Gemeinsamkeiten mit Eukaryoten (siehe Abbildung 85): In Eukaryoten geschieht Neurotransmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt über Vesikel die an die Cytoplasmamembran unterhalb von dort integrierten Porosomen andocken (Jena *et al.*, 2003; Jena, 2009). Dabei spielen SNARE-Proteine ('soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor') eine entscheidende Rolle. SNAREs in der Vesikelmembran (v-SNAREs) und in der 'target'-Membran (t-SNAREs) interagieren und bilden ringförmige Komplexe. Der Durchmesser der Ringe ist dabei abhängig von der Vesikelgröße (Cho *et al.*, 2005). Weiterhin bringt der SNARE-Komplex beide Membranen sehr nahe aneinander. In einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-abhängigen Prozess können beide Membranen fusionieren (Leabu, 2006; Jena, 2011). Diese Fusion funktioniert nach dem sog. 'kiss and run'-Mechanismus. Es kommt nicht zu einer vollständigen Verschmelzung des Vesikels mit der Ziellmembran, sondern es öffnet sich lediglich für sehr kurze Zeit ein kleiner Spalt, wodurch Neurotransmitter durch die Porosomen in den synaptischen Spalt freigesetzt werden (Kavalali *et al.*, 2009; Alabi & Tsien, 2013). Die Lösung der stabilen SNARE-Komplexe erfolgt über NSF ('N-ethylmaleimide-sensitive factor'), eine hexamere ATPase; homolog zu CDC48/p97, welches u.a. eine ähnliche Rolle in bestimmten Membranfusionsprozessen der eukaryotischen Zelle spielen kann (Zhang *et al.*, 2000; Woodman, 2003; Leabu, 2006; Jena, 2011). Nebenbei sei bemerkt, dass SNARE-

Proteine ebenfalls 'coiled-coil'-Proteine und die zentralen Elemente in beinahe allen Membranfusionsprozessen in Eukaryoten sind (Jahn & Scheller, 2006). Darüber hinaus nutzen einige pathogene Bakterien und Viren SNARE-ähnliche Proteine zur Membran-Manipulation (Wesolowski & Paumet, 2010). Der "konkreteste" Hinweis auf SNARE-Proteine im *Ignicoccus*-Genom ist ein als 'SNARE-associated Golgi protein' annotiertes Gen (Igni\_1083). In den Proteom-Analysen konnten aber nur geringe Mengen ausschließlich in der *Ignicoccus*-Reinkultur nachgewiesen werden. Ferner findet man zwar Gene/Proteine mit vorhergesagten SNARE-Domänen (Syntaxin, Syntaxin\_2, Syntaxin-6\_N), für alle diese Proteine sind jedoch eine Vielzahl an Domänen vorhergesagt, allesamt mit eher schwachen 'e-values' (z.B. Igni\_0437, Igni\_1210, Igni\_1385; sowie Igni\_0995 und Igni\_0996 aus dem ESCRT-Operon).

Letztlich muss man festhalten, dass auch eine Fusion nach dem 'kiss-and-run'-Mechanismus für *Ignicoccus* bisher nicht eindeutig gezeigt wurde und allenfalls aus den strukturell ähnlichen Gegebenheiten zum oben beschriebenen Prozess in Betracht gezogen werden kann. Daher wäre ebenso denkbar für *Ignicoccus*, dass tatsächlich kein Fusionsprozess der beiden Membranen stattfindet. Derartige Membraninteraktionen ohne Fusion scheinen in Eukaryoten eine größere Rolle zu spielen als zunächst angenommen (vermutet wird u.a. zum Lipidaustausch) und sind für die Interaktion von Endoplasmatischem Reticulum mit der Cytoplasmamembran beschrieben (was erneut topologisch äquivalent zu *Ignicoccus* wäre) (Giordano *et al.*, 2013).

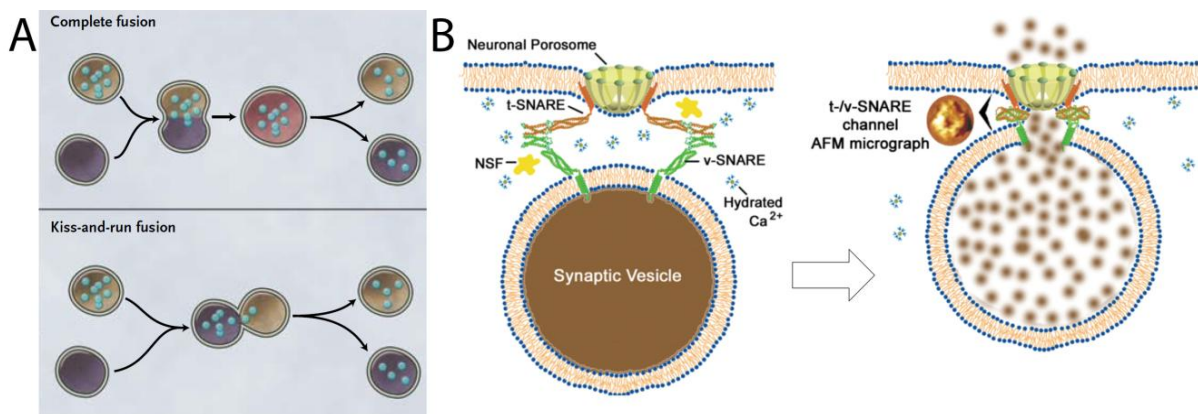


Abbildung 85 (A) 'complete fusion' kann in *Ignicoccus* für das endogene Membransystem angenommen werden; ein 'kiss and run' Mechanismus kann für die Interaktion von endogenem Membransystem und äußerer Membran zumindest in Betracht gezogen werden, De Matteis & Luini, 2011 (B) Fusionsprozess am synaptischen Spalt in Eukaryoten; aus Leabu, 2006 (gekürzt)

## 2.6 *Nanoarchaeum equitans*

*Nanoarchaeum equitans* stellte sich in den Tomogrammen prinzipiell dar, wie bereits zuvor beschrieben. Aufgrund der guten Auflösung und Kontrastverhältnisse konnten die Tomogramme jedoch auch einige interessante bisher unbekannt Details enthüllen.

Zunächst können die Zellen erneut mit etwa 400 nm Durchmesser und einem der Cytoplasmamembran aufgelagerten S-Layer beschrieben werden. Der S-Layer ist dabei äußerst detailliert zu erkennen (detaillierter als bereits publizierte Cryo-Elektronentomogramme; Junglas *et al.*, 2008). Die komplette S-Layer Struktur ist etwa 20 nm dick. Dabei erreichen die 'spacer'-Domänen etwa 14-15 nm Länge. Der daraufliegende eigentliche 'Layer' ist etwa 5-7 nm dick und ähnelt



stellenweise einem Membranbilayer (auch in den Cryo-Elektronentomogrammen zu erkennen; Junglas *et al.*, 2007). Für ein Beispiel (Abbildung 48 C) konnte eine bisher nicht beschriebene Art der Kontaktausbildung zwischen zwei *Nanoarchaeum*-Zellen gefunden werden. Hierbei sind eindeutig die S-Layer beider Zellen beteiligt und bilden eine Art Brücke. Zusätzlich können im Cytoplasma von *Nanoarchaeum equitans* ebenfalls dunkel kontrastierte Stellen gefunden werden, die den potentiellen Polyphosphatspeichern aus *Ignicoccus* (siehe 2.2) ähneln. Im Falle von Abbildung 48 C nimmt diese Struktur sogar ca. 18% des Gesamtvolumens ein.

Hauptaugenmerk der strukturellen Untersuchungen um *Nanoarchaeum* lag aber klar auf der Kontaktstelle zu *Ignicoccus*. Diesbezüglich zeigte sich ein kleines, aber wichtiges Detail, das bisher lediglich anhand weniger Ultradünnschnitte vermutet wurde (Wasserburger, 2008; Heimerl, 2009): Für alle in dieser Arbeit untersuchten Kontaktstellen (mit Elektronentomographie) konnte eine Fusion der Cytoplasmen beider Zellen gezeigt werden. Der S-Layer von *Nanoarchaeum* erscheint dabei lokal aufgelöst und somit nicht direkt am Kontakt beteiligt zu sein. Eine Rolle des S-Layers beim initialen "Kontaktaufnahmeprozess" ist aber nicht auszuschließen. An diesem Initialkontakt sind ferner mehrfach beschriebene Filamentstrukturen beteiligt und lassen auf eine Art 'tethering'-Mechanismus schließen (ähnlich zu Vesikeln) (Junglas, 2006; Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008; Heimerl, 2009; Burghardt *et al.*, 2009). Wie kürzlich gezeigt wurde kann *Nanoarchaeum equitans* aber auch an *Ignicoccus islandicus* und *Ignicoccus pacificus* anheften (Vortrag Louis Wurch, Thermophiles, 2013, Regensburg). Damit ist zumindest die initiale Kontaktausbildung weniger spezifisch als bisher angenommen (siehe Burghardt, 2008; Huber *et al.*, 2012). Die äußere Membran kann an der Kontaktstelle nur schwer verfolgt werden. Es erscheint aber so, dass *Nanoarchaeum* regelrecht ein Loch in diese Membran reißt. Da sich *Nanoarchaeum* oft als nach innen gewölbt an der Kontaktstelle zeigt, könnte auf diese Art mechanischer Stress auf die äußere Membran ausgeübt werden, entweder direkt, sozusagen durch ein Ziehen an der Membran oder evtl. auch indirekt durch lokalen Unterdruck. In diesen Zusammenhang passt auch ein Befund aus den Proteomanalysen, der zeigt, dass mit zunehmender durchschnittlicher Anzahl von *Nanoarchaeen* pro *Ignicoccus*-Zelle vermehrt mechanosensitive Kanäle (Igني\_0056, Igني\_0235) exprimiert werden. Diese Kanäle stellen Sensoren und Effektoren bei mechanischem und osmotischem Stress dar (Booth *et al.*, 2008; Balleza, 2011; Haswell *et al.*, 2011; Sukharev & Sachs, 2012; Wilson *et al.*, 2013). Insgesamt wird eher der Eindruck vermittelt, als ob das Cytoplasma von *Ignicoccus* zur letztlichen Fusion vielmehr herausgezogen/herausgesaugt wird, als das *Nanoarchaeum* in die *Ignicoccus*-Zelle einwächst. Selbst erklärend werden aufgrund einer Fusion der Cytoplasmen beider Zellen Mutmaßungen über differenzierte, selektive Transportmechanismen für Lipide, Aminosäuren, ATP und weitere Nukleotide obsolet.

### 3 Proteomics

#### 3.1 Vergleich Reinkultur/Co-Kultur (stationäre Phase)

Mittels 'whole cell shotgun proteomics' konnte bereits in einer ersten Vergleichsstudie zwischen *Ignicoccus* und der Co-Kultur mit *Nanoarchaeum* eine Mehrheit der vorhergesagten Proteine gefunden werden. Für *Ignicoccus* wurden 73% (1058 von 1444), für *Nanoarchaeum* 85% (476 von 556) der vorhergesagten Proteine gefunden. Die Werte liegen damit für Archaeen an der Spitze und nur knapp hinter *Mycoplasma* (88% bzw. 81%) unter allen bisherigen Proteomstudien (Ahrens *et al.*, 2010; Maupin-Furlow *et al.*, 2012). Trotz dieser guten Abdeckung muss erwähnt werden, dass

methodenbedingt Membranproteine und kleine Proteine tendenziell unterrepräsentiert sind (VerBerkmoes, *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 2009). Es scheint, als ob die meisten Gene konstitutiv exprimiert werden, was die Hypothese eines 'streamlined genome' unterstützt (Podar *et al.*, 2008<sup>1</sup>). Außerdem legt dies die Vermutung nahe, dass Mechanismen zur Regulation der zahlreichen zellulären Prozesse eher auf Proteinebene als auf Gen- bzw. Transkriptionsebene ablaufen; der kompartimentierte Charakter der Zellen gibt in diesem Zusammenhang zusätzlich Raum zur Spekulation. Hinsichtlich des Einflusses von *Nanoarchaeum* auf *Ignicoccus* konnte nur für etwa 10% der *Ignicoccus*-Proteine (106) ein Unterschied um den Faktor 2 und mehr festgestellt werden. Unter den Proteinen, die geringere relative Häufigkeit als in der Reinkultur aufwiesen, finden sich einige zentrale Proteine der Transkriptionsmaschinerie, der Transkriptionsregulation und der Translation. Bei den vermehrt exprimierten Proteinen handelt es sich in erster Linie um Proteine zur Energieversorgung (z.B. ATP-Synthase s.u. I, Igni\_0609; Polysulfid-Reduktase, Igni\_0528), um Proteine aus dem CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg (z.B. PEP-Synthase, Igni\_1113; PEP-Carboxylase, Igni\_0341) und einige weitere zentrale Metabolismusproteine (z.B. Fruktose-1,6-BP, Igni\_0363). Letztlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass *Nanoarchaeum* sowohl energetisch als auch metabolisch abhängig von *Ignicoccus* ist, wenngleich auch *N. equitans* ein gewisses (wenn auch geringes) physiologisches Potential zeigt. Hierzu zählen auch Enzyme, die dem Aminosäure- und Nukleotid-Metabolismus zugeschrieben werden können, und auch die ATP-Synthase-Untereinheiten A (NEQ103) und B (NEQ263) sind nicht in geringer Menge vorhanden. Obwohl anhand dieser minimalen Enzymausstattung von *Nanoarchaeum* eine autarke Lebensweise unwahrscheinlich erscheint, ist beispielsweise eine Prozessierung bzw. ein Umbau von importierten Metaboliten aus *Ignicoccus* durchaus denkbar. Um zu sehen, ob auch Proteine von *Nanoarchaeum* aufgenommen werden, z.B. zur Komplementierung der eigenen reduzierten Stoffwechselwege, wurden gereinigte *Nanoarchaeum*-Zellen analysiert. In diesen Proben wurden 464 *I. hospitalis*-Proteine detektiert. Letztlich sind für diesen Befund zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen: Erstens könnte es sich um Verunreinigungen handeln z.B. von Proteinen aus lysierten *Ignicoccus*-Zellen oder kleineren Membranfragmenten, die mit dem S-Layer von *Nanoarchaeum* noch in Verbindung stehen; zudem stellt MS eine äußerst sensitive Detektionsmethode dar. Zweitens, die Proteine werden von *Ignicoccus* zu *Nanoarchaeum* transportiert. Da alle gefundenen *Ignicoccus*-Proteine jedoch eine geringe, allenfalls moderate relative Häufigkeit aufwiesen und auch eine spezifische Anhäufung von Enzymen einer bestimmten funktionellen Gruppe nicht gefunden werden konnte, wurde (anhand diverser Überlegungen; siehe hierzu 3.1) versucht, eine Liste an Proteinen zu ermitteln, die eventuell spezifisch transportiert werden könnten. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Fusion der Cytoplasmen beider Zellen muss man jedoch davon ausgehen, dass kein spezifischer, sondern unspezifischer Transport von Proteinen stattfindet. Leicht können so auch die ähnlichen relativen Verhältnisse der *Ignicoccus*-Proteine in der *Nanoarchaeum*-"Reinkultur" und der Co-Kultur erklärt werden. Letztlich bleibt die Möglichkeit von Verunreinigungen aber trotzdem bestehen. Dennoch kann über Immunmarkierungsversuche bisher für mindestens fünf Proteine ein Transport zu *Nanoarchaeum* abgeleitet werden, da diese sowohl im Cytoplasma von *Ignicoccus* als auch im Cytoplasma von *Nanoarchaeum* detektiert werden können, obwohl für *Nanoarchaeum* keine derartigen Proteine annotiert sind. Dabei handelt es sich um die Immunmarkierungen der in dieser Arbeit gezeigten AAA-ATPase Vps4 aus dem ESCRT-System (Igni\_0994; siehe Abbildung 70), CdvA (Igni\_0996; siehe Abbildung 73), ein 'Snf7-like'-Protein (Igni\_0101; siehe Abbildung 78), ein WD40-Protein (Igni\_0561; siehe Abbildung 53) und um die Immunmarkierung von Igni\_0475 aus dem CO<sub>2</sub>-Fixierungsweg (Jennifer Flechsler).

### 3.2' Time-Course Proteomics/Transcriptomics'

Durch einen zusätzlichen Chymotrypsinverdau von hydrophoben/un(genügend)verdauten Proteinen nach der Trypsinbehandlung konnte die Proteomabdeckung für *Ignicoccus* auf 80% gesteigert werden. Auf mRNA-Ebene konnten sogar 97% der annotierten ORFs über entsprechende Transkripte identifiziert werden. Im Prinzip zeigten aber auch die Vergleiche der 'Time-Course'-Proben ein ähnliches Bild wie die Proben aus der stationären Phase (siehe 3.1). Insgesamt gesehen war sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene nur ein geringer Einfluss seitens *Nanoarchaeum* festzustellen. Zusammenfassend lässt sich ähnlich zu den Ergebnissen aus den Vergleichen der stationären Phase allein sagen: *Ignicoccus* reagiert auf *Nanoarchaeum* mit einem Anstieg von Proteinen und Komplexen, die in erster Linie der Energiegewinnung und CO<sub>2</sub>-Fixierung zuzuschreiben sind. Auf der anderen Seite wird negativer Einfluss auf die Zellteilung über Kontrollmechanismen der Transkription und Replikation genommen. Diese Ergebnisse, zusammen mit den strukturellen Analysen (siehe 2.6; Wasserburger, 2008; Heimerl, 2009) und der Tatsache, dass bisher kein Vorteil dieser gemeinsamen Lebensweise für *Ignicoccus* gefunden wurde, lassen vermuten, dass es sich bei *Nanoarchaeum* um einen Parasiten oder gar Parasitoiden (Eggleton & Gaston, 1990) handelt.

## **4 Immunmarkierungen**

Wie bereits erwähnt besitzt *Ignicoccus hospitalis* einige homologe Proteine zu eukaryotischen Proteinen, die mit dem endogenen Membransystem in irgendeiner Art und Weise in Verbindung gebracht werden können. Für einige dieser Proteine wurden Antikörper generiert und deren Bindung an Ultradünnschnitten untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert:

### 4.1 WD40-Proteine

Im Gegensatz zu Eukaryoten sind WD40-Proteine in "Prokaryoten" weit seltener und nur wenig ist über deren Funktionen bekannt (Ulrych *et al.*, 2013). Interessanterweise wurden WD40-Proteine auch in Planktomyceten identifiziert und werden dort in Zusammenhang mit deren komplexen endogenen Membransystemen gebracht (Santarella-Mellwig *et al.*, 2010). *Ignicoccus hospitalis* besitzt acht Proteine mit vorhergesagten WD40-Domänen. Für alle diese Proteine wurden (u.a.) Treffer für eukaryotische 'Coatomer'-Proteine in einer PHYRE2-Analyse erhalten. Für zwei von diesen acht Proteinen (Igni\_0008 und Igni\_0561) wurden Antikörper generiert. Im Western Blot zeigten beide Proteine je zwei prominente Banden, die eine Oligomerisierung vermuten lassen; Homo- und Heterodimere von WD40 Proteinen sind durchaus bekannt (Adams *et al.*, 2011). Darüber hinaus zeigten in beiden Fällen die potentiellen Monomere eine kleinere als die vorhergesagte Proteingröße. Im Falle von Igni\_0008 gibt es in diesem Zusammenhang Hinweise auf eine eventuelle falsche Annotation des Translationsstartes, die dies erklären könnte. Über eine Erklärung für Igni\_0561 kann derzeit nur spekuliert werden. In den Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten zeigte sich für beide Proteine ein völlig verschiedenes Markierungsmuster. Igni\_0008 war vorwiegend in der äußeren Membran zu finden (zusätzlich bekräftigt durch 'freeze fracture labeling'), Igni\_0561 fast ausschließlich im Cytoplasma. Eine Funktion ähnlich der eukaryotischen 'Coatomer'-Proteine ist daher auszuschließen. In Anbetracht der Existenz von Poren in der äußeren Membran von *Ignicoccus* ('24 nm pores' und/oder die Komplexe unter Punkt 2.5) ist dennoch insbesondere die Markierung von Igni\_0008 interessant. Das eukaryotische 'Coatomer'-Protein Sec13 ist nämlich auch beteiligt an der Ausbildung von 'Nuclear Pore Complexes' (NPCs) (Antonin *et al.*, 2008; Xu & Min, 2011). Darüber

hinaus vermittelt ein weiteres WD40-Protein (Sro7 in *Saccharomyces cerevisiae*; 'lethal giant larvae' = Lgl in *Drosophila melanogaster*; Tomosyn in Säugetieren) die Fusion von Vesikeln mit der Cytoplasmamembran durch Regulation von SNARE-Interaktionen. Unter strukturellem Gesichtspunkt ebenso interessant für *Ignicoccus* ist in diesem Zusammenhang, dass dieselben WD40-Proteine (Sro7/Lgl) auch an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt sind (Zhang *et al.*, 2005; Hattendorf *et al.*, 2007; Fasshauer & Jahn, 2007; Ashery *et al.*, 2009). Interessanterweise tauchte Sro7 in den PHYRE2-Analysen für das "verkürzte" Igni\_0008 Protein an vierter Stelle auf. Auch darüber hinaus lässt sich über eine strukturgebende Funktion von Igni\_0008 spekulieren, da jüngst ein WD40-Protein (Afe\_2303) als potentielles S-Layer-Protein von *Acidithiobacillus ferrooxidans* identifiziert wurde (Klingl, 2011; Klingl *et al.*, 2011). Während sich für Igni\_0008 die Möglichkeiten für potentielle Funktionen anhand der Lokalisierung zumindest einschränken lassen, ist es ungleich schwieriger, mögliche Funktionen für Igni\_0561 aus der Lokalisation abzuleiten. In Eukaryoten sind WD40-Domänen mitunter die häufigsten vorkommenden Domänen und haben trotz eines gemeinsamen Sequenzmotives eine hohe funktionelle Diversität. Sie sind u.a. beteiligt an Signaltransduktionsprozessen, Cytoskelettzusammenbau, Zellzykluskontrolle, Apoptose, Transkriptionsregulation, Zellteilung und RNA-Prozessierung (Smith *et al.*, 1999; Stirnimann *et al.*, 2010; Xu & Min, 2011). Dabei dienen sie im Prinzip als Adapter bzw. Interaktionsplattformen zur (reversiblen) Bildung größerer Proteinkomplexe bzw. Protein-DNA-Komplexe (Smith *et al.*, 1999; Xu & Min, 2011) und sind somit die zentralen Schnittstellen in zahlreichen zellulären Netzwerken (Stirnimann *et al.*, 2010). Interessanterweise besitzen WD40-Domänen selbst keine katalytische Aktivität (zumindest wurde bisher keine gefunden), die Proteine haben aber oft zusätzliche, katalytisch aktive Domänen (Xu & Min, 2011; Adams *et al.*, 2011). In Anbetracht zusätzlich annotierter Domänen für Igni\_0561 würde daher am ehesten eine Funktion bei Transkription oder Translation für dieses Protein in Frage kommen. Hierzu passt auch, dass das Protein generell in den Proteomanalysen häufig vorzufinden war und zudem in der Co-Kultur reprimiert wird.

#### 4.2 V4R-Proteine

In *Ignicoccus* können sieben Proteine mit einer V4R-Domäne gefunden werden. Diese Proteine sind homolog zu Bet3, einer Untereinheit aus einem eukaryotischen 'vesicle tethering complex' (TRAPP I) (Podar *et al.*, 2008<sup>2</sup>). Derartige Komplexe "fangen" sozusagen Vesikel ein und bringen sie nahe an die Zielmembran. Dadurch wird die Interaktion von SNARE-Proteinen in der Vesikel- und Zielmembran ermöglicht, womit der eigentliche Fusionsprozess beginnt (Cai *et al.*, 2007<sup>1</sup>; DeMatteis & Luini, 2011). Im Falle des 'TRAPP I'-Komplexes ist Bet3 dabei die Untereinheit, die direkt an den Vesikel-'coat' (genauer an Sec23) bindet (Cai *et al.*, 2007<sup>2</sup>). Immunmarkierungen mit Antikörpern gegen ein Bet3-homologes Protein aus *Ignicoccus* (Igni\_1332) zeigten in den Ultradünnschnitten häufig Markierungen in der Cytoplasmamembran, mitunter an vielen Stellen, an denen sich Membranen nahe kommen. Darüber hinaus konnten auch Markierungen an den filamentösen Strukturen auf den Vesikeln/Cytoplasmaausläufern gefunden werden. Aufgrund dieser Markierungsmuster ist es durchaus vorstellbar, dass Igni\_1332 eine ähnliche Rolle in *Ignicoccus* wie Bet3 in Eukaryoten spielt und an der Initiation von Membranfusionsprozessen beteiligt ist. In einer Co-Immunpräzipitation mit dem Antikörper Igni\_1332 konnte neben dem eigentlichen Protein auch eine Komponente eines vorhergesagten ABC-Phosphattransporters (Igni\_0975) identifiziert werden. Somit würde sich ein direkter Zusammenhang zwischen 'tethering' von Vesikeln/Cytoplasmaausläufern und Phosphattranslokation ergeben. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass tatsächlich

gelegentlich dunkel kontrastierte Ausläufer/Vesikel gefunden werden können, die eventuell auf einen erhöhten Phosphatgehalt hindeuten könnten (wg. der hohen Affinität des Kontrastmittels Uranylacetat zu Phosphatgruppen). Für die zwei weiteren Banden ergaben sich Treffer für CDC48 (Igni\_1431 bzw. Igni\_0693) und PEP-Synthase (Igni\_1113). Diese sind jedoch aufgrund der geringen Anzahl von 'spectral counts' tendenziell unsicher.

#### 4.3 ESCRT-III

In Eukaryoten werden durch Ubiquitinierung Membranproteine in MVBs ('multivesicular bodies', endosomaler Ursprung) sortiert und durch Fusion der MVBs mit den Lysosomen abgebaut. Den Sortierungsprozess in sogenannte ILVs ('intraluminal vesicles') in den MVBs regulieren die Proteinkomplexe ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III ('endosomal sorting complex required for transport') in chronologischer Reihenfolge. Weiterhin sind ESCRTs u.a. an der Cytokinese beteiligt, an der Abtrennung der Zellen nach Zellteilung und am 'virus budding' (z.B. HIV) (Ghazi-Tabatabai *et al.*, 2009; Guizetti *et al.*, 2011; Williams & Urbé, 2011). In all diesen Prozessen spielen Membranmanipulationen eine Rolle. Einige Crenarchaeen (Sulfolobales, Desulfurococcales) besitzen homologe Komponenten von ESCRT-III bzw. Vps4, eine ESCRT-III assoziierte 'type I' AAA-ATPase (Bernander & Ettema, 2010). Für *Sulfolobus acidocaldarius* wurde eine Beteiligung dieser Komponenten an der Zellteilung gezeigt (Lindås *et al.* 2008; Samson *et al.*, 2008) und kann nicht zuletzt aufgrund des Fehlens von FtsZ allgemein für Sulfolobales und Desulfurococcales angenommen werden (Samson & Bell, 2009; Makarova *et al.*, 2010; Bernander & Ettema, 2010). Thaumarchaeota besitzen sowohl FtsZ und ESCRT-Homologe und für *Nitrosopumilus maritimus* wurde bereits gezeigt, dass ESCRT an der Zellteilung beteiligt ist (FtsZ spielt vermutlich keine Rolle bei der Zellteilung) (Pelve *et al.*, 2011; Yutin & Koonin, 2012; Lindås & Bernander, 2013). Darüber hinaus wurden ESCRT-Komponenten in Proteomanalysen von *Sulfolobus*-Vesikeln gefunden und auch eine Funktion beim 'virus budding' von STIV ('*Sulfolobus* turreted icosahedral virus') wurde gezeigt (Ellen *et al.*, 2009; Snyder *et al.*, 2013). Die eigentlichen homologen Komponenten in Archaeen werden als CdvB und CdvC bezeichnet, wobei CdvB homolog zu eukaryotischem Snf7 ist und CdvC homolog zu Vps4. Da die einzelnen Komponenten des eukaryotischen ESCRT-III-Komplexes strukturell sehr ähnlich sind, wird CdvB oftmals auch schlicht als ESCRT-III bezeichnet. Zusammen mit CdvB und CdvC bildet CdvA (ein archaeenspezifisches 'coiled-coil'-Protein) oftmals ein Operon. Daneben können in der Regel weitere Snf7-Homologe je Genom gefunden werden, die anders als CdvB jedoch keine C-terminale 'winged-helix' (wH) Region besitzen. Auch in *Ignicoccus* bilden CdvA (Igni\_0996), CdvB (Igni\_0995) und CdvC (Igni\_0994) ein Operon. Zusätzlich können zwei Snf7-Homologe gefunden werden (Igni\_0101, Igni\_1156) (Lindås *et al.* 2008; Samson *et al.*, 2008; Makarova *et al.*, 2010; Samson *et al.*, 2011). 'Multiple Sequence Alignments' von CdvA, CdvB und den beiden weiteren 'Snf7-like'-Proteinen aus *Ignicoccus hospitalis* mit weiteren Archaeen und Eukaryoten finden sich in den 'Supplementals' von Lindås *et al.* 2008 und Samson *et al.*, 2011.

Für CdvC (Vps4) konnte auf den Ultradünnschnitten eine Markierung im Cytoplasma und in der Cytoplasmamembran gezeigt werden. Außerdem war das Protein in *Nanoarchaeum equitans* zu detektieren, was einen Transfer von *Ignicoccus* zu *Nanoarchaeum* nahe legt (siehe hierzu auch 3.1). Im Western Blot war das Protein in der *Ignicoccus*-Reinkultur eindeutig zu identifizieren, in der Co-Kultur hingegen nur zu einem frühen Zeitpunkt in der Wachstumsphase. Dieses Ergebnis korreliert daher sehr gut mit den Proteomanalysen. Aufgrund der Hemmung des Wachstums von *Ignicoccus* bei

steigender Anzahl von *Nanoarchaeen* in der Co-Kultur (Jahn *et al.*, 2008) kann eine vermutete Beteiligung des Proteins an der Zellteilung angenommen werden. Eine Lokalisierung des Proteins in der Cytoplasmamembran schließt aber auch eine Beteiligung an Membranfusions- oder Abschnürungsprozessen nicht aus.

Die Immunmarkierungen für CdvB sind nur als sehr unsicher zu betrachten, da kein Antikörper gegen das *Ignicoccus*-Protein generiert und auf Antikörper gegen die homologen Proteine aus *Sulfolobus acidocaldarius* und *Sulfolobus solfataricus* zurückgegriffen wurde. Darüber hinaus ist CdvB in *Ignicoccus* nur entfernt verwandt zu anderen CdvB-Proteinen (Lindås *et al.* 2008). Dennoch besitzt das Protein eine C-terminale 'winged-helix' (wH), die als Bindungsstelle für CdvA gilt. Mit MIM2 ('MIT-interacting motif') fehlt aber eine potentielle Interaktionsstelle für Vps4 (Samson *et al.*, 2011; PHYRE2). Für die Immunmarkierungen bleibt trotzdem festzuhalten, dass die beiden Antikörper auf den Schnitten ein ähnliches Markierungsmuster zeigten, nämlich vorwiegend in den beiden Membranen. Außerdem war dieses Markierungsmuster deutlich zu unterscheiden von den Markierungsmustern der weiteren ESCRT-III-Homologe außerhalb des Operons, die (so gut wie) keine Markierung in der äußeren Membran aufwiesen. Die Markierung der beiden *Ignicoccus*-Antikörper sowie eines Antikörpers gegen ein homologes Snf7-Protein aus *Sulfolobus solfataricus* zeigten tendenziell eine Markierung im Cytoplasma und auch in einigen Membranen von Vesikeln/Cytoplasmaausläufern. Obwohl in *Sulfolobus acidocaldarius* diese zusätzlichen ESCRT-III-Homologe mit sich selbst, untereinander und teilweise mit CdvB Oligomere bilden können (womit außerdem die Banden im Western Blot für *Ignicoccus* erklärt werden können), ist nicht klar, ob sie überhaupt eine Rolle bei der Zellteilung spielen (Samson *et al.*, 2008; Samson & Bell, 2009; Samson *et al.*, 2011). Beispielsweise ist in Eukaryoten eine Funktion von Snf7 als Aktivator eines Transkriptionsfaktors durchaus bekannt (Weiss *et al.*, 2009).

CdvA kommt in Zellen nur in geringer Menge vor (Moriscot *et al.*, 2011). Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass CdvA in den Proteomanalysen (mit einer derzeit nicht zu erklärenden Ausnahme) nicht detektiert werden konnte bzw. im Western Blot nur mit sehr langer Belichtungszeit. In den Immunmarkierungen war CdvA in den meisten Zellen homogen verteilt im Cytoplasma vorzufinden, in einigen Zellen gab es jedoch Cluster von Proteinen. In einem Fall konnte eine Anhäufung in der Cytoplasma-"Mitte" gefunden werden. Für *Metallosphaera sedula* konnten *in vitro*-Versuche bereits zeigen, dass DNA CdvA-Filamente stabilisiert. Die vermutete DNA-Bindungsstelle ist hierbei die 'coiled-coil'-Region von CdvA (Moriscot *et al.*, 2011). Interessanterweise ist DNA in *Ignicoccus* ebenfalls in Clustern im Cytoplasma zu finden (detektiert mit  $\alpha$ -DNA-Antikörpern; Jennifer Flechsler, persönliche Mitteilung), so dass für CdvA aus *Ignicoccus* ebenfalls eine potentielle Rolle bei der DNA-Segregation in Frage käme (Lindås & Bernander, 2013). Da dieser Prozess selbsterklärend zellzyklusabhängig ist, könnten damit auch die verschiedenen Markierungsmuster erklärt werden.

#### 4.4 CDC48/p97

CDC48/p97/VCP/VAT ist eine homo-hexamere ATPase, gehört zur Proteinfamilie der AAA-Proteine ('ATPases associated with diverse cellular activities') und ist eines der häufigsten Proteine in Eukaryoten (Zhang *et al.*, 2000; Lupas & Martin, 2002; Baek *et al.*, 2013). In erster Linie sind diese Proteine an der Entfaltung von Proteinen beteiligt sowie an der Disassemblierung von Proteinkomplexen. In Eukaryoten spielen sie eine wichtige Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen, wie z.B. bei der ubiquitinvermittelten Proteindegradation und bei Membranfusionsprozessen

(Yamanaka *et al.*, 2012; Baek *et al.*, 2013). Für das archaeelle Homolog VAT aus *Thermoplasma acidophilum* wurde ebenfalls eine Protein-Entfaltungs-Aktivität gezeigt (Gerega *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde für *Thermoplasma acidophilum* und für *Methanosarcina mazei* gezeigt, dass archaeelle CDC48-Proteine an die 20S-Proteasom-Untereinheit binden können (Barthelme & Sauer, 2012; Forouzan *et al.*, 2012). Notwendig ist hierfür ein sogenanntes HbYX-Motiv, das in vielen archaeellen, aber auch eukaryotischen CDC48-Proteinen (und weiteren AAA-ATPasen) zu finden ist. Daher wird einerseits für Archaeen über ein proteasomregulierendes Netzwerk aus AAA-ATPasen spekuliert, sowie andererseits für Eukaryoten ein ähnliches Bindungspotential der CDC48-Proteine an das 20S-Proteasom (Barthelme & Sauer, 2013; Pick & Bermann, 2013). Für ein CDC48-homologes Protein aus *Ignicoccus hospitalis* (Igني\_1431) wurde ein Antikörper generiert. Um die Spezifität zu erhöhen, wurde hierfür nur der N-terminale Teil des Proteins (220 Aminosäuren) rekombinant hergestellt. Der Antikörper zeigte Reaktivität im Western Blot gegen alle *Ignicoccus*-Spezies. Ebenso zeigten Fluoreszenzmarkierungen eine Lokalisierung des Proteins in der äußeren Membran aller *Ignicoccus*-Vertreter. Für *Ignicoccus hospitalis* wurde der Antikörper zudem an Ultradünnschnitten getestet. Hier zeigte sich ebenfalls eine eindeutige Markierung der äußeren Membran. Bei hoher Konzentration des Antikörpers zeigten sich auch stellenweise Markierungen in der Cytoplasmamembran. Da praktisch kein Hintergrundsignal bei diesen Markierungen zu sehen war, ist davon auszugehen, dass auch die Markierung in der Cytoplasmamembran spezifisch ist. Zusätzlich bestätigt werden kann die Lokalisation in der äußeren Membran durch die Tatsache, dass dieses Protein immer auch in MALDI-Analysen von Präparationen der äußeren Membran zu finden ist (Burghardt, 2008; Lydia Kreuter, persönliche Mitteilung). Über Funktionen von CDC48 kann derzeit nur spekuliert werden. Denkbar wäre eine Funktion bei der Interaktion zwischen innerer und äußerer Membran und einer Manipulation von potentiellen SNARE-Komplexen, wie sie für Eukaryoten gezeigt wurde (Woodman, 2003). Ebenfalls ist interessant, dass in einer Analyse der Zellhülle auch die  $\alpha$ -Untereinheit des Proteasoms gefunden wurde (Igني\_0453) sowie eine der beiden vorhergesagten  $\beta$ -Untereinheiten (Igني\_0980; die zweite ist Igني\_0616) (Burghardt, 2008). Ebenso wurden zwei Thermosom-Proteine (Igني\_0096 und Igني\_0897) aus Zellhüllpräparationen identifiziert und eines davon (Igني\_0897) isoliert (Burghardt, 2008; Mayer, 2008). In Ultradünnschnitten zeigte sich das Thermosom-Protein sowohl im Cytoplasma als auch in der äußeren Membran und ist damit neben *Sulfolobus shibatae* das einzige archaeelle Beispiel für membranassoziierte Hsp60-Proteine (Trent *et al.*, 2003; Heimerl, 2009). Alles in allem häufen sich also Hinweise, dass in der äußeren Membran Proteinprozessierung statt finden könnte, mit CDC48 als einem möglichen Regulator. Spekulationen in diese Richtung können unter 4.5 und 4.6 noch weiter geführt werden.

#### 4.5 Sec61 $\beta$

Translokation von ungefalteten Proteinen geschieht in Archaeen über den sogenannten SecYE $\beta$ -Komplex. Der Name leitet sich ab aus Homologien zu den Untereinheiten SecY und SecE des bakteriellen SecYEG-Komplexes und aus Homologie zu Sec61 $\beta$  des eukaryotischen Sec61-Komplexes (bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Ellen *et al.*, 2010; Klingl *et al.*, 2013). Primär wurde gegen das Sec61 $\beta$ -Protein aus *Ignicoccus* (Igني\_1061) ein Antikörper generiert aufgrund der ersten Proteomanalyse. Hierbei konnte das Protein nämlich nicht in der *Ignicoccus*-Reinkultur gefunden werden, sondern nur in der Co-Kultur. In der zweiten Proteomanalyse konnte dies jedoch nicht bestätigt werden, wenngleich das Protein in zwei Reinkultur- und zwei Co-Kultur-Proben nur in sehr geringer Menge zu detektieren war. Trotz der vorhergesagten Proteingröße für Igني\_1061 konnte

auch bei kürzerer Blotzeit (als den standardmäßig verwendeten 30 min bei 11 V) keine Bande bei 6 kDa im Western Blot detektiert werden. Die prominentesten Banden waren bei ca. 25 kDa, 55 kDa und 80 kDa zu finden. Ob sich hierin Bindungen zu einzelnen Untereinheiten bzw. der Gesamtkomplex widerspiegeln, muss derzeit offen bleiben. Ein Antikörper gegen ein eukaryotisches Sec61 $\beta$ -Protein lieferte ebenfalls eine (einzeln) Bande bei ca. 55 kDa. Da dieser Antikörper nur gegen ein kleines Peptid aus wenigen Aminosäuren generiert wurde, wäre es denkbar, dass dieses nur zugänglich bei Bindung an SecY (ca. 51 kDa) ist (falls die obige Annahme stimmt). Auf den Ultradünnschnitten hingegen lieferten beide Antikörper ein ähnliches Markierungsmuster. Zu detektieren war das Protein in beiden Membranen und dem Cytoplasma. Auffällig war dabei vor allem die Markierung in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen in der äußeren Membran. Zu diesen Befunden passen erneut auch Proteomanalysen der äußeren Membran von *Ignicoccus*, in denen SecY (Igni\_1199) identifiziert werden konnte (Burghardt, 2008). Da wie unter 4.3 erwähnt auch Proteasomen in der äußeren Membran gefunden wurden, ergibt sich ein interessanter Zusammenhang und eventuell eine Erklärung warum: Für Eukaryoten wurde gezeigt, dass Proteasomen direkt an den Sec61-Komplex binden können, darüber hinaus konnte mittels Co-Immunpräzipitation (neben einigen anderen Proteinen) auch CDC48 in diesen Komplexen gefunden werden (Ng *et al.*, 2007). Im Übrigen werden über den Sec61-Komplex nicht nur ungefaltete Proteine transloziert, sondern auch Proteine in Membranen eingebaut (Oliver *et al.*, 1995; Rapoport, 2007). Eine Funktion, die gerade in der (wie es scheint äußerst proteinreichen) äußeren Membran von *Ignicoccus gut* vorstellbar ist.

#### 4.6 SUMO

SUMOs ('small ubiquitin-related modifier') sind eine Gruppe von Proteinen in Eukaryoten, die in ihrer 3D-Struktur hohe Ähnlichkeit zu Ubiquitin aufweisen. Die Sequenzähnlichkeit ist jedoch lediglich ca. 18% (Müller *et al.*, 2001). Das gemeinsame Faltungsmuster dieser beiden Proteine - ein ' $\beta$ -grasp-fold' - sowie ein konserviertes, C-terminales Di-Glycin-Motiv teilen auch archaelle Proteine, die ebenfalls nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu SUMO oder Ubiquitin aufweisen (Humbard *et al.*, 2010). Ursprünglich wurde für diese archaellen Proteine eine Funktion zur Schwefelaktivierung für die Thiamin- und Molybdän-/Wolfram-Cofaktor-Biosynthese vorausgesagt (ThisF/MoaD). Bezeichnet werden sie als SAMPs ('small archaeal modifier proteins') und spielen vermutlich, wie Ubiquitin in Eukaryoten, eine Rolle bei Proteindegradationsprozessen über die Proteasomen; abzubauen Proteine werden mit SAMP über Isopeptidbindung modifiziert, also sozusagen für den Abbau markiert (Humbard *et al.*, 2010; Maupin-Furlow, 2013). Proteine mit ' $\beta$ -grasp-fold' (MoaD-Typ) finden sich auch in *Ignicoccus hospitalis* (Igni\_0260 und Igni\_0820). Im Falle von Igni\_0260 ist die MoaD-Domäne mit MoaE fusioniert, so dass nur Igni\_0860 ein endständiges Di-Glycin-Motiv besitzt (Makarova & Koonin, 2010). In den Proteomanalysen konnte Igni\_0860 nicht identifiziert werden. Ein nahe liegender Grund hierfür ist, dass Igni\_0860 lediglich 88 Aminosäuren besitzt und, wie erwähnt, kleine Proteine in den Analysen generell unterrepräsentiert sind.

Da ein Antikörper gegen eukaryotisches SUMO verfügbar war, wurde dieser ebenfalls im Western Blot und an Ultradünnschnitten getestet. Im Western Blot zeigten sich mehrere Banden. Somit ergibt sich (rein oberflächlich betrachtet) eine Parallele zu SAMP in *Haloferax volcanii* (Humbard *et al.*, 2010). Interessanterweise unterschieden sich die Markierungsmuster auf den Ultradünnschnitten. In den meisten Fällen konnte eine Markierung im Cytoplasma und der äußeren Membran gesehen werden,



daneben gab es aber auch Markierungen, die (fast) ausschließlich im Cytoplasma bzw. der äußeren Membran zu finden waren. Dies könnte einerseits Zellzyklusabhängigkeit nahe legen oder andererseits (in Hinblick auf Spekulationen bezüglich proteasomalen Abbaus) unterschiedliche Stresslevel der Zellen.

Obwohl sowohl Western Blot als auch Ultradünnschnitte Ergebnisse lieferten, muss hierzu unbedingt gesagt werden, dass letztlich nicht klar, ist was dieser Antikörper wirklich bindet bzw. ob hiermit tatsächlich 'SAMPylierte' Proteine detektiert wurden. Für sich genommen sind die Befunde daher schwach, dennoch fügen sie sich gut in die Spekulation über ein Proteinprozessierungssystem in der äußeren Membran ein, was ein Grund war, sie letztlich auch in diese Arbeit mit aufzunehmen. Der zweite Grund zielt bereits auf den Ausblick ab und ist eine Empfehlung für diese beiden ' $\beta$ -grasp-fold'-Proteine aus *Ignicoccus* Antikörper zu generieren. Ubiquitin ist ein zentrales Protein für eukaryotische Prozesse (nicht nur proteolytische) und eine Vielzahl der in dieser Arbeit untersuchten/erwähnten Proteine können in Eukaryoten mit Ubiquitin in Verbindung gebracht werden: ESCRTs, CDC48, WD40-Proteine, der Sec61-Komplex und schließlich Proteasomen (Ghislain *et al.*, 1996; Rumpf & Jentsch, 2006; Qiu *et al.*, 2009; Bagola *et al.*, 2011; Williams & Urbé, 2011). Darüber hinaus wird über SAMPylierung von Thermosomen in *Sulfolobus* spekuliert (Makarova & Koonin, 2010).

## 5 Spekulation

Um zum Schluss noch einmal den Bogen zur Einleitung zu spannen, soll kurz noch ein Gedanke festgehalten werden. Die Befunde der Arbeit erlauben eine (zugegebenermaßen) gewagte Spekulation über die Entstehung des Zellkerns in Eukaryoten: Wenngleich *Ignicoccus* bereits als 'host' vorgeschlagen wurde (Godde, 2012), gehen, wie eingangs erwähnt, viele Szenarien von einem archaellen Endosymbionten aus. Was wäre also, wenn ein strukturell ähnlicher Organismus zu *Ignicoccus* evtl. aus einem 'TACK'-Superphylum (eine direkte Beziehung von *Ignicoccus* zu Eukaryoten kann phylogenetisch nicht gestützt werden; Rochette *et al.*, 2014) in einem Endosymbioseszenario nicht der 'host' wäre, sondern der Endosymbiont?

Mit Homologen von CDC48, Sec61 $\beta$  und NPC-Proteinen wurden drei Proteine in der äußeren Membran lokalisiert, die charakteristisch für die Kernmembran bzw. das endogene Membransystem in Eukaryoten sind. Darüber hinaus können strukturelle Parallelen des endogenen Membransystems in *Ignicoccus* insbesondere zu primitiv angesehenen Eukaryoten (z.B. *Giardia*) gefunden werden. Von daher würde ein derartiges Szenario eine Reduktion des IMCs erfordern sowie die Auflösung der ursprünglichen Cytoplasmamembran, die sozusagen durch die äußere Membran ersetzt wird; die strukturelle Gestalt des Cytoplasmas und deren Dynamik bleibt dabei erhalten. Erklärbar wäre diese Reduktion eventuell z.B. mit den geänderten osmotischen Bedingungen in einer Wirtszelle oder dass eine innere heterochirale Membran weniger stabil ist als eine äußere. Außerdem ergäben Topologie und Orientierung der Proteinkomplexe, wie für andere Endosymbiose-Hypothesen angeprangert (Jékely, 2006), keinen Konflikt. Dieses Szenario hätte darüber hinaus einen zusätzlichen Vorteil: Die gefundenen Filamente im IMC von *Ignicoccus* wären in komprimiertem Zustand (also bei reduziertem/aufgelöstem IMC) gut als Vorläufer einer Kernlamina vorstellbar.

Zuletzt bleiben aber mindestens (!) zwei Fragen bestehen: Wer ist in dieser Hypothese der Wirt? Ist eine derartige Hypothese phylogenetisch gesehen tragbar?



## V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Präparationsmethode entwickelt werden zur FIB/SEM-Analyse von *Ignicoccus*. In diesem Rahmen wurde ebenfalls eine Filtermethode zur Konzentrierung von Zellen etabliert, die sich allgemein für die Probenpräparation von *Ignicoccus* zu Elektronenmikroskopiezwecken als nützlich erwies, da sie effiziente Konzentrierung der Zellen bei optimaler Strukturhaltung bietet. Die 3D-Modelle aus den FIB/SEM-Analysen lieferten einen umfassenden Überblick zur Beschaffenheit der Zellen: Die Zellen besitzen neben einer äußeren Membran ein komplexes endogenes Membransystem, das neben einem Cytoplasma zahlreiche membranumschlossene röhrenförmige Gebilde und (wenige) "freie" Vesikel umfasst. Die Zellen sind daher kompartimentiert, aber auch polarisiert. Die Relation der einzelnen Kompartimente zueinander wurde umfassend dargelegt und strukturelle Ähnlichkeiten zum eukaryotischen endogenen Membransystem diskutiert. Auch konnten Einschlüsse im Cytoplasma gefunden werden, die EDX-Analysen zufolge potentielle Polyphosphatspeicher darstellen. Daneben wurden weitere Einschlüsse im Cytoplasma von bisher unbekannter Natur gefunden. Mittels Elektronentomographie von Serienschnitten konnten darüber hinaus hochauflösende Rekonstruktionen von *Ignicoccus* angefertigt werden. Damit ist *Ignicoccus* das erste Archaeum, für das komplette Zellen mit dieser hochauflösenden Methode rekonstruiert wurden. In diesen Tomogrammen konnten drei wichtige strukturelle Details visualisiert werden: Erstens zeigte sich im IMC eine umfangreiche filamentöse Matrix, die letztlich die Komponenten des endogenen Membransystems untereinander sowie mit der äußeren Membran verbindet. In Anbetracht der dynamischen Verhältnisse des endogenen Membransystems liegt eine Beteiligung dieser Strukturen an der Dynamik nahe und würde sie funktionell als Cytoskelett charakterisieren. Zweitens konnten Interaktionsstellen zwischen innerem Membransystem und äußerer Membran gefunden und als ringförmige Komplexe charakterisiert werden. Drittens, eine bisher lediglich vermutete Interaktion von *Ignicoccus* mit *Nanoarchaeum* über Fusionierung der Cytoplasmen beider Zellen konnte erstmals und für mehrere Beispiele deutlich gezeigt werden.

Weiterhin konnten in umfangreichen Proteomanalysen für *Ignicoccus* ca. 80% aller vorhergesagten Proteine gefunden werden, für *Nanoarchaeum* ca. 85%. Sie lieferten damit mitunter die höchsten Abdeckungswerte derartiger Analysen, die bisher überhaupt erreicht wurden. Auf mRNA-Ebene konnten (zusammengenommen) sogar für ca. 97% der annotierten ORFs Transkripte detektiert werden und beweisen damit die Theorie eines 'streamlined genomes' in *Ignicoccus*. Vergleichend zeigte sich insgesamt lediglich ein geringer Einfluss seitens *Nanoarchaeum* auf *Ignicoccus* (sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene). Der größte Einfluss spiegelte sich tendenziell in Hochregulierung von Energiestoffwechsel und CO<sub>2</sub>-Fixierung sowie einer Repression von Transkription und Zellteilung in *Ignicoccus* wider.

Letztlich wurden homologe Proteine des eukaryotischen Vesikeltransportsystems in *Ignicoccus* lokalisiert. Aufgrund der Ergebnisse wurden mögliche Funktionen diskutiert, bleiben insgesamt aber an vielen Stellen spekulativ: Eines der WD40-Proteine (Igni\_0561) war im Cytoplasma lokalisiert und legt aufgrund zusätzlich annotierter Domänen eine Beteiligung an Transkription bzw. Translation nahe. Ein weiteres WD40-Protein befand sich in der äußeren Membran von *Ignicoccus*. Hierfür kann vor allem über Beteiligung an Poren-Komplexen oder generell strukturgebende Funktion spekuliert werden. Ein V4R-Protein (Igni\_1332) legt aufgrund seiner Lokalisation eine ähnliche 'tethering' Funktion wie in Eukaryoten nahe und scheint zudem an ein Phosphattransportsystem gekoppelt zu sein. Die ESCRT-Proteine scheinen, wie allgemein für Crenarchaeen vermutet wird, an der Zellteilung

beteiligt zu sein. Eine Rolle für Membranabschnürungs- und Fusionsprozesse kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Die Lokalisierung eines CDC48-Proteins, Sec61 $\beta$  und evtl. ' $\beta$ -grasp-fold'-Proteinen lassen aufgrund von potentiellen Interaktionspartnern und zusammen mit Hinweisen auf die Existenz von Proteasomen und Thermosomen in der äußeren Membran Spekulationen über ein Proteinprozessierungssystem (Faltung/Entfaltung/Einbau/Abbau) in bzw. assoziiert mit der äußeren Membran zu.

## VI Ausblick

Aus der vorliegenden Arbeit ergibt sich eine Vielzahl an Anknüpfungspunkten für zukünftige Untersuchungen:

Zellmassen für weitere 'Time-Course'-Analysen sind bereits generiert. Nach Erforschung des Proteoms und Transkriptoms sind Analysen bezüglich des 'Metaboloms' erneut in Zusammenarbeit mit dem 'Oak Ridge National Laboratory' bereits im Gange. Da die etablierte Filtermethode die effiziente Konzentrierung von Zellen zur Elektronenmikroskopie auch für frühe Zeitpunkte der Wachstumskurve ermöglicht, sind ebenfalls 'Time-Course'-Proben für ultrastrukturelle Untersuchungen im TEM bzw. FIB/SEM vorgesehen. Diese Proben sind bereits hochdruckgefroren und lagern derzeit in flüssigem Stickstoff. Sie sollen Aufschluss darüber geben, ob der geringe Prozentsatz an ungleich großen Zellen (in der Regel mit großem IMC) eventuell ein wachstumsphasenabhängiges Phänomen darstellt und ob sich die Relationen der einzelnen Kompartimente zueinander im Laufe der Zeit ändern. Auch soll untersucht werden, ob sich Auffälligkeiten im Zeitverlauf für das endogene Membransystem allgemein finden lassen (z.B. mehr Vesikel zu einem bestimmten Zeitpunkt). Letztlich sollen die Proben auch nähere Details zum "Infektionsprozess" von *Nanoarchaeum* darlegen. Für die Untersuchung dieser 'Time-Course'-Proben würde sich erneut eine Kombination aus FIB/SEM und Elektronentomographie anbieten. Da derzeit in Regensburg die Methode der STEM-Tomographie etabliert wird, käme auch dieses Verfahren für zukünftige Untersuchungen von *Ignicoccus* in Frage. Hierbei könnten Tomographien von etwa 500 nm dicken Schnitten gemacht werden. Bei Serienschnitten könnten so Informationslücken zwischen den Tomogrammen minimiert werden, da weniger Schnitte zur Abdeckung einer kompletten Zelle nötig sind. Daneben würde sich der aufwändige Prozess des Zusammenfügens der Einzeltomogramme vereinfachen. Weiterhin könnten EDX-Analysen der wenig kontrastierten Einschlüsse gemacht werden, um Näheres zu deren Beschaffenheit zu erfahren. In diesem Zusammenhang wären auch strukturelle Untersuchungen von Zellen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen interessant, um eventuell Korrelationen mit der Anhäufung von Polyphosphat bzw. weiterer Einschlüsse zu sehen. Hinsichtlich weiterer kleinerer Strukturen (z.B. einzelne Vesikel, ringförmige Komplexe in der äußeren Membran, Kontaktstelle zwischen *Ignicoccus* und *Nanoarchaeum*) könnten Tomographien mit höherer Vergrößerung eventuell mehr Aufschluss geben. Insbesondere für die Kontaktstelle könnte auch eine 'dual-axis'-Tomographie hilfreich sein, um den Verlauf der Membranen noch besser verfolgen zu können. Auch Untersuchungen der Kontaktstelle im neu entdeckten *Acidilobus-Nanoarchaeum*-System wären höchst interessant. Für die gezeigten ringförmigen Strukturen zwischen beiden Membranen wäre Cryo-Elektronentomographie die Methode der Wahl. Bei Aufzeichnung mehrerer solcher Tomogramme könnte darüber hinaus ein 'Sub-Volume-Averaging' die Auflösung für diese Struktur nochmals erhöhen. Ebenfalls zu empfehlen wären bioinformatische Analysen, um die zahlreichen hypothetischen Proteine in *Ignicoccus* evtl. zu charakterisieren und insbesondere um 'coiled-coil'-Proteine aufzuspüren, die potentiell als SNARE-Proteine und/oder Cytoskelettelemente in Frage kommen. "Andersherum" könnte auch versucht werden, die Filamente im IMC zu isolieren und zu identifizieren. Hier könnten eventuell entsprechende Protokolle zur Isolation des Cytoskeletts in Eukaryoten als Ausgangspunkt dienen. Zur Verifizierung des Bindungsverhaltens aller Antikörper dieser Arbeit könnten Immunmarkierungen mit der sensitiven 'Tokuyasu'-Methode gemacht werden. Insbesondere für den CdvA-Antikörper wäre eine Markierung an Serienschnitten (und anschließender 3D-Visualisierung) interessant. Ebenfalls würde sich für CdvA ein Doppelmarkierungsexperiment mit  $\alpha$ -DNA-Antikörper anbieten, um die Mutmaßungen in dieser Arbeit zu bestätigen/widerlegen. Da

zahlreiche Bindungspartner für die eukaryotischen Pendanten der untersuchten Proteine bekannt sind, könnten darüber hinaus Co-Immunpräzipitationen gemacht werden. Auch könnte versucht werden, die einzelnen Proteine zu kristallisieren. Für das WD40-Protein Igni\_0008 wurde damit unlängst begonnen (AG Ziegler). Auch eine Vielzahl an neuen potentiell interessanten Zielen zur Generierung von Antikörpern ergab sich in dieser Arbeit. Allen voran stehen hier *Ignicoccus*-CdvB, die Proteasom-Untereinheiten, die 'β-grasp-fold'-Proteine, das zweite CDC48-Protein und das zweite Thermosom-Protein. Außerdem bieten sich alle weiteren WD40-Proteine, alle weiteren V4R-Proteine sowie das als 'SNARE-associated-golgi-protein' annotierte Protein an. Neben Lokalisierungen wäre natürlich auch eine funktionelle Charakterisierung dieser Proteine wichtig. Die bereits angesprochenen Co-Immunpräzipitationen könnten hierbei zumindest etwas Aufschluss geben. Aber, um Funktionen von einzelnen Proteinen im zellulären Kontext wirklich verstehen zu können, führt langfristig vermutlich kein Weg an der Etablierung eines genetischen Systems für *Ignicoccus* vorbei.

**VII Literaturverzeichnis**

- Abodeely** M, DuBois KN, Hehl A, Stefanic S, Sajid M, De Souza W, Attias M, Engel JC, Hsieh I, Fetter RD, McKerrow JH (2009), "A Contiguous Compartment Functions as Endoplasmic Reticulum and Endosome/Lysosome in *Giardia lamblia*", *Eukaryotic Cell*, 8(11):1665-76, doi:10.1128/EC.00123-09
- Abramoff** M, Magelhaes P, Ram S (2004), "Image Processing with ImageJ", *Biophotonics International*, 11:36-42
- Adams** DR, Ron D, Kiely PA (2011), "RACK1, A multifaceted scaffolding protein: structure and function", *Cell Communication and Signaling*, 9:22, doi:10.1186/1478-811X-9-22
- Ahrens** CH, Brunner E, Qeli E, Basler K, Aebersold R (2010), "Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11:789-801, doi:10.1038/nrm2973
- Alabi** AA, Tsien RW (2013), "Perspectives on Kiss-and-Run: Role in Exocytosis, Endocytosis, and Neurotransmission", *Annual Review of Physiology*, 75:393-422, doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153305
- Albers** SV & Meyer BH (2011), "The archaeal cell envelope", *Nature Reviews Microbiology*, 9:414-26, doi:10.1038/nrmicro2576
- Antonin** W, Ellenberg J, Dultz E (2008), "Nuclear pore complex assembly through the cell cycle: Regulation and membrane organization", *FEBS Letters*, 582:2004-16, doi:10.1016/j.febslet.2008.02.067
- Ashery** U, Bielopolski N, Barak B, Yizhar O (2009), "Friends and foes in synaptic transmission - the role of tomosyn in vesicle priming", *Trends in Neurosciences*, 32(5):275-82, doi:10.1016/j.tins.2009.01.004
- Ausmees** N, Kuhn JR, Jacobs-Wagner C (2003), "The Bacterial Cytoskeleton: An Intermediate Filament-Like Function in Cell Shape", *Cell*, 115:705-13, doi:10.1016/S0092-8674(03)00935-8
- Babes** V (1895), "Beobachtung über die metachromatischen Körperchen, Sporenbildung, Verzweigung, Kolben- und Kapselbildung pathogener Bakterien", *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 20:412-37
- Baek** GH, Cheng H, Choe V, Bao X, Shao J, Luo S, Rao H (2013), "Cdc48: A Swiss Army Knife of Cell Biology", *Journal of Amino Acids*, Article ID 183421, doi:10.1155/2013/183421
- Bagola** K, Mehnert M, Jarosch E, Sommer T (2011), "Protein dislocation from the ER", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808:925-36, doi:10.1016/j.bbamem.2010.06.025
- Ballerini** M, Milani M, Costato M, Squadrini F, Turcu IC (1997), "Life science applications of focused ion beams (FIB)", *European Journal of Histochemistry*, 41(Suppl2):89-90
- Balleza** D (2011), "Mechanosensitive Channels in Archaea: Roles, Lipid-Protein Interactions and Future Questions", in "Archaea: Structure, Habitats and Ecological Significance", (Kato SY), Nova Science Publishers Inc., pp 143-61
- Barns** SM, Delwiche CF, Palmer JD, Pace NR (1996), "Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:9188-93
- Barthelme** D, Sauer RT, (2012) "Identification of the Cdc48-20S Proteasome as an Ancient AAA+ Proteolytic Machine", *Science*, 337:843-46, doi:10.1126/science.1224352
- Barthelme** D, Sauer RT, (2013) "Bipartite determinants mediate an evolutionarily conserved interaction between Cdc48 and the 20S peptidase", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9):3327-32, doi:10.1073/pnas.1300408110

- Benchimol M, De Souza W, (2011)** "The Ultrastructure of *Giardia* During Growth and Differentiation", in "*Giardia - A Model Organism*" (Luján HD, Svärd S), Springer Verlag Wien, pp 141-160, doi:10.1007/978-3-7091-0198-8\_9
- Berg IA, Kockelkorn D, Ramos-Vera WH, Say RF, Zarzycki J, Hügler M, Alber BE, Fuchs G (2010)**, "Autotrophic carbon fixation in archaea", *Nature Reviews Microbiology*, 8:447-460, doi:10.1038/nrmicro2365
- Bernander R, Ettema TJG (2010)**, "FtsZ-less cell division in archaea and bacteria", *Current Opinion in Microbiology*, 13:747-52, doi:10.1016/j.mib.2010.10.005
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987)**, "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels", *Electrophoresis*, 8:93-99, doi:10.1002/elps.1150080203
- Böhm S, Lamberti G, Fernández-Sáiz V, Stapf C, Buchberger A (2011)**, "Cellular functions of Ufd2 and Ufd3 in proteasomal protein degradation depend on Cdc48 binding", *Molecular and Cellular Biology*, 31:1528-39, doi:10.1128/MCB.00962-10
- Booth IR, Miller S, Rasmussen A, Rasmussen T, Edwards MD (2008)**, "Mechanosensitive Channels: Their Mechanisms and Roles in Preserving Bacterial Ultrastructure During Adaptation to Environmental Changes" (El-Sharoud W), Springer Verlag Heidelberg Berlin, pp 73-95, doi: 10.1007/978-3-540-74921-9\_3
- Bradford MM (1976)**, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248-54, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Braunfeld MB, Koster AJ, Sedat JW, Agard DA (1994)**, "Cryo-automated electron tomography: toward high resolution reconstructions of plastic embedded structures", *Journal of Microscopy*, 174(2):75-84, doi:10.1111/j.1365-2818.1994.tb03451.x
- Brochier C, Gribaldo S, Zivanovic Y, Confalonieri F, Forterre P (2005)** "Nanoarchaea: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales", *Genome Biology*, 6(5):R42, doi:10.1186/gb-2005-6-5-r42
- Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P (2008)**, "Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota", *Nature Reviews Microbiology*, 6(3):245-52, doi:10.1038/nrmicro1852
- Burghardt T, Näther DJ, Junglas B, Huber H, Rachel R (2007)**, "The dominating outer membrane protein of the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*: a novel pore-forming complex", *Molecular Microbiology*, 63(1):166-76, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05509.x
- Burghardt T (2008)**, "Einblicke in die Interaktion zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*: Das Membranprotein Ihomp1 sowie Nachweis weiterer Proteine der Zellhüllen", *Dissertation*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Burghardt T, Saller M, Gürster S, Müller D, Meyer C, Jahn U, Hochmuth E, Deutzmann R, Siedler F, Babinger P, Wirth R, Huber H, Rachel R (2008)**, "Insight into the proteome of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*: the major cytosolic and membrane proteins", *Archives of Microbiology*, 190:379–94; doi:10.1007/s00203-008-0399-x
- Burghardt T, Junglas B, Siedler F, Wirth R, Huber H, Rachel R (2009)**, "The interaction of *Nanoarchaeum equitans* with *Ignicoccus hospitalis*: proteins in the contact site between two cells", *Biochemical Society Transactions*, 37:127-32; doi:10.1042/BST0370127
- Buser C, Walther P (2008)**, "Freeze-substitution: the addition of water to polar solvents enhances the retention of structure and acts at temperatures around -60°C", *Journal of Microscopy*, 230(Pt2):268-77, doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.01984.x



- Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S (2007<sup>1</sup>)**, "Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle", *Developmental Cell*, 12:671-682, doi:10.1016/j.devcel.2007.04.005
- Cai H, Yu S, Menon S, Cai Y, Lazarova D, Fu C, Reinisch K, Hay JC, Ferro-Novick S (2007<sup>2</sup>)**, "TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23", *Nature*, 445:941-44, doi:10.1038/nature05527
- Carazo JM, Herman GT, Sorozano COS, Marabini R (2006)**, "Algorithms for Three-dimensional Reconstruction From the Imperfect Projection Data Provided by Electron Microscopy" (Frank J), Second Edition, Springer Verlag, pp 217-243, doi:10.1007/978-0-387-69008-7\_8
- Carballido-López R (2006)**, "The Bacterial Actin-Like Cytoskeleton", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4):888-909, doi:10.1128/MMBR.00014-06
- Cha S, Imielinski MB, Rejtar T, Richardson EA, Thakur D, Sgroi DC, Karger BL (2010)**, "In situ proteomic analysis of human breast cancer epithelial cells using laser capture microdissection: annotation by protein set enrichment analysis and gene ontology", *Molecular and Cellular Proteomics*, 9: 2529-44, doi:10.1074/mcp.M110.000398
- Chen X, Winters CA, Reese TS (2008)**, "Life Inside a Thin Section: Tomography", *The Journal of Neurosciences*, 28(38):9321-27, doi:10.1523/JNEUROSCI.2992-08.2008
- Cho WJ, Jeremic A, Jena BP (2005)**, "Size of Supramolecular SNARE Complex: Membrane-Directed Self-Assembly", *Journal of the American Chemical Society*, 127:10156-57, doi:10.1021/ja052442m
- Cicarelli FD, Doerks T, von Mehring C, Creevey CJ, Snel B, Bork P (2006)** "Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life", *Science*, 311:1283-87, doi:10.1126/science.1121745
- Crowther RA, DeRosier DJ, Klug A (1970<sup>1</sup>)**, "The Reconstruction of a Three-Dimensional Structure from Projections and its Application to Electron Microscopy", *Proceedings of the Royal Society of London A*, 317:319-40, doi:10.1098/rspa.1970.0119
- Crowther RA, Amos LA, Finch JT, DeRosier DJ, Klug A (1970<sup>2</sup>)**, "Three-Dimensional Reconstruction of Spherical Viruses by Fourier Synthesis from Electron Micrographs", *Nature*, 226:421-26, doi:10.1038/226421a0
- Dacks JB, Field MC (2007)**, "Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode", *Journal of Cell Science*, 120:2977-85, doi:10.1242/jcs.013250
- Dahl C, Prange A (2006)**, "Bacterial Sulfur Globules: Occurrence, Structure and Metabolism", in "Inclusions in Prokaryotes" (Shively JM), Springer Berlin Heidelberg, pp 22-51, doi:10.1007/7171\_002
- Daxer S, (2011)** "Lokalisation stoffwechselrelevanter Enzymkomplexe sowie Anreicherung einer membrangebundenen Pyrophosphatase in Vertretern der archaeellen Gattung *Ignicoccus*", *Masterarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- De Matteis MA, Luini A (2011)**, "Mendelian Disorders of Membrane Trafficking", *The New England Journal of Medicine*, 365:927-38, doi:10.1056/NEJMra0910494
- DeRosier DJ, Klug A (1968)**, "Reconstruction of Three-Dimensional Structures from Electron Micrographs", *Nature*, 217:130-34, doi:10.1038/217130a0
- Devos DP, (2014)** "Re-interpretation of the evidence for the PVC cell plan supports a Gram-negative origin", *Antonie van Leeuwenhoek*, 105:271-74, doi:10.1007/s10482-013-0087-y
- Dibrova DV, Galperin MY, Mulkidjanian AY (2014)**, "Phylogenomic reconstruction of archaeal fatty acid metabolism", *Environmental Microbiology*, 16(4):907-18, doi:10.1111/1462-2920.12359
- Docampo R (2006)**, "Acidocalcisomes and Polyphosphate Granules", in "Inclusions in Prokaryotes" (Shively JM), Springer Berlin Heidelberg, pp 53-70, doi:10.1007/7171\_003

- Domogatskaya A, Rodin R, Tryggvason K (2012)**, "Functional Diversity of Laminins", *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28:523-53, doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155750
- Donohoe BS, Mogelsvang S, Staehlin LA (2006)**, "Electron tomography of ER, Golgi and related membrane systems", *Methods*, 39:154-62, doi:10.1016/j.ymeth.2006.05.013
- Earl LA, Lifson JD, Subramaniam S, (2013)** "Catching HIV 'in the act' with 3D electron microscopy", *Trends in Microbiology*, 21(8):397-404, doi:10.1016/j.tim.2013.06.004
- Eggleton P, Gaston KJ, (1990)**, "'Parasitoid' species and assemblages: convenient definitions or misleading compromises", *Oikos*, 59(3):417-21, doi:10.2307/3545155
- Ellen AF, Albers SV, Huibers W, Pitcher A, Hobel CFV, Schwarz H, Folea M, Schouten S, Boekema EJ, Poolman B, Driessen AJM (2009)**, "Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex compounds", *Extremophiles*, 13:67-79, doi:10.1007/s00792-008-0199-x
- Ellen AF, Zolghadr B, Driessen AMJ, Albers SV (2010)**, "Shaping the archaeal cell envelope", *Archaea*, Article ID 608243, doi:10.1155/2010/608243
- Ellen AF, Rohulya OV, Fusetti F, Wagner M, Albers SV, Driessen AJM (2011)**, "The *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins", *Journal of Bacteriology*, 193(17):4380-87, doi:10.1128/JB.05028-11
- Elliott DA (2007)**, "Serial sectioning via microtomy (or, how to get over 100 consecutive serial sections on one TEM grid)", *Microscopy Today*, 15:30-33
- Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C (2009)**, "Current trends in quantitative proteomics", *Journal of Mass Spectrometry*, 44:1637-60, doi:10.1002/jms.1692
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR III (1994)**, "An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5:976-89, doi:10.1016/1044-0305(94)80016-2
- Ettema TJG, Lindås AC, Bernander R (2011)**, "An actin-based cytoskeleton in archaea", *Molecular Microbiology*, 80(4):1052-61, doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07635.x
- Fasshauer D, Jahn R (2007)**, "Budding insights on cell polarity", *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(5):360-62, doi:10.1038/nsmb0507-360
- Fernández JJ, Agulleiro JR, Bilbao-Castro JR, Martínez A, García I, Chichón FJ, Mertin-Benito J, Carrascosa JL (2010)**, "Image processing in electron tomography", in "Microscopy: Science, Technology, Applications and Education" (Méndez-Vilas A, Díaz J), pp 19-28, Formatex Research Center, Badajoz, E
- Fiebig A, Pradella S, Petersen J, Päuker O, Michael V, Lünsdorf H, Göker M, Klenk HP, Wagner-Döbler I (2013)**, "Genome of the R-body producing marine alphaproteobacterium *Labrenzia alexandrii* type strain (DFL-11T)", *Standards in Genomic Sciences*, 7:413-26, doi:10.4056/sigs.3456959
- Flechsler J (2010)**, "Immunlokalisation von Proteinkomplexen und Enzymen an Isolaten der hyperthermophilen Archaeen der Gattung *Ignicoccus*", *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Foith A (2013)**, "Immunlokalisation von Proteinen an hyperthermophilen Archaeen der Gattung *Ignicoccus*", *Bachelorarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Forouzan D, Ammelburg M, Hobel CF, Ströh LJ, Sessler N, Martin J, Lupas AN (2012)**, "The archaeal proteasome is regulated by a network of AAA ATPases", *The Journal of Biological Chemistry*, 287:39254-62, doi:10.1074/jbc.M112.386458

- Forterre P (2013)**, "The Common Ancestor of Archaea and Eukarya Was Not an Archaeon", *Archaea*, Article ID 372396, doi:10.1155/2013/372396
- Foster PG, Cox CJ, Embley TM (2009)**, "The primary divisions of life: a phylogenomic approach employing composition-heterogeneous methods", *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364:2197-2207, doi:10.1098/rstb.2009.0034
- Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA (1985)**, "Substructure of Human von Willebrand Factor", *The Journal of Clinical Investigation*, 76(4):1491-1500, doi:10.1172/JCI112129
- Fridman K, Mader A, Zwerger M, Elia N, Medalia O (2012)**, "Advances in tomography probing the molecular architecture of cells", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13:736-42, doi:10.1038/nrm3453
- Fuerst JA, Sagulenko E (2011)**, "Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function", *Nature Reviews Microbiology*, 9:403-413, doi:10.1038/nrmicro2578
- Fuerst JA (2013)**, "The PVC superphylum: exceptions to the bacterial definition?", *Antonie van Leeuwenhoek*, 104:451-66, doi:10.1007/s10482-013-9986-1
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005)**, "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server", in "The Proteomics Protocols Handbook" (Walker JM), Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, pp 571-607, doi: 10.1385/1-59259-890-0:571
- Gaudin M, Gaudiard E, Schouten S, Houel-Renault L, Lenormand P, Marguet E, Forterre P (2013)**, "Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA", *Environmental Microbiology Reports*, 5:109-16, doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00348.x
- Gaudin M, Krupovic M, Marguet E, Gaudiard E, Cvirkaite-Krupovic V, Le Cam E, Oberto J, Forterre P (2014)**, "Extracellular membrane vesicles harbouring viral genomes", *Environmental Microbiology*, 16:1167-75, doi:10.1111/1462-2920.12235
- Gerega A, Rockel B, Peters J, Tamura T, Baumeister W, Zwickl P (2006)**, "VAT, the *Thermoplasma* Homolog of Mammalian p97/VCP, Is an N Domain-regulated Protein Unfoldase", *The Journal of Biological Chemistry*, 280(52):42856-62, doi:10.1074/jbc.M510592200
- Ghazi-Tabatabai S, Obita T, Pobbati AV, Perisic O, Samson RY, Bell SD, Williams RL (2009)**, "Evolution and assembly of ESCRTs", *Biochemical Society Transactions*, 37(1):151-55, doi:10.1042/BST0370151
- Ghislain M, Dohmen RJ, Lévy F, Varshavsky A (1996)**, "Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*", *The EMBO Journal*, 15(18):4884-99
- Giannone RJ, Huber H, Karpinets T, Heimerl T, Küper U, Rachel R, Keller M, Hettich RL, Podar M (2011)**, "Proteomic Characterization of Cellular and Molecular Processes that Enable the *Nanoarchaeum equitans-Ignicoccus hospitalis* Relationship", *PLoS One*, 6(8):e22942., doi:10.1371/journal.pone.0022942
- Gilbert PFC (1972)**, "Iterative Methods for the Three-Dimensional Reconstruction of an Object by Projections", *Journal of Theoretical Biology*, 36:105-17, doi:10.1016/0022-5193(72)90180-4
- Giordano F, Saheki Y, Idevall-Hagren O, Colombo SF, Pirruccello M, Milosevic I, Gracheva EO, Bagriantsev SN, Borgese N, De Camilli P (2013)**, "PI(4,5)P<sub>2</sub>-Dependent and Ca<sup>2+</sup>-Regulated ER-PM Interactions Mediated by the Extended Synaptotagmins", *Cell*, 153:1494-509, doi:10.1016/j.cell.2013.05.026
- Godde JS (2012)**, "Breaking through a phylogenetic impasse: a pair of associated archaea might have played host in the endosymbiotic origin of eukaryotes", *Cell & Bioscience*, 2:29, doi:10.1186/2045-3701-2-29
- Godsel LM, Hobbs RP, Green KJ, (2007)** "Intermediate filament assembly: dynamics to disease", *Trends in Cell Biology*, 18(1):28-37, doi:10.1016/j.tcb.2007.11.004

- Gordon R**, Bender R, Herman GT (1970), "Algebraic Reconstruction Techniques (ART) for three-dimensional electron microscopy and X-ray photography", *Journal of Theoretical Biology*, 29:471-81, doi:10.1016/0022-5193(70)90109-8
- Goris B**, van den Broek W, Mezerji HH, Bals S (2012), "Electron tomography based on a total variation minimization reconstruction technique", *Ultramicroscopy*, 113:120-30, doi:10.1016/j.ultramicro.2011.11.004
- Graham LL**, Beveridge TJ, Nanninga N (1991), "Periplasmic space and the concept of the periplasm", *Trends in Biochemical Sciences*, 16(9):328-29, doi:10.1016/0968-0004(91)90135-1
- Gray MW** (1992), "The Endosymbiont Hypothesis Revisited", *International Review of Cytology*, 141:233-357, doi:10.1016/S0074-7696(08)62068-9
- Grimm R**, Singh H, Rachel R, Typke D, Zillig W, Baumeister W (1998), "Electron Tomography of Ice-Embedded Prokaryotic Cells", *Biophysical Journal*, 74:1031-42, doi:10.1016/S0006-3495(98)74028-7
- Guizetti J**, Schermelleh L, Mäntler J, Maar S, Poser I, Leonhardt H, Müller-Reichert T, Gerlich DW (2011), "Cortical Constriction During Abscission Involves Helices of ESCRT-III-Dependent Filaments", *Science*, 331:1616-20, doi:10.1126/science.1201847
- Guldan H**, Matysik FM, Bocola M, Sterner R, Babinger P (2011), "Functional Assignment of an Enzyme that Catalyzes the Synthesis of an Archaea-Type Ether Lipid in Bacteria", *Angewandte Chemie International Edition*, 50(35):8188-91, doi:10.1002/anie.201101832
- Gupta RS**, Golding GB (1996), "The origin of the eukaryotic cell", *Trends in Biochemical Sciences*, 21(5):166-71, doi:10.1016/S0968-0004(96)20013-1
- Gürster S** (2007), "Nanoarchaeum equitans: Versuche zur Reindarstellung und strukturellen und proteinbiochemischen Charakterisierung", *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Guy G**, Ettema TJG (2011), "The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes", *Trends in Microbiology*, 19(12):580-87, doi:10.1016/j.tim.2011.09.002
- Hanahan D** (1983), "Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids", *Journal of Molecular Biology*, 166:557-80, doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8
- Hara F**, Yamashiro K, Nemoto N, Ohta Y, Yokobori SI, Yasunaga T, Hisanaga SI, Yamagishi A (2007), "An actin homolog of the archaeon *Thermoplasma acidophilum* that retains the ancient characteristics of eukaryotic actin", *Journal of Bacteriology*, 189(5):2039-45, doi:10.1128/JB.01454-06
- Haswell ES**, Phillips R, Rees DC (2011), "Mechanosensitive Channels: What Can They Do and How Do They Do It", *Structure*, 19:1356-69, doi:10.1016/j.str.2011.09.005
- Hattendorf DA**, Andreeva A, Gangar A, Brennwald PJ, Weis WI (2007), "Structure of the yeast polarity protein Sro7 reveals a SNARE regulatory mechanism", *Nature*, 446:567-71 doi:10.1038/nature05635
- Hawkes PW** (2006), "The Electron Microscope as a Structure Projector", in "Electron Tomography" (Frank J), Second Edition, Springer Verlag, pp 83-111, doi:10.1007/978-0-387-69008-7\_4
- Hehl AB** (2011), "Intracellular Protein Trafficking" in "*Giardia* - A Model Organism" (Luján HD, Svärd S), Springer Verlag Wien, pp 219-231, doi:10.1007/978-3-7091-0198-8\_14
- Heimerl T** (2009), "Ultrastruktur der Co-Kultur KIN4/M: Serienschritte, 3D-Modelle und Immunmarkierungsversuche", *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Hermann H**, Aebi U (2004), "Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds", *Annual Review of Biochemistry*, 73:749-89, doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073823

- Herzog B, Wirth R (2012)**, "Swimming Behavior of Selected Species of *Archaea*", *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6):1670, doi:10.1128/AEM.06723-11.
- His W (1870)**, "Beschreibung eines Mikrotoms", *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 6(1):229-32, doi:10.1007/BF02955980
- Hoenger A, McIntosh JR (2009)**, "Probing the macromolecular organization of cells by electron tomography", *Current Opinion in Cell Biology*, 21:89-96, doi:10.1016/j.ceb.2008.12.003
- Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H (2008)**, "Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10):3963-67, doi:10.1073/pnas.0709530105
- Höög J, Schwartz C, Noon AT, O'Toole ET, Mastrorarde D, McIntosh JR, Antony C (2007)**, "Organization of Interphase Microtubules in Fission Yeast Analyzed by Electron Tomography", *Developmental Cell*, 12:349-61, doi:10.1016/j.devcel.2007.01.020
- Hoppe W, Schramm HJ, Sturm M, Hunsmann N, Gaßmann J (1976)**, "Three-Dimensional Electron Microscopy of Individual Biological Objects Part I. Methods", *Zeitschrift für Naturforschung*, 31a:645-55
- Horiike T, Hamada K, Kanaya S, Shinozawa T (2001)**, "Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of *Archaea* in *Bacteria* is revealed by homology-hit analysis", *Nature Cell Biology*, 3(2):210-14, doi:10.1038/35055129
- Horn C, Paulmann B, Kerlen G, Junker N, Huber H (1999)**, "In vivo observation of cell division of anaerobic hyperthermophiles by using a high-intensity dark-field microscope", *Journal of Bacteriology*, 181(16):5114-8
- Huber H, Burggraf S, Mayer T, Wyschkony I, Rachel R, Stetter KO (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.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:2093-100, doi:10.1099/00207713-50-6-2093
- Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO (2002)**, "A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont", *Nature*, 417(6884):63-7, doi:10.1038/417063a
- Huber H, Stetter KO (2006)**, "Desulfurococcales", in "The Prokaryotes Volume 3: *Archaea*. *Bacteria*: Firmicutes, Actinomycetes" (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackenbrandt E), Springer Verlag, pp 52-68, doi:10.1007/0-387-30743-5\_4
- Huber H, Gallenberger M, Jahn U, Eylert E, Berg IA, Kockelkorn D, Eisenreich W, Fuchs G (2008)**, "A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic *Archaeum Ignicoccus hospitalis*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(22):7851-6, doi:10.1073/pnas.0801043105
- Huber H, Küper U, Daxer S, Rachel R (2012)**, "The unusual cell biology of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*", *Antonie van Leeuwenhoek*, 102:203-19, doi:10.1007/s10482-012-9748-5
- Humbard MA, Miranda HV, Lim JM, Krause DJ, Pritz JR, Zhou G, Chen S, Wells L, Maupin-Furlow JA (2010)**, "Ubiquitin-like small archaeal modifier proteins (SAMPs) in *Haloferax volcanii*", *Nature*, 463:54-60, doi:10.1038/nature08659
- Jahn R, Scheller RH (2006)**, "SNAREs - engines for membrane fusion", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:631-43, doi:10.1038/nrm2002
- Jahn U, Summons R, Sturt H, Grosjean E, Huber H (2004)**, "Composition of the lipids of *Nanoarchaeum equitans* and their origin from its host *Ignicoccus* sp. strain KIN4/I", *Archives of Microbiology*, 182: 404–13; doi:10.1007/s00203-004-0725-x

- Jahn U, Huber H, Eisenreich W, Hügler M, Fuchs G (2007)**, "Insights into the Autotrophic CO<sub>2</sub> Fixation Pathway of the Archaeon *Ignicoccus hospitalis*: Comprehensive Analysis of the Central Carbon Metabolism", *Journal of Bacteriology*, 189(11):4108-19, doi:10.1128/JB.00047-07
- Jahn U, Gallenberger M, Paper W, Junglas B, Eisenreich W, Stetter KO, Rachel R, Huber H (2008)** "*Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: New Insights into a Unique, Intimate Association of Two Archaea", *Journal of Bacteriology*, 190(5):1743–50, doi:10.1128/JB.01731-07
- Jékely G (2007)**, "Origin of Eukaryotic Endomembranes: A Critical Evaluation of Different Model Scenarios", in "Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton: Origins and Evolution" (Jékely G), Landes Bioscience/Springer Science + Business Media, NY, USA, pp 38-51, doi:10.1007/978-0-387-74021-8\_3
- Jena BP, Cho SJ, Jeremic A, Stromer MH, Abu-Hamdah R (2003)**, "Structure and Composition of the Fusion Pore", *Biophysical Journal*, 84:1337-43, doi:10.1016/S0006-3495(03)74949-2
- Jena BP (2009)**, "Porosome: The Secretory Portal in Cells", *Biochemistry*, 48:4009-18, doi:10.1021/bi9002698
- Jena BP (2011)**, "Role of SNAREs in Membrane Fusion", in "Cell Fusion in Health and Disease" (Dittmar T, Zänker KS), Springer Netherlands, pp 13-32, doi:10.1007/978-94-007-0763-4\_3
- Jonić S, Sorzano COS, Boisset N (2008)**, "Comparison of single-particle analysis and electron tomography approaches: an overview", *Journal of Microscopy*, 232(3):562-79, doi:10.1111/j.1365-2818.2008.02119.x
- Junglas B (2006)**, "Die hyperthermophilen Archaeen *Ignicoccus sp.* KIN4/M und *Nanoarchaeum equitans*: Ultrastrukturelle und Immunocytochemische Untersuchungen an Ultradünnschnitten", *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Junglas B, Briegel A, Burghardt T, Walther P, Wirth R, Huber H, 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", *Archives of Microbiology*, 190:395–408; doi:10.1007/s00203-008-0402-6
- Kavalali ET (2009)**, "Endocytosis: Kiss and Run", in "Encyclopedia of Neurosciences" (Squire LR), Academic Press, pp 1007-1013
- Kelley LA, Sternberg MJE (2009)**, "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server", *Nature Protocols*, 4(3):363-71, doi:10.1038/nprot.2009.2
- Kelly S, Wickstead B, Gull K (2011)**, "Archaeal phylogenomics provides evidence in support of a methanogenic origin of the Archaea and a thaumarchaeal origin for the eukaryotes", *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 278:1009-18, doi:10.1098/rspb.2010.1427
- Klingl A (2011)**, "Struktur und Funktion von S-Layern acidophiler Bakterien und Archaeen, ihre Rolle bei der Pyrit-Oxidation sowie die Adhäsion an Oberflächen", *Dissertation*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Klingl A, Moissl-Eichinger C, Wanner G, Zweck J, Huber H, Thomm M, Rachel R (2011)**, "Analysis of the surface proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain SP51 and the new, pyrite-oxidizing *Acidithiobacillus* isolate HV2/2, and their possible involvement in pyrite oxidation", *Archives of Microbiology*, 193:867-882, doi:10.1007/s00203-011-0720-y
- Klingl A, Flechsler J, Heimerl T, Rachel R (2013)**, "Archaeal Cells", *Encyclopedia of Life Sciences*, doi:10.1002/9780470015902.a0000383.pub2
- Knott G, Marchman, Wall D, Lich B (2008)**, "Serial Section Scanning Electron Microscopy of Adult Brain Tissue Using Focused Ion Beam Milling", *The Journal of Neuroscience*, 28(12):2959-64, doi:10.1523/JNEUROSCI.3189-07.2008
- Knott G, Genoud C (2013)**, "Is EM dead?", *Journal of Cell Science*, 126:4545-52, doi:10.1242/jcs.124123

- Koch AL (1998)**, "The Biophysics of the Gram-Negative Periplasmic Space", *Critical Reviews in Microbiology*, 24(1):23-59
- Komeili A, Li Z, Newman DK, Jensen GJ (2006)**, "Magnetosomes Are Cell Membrane Invaginations Organized by the Actin-Like Protein MamK", *Science*, 311:242-45, doi:10.1126/science.1123231
- Koonin EV (1993)**, "A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif", *Journal of Molecular Biology*, 229:1165-74, doi:10.1006/jmbi.1993.1115
- Koonin EV, Yutin N (2014)**, "The Dispersed Archaeal Eukaryome and the Complex Archaeal Ancestor of Eukaryotes", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6:a016188, doi:10.1101/cshperspect.a016188
- Kornberg A, Rao NN, Ault-Riché D (1999)**, "Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions", *Annual Review of Biochemistry*, 68:89-125, doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.89
- Koster AJ, Bárcena M (2006)**, "Cryotomography: Low-dose Automated Tomography of Frozen-hydrated Specimens", in "Electron Tomography" (Frank J), Second Edition, Springer Verlag, pp 113-161, doi:10.1007/978-0-387-69008-7\_5
- Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR (1996)**, "Computer Visualization of three-dimensional image data using IMOD", *Journal of Structural Biology*, 116:71-6, doi:10.1006/jsbi.1996.0013
- Kreuter L (2010)**, "Untersuchung energiekonservierender Enzymkomplexe innerhalb der archaeellen Gattung *Ignicoccus*", *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Kulaev IS, Vagabov VM, Kulakovskaya TV (2004)**, "The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates" (Second Edition), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, doi:10.1002/0470858192
- Küper U (2010)**, "Untersuchungen zur Energiegewinnung des hyperthermophilen, schwefelreduzierenden Archaeons *Ignicoccus hospitalis*", *Dissertation*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Küper U, Meyer C, Müller V, Rachel R, Huber H (2010)**, "Energized outer membrane and spatial separation of metabolic processes in the hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7):3152-56, doi:10.1073/pnas.0911711107
- Kürner J (2005)**, "Elektronentomographische und biochemische Untersuchung des Cytoskeletts von *Spiroplasma melliferum*", *Dissertation*, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Strukturbiologie der Technischen Universität München
- Kürner J, Achilleas FS, Baumeister W (2005)** "Cryo-Electron Tomography Reveals the Cytoskeletal Structure of *Spiroplasma melliferum*", *Science*, 307:436-8, doi:10.1126/science.1104031
- Ladinsky MS, Mastronarde D, McIntosh JR, Howell KE, Staehelin A (1999)**, "Golgi structure in three dimensions functional insights from the normal rat kidney cell", *The Journal of Cell Biology*, 144(6):1135-49, doi:10.1083/jcb.144.6.1135
- Lake JA, Henderson E, Oakes M, Clark MW (1984)**, "Eocytes: A new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81:3786-90
- Lake JA, Riviera MC (1994)**, "Was the nucleus the first endosymbiont?", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91:2880-81, doi:10.1073/pnas.91.8.2880
- Lämmli UK (1970)**, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, 227:680-85, doi:10.1038/227680a0
- Lange M (2009)**, "Neue Hochtemperatur-Organismen von Lesbos und dem Ostpazifischen-Rücken", *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg

- Langley S (2006)**, "Metal Inclusions in Bacteria", in "Inclusions in Prokaryotes" (Shively JM), Springer Berlin Heidelberg, pp 311-319, doi:10.1007/7171\_012
- Lanzavecchia S, Cantele F, Bellon PL, Zampighi L, Kreman M, Wright E, Zampighi GA (2005)**, "Conical tomography of freeze-fracture replicas: a method for the study of integral membrane proteins inserted in phospholipid bilayers", *Journal of Structural Biology*, 149:87-98, doi:10.1016/j.jsb.2004.09.004
- Lasek-Nesselquist E, Gogarten JP (2013)**, "The effects of model choice and mitigating bias on the ribosomal tree of life", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69:17-38, doi:10.1016/j.ympev.2013.05.006
- Leabu M (2006)**, "Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2):423-27, doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00409.x
- Lee KC, Webb RI, Janssen PH, Sangwan P, Romeo, T, Staley JT, Fuerst JA (2009)**, "Phylum *Verrucomicrobia* representatives share a compartmentalized cell plan with members of bacterial phylum *Planctomycetes*", *BMC Microbiology*, 9:5, doi:10.1186/1471-2180-9-5
- Li Z, Clarke AJ, Beveridge TJ (1998)**, "Gram-negative Bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria", *Journal of Bacteriology*, 180(20):5478-83
- Li Z, Trimble MJ, Brun YV, Jensen GJ (2007)**, "The structure of FtsZ filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division", *The EMBO Journal*, 26:4694-708, doi:10.1038/sj.emboj.7601895
- Liberton M, Austin JR, Berg H, Pakrasi HB (2011)**, "Unique Thylakoid Membrane Architecture of a Unicellular N<sub>2</sub>-Fixing Cyanobacterium Revealed by Electron Tomography", *Plant Physiology*, 155:1656-66, doi:10.1104/pp.110.165332
- Liebl W, Winterhalter C, Baumeister W, Armbrrecht M, Valdez M (2008)**, "Xylanase Attachment to the Cell Wall of the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*", *Journal of Bacteriology*, 190(4):1350-58, doi:10.1128/JB.01149-07
- Lindås AC, Karlsson EA, Lindgren MT, Ettema TJG, Bernander R (2008)**, "A unique cell division machinery in the Archaea", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48):18942-46, doi:10.1073/pnas.0809467105
- Lindås AC, Bernander R (2013)**, "The cell cycle of archaea", *Nature Reviews Microbiology*, 11:627-38, doi:10.1038/nrmicro3077
- Lindås AC, Chruszcz M, Bernander R, Valegård K (2014)**, "Structure of crenactin, an archaeal actin homologue active at 90°C", *Acta Crystallographica Section D*, D70:492-500, doi:10.1107/S1399004714000935
- Lombard J, López-García P, Moreira D (2012)**, "An ACP-Independent Fatty Acid Synthesis Pathway in Archaea: Implications for the Origin of Phospholipids", *Molecular Biology and Evolution*, 29(11):3261-65, doi:10.1093/molbev/mss160
- Lonhienne TGA, Sagulenko E, Webb RI, Lee KC, Franke J, Devos DP, Nouwens A, Carroll BJ, Fuerst JA (2010)**, Endocytosis-like protein uptake in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29):12883-88, doi:10.1073/pnas.1001085107
- López-García P, Moreira D, Douzery E, Forterre P, van Zuilen M, Claeys P, Prieur D (2006)** "Ancient Fossil Record and Early Evolution (ca. 3.8 to 0.5 Ga)", in "From Suns to Life: A Chronological Approach to the History of Life on Earth" (Gargaud M, Claeys P, López-García P, Martin H, Montmerle T, Pascal R, Reisse J), Springer, Dodrecht, NL, pp 247-90, doi:10.1007/978-0-387-45083-4\_7
- López-García P, Moreira D (2006)**, "Selective forces for the origin of the eukaryotic nucleus", *BioEssays*, 28:525-33, doi:10.1002/bies.20413
- Lučić V, Förster F, Baumeister W (2005)**, "Structural Studies by Electron Tomography: From Cells to Molecules", *Annual Review of Biochemistry*, 74:833-65, doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074112



- Lučić V, Riegort A, Baumeister W (2013)**, "Cryo-electron tomography: The challenge of doing structural biology in situ", *The Journal of Cell Biology*, 202(3):407-19, doi:10.1083/jcb.201304193
- Lupas AN & Martin J (2002)**, "AAA proteins", *Current Opinion in Structural Biology*, 12:746-53, doi:10.1016/S0959-440X(02)00388-3
- Luther PK (2006)**, "Sample shrinkage and radiation damage of plastic sections", in "Electron Tomography" (Frank J), Second Edition, Springer Verlag, pp 17-48, doi:10.1007/978-0-387-69008-7\_2
- Makarova KS, Sorokin AV, Novichkov PS, Wolf YI, Koonin EV (2007)**, "Clusters of orthologous genes for 41 archaeal genomes and implications for evolutionary genomics of archaea", *Biology Direct*, 2: 33, doi:10.1186/1745-6150-2-33
- Makarova KS, Koonin EV (2010)**, "Archaeal Ubiquitin-Like Proteins Functional Versatility and Putative Ancestral Involvement in tRNA Modification Revealed by Comparative Genomic Analysis", *Archaea*, Article ID 710303, doi:10.1155/2010/710303
- Makarova KS, Yutin N, Bell SD, Koonin EV (2010)**, "Evolution of diverse cell division and vesicle formation systems in Archaea", *Nature Reviews Microbiology*, 8:731-41, doi:10.1038/nrmicro2406
- Marguet E, Gaudin M, Gaudiard E, Fourquaux I, le Blond du Plouy S, Matsui I, Forterre P (2013)**, "Membrane vesicles, nanopods and/or nanotubes produced by hyperthermophilic archaea of the genus *Thermococcus*", *Biochemical Society Transactions*, 41(1):436-442, doi:10.1042/BST20120293
- Margulis L, Fester R (1993)**, "Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation", MIT Press, Cambridge, MA, USA
- Margulis L, Chapman M, Guerrero R, Hall J (2006)**, "The last eukaryotic common ancestor (LECA): Acquisition of cytoskeletal motility from aerotolerant spirochetes in the Proterozoic Eon", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35):13080-85, doi:10.1073/pnas.0604985103
- Martijn J & Ettema TJG (2013)**, "From archaeon to eukaryote: the evolutionary dark ages of the eukaryotic cell", *Biochemical Society Transactions*, 41:451-57, doi:10.1042/BST20120292
- Martin W, Müller M (1998)**, "The hydrogen hypothesis for the first eukaryote", *Nature*, 392:37-41, doi:10.1038/32096
- Mashburn-Warren LM, Whiteley M (2006)**, "Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes", *Molecular Microbiology*, 61(4):839-46, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05272.x
- Mashburn-Warren LM, Howe J, Garidel P, Richter W, Steininger F, Roessle M, Brandenburg K, Whiteley M (2008)**, "Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation", *Molecular Microbiology*, 69(2):491-502, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06302.x
- Mastrorade DN (1997)**, "Dual-axis tomography: An approach with alignment methods that preserve resolution", *Journal of Structural Biology*, 120:343-52, doi:10.1006/jsbi.1997.3919
- Mastrorade DN (2005)**, "Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements", *Journal of Structural Biology*, 152:36-51, doi:10.1016/j.jsb.2005.07.007
- Maupin-Furlow JA, Humbard MA, Kirkland PA (2012)**, "Extreme challenges and advances in archaeal proteomics", *Current Opinion in Microbiology*, 15:351-56, doi:10.1016/j.mib.2012.02.002
- Maupin-Furlow JA (2013)**, "Archaeal Proteasomes and Sampylation", *Subcellular Biochemistry*, 66:297-327, doi:10.1007/978-94-007-5940-4\_11.
- Mayer F (2008)**, "Isolierung und biochemische Charakterisierung von Membran-assoziierten Proteinkomplexen des hyperthermophilen Archaeums *Ignicoccus hospitalis*", *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg

- Mayer F, Küper U, Meyer C, Daxer S, Müller V, Rachel R, Huber H (2012)**, "An AMP-forming Acetyl-CoA Synthetase in the outermost membrane of the Membrane of the Hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*", *Journal of Bacteriology*, 194(6): 1572-81, doi:10.1128/JB.06130-11
- McBroom AJ, Kuehn MJ (2007)**, "Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response", *Molecular Microbiology*, 63(2):545-58, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x
- McDonald K (2007)**, "Cryopreparation Methods for Electron Microscopy of Selected Model Systems", *Methods in Cell Biology*, 79:23-56, doi:10.1016/S0091-679X(06)79002-1
- McDonald WH, Ohi R, Miyamoto DT, Mitchison TJ, Yates JR III (2002)**, "Comparison of three directly coupled HPLC MS/MS strategies for identification of proteins from complex mixtures: single-dimension LC-MS/MS, 2-phase MudPIT, and 3-phase MudPIT", *International Journal of Mass Spectrometry*, 219:245-51, doi:10.1016/S1387-3806(02)00563-8
- McEwen BF, Heagle AB (1997)**, "Electron Microscopic Tomography A Tool for Probing the Structure and Function of Subcellular Components", *International Journal of Imaging Systems and Technology*, 8(2):175-87, doi:10.1002/(SICI)1098-1098(1997)8:2<175::AID-IMA5>3.0.CO;2-7
- McEwen BF, Marko M (1998)**, "Three-Dimensional Transmission Electron Microscopy and Its Application to Mitosis Research", *Methods in Cell Biology*, 61:81-111, doi:10.1016/S0091-679X(08)61976-7
- McEwen BF, Marko M (2001)**, "The Emergence of Electron Tomography as an Important Tool for Investigating Cellular Ultrastructure", *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(5):553-63, doi:10.1177/002215540104900502
- Meshcheryakov V, Nitanai Y, Maytum R, Geeves MA, Maeda Y (2008)**, "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of full-length yeast tropomyosin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*", *Acta Crystallographica Section F*, F64:528-30, doi:10.1107/S1744309108013110
- Meyer A (1904)**, "Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins", *Botanische Zeitung*, 62:113-153
- Meyer C (2007)**, "Charakterisierung von Zellanhängen und extrazellulären Strukturen bei *Ignicoccus pacificus*", *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Meyer C (2010)**, "Die Fibers von *Ignicoccus hospitalis*: Ultrastruktur, Verankerung und molekularbiologische Untersuchungen", *Dissertation*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Meyer C, Heimerl T, Wirth R, Klingl A, Rachel R (2014)**, "The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis* are anchored in the cell by a spherical structure located beneath the cytoplasmic membrane" (Manuskript in Arbeit)
- Michie KA, Löwe J (2006)**, "Dynamic Filaments of the Bacterial Cytoskeleton", *The Annual Review of Biochemistry*, 75:467-92, doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142452
- Michie KA (2008)**, "Molecular Components of the Bacterial Cytoskeleton", in "Bacterial Physiology - A Molecular Approach" (El-Sharoud W), Springer Verlag Heidelberg Berlin, pp 43-71, doi:10.1007/978-3-540-74921-9\_2
- Milne JLS, Subramaniam S (2009)**, "Cryo-electron tomography of bacteria: progress, challenges and future prospects", *Nature Reviews Microbiology*, 7:666-75, doi:10.1038/nrmicro2183
- Mironov AA, Banin VV, Sesorova IS, Dolgikh VV, Luini A, Beznoussenko GV (2007)**, "Evolution of the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Complex", in "Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton: Origins and Evolution" (Jékely G), Landes Bioscience/Springer Science + Business Media, NY, USA, pp 61-72, doi:10.1007/978-0-387-74021-8\_5
- Moor H, Riehle U (1968)**, "Snap-freezing under high pressure: a new fixation technique for freeze-etching", *Proceedings of the 4th International Conference on Electron Microscopy*, 2:33-34

- Moreira D, López-García P (1996)**, "Symbiosis Between Methanogenic Archaea and  $\delta$ -Proteobacteria as the Origin of Eukaryotes: The Syntrophic Hypothesis", *Journal of Molecular Evolution*, 47(5):517-30, doi:10.1007/PL00006408
- Moriscot C, Gribaldo S, Jault JM, Krupovic M, Arnaud J, Jamin M, Schoehn G, Forterre P, Weisshorn W, Renesto P (2011)**, "Crenarchaeal CdvA Forms Double-Helical Filaments Containing DNA and Interacts with ESCRT-III-Like CdvB", *PLoS One*, 6(7):e21921, doi:10.1371/journal.pone.0021921
- Mowbrey K, Dacks JB (2009)**, "Evolution and diversity of the Golgi body", *FEBS Letters*, 583:3738-45, doi:10.1016/j.febslet.2009.10.025
- Müller S, Hoegge C, Pyrowolakis G, Jentsch S (2001)**, "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2:202-10, doi:10.1038/35056591
- Nans A, Mohandas N, Stokes DL (2011)** "Native Ultrastructure of the Red Cell Cytoskeleton by Cryo-Electron Tomography", *Biophysical Journal*, 101:2341-50, doi:10.1016/j.bpj.2011.09.050
- Narayan K, Danielson CM, Lagarec K, Lowekamp BC, Coffman P, Laquerre A, Phaneuff MW, Hope TJ, Subramaniam S (2014)**, "Multi-resolution correlative focused ion beam scanning electron microscopy: Applications to cell biology", *Journal of Structural Biology*, 185(3):278-84, doi:10.1016/j.jsb.2013.11.008
- Naß B, Pöll U, Langer J, Kreuter L, Küper U, Flechsler J, Heimerl T, Rachel R, Huber H, Kletzin A (2014)**, "Three Multiheme c-Type Cytochromes from the Hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*: Purification, Properties and Localization", *Microbiology*, doi:10.1099/mic.0.077792-0
- Näther DJ, Rachel R (2004)**, "The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition", *Biochemical Society Transactions*, 32(2):199-203
- Ng KH, Srinivas V, Srinivasan R, Balasubramanian M (2013)**, "The Nitrosopumilus maritimus CdvB, but Not FtsZ, Assembles into Polymers", *Archaea*, Article ID 104147, doi:10.1155/2013/104147
- Ng W, Sergeyenko T, Zeng N, Brown JD, Römisch K (2007)**, "Characterization of the proteasome interaction with the Sec61 channel in the endoplasmic reticulum", *Journal of Cell Science*, 120:682-91, doi:10.1242/jcs.03351
- Nunoura T, Takaki Y, Kakuta J, Nishi S, Sugahara J, Kazama H, Chee GJ, Hattori M, Kanai A, Atomi H, Takai K, Takami H (2010)**, "Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group", *Nucleic Acids Research*, 39(8):3204-23, doi:10.1093/nar/gkq1228
- Nyquist H (1928)**, "Certain Topics in Telegraph Transmission Theory", *Transactions of the American Institute of Electrical Engineers*, 47(2):617-44, doi:10.1109/T-AIEE.1928.5055024
- Oliver J, Jungnickel B, Görlich D, Rapoport T, High S (1995)**, "The Sec61 complex is essential for the insertion of proteins into the membrane of the endoplasmic reticulum", *FEBS Letters*, 362:126-30, doi:10.1016/0014-5793(95)00223-V
- Orell A, Navarro CA, Rivero M, Aguilar JS, Jerez CA (2012)**, "Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions", *Extremophiles*, 16:573-83, doi:10.1007/s00792-012-0457-9
- Paper W, Jahn U, Hohn MJ, Kronner M, Näther DJ, Burghardt T, Rachel R, Stetter KO, Huber H (2007)**, "*Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of '*Nanoarchaeum equitans*'", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt4):803-8, doi:10.1099/ijs.0.64721-0
- Park SJ, Schertel A, Lee KE, Han SS (2014)**, "Ultra-structural analysis of the brain in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease using FIB/SEM microscopy", *Microscopy*, 63(1):3-13, doi:10.1093/jmicro/dft039

- Pelve EA**, Lindås AC, Martens-Habbena W, de la Torre JR, Stahl DA, Bernander R, (2011) "Cdv-based cell division and cell cycle organization in the thaumarchaeon *Nitrosopumilus maritimus*", *Molecular Microbiology*, 82(3):555-66, doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07834.x
- Penczek PA**, Marko M, Buttle K, Frank F (1995), "Double-tilt electron tomography", *Ultramicroscopy*, 60:393-410, doi:10.1016/0304-3991(95)00078-X
- Penczek PA** (2010), "Fundamentals of three-dimensional reconstruction from projections", *Methods in Enzymology*, 482:1-33, doi:10.1016/S0076-6879(10)82001-4
- Perkins DN**, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS (1999), "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data", *Electrophoresis*, 20(18):3551-67, doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2
- Pick E**, Berman TS (2013), "Formation of alternative proteasomes Same lady, different cap", *FEBS Letters*, 587:389-93, doi:10.1016/j.febslet.2013.01.014
- Pierson J**, Vos M, McIntosh JR, Peters PJ (2011), "Perspectives on electron cryo-tomography of vitreous cryosections", *Journal of Electron Microscopy*, 60(Suppl1):93-100, doi:10.1093/jmicro/dfr014
- Pisani D**, Cotton JA, McInerney JO (2007), "Supertrees Disentangle the Chimerical Origin of Eukaryotic Genomes", *Molecular Biology and Evolution*, 24(8):1752-60, doi:10.1093/molbev/msm095
- Podar M**, Anderson I, Makarova KS, Elkins JG, Ivanova N, AWall M, Lykidis A, Mavromatis K, Sun H, Hudson ME, Chen W, Deciu C, Hutchison D, Eads JR, Anderson A, Fernandes F, Szeto E, Lapidus A, Kyrpides NC, Saier MH Jr, Richardson PM, Rachel R, Huber H, Eisen JA, Koonin EV, Keller M, Stetter KO (2008<sup>1</sup>), "A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis-Nanoarchaeum equitans*", *Genome Biology*, 9:R158, doi:10.1186/gb-2008-9-11-r158
- Podar M**, Wall MA, Makarova KS, Koonin EV (2008<sup>2</sup>), "The prokaryotic V4R domain is the likely ancestor of a key component of the eukaryotic vesicle transport system", *Biology Direct*, 3:2, doi:10.1186/1745-6150-3-2
- Pogliano J** (2008), "The bacterial cytoskeleton", *Current Opinion in Cell Biology*, 20:19-27, doi:10.1016/j.ceb.2007.12.006
- Pond FR**, Gibson I, Lalucat J, Quackenbusch RL (1989), "R-body-producing bacteria", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(1):25-67
- Pötter M**, Steinbüchel A (2006), "Biogenesis and Structure of Polyhydroxyalkanoate Granules", in "Inclusions in Prokaryotes" (Shively JM), Springer Berlin Heidelberg, pp 110-136, doi:10.1007/7171\_005
- Prangishvili D**, Holz I, Stieger E, Nickell S, Kristjansson, Zillig W (2000), "Sulfolobins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*", *Journal of Bacteriology*, 182(10):2985-88, doi:10.1128/JB.182.10.2985-2988.2000
- Preibsch S**, Saalfeld S, Tomancak P (2009), "Globally Optimal Stitching of Tiled 3D Microscopic Image Acquisitions", *Bioinformatics*, 25(11):1463-65, doi:10.1093/bioinformatics/btp184
- Qiu L**, Pashkova N, Walker JR, Winistorfer S, Allali-Hassani A, Akutsu M, Piper R, Dhe-Paganon S (2009), "Structure and Function of the PLAA Ufd3-p97 Cdc48 Complex", *The Journal of Biological Chemistry*, 285(1):365-72, doi:10.1074/jbc.M109.044685
- Rachel R**, Wyschkony I, Riehl S, Huber H (2002), "The ultrastructure of *Ignicoccus*: Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon", *Archaea*, 1(1):9-18
- Rachel R**, Meyer C, Klingl A, Gürster S, Heimerl T, Wasserburger N, Burghardt T, Küper U, Bellack A, Schopf S, Wirth R, Huber H, Wanner G (2010), "Analysis of the Ultrastructure of Archaea by Electron Microscopy", *Methods in Cell Biology*, 96:47-69, doi:10.1016/S0091-679X(10)96003-2

- Radermacher M (2006)**, "Weighted Back-projection Methods", in "Electron Tomography" (Frank J), Second Edition, Springer Verlag, pp 245-273, doi:10.1007/978-0-387-69008-7\_9
- Radon J (1917)**, "Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten", *Berichte über die Verhandlungen der Königlich-Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig, Mathematisch-Physische Klasse*, 69:262-77
- Ramakrishnan V, Adams MWW (1995)**, "Preparation of Genomic DNA from Sulfur-dependent Hyperthermophilic Archaea", in "Archaea: a laboratory manual - Thermophiles" (Robb FT, Place AR) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 95-96
- Ramsay JP, Williamson NR, Spring DR, Salmond GPC (2011)**, "A quorum-sensing molecule acts as a morphogen controlling gas vesicle organelle biogenesis and adaptive flotation in an enterobacterium", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(36):14932-37, doi:10.1073/pnas.1109169108
- Rapoport TA, (2007)** "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes", *Nature*, 450:663-69, doi:10.1038/nature06384
- Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y (2003)**, "Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures", *Bioinformatics*, 19(3):368-75, doi:10.1093/bioinformatics/btf877
- Remonsellez F, Orell A, Jerez CA (2006)**, "Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism", *Microbiology*, 152:59-66, doi:10.1099/mic.0.28241-0
- Reysenbach AL, Liu Y, Banta AB, Beveridge TJ, Kirshtein JD, Schouten S, Tivey MK, Von Damm KL, Voytek MA (2006)**, "A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents", *Nature*, 442:444-7, doi:10.1038/nature04921
- Rieger G, Müller K, Hermann R, Stetter KO, Rachel R (1997)**, "Cultivation of hyperthermophilic archaea in capillary tubes resulting in improved preservation of fine structures", *Archives of Microbiology*, 168:373-79, doi:10.1007/s002030050511
- Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, Darling A, Malfatti S, Swan BK, Gies EA, Dodsworth JA, Hedlund BP, Tsiamis G, Sievert SM, Liu WT, Eisen JA, Hallam SJ, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Rubin EM, Hugenholtz P, Woyke T (2013)**, "Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter", *Nature*, 499:431-37, doi:10.1038/nature12352
- Rochette NC, Brochier-Armanet C, Gouy M (2014)**, "Phylogenomic Test of the Hypotheses for the Evolutionary Origin of Eukaryotes", *Molecular Biology and Evolution*, 31(4):832-45, doi:10.1093/molbev/mst272
- Rudnick H, Hendrich S, Pilatus U, Blotevogel KH (1990)**, "Phosphate accumulation and the occurrence of polyphosphates and cyclic 2,3-diphosphoglycerate in *Methanosarcina frisia*", *Archives of Microbiology*, 154:584-588, doi:10.1007/BF00248840
- Rumpf S, Jentsch S (2006)**, "Functional Division of Substrate Processing Cofactors of the Ubiquitin-Selective Cdc48 Chaperone", *Molecular Cell*, 21:261-69, doi:10.1016/j.molcel.2005.12.014
- Sagulenko E, Morgan GP, Webb RI, Yee B, Lee KC, Fuerst JA (2014)**, "Structural Studies of Planctomycete Gemmata obscuriglobus Support Cell Compartmentalisation in a Bacterium", *PLoS One*, 9(3):e91344, doi:10.1371/journal.pone.0091344
- Sakuraba H, Kawakami R, Ohshima T (2005)**, "First archaeal inorganic polyphosphate-ATP-dependent NAD kinase, from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* cloning, expression, and characterization", *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8):4352-58, doi:10.1128/AEM.71.8.4352-4358.2005
- Salama NR, Chuang JS, Schekman RW (1997)**, "Sec31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum", *Molecular Biology of the Cell*, 8:205-17, doi:10.1091/mbc.8.2.205

- Salecker B (2010)**, "Räumliche Rekonstruktion und Visualisierung auf der Basis von elektronenmikroskopischen Daten", *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Sambrook J, Russell DW (2001)**, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA
- Samson RY, Obita T, Freund SM, Williams RL, Bell SD (2008)**, "A Role for the ESCRT System in Cell Division in Archaea", *Science*, 322:1710-13, doi:10.1126/science.1165322
- Samson RY, Bell SD (2009)**, "Ancient ESCRTs and the evolution of binary fission", *Trends in Microbiology*, 17(11):507-13, doi:10.1016/j.tim.2009.08.003
- Samson RY, Obita T, Hodgson B, Shaw MK, Choung PLG, Williams RL, Bell SD (2011)**, "Molecular and structural basis of ESCRT-III recruitment to membranes during archaeal cell division", *Molecular Cell*, 41(2):186-96, doi:10.1016/j.molcel.2010.12.018
- Sanchez-Amat A (2006)**, "R-bodies", in "Inclusions in Prokaryotes" (Shively JM), Springer Berlin Heidelberg, pp 331-341, doi:10.1007/7171\_014
- Santarella-Mellwig R, Franke J, Jaedicke A, Gorjanacz M, Bauer U, Budd A, Mattaj IW, Devos DP (2010)**, "The Compartmentalized Bacteria of the Planctomycetes-Verrucomicrobia-Chlamydiae Superphylum Have Membrane Coat-Like Proteins", *PLoS Biology*, 8(1):e1000281, doi:10.1371/journal.pbio.1000281
- Santarella-Mellwig R, Pruggnaller S, Roos N, Mattaj IW, Devos DP (2013)**, "Three-Dimensional Reconstruction of Bacteria with a Complex Endomembrane System", *PLoS Biology*, 11(5):e1001565, doi:10.1371/journal.pbio.1001565
- Schägger H, von Jagow G (1987)**, "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa", *Analytical Biochemistry*, 166:368-79, doi:10.1016/0003-2697(87)90587-2
- Scherer PA, Böhm HP (1983)**, "Ultrastructural investigation of 12 *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphatelike inclusions", *Canadian Journal of Microbiology*, 29(9):1190-99, doi:10.1139/m83-182
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012)**, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature Methods*, 9(7):671-75, doi:10.1038/nmeth.2089
- Schooling SR, Beveridge TJ (2006)**, "Membrane Vesicles: an Overlooked Component of the Matrices of Biofilms", *Journal of Bacteriology*, 188(16):5945-57, doi:10.1128/JB.00257-06
- Searcy DG (1992)**, "Origins of mitochondria and chloroplasts from sulfur-based symbioses", in "The Origin and Evolution of the Cell" (Hartman H, Matsuno K), World Scientific, Singapore, pp. 47-78
- Seltmann G, Holst O (2002)**, "Periplasmic Space and Rigid Layer", in "The Bacterial Cell Wall" (Seltmann G, Holst O), Springer Berlin Heidelberg, pp 103-132, doi:10.1007/978-3-662-04878-8\_3
- Seufferheld MJ, Vieira MCF, Ruiz FA, Rodrigues CO, Moreno SNJ, Docampo R (2003)**, "Identification of Organelles in Bacteria Similar to Acidocalcisomes of Unicellular Eukaryotes", *The Journal of Biological Chemistry*, 278:29971-78, doi:10.1074/jbc.M304548200
- Seufferheld MJ, Lea CR, Vieira M, Oldfield E, Docampo R (2004)**, "The H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* Is Predominantly Located in Polyphosphate-rich Acidocalcisomes", *The Journal of Biological Chemistry*, 279:51193-202, doi:10.1074/jbc.M406099200
- Seufferheld MJ, Kirn KM, Whitfield J, Valerio A, Caetano-Anollés (2011)**, "Evolution of vacuolar proton pyrophosphatase domains and volutin granules: clues into the early evolutionary origin of the acidocalcisome", *Biology Direct*, 6:50, doi:10.1186/1745-6150-6-50

- Shannon CE (1949)**, "Communication in the Presence of Noise", *Proceedings of the Institute of Radio Engineers*, 37(1):10-21, doi:10.1109/JRPROC.1949.232969
- Shih YL, Rothfield L (2006)**, "The bacterial cytoskeleton", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3):729-54, doi:10.1128/MMBR.00017-06
- Shimada H, Yamagishi A (2011)**, "Stability of Heterochiral Hybrid Membrane Made of Bacterial sn-G3P Lipids and Archaeal sn-G1P Lipids", *Biochemistry*, 50:4114-4120, doi:10.1021/bi200172d
- Siebers B, Zaparty M, Raddatz G, Tjaden B, Albers SV, Bell SD, Blombach F, Kletzin A, Krypides N, Lanz C, Plagens A, Rampp M, Rosinus A, von Jahn M, Makarova KS, Klenk HP, Schuster SC, Hensel R (2011)**, "The Complete Genome Sequence of *Thermoproteus tenax*: A Physiologically Versatile Member of the Crenarchaeota", *PLoS One*, 6(10):e24222, doi:10.1371/journal.pone.0024222
- Simpson AGB, Roger AJ (2004)** "Excavata and the Origin of Amictochondriate Eukaryotes", in "Organelles, Genomes and Eukaryote Phylogeny", (Hirt RP, Horner DS), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 27-54, doi:10.1201/9780203508930.pt1
- Sinninghe Damsté JS, Rijpstra WIC, Hopmans EC, Schouten S, Balk M, Stams AJM (2007)**, "Structural characterization of diabolic acid-based tetraester, tetraether and mixed ether/ester, membrane-spanning lipids of bacteria from the order *Thermotogales*", *Archives of Microbiology*, 188:629-41, doi:10.1007/s00203-007-0284-z
- Sitte H (1981)**, "Ultramikrotomie - Häufige Probleme und Fehler", Reichert-Jung Optische Werke AG, Wien
- Sjöstrand FS (1958)**, "Ultrastructure of Retinal Rod Synapses of the Guinea Pig Eye as Revealed by Three-Dimensional Reconstructions from Serial Sections", *Journal of Ultrastructure Research*; 2(1):122-70, doi:10.1016/S0022-5320(58)90050-9
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ (1999)**, "The WD repeat: a common architecture for diverse functions", *Trends in Biochemical Sciences*, 24(5):181-85, doi:10.1016/S0968-0004(99)01384-5
- Snyder JC, Samson RY, Brumfield SK, Bell SD, Young MJ (2013)**, "Functional interplay between a virus and the ESCRT machinery in Archaea", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(26):10783-87, doi:10.1073/pnas.1301605110
- Sogin ML (1991)**, "Early evolution and the origin of eukaryotes", *Current Opinion in Genetics and Development*, 1(4):457-63, doi:10.1016/S0959-437X(05)80192-3
- Soler N, Marquet E, Verbavatz JM, Forterre P (2008)**, "Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales", *Research in Microbiology*, 159: 390-99, doi:10.1016/j.resmic.2008.04.015
- Soler N, Gaudin M, Marquet E, Forterre P (2011)**, "Plasmids, viruses and virus-like membrane vesicles from Thermococcales", *Biochemical Society Transactions*, 39(1):36-44, doi:10.1042/BST0390036
- Soto GE, Young SJ, Matrone ME, Deerinck TJ, Lamont S, Carragher BO, Hama K, Ellisman MH (1994)**, "Serial section electron tomography: A method for three-dimensional reconstruction of large structures", *Neuroimage*, 1(3):230-243, doi:10.1006/nimg.1994.1008
- Stirnimann CU, Petsalaki E, Russell RB, Müller CW (2010)**, "WD40 proteins propel cellular networks", *Trends in Biochemical Sciences*, 35:565-74, doi:10.1016/j.tibs.2010.04.003
- Stock JB, Rauch B, Roseman S (1977)**, "Periplasmic Space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*", *The Journal of Biological Chemistry*, 252(21):7850-61
- Strand KR, Sun C, Li T, Jenney FE Jr, Schut GJ, Adams MWW (2010)**, "Oxidative stress protection and the repair response to hydrogen peroxide in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and in related species", *Archives of Microbiology*, 192:447-459, doi:10.1007/s00203-010-0570-z

- Strunk T**, Hamacher K, Hoffgaard F, Engelhardt H, Zillig MD, Faist K, Wenzel W, Pfeifer F (2011), "Structural model of the gas vesicle protein GvpA and analysis of GvpA mutants *in vivo*", *Molecular Microbiology*, 81(1):56-68, doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07669.x
- Studer D**, Graber W, Al-Amoudi A, Egli P (2001), "A new approach for cryofixation by high-pressure freezing", *Journal of Microscopy*, 203(3):285-94, doi:10.1046/j.1365-2818.2001.00919.x
- Studier FW** (2005), "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures", *Protein Expression and Purification*, 41:207-234, doi:10.1016/j.pep.2005.01.016
- Subramanian A**, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005), "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43):15545-50, doi:10.1073/pnas.0506580102
- Sukharev S**, Sachs F (2012), "Molecular force transduction by ion channels - diversity and unifying principles", *Journal of Cell Science*, 125:3075-83, doi:10.1242/jcs.092353
- Tabb DL**, McDONALD WH, YATES JR III (2002), "DTASelect and Contrast Tools for Assembling and Comparing Protein Identifications from Shotgun Proteomics", *Journal of Proteome Research*, 1(1):21-26, doi:10.1021/pr015504q
- Tan HH**, Makino A, Sudesh K, Greimel P, Kobayashi T (2012), "Spectroscopic Evidence for the Unusual Stereochemical Configuration of an Endosome-Specific Lipid", *Angewandte Chemie International Edition*, 51(2):533-35, doi:10.1002/anie.201106470
- Thévenaz P**, Ruttimann UE, Unser M, (1998), "A Pyramid Approach to Subpixel Registration Based on Intensity", *IEEE Transactions of Image Processing*, 7(1):27-41, doi:10.1109/83.650848
- Tong J**, Midgley P (2006), "A novel dual-axis reconstruction algorithm for electron tomography", *Journal of Physics: Conference Series*, 26:33-36, doi:10.1088/1742-6596/26/1/008
- Toso DB**, Henstra AM, Gunsalus RP, Zhou ZH (2011), "Structural, mass and elemental analyses of storage granules in methanogenic archaeal cells", *Environmental Microbiology*, 13(9):2587-99, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02531.x
- Trent JD**, Kagawa HK, Paavola CD, McMillan RA, Howard J, Jahnke L, Lavin C, Embaye T, Henze CE (2003), "Intracellular localization of a group II chaperonin indicates a membrane-related function", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26):15589-94, doi:10.1073/pnas.2136795100
- Tucker JD**, Siebert CA, Escalante M, Adams PG, Olsen JD, Otto C, Stokes DL, Hunter CN (2010), "Membrane invagination in *Rhodobacter sphaeroides* is initiated at curved regions of the cytoplasmic membrane, then forms both budded and fully detached spherical vesicles", *Molecular Microbiology*, 76(4):833-47, doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07153.x
- Tuckwell D** (1999), "Evolution of von Willebrand factor A (vWA) domains", *Biochemical Society Transactions*, 27(6):835-40, doi:10.1042/bst0270835
- Ulrych A**, Goldová J, Petříček M, Benada O, Kofroňová O, Rampírová P, Petříčková K, Branny P (2013), "The pleiotropic effect of WD-40 domain containing proteins on cellular differentiation and production of secondary metabolites in *Streptomyces coelicolor*", *Molecular BioSystems*, 9:1453-69, doi:10.1039/c3mb25542e
- van Niftrik L**, Geerts WJC, van Donselaar EG, Humbel B, Yakushevskaya A, Verkleij AJ, Jetten MSM, Strous M (2008), "Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: A membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria", *Journal of Structural Biology*, 161:401-410, doi:10.1016/j.jsb.2007.05.005



- VerBerkmoes** N, Sharp J, Hettich R (2004), "Mass Spectrometry", in "Microbial Functional Genomics" (Zhou J, Thompson DK, Xu Y, Tiedje JM), John Wiley & Sons, Inc., pp 241-283, doi:10.1002/0471647527.ch9
- Vesteg** M, Krajčovič J (2011), "The falsifiability of the models for the origin of eukaryotes", *Current Opinion in Genetics & Development*, 57:367-90; doi:10.1007/s00294-011-0357-z
- Villinger** C, Gregorius H, Kranz C, Höhn K, Münzberg C, von Wichert G, Mizaikoff B, Wanner G, Walther P (2012), "FIB/SEM tomography with TEM-like resolution for 3D imaging of high-pressure frozen cells", *Histochemistry and Cell Biology*, 138:549-56, doi:10.1007/s00418-012-1020-6
- Villinger** C, Schauflinger M, Gregorius H, Kranz C, Höhn K, Nafeey S, Walther P (2014), "Three-Dimensional Imaging of Adherent Cells using FIB/SEM and STEM" in "Electron Microscopy: Methods and Protocols" (Kuo J), *Methods in Molecular Biology*, 1117, Springer Science + Business Media, NY, USA, pp 617-638, doi:10.1007/978-1-62703-776-1\_27
- Voortman** LM, Franken EM, van Vilet LJ, Rieger B (2012), "Fast, spatially varying CTF correction in TEM", *Ultramicroscopy*, 118:26-34, doi:10.1016/j.ultramic.2012.05.002
- Wältermann** M, Steinbüchel A, (2006) "Wax Ester and Triacylglycerol Inclusions", in "Inclusions in Prokaryotes" (Shively JM), Springer Berlin Heidelberg, pp 137-166, doi:10.1007/7171\_006
- Walther** P, Ziegler A, (2002) "Freeze substitution of high-pressure frozen samples the visibility of biological membranes is improved when the substitution medium contains water", *Journal of Microscopy*, 208(Pt1):3-10, doi:10.1046/j.1365-2818.2002.01064.x
- Wanner** G, Schäfer T, Lütz-Meindl U (2013), "3-D analysis of dictyosomes and multivesicular bodies in the green alga *Micrasterias denticulata* by FIB/SEM tomography", *Journal of Structural Biology*, 184(2):203-11, doi:10.1016/j.jsb.2013.10.003
- Wasserburger** N (2008), "Anzucht, elektronenmikroskopische Präparation und Darstellung der archaeellen Cokultur von *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*", *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Waters** E, Hohn MJ, Ahel I, Graham DE, Adams MD, Barnstead M, Beeson KY, Bibbs L, Bolandos R, Keller M, Kretz K, Lin X, Mathur E, Ni J, Podar M, Richardson T, Sutton GG, Simon M, Söll D, Stetter KO, Short JM, Noordewier M (2003), "The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22):12984-8, doi:10.1073/pnas.1735403100
- Weigl** J (2013), "Reinigung und Charakterisierung der ATP-Synthase aus *Ignicoccus islandicus*", *Bachelorarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Weijers** JWH, Schouten S, Hopmans EC, Geenevasen JAJ, David ORP, Coleman JM, Pancost RD, Sinninghe Damsté JS (2006), "Membrane lipids of mesophilic anaerobic bacteria thriving in peats have typical archaeal traits", *Environmental Microbiology*, 8(4):648-57, doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00941.x
- Weinfurter** A (2012), "Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit bei der Reinigung der ATP-Synthase von *Ignicoccus hospitalis*", *Bachelorarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Weiss** P, Huppert S, Kölling R (2009), "Analysis of the dual function of the ESCRT-III protein Snf7 in endocytic trafficking and in gene expression", *Biochemical Journal*, 424:89-97, doi:10.1042/BJ20090957
- Wesolowski** J, Paumet F (2010), "SNARE motif: A common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion", *Virulence*, 1(4):319-24, doi:10.1371/journal.pone.0007375
- Wickstead** B, Gull K (2011), "The evolution of the cytoskeleton", *Journal of Cell Biology*, 194(4):513-25, doi:10.1083/jcb.201102065
- Wiegmann** P (2011), "Ionenabhängigkeit und Hemmstoffsensitivität der ATP-Synthase von *Ignicoccus hospitalis*", *Bachelorarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg

- Wiegmann P (2013)**, "Heterologe Expression von Membranproteinen des hyperthermophilen Crenarchaeons *Ignicoccus hospitalis* sowie Expression und Aufreinigung eines mechanosensitiven Kanals von *Nanoarchaeum equitans*", *Masterarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Williams R, Urbé S (2011)**, "The emerging shape of the ESCRT machinery", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8:355-68, doi:10.1038/nrm2162
- Williams TA, Foster PG, Nye TMW, Cox CJ, Embley TM (2012)**, "A congruent phylogenomic signal places eukaryotes within the Archaea", *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 279:4870-79, doi:10.1098/rspb.2012.1795
- Williams TA, Foster PG, Cox CJ, Embley TM (2013)**, "An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life", *Nature*, 504:231-36, doi:10.1038/nature12779
- Williams TA, Embley TM (2014)**, "Archaeal 'dark matter' and the origin of eukaryotes", *Genome Biology and Evolution*, 6(3):474-81, doi:10.1093/gbe/evu031
- Wilson CM, Rodriguez M Jr, Johnson CM, Martin SL, Chu TM, Wolfinger RD, Hauser LJ, Land ML, Klingeman DM, Syed MH, Raguskas AJ, Tschaplinski TJ, Mielenz JR, Brown SD (2013)**, "Global transcriptome analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during growth on dilute acid pretreated Populus and switchgrass", *Biotechnology for Biofuels*, 6:179, doi:10.1186/1754-6834-6-179
- Wilson ME, Maksaev G, Haswell ES, (2013)** "MscS-like Mechanosensitive Channels in Plants and Microbes", *Biochemistry*, 52:5708-22, doi: 10.1021/bi400804z
- Woese CR, Fox GE, (1977)** "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11):5088-90, doi:10.1073/pnas.74.11.5088
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990)**, "Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87:4576-79, doi:10.1073/pnas.87.12.4576
- Wolf D, Lubk A, Lichte H, (2014)** "Weighted simultaneous iterative reconstruction technique for single-axis tomography", *Ultramicroscopy*, 136:15-25, 10.1016/j.ultramic.2013.07.016
- Wolf YI, Makarova KS, Yutin N, Koonin EV (2012)**, "Updated clusters of orthologous genes for Archaea: a complex ancestor of the Archaea and the byways of horizontal gene transfer", *Biology Direct*, 7:46, doi:10.1186/1745-6150-7-46
- Woodman PG (2003)**, "p97, a protein coping with multiple identities", *Journal of Cell Science*, 116(21):4283-90, doi:10.1242/jcs.00817
- Wu N, Matand K, Kebede B, Acquah G, Williams S (2010)**, "Enhancing DNA electrotransformation efficiency in *Escherichia coli* DH10B electrocompetent cells", *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(5), doi:10.2225/vol13-issue5-fulltext-11
- Xu C, Min J (2011)**, "Structure and function of WD40 domain proteins", *Protein & Cell*, 2(3):202-14, doi:10.1007/s13238-011-1018-1
- Yamanaka K, Sasagawa Y, Ogura T (2012)**, "Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823:130-137, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.07.001
- Yu X, Goforth C, Meyer C, Rachel R, Wirth R, Schröder GF, Egelman EH (2012)**, "Filaments from *Ignicoccus hospitalis* Show Diversity of Packing in Proteins Containing N-terminal Type IV Piliin Helices", *Journal of Molecular Biology*, 422(2):274-81, doi:10.1016/j.jmb.2012.05.031.
- Yutin N, Puigbó P, Koonin EV, Wolf YI (2012)**, "Phylogenomics of Prokaryotic Ribosomal Proteins", *PLoS One*, 7(5):e36972, doi:10.1371/journal.pone.0036972
- Yutin N, Koonin EV (2012)**, "Archaeal origin of tubulin", *Biology Direct*, 7:10, doi:10.1186/1745-6150-7-10

- 
- Zhang X**, Shaw A, Bates PA, Newman RH, Gowen B, Orlova E, Gorman MA, Kondo H, Dokurno P, Lally J, Leonard G, Meyer H, van Heel M, Freemont PS (2000), "Structure of the AAA ATPase p97", *Molecular Cell*, 6:1473-84, doi:10.1016/S1097-2765(00)00143-X
- Zhang X**, Wang P, Gangar A, Zhang J, Brennwald P, TerBush D, Guo W (2005), "Lethal giant larvae proteins interact with the exocyst complex and are involved in polarized exocytosis", *The Journal of Cell Biology*, 170:273-83, doi:10.1083/jcb.200502055
- Ziegler A** (2014), "Aufreinigung und Charakterisierung der ATP-Synthase/ATPase von *Ignicoccus pacificus*", *Zulassungsarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Zillig W** (1994), "Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria", *Current Opinion in Genetics and Development*, 1:544-51, doi:10.1016/S0959-437X(05)80206-0



## VIII Anhang

### 1 Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elementsymbole wurden gemäß den IUPAC-Richtlinien verwendet.

°C	Grad Celsius
1° AK	primärer Antikörper
2° AK	sekundärer Antikörper
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AAA	'ATPases associated with diverse cellular activities'
ABC	'ATP binding cassette'
AG	Arbeitsgruppe
AI	'Auto-Induction'
AK	Antikörper
Alba	'acetylation lowers binding affinity'
APS	Ammoniumpersulfat
arCOG	'archaeal clusters of orthologous groups'
ART	'algebraic reconstruction technique'
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B	Belgien
BBR	Bakterienbank Regensburg
Bet	'blocked early in transport'
BP	Bisphosphatase
BPB	Bromphenolblau
BSA	'bovine serum albumin'
BSE	'backscattered electrons'
bzw.	beziehungsweise
CA	California
CAS	'CRISPR associated protein'

---

CBS	'cystathionine beta synthase'
CCD	'charge-coupled device'
CDC	'cell division control'
cDNA	'complementary DNA'
Cdv	'cell division protein'
Cellulosekap.	Cellulosekapillare
CH	Schweiz
CMOS	'complementary metal-oxide-semiconductor'
CoA	Coenzym A
cos	Cosinus
CP	Cytoplasma
CRISPR	'clustered regularly interspaced short palindromic repeat'
Cryo-ET	Cryo-Elektronentomographie
Cst	'carbon starvation protein'
CTF	'contrast transfer function'
d	Durchmesser
D	Präparatdicke
DK	Dänemark
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	'deoxyribonucleic acid'
DnD	DMSO und DTT
ds	'double stranded'
DTT	Dithiothreitol
E	Spanien
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDX	'energy dispersive x-ray analysis'
EF	Elongationsfaktor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat

---

ELISA	'Enzyme Linked Immunosorbent Assay'
EM	Elektronenmikroskop(ie)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESCRT	'endosomal sorting complex required for transport'
ESI	'Electrospray Ionization'
ESP	'eukaryotic signature proteins'
<i>et al.</i>	<i>et alii/et aliae</i>
ET	Elektronentomographie
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
e-value	'expect value'
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDR	'false-discovery-rate'
FIB/SEM	'focused ion beam/scanning electron microscopy'
FIN	Finnland
FISH	'fluorescence <i>in situ</i> hybridization'
fps	'frames per second'
FSB	'Frozen Stock Buffer'
Fts	'filamenting temperature-sensitive'
g	Erdbeschleunigung
GA	Georgia
GA	Glutardialdehyd
GAR	'goat anti rabbit'
gDNA	genomische DNA
GESA	'Gene Set Enrichment Analysis'
ggf.	gegebenenfalls
GTE	Glucose/Tris/EDTA
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

---

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV	'human immunodeficiency virus'
HPF	'high-pressure freezing'
HRP	'horse raddish peroxidase'
Hsp	'heat shock protein'
HUGA	H <sub>2</sub> O/UAc/GA/Aceton
<i>I. hospitalis</i>	<i>Ignicoccus hospitalis</i>
IF	Intermediärfilament
IgG	Immunglobulin G
Ihomp	' <i>Ignicoccus hospitalis</i> outer membrane protein'
lis	<i>Ignicoccus islandicus</i>
ILV	'intraluminal vesicles'
IMAC	'Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography'
IMC	'Intermembrane Compartment'
IN	Indiana
Inc.	Incorporated
Ipa	<i>Ignicoccus pacificus</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JP	Japan
kDa	Kilodalton
LB	'lysogeny broth'
LC-MS/MS	'liquid chromatography tandem mass spectrometry'
LEW	'lysis, equilibration, and washing'
Lgl	'Leathal giant larvae'
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LUT	'lookup table'
MA	Maine
MALDI	'matrix-assisted laser desorption/ionization'



---

Mbp	'mega base pairs'
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MI	Michigan
MIM2	'MIT-interacting motif'
min	Minute
MNA	Methylnadic Anhydrid
mRNA	'messenger RNA'
MS	Massenspektroskopie
MudPIT	'Multidimensional Protein Identification Technology'
MVB	'multivesicular bodies'
MWCO	'molecular weight cut-off'
<i>N. equitans</i>	<i>Nanoarchaeum equitans</i>
NA	numerische Apertur
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NC	North Carolina
Nde	<i>Neisseria denitrificans</i>
NES	'normalized enrichment score'
NL	Niederlande
NPC	'nuclear pore complex'
NSF	'N-ethylmaleimide-sensitive factor'
nSpC	'normalized spectral counts'
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
NY	New York
NZ	New Zealand
OD	optische Dichte
ORF	'open reading frame'
p.a.	<i>pro analysi</i>
p6	hexagonal

---

PA	Pennsylvania
Par	'partition protein'
PBS	'phosphate buffered saline'
PC	Personal Computer
PC-Membran	Polycarbonat-Membran
PCR	'polymerase chain reaction'
PEP	Phosphoenolpyruvat
PHB	Polyhydroxybutyrat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PolyP	Polyphosphat
PPK	Polyphosphatkinase
PPX	Exopolyphosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RAG	'rabbit anti goat'
R-bodies	'refractile inclusion bodies'
Rec	'recombination protein'
RNA	'ribonucleic acid'
RP	'reverse phase'
rpm	'rounds per minute'
rRNA	ribosomale RNA
RSpC	're-normalized spectral counts'
s	Sekunde
S	Svedberg
Saci	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
SCX	'strong cation exchanger'
SDS	'sodium dodecyl sulfat'
SIRT	'simultaneous iterative reconstruction technique'
S-Layer	'Surface-Layer'

---

SME	synthetisches Meerwasserr
SNARE	'soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor'
Snf	'sucrose non-fermenting'
sn-G1P	sn-Glycerin-1-Phosphat
sn-G3P	sn-Glycerin-3-Phosphat
SNR	'Signal to Noise Ratio'
SOB	'super optimal broth'
SOC	'Super Optimal broth with Catabolite repression'
sp.	<i>species</i>
SpC	'spectral counts'
Sro	'suppressor of RHO3 protein'
Sso	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
STEM	'scanning transmission electron microscopy'
STIV	' <i>Sulfolobus</i> turreted icosahedral virus'
SUMO	'small ubiquitin-related modifier'
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCA	'trichloroacetic acid'
TE	Tris/EDTA
TED	'tris(carboxymethyl)ethylene diamine'
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFB	Transformation Buffer
TGN	'Trans-Golgi Network'
Thi	Thiamin-Biosynthese-Protein
TMD	'Transmembrane Domain'
TN	Tennessee
TRAPP	'transport protein particle'

---

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	'transfer RNA'
trunc	'truncated'
t-SNARE	'target-SNARE'
TVN	'tubular vesicular network'
UAc	Uranylacetat
UK	United Kingdom
ün	über Nacht
USA	United States of America
Usp	'universal stress protein'
UV	ultraviolett
V	Volt
V4R	4-Vinyl-Reduktase-Domäne
VAT	'VCP-like ATPase from <i>Thermoplasma acidophilum</i> '
VCP	'valosin containing protein'
Vps	'vacuolar protein sorting'
v-SNARE	'vesicle-SNARE'
vWA	'von-Willebrand-Faktor A'
w	Anreicherungsfaktor
WA	Washington
WACA	'Walker A Cytoskeletal ATPases'
WBP	'weighted back projection'
wH	'winged-helix'
WI	Wisconsin
WT	Wildtyp
Xho	<i>Xanthomonas holcicola</i>
YPD	'yeast extract peptone dextrose'
z.B.	zum Beispiel

## 2 'Supplemental Blu-ray Disc'

Die Videos auf diesem Datenträger wurden mit ImageJ unter Verwendung der MJPEG-Kompression generiert. Zur Ansicht der Videos wird der 'VLC Media Player' empfohlen.

### "01 - Methodik"

In diesem Ordner befinden sich drei Unterordner. Im "01 - WBP vs SIRT"-Ordner sind Videos der entsprechenden Tomogramme zu finden. Diese wurden in x- und y-Richtung um den Faktor 2 'gebinned'. Daneben sind die Ausschnitte aus diesen Tomogrammen (Abbildungen 12 & 13) in voller Auflösung enthalten. Im Ordner "02 - SIRT-Iterationen" sind die entsprechenden Videos zu Abbildung 14 gezeigt. Im Ordner "03 - Defokus & CTF" sind die entsprechenden Videos zu den Datensätzen, die mit 5  $\mu\text{m}$  bzw. 3  $\mu\text{m}$  Defokus aufgenommen wurden. Jeweils befinden sich davon CTF-korrigierte und unkorrigierte Versionen die wiederum jeweils mit WBP und SIRT berechnet wurden. Darüber hinaus gibt es Bilder zu jedem Datensatz von je einer Schicht.

### "02 - Struktur"

In diesem Ordner sind ebenfalls drei Unterordner enthalten. Im Ordner "01 - FIB-SEM" sind die 3D-Modelle der beiden Datensätze zu sehen. Zudem sind die korrigierte und unkorrigierte Version des 5x5x10 nm Datensatzes enthalten sowie vergleichende Bilder der 3D-Modelle. In einem weiteren Ordner ist Abbildung 44 in voller Auflösung enthalten. Der Ordner "02 - Elektronentomographie" enthält Videos der einzelnen zusammengesetzten Datensätze. Außerdem sind 'Screenshots' der Kontaktstellen in voller Auflösung enthalten und Videos der 3D-Modelle zu den Datensätzen B1 und B2. Im Ordner "03 - Dynamik" befinden sich die bearbeiteten Videos A und B jeweils mit und ohne LUT (siehe II/2.3).

### "03 - Proteomics"

Dieser Ordner enthält Excel-Tabellen zu den beiden Versuchsreihen. Maßgeblich für die relativen Häufigkeiten der Proteine sind im Falle der stationären Phase der RSpC-Wert bzw. in den 'Time-Course'-Proben der nSpC-Wert. Die Microarray-Daten sind als 'least square means' angegeben; ein negatives Vorzeichen bedeutet, dass das entsprechende Signal geringer war als das durchschnittliche Array-Signal bzw. ein positiver Wert bedeutet ein höheres Signal als der Durchschnitt. Sowohl für Proteom als auch Transkriptom sind in der 'Time-Course'-Datentabelle zusätzlich die Änderungsfaktoren relativ zum ersten Zeitpunkt (L1) angegeben. Für die Ansicht der Trendlinien ist mindestens "MS Office 2010" erforderlich.

### "04 - PHYRE2-Daten"

Dieser Ordner enthält PHYRE2-Daten einiger (für diese Arbeit) relevanter Proteine. Mit 'summary.html' kann in jedem Ordner die jeweilige Übersicht im 'Browser' geöffnet werden.