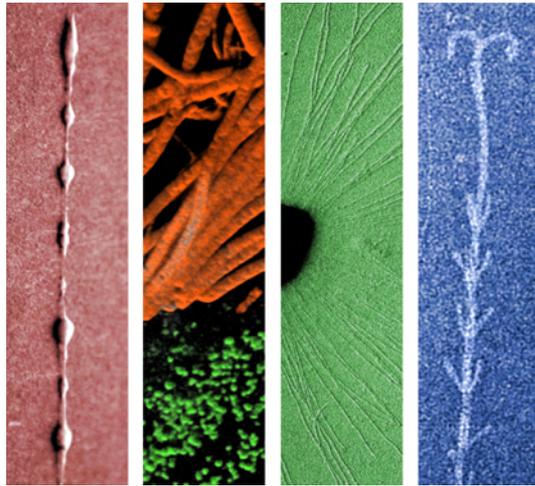


*Molekularbiologische und strukturelle Untersuchungen zur Biologie
des neuartigen, kälteliebenden SM1 Euryarchaeons
und seiner verschiedenen Lebensgemeinschaften*



DISSERTATION

*zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg*



vorgelegt von

Christine Moissl

aus Kröning

Regensburg, 2004

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. R. Huber

Promotionsgesuch eingereicht am: 21.07.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2004

<i>Prüfungsausschuß:</i>	<i>Vorsitzender</i>	<i>Prof. Dr. R. Wirth</i>
	<i>1. Gutachter</i>	<i>Prof. Dr. R. Huber</i>
	<i>2. Gutachter</i>	<i>Prof. Dr. A. Bresinsky</i>
	<i>3. Prüfer</i>	<i>Prof. Dr. S. Schneuwly</i>

*It is not necessary to go to extreme environments
to encounter exotic diversity; it is all around us.*

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	11
1. Bezugsquellen	11
1.1 Chemikalien und Biochemikalien	11
1.2 Molekularmassenstandards.....	12
1.3 Sekundäre Antikörper.....	12
1.4 Reaktionskits.....	12
1.5 Enzyme.....	12
1.6 PCR- Primer und Oligonukleotidsonden.....	13
1.7 Gase.....	13
1.8 Verbrauchsmaterial.....	13
1.9 Sonstiges.....	13
2. Sterilisation	14
3. Probenahmen und Messungen an sulfidischen Quellen	14
3.1 Probenahmen.....	14
3.2 Messungen.....	14
4. Züchtung und selektive Gewinnung des SM1 Euryarchaeons	14
4.1 <i>In situ</i> - Kultivierung mikrobieller Perlenkettengemeinschaften	14
4.2 Ernte und selektive Gewinnung des SM1 Euryarchaeons ('Aufreinigung').....	15
4.3 Herstellung eines Percoll- Gradienten.....	15
4.4 Selektive Gewinnung des SM1 Euryarchaeons ohne Percoll.....	15
4.5 SM1 Biofilme.....	15
5. Biologische Untersuchungen des SM1 Euryarchaeons	16
5.1 Lebend-/Tot- Färbung	16
5.2 Temperatur und Sauerstoff.....	16
5.3 pH- Wert.....	16
5.4 SDS.....	16
5.5 Salz.....	16
5.6 Proteinase K.....	16
5.7 EDTA.....	17
5.8 Gram- Färbung.....	17
5.9 Katalase.....	17
6. Phasenkontrast- und Epifluoreszenzmikroskopie	17
7. Transmissions- Elektronenmikroskopie (TEM), Cryo- Elektronentomographie und konfokale Laserscanning- Mikroskopie (CLSM)	18
7.1 Transmissions- Elektronenmikroskopie	18
7.1.1 Herstellung eines Suspensionspräparats.....	18
7.1.2 Kontrastierung des Suspensionspräparats.....	18
7.1.3 Gefrierätzung.....	18
7.1.4 Einbettung von Zellen und Mikrotomie.....	19
7.1.5 Bildverarbeitung elektronenmikroskopischer Daten.....	19
7.1.6 EDAX- Analyse.....	19

7.2 Cryo- Elektronentomographie.....	19
7.3 Konfokale Laserscanning- Mikroskopie (CLSM).....	20
7.3.1 Proben und deren Vorbereitung.....	20
7.3.1.1 Mikrobielle Perlenkettengemeinschaft.....	20
7.3.1.2 SM1 Biofilme.....	20
7.3.2 Aufzeichnung und Bearbeitung der Daten.....	20
7.3.2.1 Analyse der Perlenkettengemeinschaft.....	21
7.3.2.2 Analyse der SM1 Biofilme.....	21
8. DNA- Isolierung und Konzentrationsbestimmung	21
8.1 DNA- Isolierung	21
8.1.1 Lösungen.....	21
8.1.2 Durchführung.....	22
8.2 DNA- Isolierung mit Reaktionskit.....	22
8.3 Nukleinsäuren- Konzentrationsbestimmung.....	22
8.3.1 Photometrische Bestimmung.....	22
8.3.2 Bestimmung mittels Ethidiumbromid- Agaroseplatten.....	23
9. Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	23
9.1 Lösungen.....	23
9.2 Primer.....	24
9.3 Durchführung der PCR und Gelelektrophorese.....	24
9.4 Ganzzell- PCR.....	25
10. Klonierung von PCR- Produkten.....	25
10.1 Lösungen und Puffer.....	25
10.2 Durchführung.....	26
10.2.1 Reinigung des PCR- Produkts.....	26
10.2.1.1 Reinigung mittels Gelelektrophorese.....	26
10.2.1.2 Reinigung mittels Microcon 100- Filtern.....	26
10.2.2 Klonierung.....	26
10.2.3 Screening der Klone und Restriktionsverdau (ARDRA).....	26
10.2.4 Sichern der Klone.....	27
10.2.5 Isolierung der Plasmid- DNA.....	27
11. Sequenzierung.....	27
12. Sequenzdatenanalyse.....	27
12.1 16S rRNA- Gensequenzen.....	27
12.2 Sonstige Gensequenzen.....	27
13. Ganzzellhybridisierung mit farbstoffmarkierten Oligonukleotidsonden.....	28
13.1 Verwendete Oligonukleotidsonden und Fluoreszenzfarbstoffe.....	28
13.2 Sondenkonstruktion.....	28
13.3 Beschichtung der Objektträger.....	29
13.4 Fixierung der Zellen.....	29
13.5 Trägergebundene Fluoreszenz- <i>in situ</i> - Hybridisierung (FISH).....	29
13.6 FISH in Suspension.....	31
14. Proteinbiochemische Methoden.....	32
14.1 Proteingewinnung.....	32
14.1.1 Gewinnung von Ganzzellextrakten.....	32
14.1.2 S- Layer- Präparation	32

14.1.3 Gewinnung von Hamifractionen.....	33
14.1.3.1 Mechanisches Abscheren der Hami.....	33
14.1.3.2 SDS- Behandlung.....	33
14.2 Proteinreinigung.....	33
14.2.1 Saccharose- Gradientenzentrifugation.....	33
14.2.2 Ammoniumsulfatfällung.....	34
14.2.3 Dialyse.....	34
14.3 Analyse von Proteinlösungen.....	34
14.3.1 Proteinmengenbestimmung: Bicinholinsäure (BCA)- Test	34
14.3.2 SDS- PAGE (SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese).....	35
14.3.2.1 Herstellung der Gele und Puffer.....	35
14.3.2.2 Durchführung.....	35
14.3.2.3 Coomassie- Färbung und Trocknung von Proteingelen.....	36
14.4 Western Blot.....	36
14.4.1 Transfer von Proteinen auf eine PVDF- Membran	36
14.4.2 Ponceau S- Färbung.....	37
14.5 Nachweis einer Protein- Glykosilierung.....	37
14.5.1 Periodat- Schiff- Färbung.....	37
14.5.2 PNGase F- Behandlung.....	37
14.6 Sequenzierung von Proteinen durch Edman- Abbau	37
15. Immunologische Methoden.....	38
15.1 Produktion von spezifischen Antikörpern	38
15.2 Lösungen.....	38
15.3 Immuno- FISH.....	38
15.4 Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie.....	39
15.5 Immuno- Blot.....	39
15.6 Antikörper- Affinitätsreinigung	40
16. Physikalisch- biochemische Untersuchungen zur Hamistabilität	40
17. Molekulargenetische Methoden.....	41
17.1 Primerkonstruktion.....	41
17.2 RAGE (Rapid Amplification of Genomic Ends, modifiziert).....	41
17.2.1 Lineare Amplifikation.....	41
17.2.2 Transferase- Reaktion.....	42
17.2.3 Nested PCR	42
17.3 Restriktionsverdau der DNA.....	42
17.4 Southern- Blot.....	42
17.4.1 Vorbehandlung des Gels.....	42
17.4.2 Kapillarblot.....	43
17.5 DNA- Hybridisierung mit DIG- markierten Sonden.....	43
17.5.1 Herstellung DIG- markierter Sonden.....	43
17.5.2 DNA- Hybridisierung.....	43
17.5.3 Detektion mittels anti- DIG- AP- Antikörpern.....	44
17.6 Analyse des mRNA- Pools.....	44
17.6.1 Isolierung der RNA.....	44
17.6.2 Amplifikation von RNA (RT- PCR, Reverse Transkription).....	44
17.6.3 PCR zur Detektion gesuchter RNA- Abschnitte.....	45

18. Klonierung und Expression.....	45
18.1 Klonierung von DNA- Fragmenten für die Expression.....	45
18.1.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	45
18.1.2 Einführung von Restriktionsschnittstellen.....	45
18.1.3 Ligation und Klonierung.....	46
18.1.4 Transformation von E. coli.....	46
18.2 Expression von Proteinen in E. coli.....	47
18.2.1 Verwendetes Expressionssystem.....	47
18.2.2 Durchführung der Proteinexpression.....	47
III. Ergebnisse.....	48
1. Zusammensetzung u. Aufwuchsverhalten d. mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft des Sippenauer Moors...48	
1.1 Probenahmeort: Sippenauer Moor	48
1.2 Molekularbiologische Untersuchungen der bakteriellen Partner des SM1 Euryarchaeons in der mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft.....	50
1.2.1 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen und EDAX- Analysen.....	50
1.2.2 Klonierung und phylogenetische Analyse des bakteriellen 16S rRNA- Genpools einer Perle.....	51
1.2.3 Analyse des Aufbaus der mikrobiellen Perlenkettenstruktur mittels FISH.....	53
1.2.4 Analyse des dreidimensionalen Aufbaus einer Perle mittels CLSM.....	54
1.2.5 Beteiligung weiterer Organismen an der Perlenkettengemeinschaft	55
1.3 Entwicklung eines <i>in situ</i> - Kultivierungssystems für die mikrobielle Perlenkettengemeinschaft.....	55
1.3.1 <i>In situ</i> - Kultivierung der Perlenkettengemeinschaft in ihrem Biotop	56
1.3.2 Selektive physikalische Abtrennung des SM1 Euryarchaeons.....	58
1.3.3 Phylogenetische Untersuchungen der aufgereinigten SM1 Euryarchaeen- Fraktion.....	60
2. Untersuchungen zur Biologie des SM1 Euryarchaeons.....	60
2.1 Allgemeine Untersuchungen zur Physiologie.....	60
2.1.1 Einfluss von Temperatur und Sauerstoff.....	60
2.1.2 Einfluss des pH- Werts.....	61
2.1.3 Einfluss der Ionenkonzentration.....	61
2.1.4 Einfluss von Proteinase K.....	62
2.1.5 Einfluss von Na ₂ EDTA	62
2.1.6 Einfluss von SDS.....	62
2.1.7 Nachweis von Katalase.....	62
2.2 Untersuchungen zur Struktur der SM1 Euryarchaeen	62
2.2.1 Phasenkontrastmikroskopie.....	62
2.2.2 Gram- Färbung.....	62
2.2.3 Transmissions- Elektronenmikroskopie und Cryo- Elektronentomographie.....	63
2.2.3.1 Allgemeine Beobachtungen.....	63
2.2.3.2 Aufbau der Zellwand.....	64
2.2.3.2.1 Ultradünnschnitte.....	64
2.2.3.2.2 Gefrierätzung.....	65
2.2.3.2.3 Isolierung des Oberflächenpolymers.....	65
2.2.3.2.4 Cryo- Elektronentomographie.....	66
2.2.3.3 Weitere strukturelle Besonderheiten.....	68
2.3 Immunologische Untersuchungen.....	68
2.3.1 Immuno- FISH.....	68
2.3.2 Immunogold- Markierung	69
3. Untersuchungen zur Charakterisierung der neuartigen SM1- Zelloberflächenstrukturen ('Hami').....	70
3.1 Transmissions- Elektronenmikroskopie.....	70
3.1.1 Mikroskopische Untersuchungen zur Feinstruktur.....	70
3.1.1.1 Uranylacetat- Kontrastierung.....	70
3.1.1.2 Phosphorwolframsäure- Kontrastierung.....	73

3.1.2 Periodizitätsanalysen.....	73
3.1.3 Untersuchungen zur Verankerung der Hami.....	74
3.2 Cryo- Elektronentomographie.....	75
3.3 Entwicklung eines Modells.....	77
3.4 Untersuchungen zur Adhäsion(skraft) der SM1- Hami	77
3.4.1 Experimente mit der optischen Laserpinzette.....	78
3.4.2 Inkubationsstudien zur Adhäsion.....	78
3.5 Proteinbiochemische und immunologische Untersuchungen.....	79
3.5.1 Abtrennung und Reinigung der SM1- Hami	79
3.5.2 Biochemische Analysen.....	79
3.5.2.1 SDS- PAGE.....	79
3.5.2.2 Nachweis einer Glykosylierung.....	80
3.5.2.3 Immunologische Untersuchungen.....	80
3.5.2.4 Untersuchungen zur Stabilität.....	81
3.5.3 Sequenzierung des Proteins.....	81
3.5.4 Konstruktion von Primern auf der Grundlage der Peptidsequenzen.....	81
3.5.5 PCR zur Amplifikation von Teilen des Hami- Gens.....	82
3.5.6 Vorversuche und Sequenzierung des Hami- Gens.....	83
3.5.6.1 Restriktionsverdau genomischer SM1- DNA	83
3.5.6.2 Detektion des Hami- Gens durch Southern Blot.....	83
3.5.6.3 'Primer- Walking' mittels RAGE und Erfassung der Gensequenz.....	84
3.5.6.4 Theoretische Eigenschaften des Hami- Gens.....	84
3.5.7 Klonierung des Hami- Gens und Expression.....	85
3.5.8 Detektion der mRNA des Hami- Gens in der natürlichen SM1 Population.....	85
4. Mikroskopische und phylogenetische Untersuchungen zur Biologie des SM1 Euryarchaeons in einem weiteren Biotop: Islinger Mühlbach.....	86
4.1 Probenahmeort: Islinger Mühlbach.....	86
4.2 Allgemeine Untersuchungen zu den Perlenkettengemeinschaften im Islinger Mühlbach.....	87
4.2.1 Bakterielle Phylogenie.....	88
4.2.2 FISH- Analysen und Untersuchung der bakteriellen Partner.....	89
4.3 <i>In situ</i> - Kultivierung der Perlenkettengemeinschaften an Polyethylenetzen und Entdeckung einer anderen Lebensform des SM1 Euryarchaeons	91
4.4 Bakteriell- phylogenetische und mikroskopische Untersuchungen des euryarchaeellen SM1 Biofilms.....	92
4.4.1 Bakterielle Phylogenie.....	92
4.4.2 Strukturelle Untersuchungen des SM1 Biofilms mittels TEM.....	93
4.4.3 Strukturelle Untersuchungen mittels CLSM.....	94
4.4.4 Immunologische Untersuchungen.....	96
4.4.5 Detektion des Hami- Gens in SM1- Populationen des Islinger Mühlbachs.....	97
5. Tabellarischer Vergleich des SM1 Euryarchaeons und seiner Lebensgemeinschaften im Sippenauer Moor und Islinger Mühlbach.....	98
5.1 Natürliche, mikrobielle Perlenkettengemeinschaften	98
5.2 Polyethylenetzpopulationen	99
5.3 Natürlicher, euryarchaeeller SM1 Biofilm.....	100
IV. Diskussion.....	101
V. Zusammenfassung.....	115
VI. Abkürzungsverzeichnis.....	116
VII. Literaturverzeichnis.....	118
VIII. Anhang.....	131

I. Einleitung

Schon seit über 3,5 Milliarden Jahren besiedeln Mikroorganismen die ökologischen Nischen der Erde. Seitdem hat sich eine immense, mikroskopisch kleine, biologische Diversität entwickelt, die aber dem menschlichen Auge bis dato nahezu verborgen blieb. Die Bedeutung der Prokaryonten jenseits der Krankheits- und Fäulniserreger wird nach wie vor unterschätzt und erfährt durch die breite Bevölkerung nur geringe Beachtung. In der modernen Wissenschaft hingegen erlaubte der kombinierte Einsatz molekularbiologischer und mikroskopischer Techniken eine Visualisierung und Erfassung, und damit ein langsames Begreifen der enormen Diversität und Ubiquität der mikrobiellen Domänen (Bacteria und Archaea). Sie sind ein grundlegender Bestandteil unserer Biosphäre und die Motoren der biogeochemischen Zyklen (Torsvik et al., 2002).

Insgesamt existieren auf der Erde 10^9 mal mehr Prokaryonten als Sterne im Universum; man geht von einer Gesamtzellzahl von mehr als 10^{30} Mikroorganismen aus (Curtis und Sloan, 2004). Selbst der menschliche Körper trägt 10- 100 mal mehr (endosymbiontische) Prokaryonten (10^{14} - 10^{15}) als eigene Zellen (10^{13}) mit sich (Schleifer, 2004). Doch sind die Prokaryonten den Eukaryonten nicht nur zahlenmäßig überlegen - sie sind darüber hinaus sogar die Hauptbiomasseproduzenten auf der Erde (Whitman et al., 1998; Pedersen, 2000): Die allein von Mikroorganismen in terrestrischen und marinen Sedimenten gebundene Kohlenstoffmenge entspricht der der gesamten Pflanzenpopulation der Erde (350- 550 Pg; Pg= 10^{15} g).

<i>Biotope</i>	<i>Anzahl Prokaryonten</i>
Meer- und Süßwasser	$1,2 \times 10^{29}$
Boden	$2,6 \times 10^{29}$
Marine Sedimente	$3,55 \times 10^{30}$
Terrestrische Sedimente	$0,25 - 2,50 \times 10^{30}$
Summe	$4,15- 6,40 \times 10^{30}$

Tabelle 1: Anzahl der Prokaryonten in den entsprechenden Biotopen (Whitman et al., 1998)

Wie neueste Untersuchungen zeigen, sitzt die Mehrzahl der Prokaryonten in der Kruste der Erde (Tab. 1; Whitman et al., 1998). In Böden und Sedimenten ist gleichzeitig auch die größte mikrobielle Artenvielfalt anzutreffen. In einem Milliliter Meerwasser (ca. 10^6 Mikroorganismen) findet man ca. 160 verschiedene Arten von Mikroben, in einem Gramm Erde (ca. 10^9

„Prokaryotes: The unseen majority”

(Whitman et al., 1998)

Mikroorganismen) dagegen bereits ca. 7000 Arten (Curtis und Sloan, 2004). Man vermutet in den Ozeanen der Erde insgesamt mehr als zwei Millionen und in einer Tonne Erde bis zu drei Millionen prokaryontische Arten (Curtis und Sloan, 2004). Im Vergleich dazu sei erwähnt, dass bisher insgesamt etwa 1,5 Millionen Tierarten und 400.000 Pflanzenspezies entdeckt und beschrieben wurden (Baron et al., 1992)

Die Zahl der charakterisierten prokaryontischen Arten liegt nur bei ca. 6000 (Fox, 2003), womit deutlich wird, dass sich die überwältigende Mehrheit der mikrobiellen Diversität natürlicher Habitate immer noch der Kultivierung im Labor und damit dem genauen Studium entzieht. Momentan ist schätzungsweise erst etwa 0,1% - 1% des mikrobiellen Lebens in Kultursammlungen hinterlegt (Amann et al., 1995; Colwell, 1997), weshalb immer noch 20 der 44 beschriebenen prokaryontischen Phyla ohne kultivierten Vertreter sind (Fox, 2003).

Mit ihrer Fähigkeit zur Energiegewinnung aus anorganischen Substanzen, schufen die mikrobiellen Erstbewohner der Erde die Grundlage für die heutige, an Sauerstoff und organischen Verbindungen reiche Biosphäre (Pace, 1997). Die große biochemische und physiologische Flexibilität der Mikroorganismen erlaubte eine Besiedlung verschiedenster, sogar 'extremer' Biotope (Torsvik et al., 2002; Schleifer, 2004). Während Eukaryonten eher moderate Habitate bevorzugen, besitzen viele Mikroorganismen die Fähigkeit auch bei hohen Temperaturen, hoher Salinität, niedrigen und hohen pH- Werten, zu leben (Rothschild und Mancinelli, 2001). An solche Bedingungen schien besonders eine Linie des mikrobiellen Lebens, die Domäne der Archaea, ausgezeichnet angepasst und in ihrer Verbreitung auf diese extremen ökologischen Nischen beschränkt zu sein. Noch 15 Jahre nach der Entdeckung und Beschreibung der drei Domänen (Bacteria, Archaea und Eukarya) durch Woese und Fox (1977) wurde die ökologische Signifikanz der Archaea (mit den Reichen: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Nanoarchaeota und Korarchaeota) als vergleichsweise gering eingeschätzt, da sie bis dato nur in extremeren und damit selteneren Biotopen (z.B. terrestrische Solfatarenfelder und marine Hydrothermalgebiete) nachgewiesen bzw. daraus isoliert worden waren (Woese und Fox, 1977; Olsen, 1994; Barns et al., 1994; DeLong und Pace, 2001; Huber et al., 2002).

„A phylogenetic analysis based upon ribosomal RNA sequence characterization reveals that living systems represent one of three aboriginal lines of descent: (i) the eubacteria, comprising all typical bacteria; (ii) the archaebacteria, containing methanogenic bacteria; and (iii) the urkaryotes, now represented in the cytoplasmic component of eukaryotic cells.“

(Woese und Fox, 1977)

Die Vorstellung bezüglich der 'extremophilen' und ökologisch eingeschränkten Archaea änderte sich abrupt, als es durch 16S rRNA- Genanalysen und quantitative Hybridisierungen gelang, Archaea in großer Zahl (bis zu 30% der Gesamtzellzahlen) in Meerwasser nachzuweisen (Fuhrman et al., 1992; DeLong, 1992). Diesen Entdeckungen schlossen sich bald schon weitere Berichte über den Nachweis von Archaea in Niedertemperatur- und gemäßigten Biotopen an (DeLong et al., 1994; Ueda et al., 1995; Hershberger et al., 1996; Kudo et al., 1997). Nicht nur auf genomischer bzw. ribosomaler Ebene, sondern auch durch die Analyse von Lipiden in Plankton und Sedimenten konnten Archaea in Kaltwassergebieten nachgewiesen werden (Schouten et al., 2000). Bis heute wurden viele verschiedene gemäßigte Biotope untersucht, und das Vorkommen von Eury- und Crenarchaeota z.B. in Ozeanen (z.B. Massana et al., 1997; Vetriani et al., 1998), Seen (z.B. MacGregor et al., 1997; Jurgens et al., 2000), Böden (z.B. Bintrim et al., 1997), Reisfeldern (z.B. Großkopf et al., 1998) und in Gemeinschaften mit Eukaryonten (McInerney et al., 1995; Preston et al., 1996) gezeigt.

Es wird immer deutlicher, dass die ökologische Signifikanz und der ubiquitäre Charakter der Archaea nicht mehr von der Hand zu weisen sind. Es ist vielmehr sogar wahrscheinlich, dass die Domäne der Archaea eine der am häufigsten vorkommenden Gruppen von Organismen auf der Erde ist (DeLong et al., 1994; Ovreas et al., 1997; Bèjà et al., 2000; DeLong, 2003). In tieferen ozeanischen Schichten (unter der euphotischen Zone) können z.B. Crenarchaeota bis zu 90% der Gesamtzellzahlen ausmachen. Insgesamt vermutet man, dass den in globalen Ozeanen vorkommenden ca. $3,1 \times 10^{28}$ Bacteria eine Zahl von ca. $1,3 \times 10^{28}$ Archaea gegenübersteht (Karner et al., 2003).

Die überwältigende Mehrzahl der archaeellen Isolate gehört immer noch dem 'extremen' Teil der Archaea an. Lediglich in drei Einzelfällen konnten Reinkulturen von psychrophilen bzw. psychrotoleranten methanogenen Vertretern erhalten werden (Franzmann et al., 1992; Franzmann et al., 1997; Simankova et al., 2001).

Aus diesem Grund bleibt die Charakterisierung dieser kryptischen und nahezu unstudierten, aber ubiquitären Mikroorganismen ein wichtiges Ziel, um tiefer greifende Einsichten in die mikrobielle Evolution, Physiologie und Ökologie zu gewinnen. Eine Kombination von bio- und geochemischen *in situ*- Analysen (Boschker et al., 1998; Hinrichs et al., 1999; Radajewski et al., 2000) sowie innovativen und alternativen Kultivierungsstrategien (Huber et al., 1995; Huber, 1999) könnte hier eine gute Möglichkeit bieten, Rückschlüsse auf die Lebensweise dieser ungewöhnlichen Archaea zu

„Archaea here, there, and everywhere“

(Forterre, 1997)

ziehen. In Anlehnung an die Untersuchungen von Sergei Winogradsky (1887, 1888), welcher die Bedeutung und Funktion von Mikroben in ihrem natürlichen Biotop allein durch genaue Beobachtung erforschte, wurden in den letzten Jahren mit modernen Methoden einige große Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt.

So wurden in kalten, marinen Sedimenten und Meerwasserproben große Mengen an Tetraether-Lipiden (Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraether, GDGT) nachgewiesen, welche Membranbestandteile planktonischer Archaea darstellen (Schouten et al., 2000). Vergleicht man die gefundenen Lipide mit denen von hyperthermophilen Archaea (z.B. *Sulfolobus solfataricus*), so findet man deutliche strukturelle Unterschiede. Eines der dabei erhaltenen, neuen Etherlipide, das sogenannte Crenarchaeol erlaubt wahrscheinlich eine erhöhte Fluidität der Membranen bei niedrigeren Temperaturen (Sinninghe Damsté et al., 2002). Es wird vermutet, dass sich diese Lipidstrukturen im Zug der evolutionären Anpassung der Organismen von (hyper-)thermalen Gebieten auf gemäßigte Niedertemperaturbiotope gebildet haben. Interessanterweise kann der chemische Aufbau mancher GDGTs bisher nur durch die Koexistenz typischer archaeeller und bakterieller Biosynthesewege in einem einzelnen Organismus erklärt werden (Schouten et al., 2000), was wiederum Fragen bezüglich der ökologischen Bedeutsamkeit und der phylogenetischen Position dieser Organismen aufwirft.

Die Untersuchung des $\Delta^{14}\text{C}$ - Werts spezifischer Lipidbiomarker (Etherlipide) im Santa Barbara und Santa Monica Bassin zeigte, dass Tiefsee- Archaea vermutlich kein organisches Material, sondern CO_2 als Haupt- C- Quelle benutzen. Das könnte bedeuten, dass diese marinen Archaea eine bisher unbekannte Quelle der Primärproduktion in der Tiefsee darstellen; allerdings bleibt die Frage nach ihrer Energiequelle weiterhin offen (Pearson et al., 2001).

Im Gegensatz zum erfolgreichen Nachweis der Archaea in Niedertemperaturbiotopen über 16S rRNA- Gen- und Lipidanalysen ist die direkte Visualisierung und damit Quantifizierung und Identifizierung von Archaea nur in wenigen Fällen gelungen. Man behilft sich hier der Methode der Fluoreszenz- *in situ*- Hybridisierung (FISH), bei der gewünschte Organismen mittels spezifischer Gensonden angefärbt und sichtbar gemacht werden können.

Auf diese Weise konnte die einzigartige Symbiose zwischen einem marinen Schwamm (*Axinella mexicana*) und einem Crenarchaeon beschrieben werden (Preston et al., 1996). Dieses Zusammenleben konnte in freilebenden Schwämmen, aber auch bei im Aquarium gehaltenen

„Archaea, archaea everywhere!“

(Olsen, 1994)

Organismen nachgewiesen werden. Sich aktiv teilende Zellen ließen darauf schließen, dass die Wachstumstemperatur des Archaeons der des Wirts entsprach (8-18°C). Obwohl der Symbiont nicht in Kultur gebracht werden konnte, wurde der Name "*Cenarchaeum symbiosum*" vorgeschlagen. Genetische Analysen machten allerdings deutlich, dass dieses Crenarchaeon in Form zweier nah verwandter Varianten im Wirt vorliegt (Schleper et al., 1998).

Einblicke in die Physiologie und Lebensweise unkultivierter, nicht extremer Euryarchaeota wurden durch die intensive Untersuchung der anaeroben Methanoxidation gewonnen. Diese wurde in vielen anoxigenen, marinen Sedimenten nachgewiesen und ist biogeochemisch von großer Bedeutung, da sie das Treibhausgas Methan dem Kreislauf entzieht. Da es sich aber um eine thermodynamisch ungünstige Reaktion handelt, gab diese Methanoxidation einige Rätsel auf (Valentine, 2002).

Durch *in situ*- und Labor- Analysen konnte dieser ungewöhnliche Stoffwechselweg einem Konsortium aus methanogenen Archaeen und sulfatreduzierenden Bakterien zugeordnet werden (Hoehler et al., 1994). Dabei wurde angenommen, dass die Archaeen fähig sind Methan zu oxidieren und der hierbei entstehende Wasserstoff durch die Sulfatreduzierer effizient entzogen und verstoffwechselt wird (Hoehler et al., 1994). In späteren Studien wurden in Sedimenten (Eel River Basin, vor Kalifornien, USA), in welchen anaerobe Methanoxidation nachgewiesen wurde, archaeelle Lipid- Biomarker entdeckt, die so wenig ¹³C enthielten, dass Methan die Kohlenstoff-Quelle darstellen musste (Hinrichs et al., 1999).

Parallel durchgeführte phylogenetische Analysen von Proben aus Gebieten mit starker Methanoxidationsaktivität zeigten die Vorherrschaft von archaeellen Vertretern der *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales* (Cluster ANME-1: Hinrichs et al., 1999; Cluster ANME-2: Boetius et al. 2000, Orphan et al. 2002).

Durch FISH mit spezifischen Sonden konnte eine enge mikrobielle Partnerschaft von bakteriellen Sulfatreduzierern (*Desulfosarcina/ Desulfococcus*) und Archaeen (*Methanosarcinales*, ANME-2) visualisiert werden (Boetius et al., 2000). In diesen Konsortien ist eine kleine Kolonie von Archaeen (ca. 100 Zellen) eng von den sulfatreduzierenden Bakterien umschlossen (Boetius et al., 2000). Neuere Studien zeigen, dass die Diversität dieser Konsortien wohl größer ist als zunächst angenommen (Orphan et al., 2002). So ist auch die archaeelle Gruppe ANME- 1 an der anaeroben Methanoxidation beteiligt, ohne jedoch in ein festes Konsortium eingebunden zu sein. Ebenso ist vermutlich bei den Bakterien eine höhere Variabilität zu erwarten (Valentine, 2002). Durch

„Archaeaes now!“

(Reeve, 1999)

kultivierungs- unabhängige Studien im Labor wurde eine für die Methanoxidation optimale Durchschnittstemperatur bestimmt, die zwischen 4 und 16°C lag (Nauhaus et al. 2002, Valentine, 2002).

Ein weiterer, großer Schritt im Studium der mikrobiellen Evolution und Ökologie wurde durch die im größeren Maßstab durchgeführte DNA- Sequenzierung und Genomanalyse ermöglicht. Bis dato dienten ausschließlich Reinkulturen als Hauptquelle für Gesamtgenomdaten. Mit der Metagenomik richtete sich das Augenmerk auf unkultivierte Mikroorganismen. Die Klonierung von konservierten Genen und Genomfragmenten direkt aus der Natur erlaubte deren Verwendung für wissenschaftliche und sogar industrielle Untersuchungen und Anwendungen (Béjà et al., 2000; Rondon et al., 2000; Gupta et al., 2002).

Inzwischen ist die Technik der 'Shotgun'- Sequenzierung als Highthroughput- Methode anwendbar. Sie ermöglichte erst kürzlich die Sequenzierung von Genomfragmenten aus 1500 Liter Meerwasser (Venter et al., 2004). Insgesamt wurden 1,045 Milliarden Basenpaare sequenziert, 1800 Mikrobenarten identifiziert (148 davon bisher unbekannt) und über 1,2 Millionen unbekannter Gene entdeckt (Venter et al., 2004).

Die lückenlose Sequenzierung des Gesamtgenoms unkultivierter Mikroorganismen gestaltet sich aber schwierig, da die überwältigende Mehrheit von Bakterien und Archaeen in der Natur in Symbiosen, Konsortien und Gemeinschaften eingebunden ist (Stickler, 1999; O'Toole et al., 2000). Meist sind hunderte oder sogar tausende Arten am Aufbau solcher Strukturen beteiligt (Torsvik et al., 2002). Gesamtgenomdaten von Unkultivierten wären jedoch aufschlussreich, um Einblicke in deren natürliche Organisation und prinzipielle (physiologische) Fähigkeiten zu gewinnen.

Tyson et al. (2004) wählten für ihre Gesamtgenomanalysen eine relativ einfach aufgebaute natürliche mikrobielle Gemeinschaft aus, welche im Wassersystem einer verlassenen Mine (Sierra Nevada, Kalifornien) entdeckt wurde. Die dortigen Mikroorganismen produzieren aus Pyrit große Mengen an Schwefelsäure, was einen Umgebungs- pH- Wert von 0,5 verursacht. Die Temperatur des Biotops liegt bei 40°C. Die sauren Bedingungen verbunden mit der eher restriktiven Energiequelle sind der Grund für den einfachen Aufbau und die Artenarmut der untersuchten Gemeinschaft. Dies ermöglichte die nahezu komplette Sequenzierung eines bakteriellen (*Leptospirillum* sp.) und eines archaeellen (*Ferroplasma* sp.) Genoms, sowie partieller Genome von drei weiteren Mikroorganismen. Es konnte gezeigt werden, dass das Genom der identifizierten *Ferroplasma*- Spezies mosaikartig aus Genen nah verwandter Spezies zusammengesetzt ist. Für jeden Organismus konnten zudem Stoffwechselwege für Kohlenstoff- und Stickstofffixierung sowie Energiegewinnung nachgewiesen werden. Diese Genomanalysen ermöglichten erste Einblicke in

die Überlebensstrategien in einem extremen Biotop (Tyson et al., 2004; DeLong, 2004).

Die Untersuchung unkultivierter Archaea nicht extremer Gebiete gestaltet sich jedoch ungleich schwieriger. In den meisten Fällen erweist sich neben dem komplizierten Nachweis die durch die Diversität bedingte geringe Konzentration des zu untersuchenden Biomaterials als limitierend für detailliertere und tiefgreifendere Untersuchungen.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Huber (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg) wählte für das Studium neuartiger, kälteliebender Archaea das Naturschutz- und FFH-Gebiet 'Sippenauer Moor' aus. Dieses etwa 20 km südlich von Regensburg gelegene Moor repräsentiert das einzige, von schwefelhaltigem Wasser geprägte Quell- und Durchströmungsmoor Bayerns. Seine Feuchtigkeit verdankt das Moor den zahlreichen, ca. 10°C kalten Karstwasserquellen, welche entlang einer Störungslinie innerhalb des Malmkalks (südlicher Steilhang) entspringen. Östliche Teile des Moors sind durch Lößeinwehungen geprägt, während andere Bereiche (Altfläche) einen eher kiesartigen, wasserdurchlässigen Untergrund aufweisen. Auf allen Flächen hat sich jedoch seit der letzten Eiszeit (vor ca. 13.000 Jahren) bis zu drei Meter dicker Niedermoortorf gebildet (Bresinsky, 1991; Warneke, 1992; Bresinsky, 1999; Bresinsky, 2001; www.regensburgische-botanische-gesellschaft.de).

Das Moor liegt im Landkreis Kelheim (Regierungsbezirk Niederbayern) am Feckinger Bach zwischen Sippenau und Mitterfecking oberhalb der Einmündung des Esperbaches und erstreckt sich über eine Größe von insgesamt 8,271 ha (Bresinsky, 1991; Warneke, 1993). Seit 1911 befinden sich Teile des Moors, seit 1990 das ganze heutige Naturschutzgebiet im Besitz der Regensburgischen Botanischen Gesellschaft. Das Interesse der Gesellschaft für dieses Gebiet kommt nicht von ungefähr: Es beherbergt viele, inzwischen gefährdete Pflanzengesellschaften und ist gerade deshalb besonders schutz- und erhaltungswürdig (Bresinsky, 1991; Bresinsky, 1999; Bresinsky, 2001; Warneke, 1993).

Doch wie viele weitere vergleichbare Naturschätze ist auch das Sippenauer Moor bedroht. Ein Abpumpen von Karstwasser, verursacht durch das Kalkwerk Saal, bedingt eine Depression des Karstwasserstands, verringert die Feuchtigkeit der Moorflächen und wirkt sich dadurch negativ auf deren Flora aus (Bresinsky, 1999; Bresinsky, 2001). Durch Stützungsmaßnahmen (z.B. Berieselung der Altfläche mit gefördertem Karstwasser) soll dieser Entwicklung entgegengewirkt werden; erste positive Erfolge sind bereits zu verzeichnen (Bresinsky, 2001; Bresinsky, pers. Mitt.).

Die sulfidhaltige Hauptquelle des Moors mündet in einen Quelltopf (7x 4 m), der wiederum einen kleinen Quellbach (Mineralbach) speist. Dieses Wassersystem ist ein Ort größter Bioaktivität, was sich im Auftreten unterschiedlichster mikrobieller Matten äußert. Die Dominanz weißer Matten ist

v.a. in gut durchlüfteten Bereichen zu erkennen (z.B. an kleinen Wasserfällen oder an der sprudelnden Hauptquelle), während an anaeroben, schlecht durchlüfteten Stellen dunkle, braune oder schwarze Mikrobenbeläge vorherrschen.

Die genaue Herkunft des Sulfids des Quellwassers ist bisher ungeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass es biogen, d.h. durch eine Umsetzung von Mikroorganismen, entsteht. Im Allgemeinen stammen Schwefelwässer aus Sedimenten, welche gleichzeitig Sulfat und Organik enthalten, so dass sulfatreduzierende Mikroorganismen Schwefelwasserstoff erzeugen könnten (Wallhäuser und Puchelt, 1966; Puchelt, 1967).

Das Karstwasser des Sippenauer Moors nimmt einen langen Weg aus Süden und durchströmt dabei vermutlich Braunkohle führende, pyritreiche Schichten des Tertiärs im Alpenvorland und/oder Pyritknollen tragende Schichten des anstehenden Malmkalks (www.regensburgische-botanische-gesellschaft.de). Durch die Oxidation von Pyrit in oberflächennahen Schichten könnte Sulfat und daraus in tieferen Schichten durch Reduktion wiederum Sulfid entstehen; ähnliche Mechanismen werden für die Entstehung des Schwefelwassers von Bad Gögging angenommen (Nielsen, 1981).

In der Hauptquelle des Sippenauer Moors wurde eine interessante mikrobielle Gemeinschaft entdeckt. Sie wächst im 10°C kalten, sulfidischen Wasser und erinnert in ihrer makroskopischen Wuchsform an eine Perlenkette (Abb. 1): Bis zu 15 kleine weiße perlenartige Verbände mit einem Durchmesser von 0,5- 3 mm sind durch einen dünnen mikrobiell aufgebauten Faden miteinander verbunden. Diese Perlenketten sind an einem Ende an festen Materialien befestigt (Steine, Blätter...) und flottieren frei im strömenden, sulfidhaltigen Quellwasser.

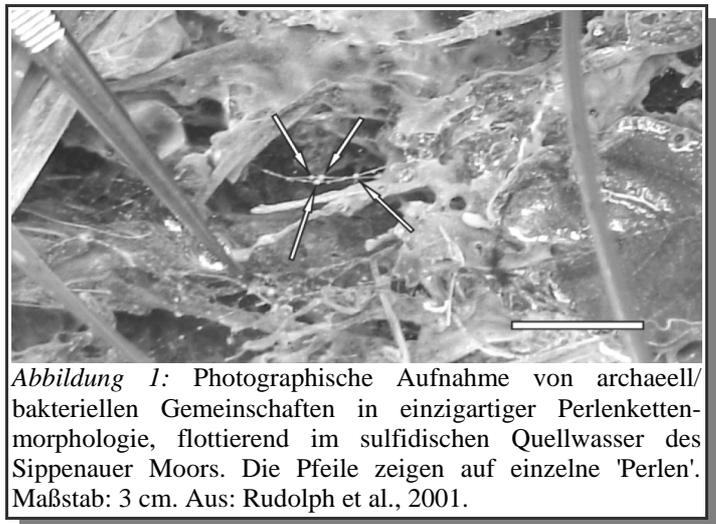


Abbildung 1: Photographische Aufnahme von archaell/bakteriellen Gemeinschaften in einzigartiger Perlenkettenmorphologie, flottierend im sulfidischen Quellwasser des Sippenauer Moors. Die Pfeile zeigen auf einzelne 'Perlen'. Maßstab: 3 cm. Aus: Rudolph et al., 2001.

**„Die Lage des Ortes ist romantisch schön,
und die Gegend ungemein gesund.“**

(Beschreibung des Sippenauer Moors durch Graf, 1805)

Vorausgegangene Untersuchungen mittels FISH haben gezeigt, dass die äußere Hülle der Perlen von filamentösen Bakterien, das Innere von bis zu etwa 10^7 kokkoiden Archaeen dominiert wird, welche in Form einer Mikrokolonie wachsen (Rudolph et al, 2001, Rudolph 2003). Auffällig hierbei ist die regelmäßige dreidimensionale Anordnung der Archaeen zueinander, was auf die Einbettung der Einzelzellen in eine Matrix schließen lässt, deren chemische Zusammensetzung bisher noch ungeklärt ist (Abb. 2).

Das Äußere der mikrobiellen Perlenkettengemeinschaften wird von filamentösen Mikroorganismen dominiert, die in einer Rosettenform wachsen und lichtbrechende Granula einlagern. Es handelt sich dabei vermutlich um einen Vertreter der Gattung *Thiothrix*, welcher bereits in bakteriell- phylogenetischen Analysen nachgewiesen wurde (Rudolph, 1998; Moissl, 2000).

Phylogenetische Untersuchungen von periodisch gesammelten Perlen haben gezeigt, dass die kontinuierlich nachweisbaren Archaeen einen neuen euryarchaeellen Phylotyp repräsentieren, der innerhalb der Euryarchaeota im 16S rRNA- Baum tief abzweigt. Dieses sogenannte SM1 Euryarchaeon zeigt nur geringe Verwandtschaftsgrade zu bereits

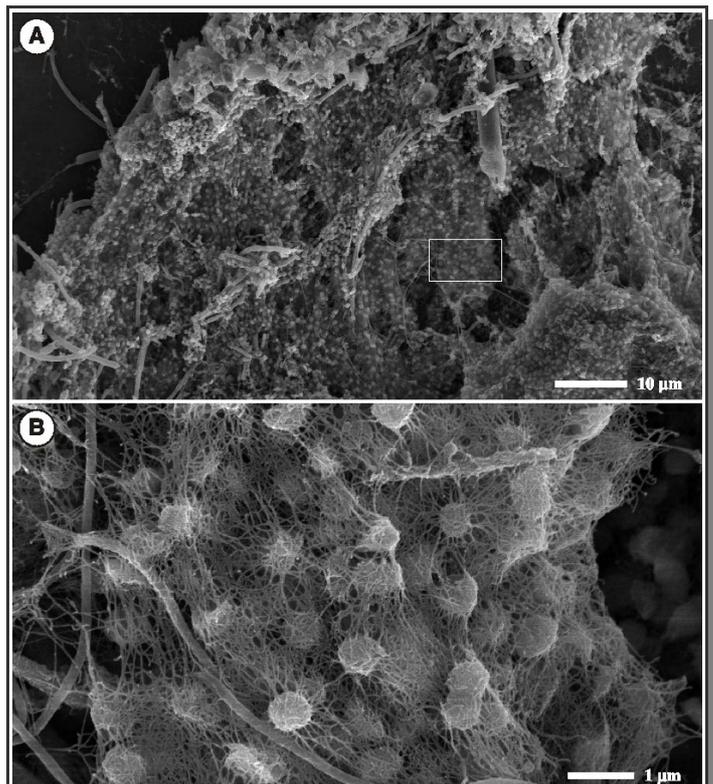


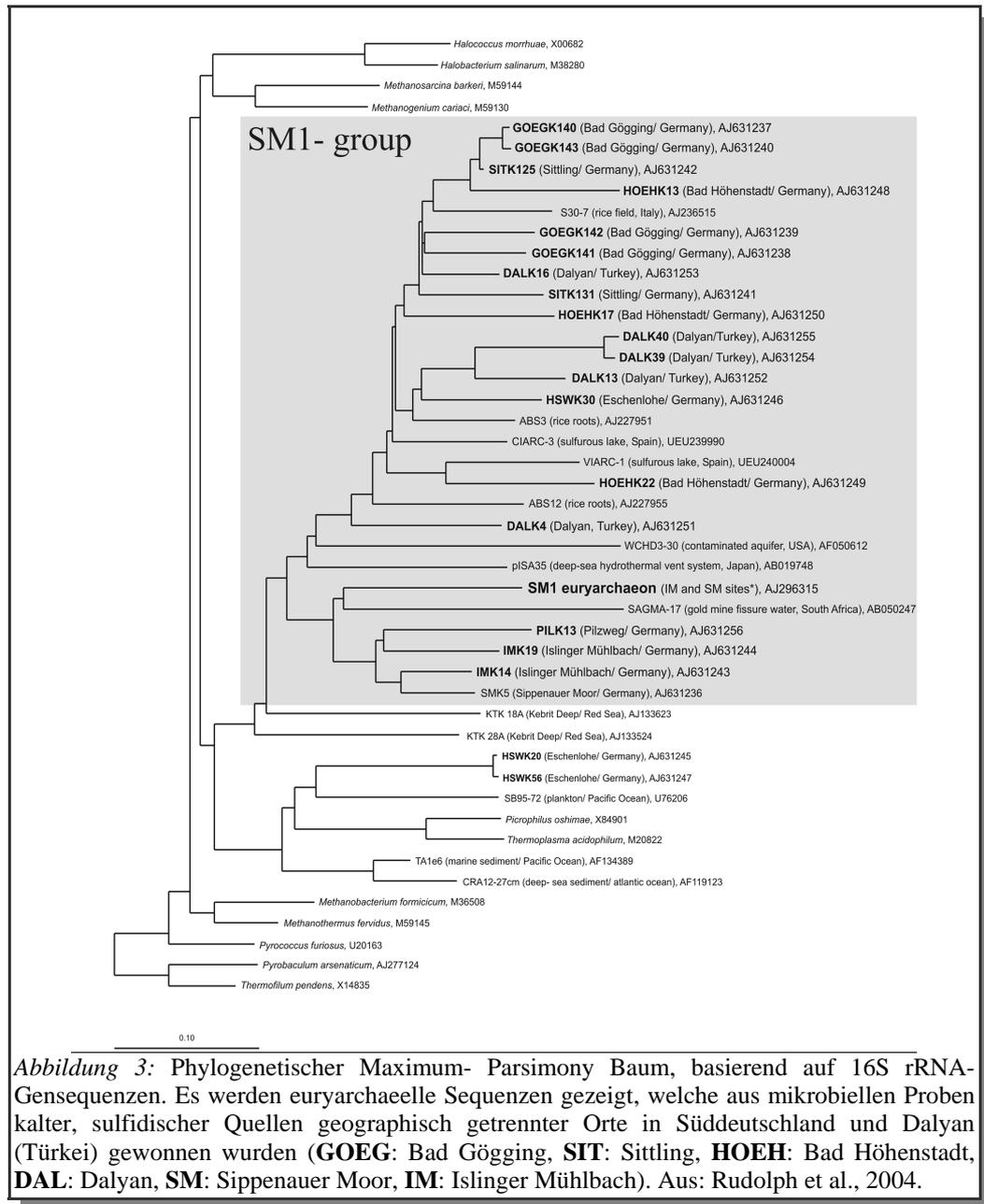
Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer einzelnen Perle aus dem Sippenauer Moor.

A: Übersicht über den inneren Teil einer Perle. Viele kleine Kokken sind erkennbar.

B: Detailausschnitt aus A. Die Kokken sind in eine fibrilläre Matrix eingebettet. Aus: Rudolph et al., 2001.

kultivierten und unkultivierten Vertretern (Rudolph et al, 2001; Rudolph, 2003).

Die SM1- Sequenz clustert zusammen mit anderen euryarchaeellen Sequenzen (SM1- Gruppe), welche aus umfassenden phylogenetischen Analysen bayerischer Schwefelquellen gewonnen wurden (Rudolph et al., 2004). Interessanterweise fallen in diese phylogenetische Gruppe weitere, bereits hinterlegte Sequenzen, die aus weltweit verbreiteten Biotopen stammen. Diese Tatsache lässt auf eine große, ökologische Bedeutung der SM1- Gruppe in terrestrischen und marinen Gebieten schließen (Abb. 3; Rudolph et al., 2004).



In dieser Dissertation sollte die außergewöhnliche mikrobielle Perlenkettengemeinschaft hinsichtlich mehrerer Gesichtspunkte detailliert untersucht werden. Zunächst sollte die Analyse des bakteriellen Partners des SM1 Euryarchaeons in den Perlenketten des Sippenauer Moors, später auch in einem anderen Biotop (Islinger Mühlbach), im Vordergrund stehen. Da die Kultivierung des SM1 Euryarchaeons im Labor bisher ohne Erfolg geblieben war, sollte zudem ein System geschaffen werden, welches die regelmäßige und zuverlässige Probenahme von mikrobiellen Perlenkettengemeinschaften und damit die molekularbiologische und strukturelle Charakterisierung dieses neuartigen, kälteliebenden Archaeons erlaubt.

II. Material und Methoden

1. Bezugsquellen

1.1 Chemikalien und Biochemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Acrylamid (2x kristallisiert)	Serva, Heidelberg
Agar bacteriological (Agar No. 1)	Oxoid LTD., Basingstoke (UK)
Agarose 1000, High Resolution	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra- Qualität	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose, Low Melting Point	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ampicillin, Na- Salz	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva, Heidelberg
Aquaphenol™ und pH- Maker™	Appligene, Heidelberg
Avidin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bind- Silan	LKB- Produkter AB, Brommer (S)
Bisacrylamid (N,N'- Methylenebisacrylamid)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA, Rinderserumalbumin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Casamino acids	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Chloramphenicol	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Citifluor AF-1	UKC, Chem. Lab., Canterbury (GB)
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DAPI (4,6 Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
EDTA, Na ₂ - Salz (Ethyldiamintetraessigsäure)	Serva, Heidelberg
Epon 812 Resin- Mix	Fluka, Buchs (CH)
EtBr (Ethidiumbromid)	Serva, Heidelberg
Ethanol,	J. T. Baker, Deventer (NL)
Fibronektin	BD GmbH, Heidelberg
Ficoll	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glykogen	MBI Fermentas, St. Leon- Roth
HClO ₄ , Natriumhypochlorid- Lösung (Chlorbleichlauge)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Hepes	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
IPTG (Isopropyl- β-D- Thiogalactosid)	ICN, Biochemicals GmbH, Eschwege
Kanamycin, Monosulfat	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Lambda DNA	MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Roth
Laminin	BD GmbH, Heidelberg
MES	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
MOPS	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Osmiumtetroxid (kristallin), OsO ₄	Plano, Wetzlar
Ovalbumin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Percoll Colloidal PVP	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
PET28a- Vektor	Novagen, Madison (USA)
Polyglutamat	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Polylysin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ponceau S	Serva, Heidelberg
RbCl	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Serdolit MB-1 (20- 50 mesh)	Serva, Heidelberg
Saccharose (Sucrose)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Triethylamin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	USB, Cleveland (USA)
Trockenmilchpulver	Domspitz, Regensburg
Trypton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Trypton- Pepton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Tween 20	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Uranylacetat	Serva, Heidelberg
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid)	Serva, Heidelberg

Tabelle 2: Bezugsquellen der Chemikalien und Biochemikalien

Alle sonstigen verwendeten Chemikalien wurden von VWR, Darmstadt bezogen. Der Reinheitsgrad der Substanzen war, sofern nicht anders angegeben, p.a..

1.2 Molekularmassenstandards

<i>Standard</i>	<i>Bezugsquelle</i>
25 bp- DNA Leiter	Life Technologies, Gaithersburg (USA)
DIG- Standard, Lambda DNA Standard/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lambda DNA Standard/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Roth
Protein Leiter, 10- 200 kDa	MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Roth
Protein Leiter; 10- 180 kDa (prestained)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Roth

Tabelle 3: Bezugsquellen der Molekularmassenstandards

1.3 Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Label</i>	<i>produziert in</i>	<i>Bezugsquelle</i>
anti- DIG (Fab fragments)	Alkalische Phosphatase (AP)	Schaf	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
anti- His- Tag	-	Maus	Novagen, EMD Biosciences Inc., Madison (USA)
anti- Huhn IgY (H+L)	CY3	Kaninchen	Dianova, Hamburg
anti- Huhn IgY (H+L)	12 nm Gold	Esel	Dianova, Hamburg
anti- Huhn IgY (H+L)	Merrettich- Peroxidase	Kaninchen	Dianova, Hamburg
anti- Huhn IgY (H+L)	FITC	Kaninchen	Dianova, Hamburg
anti- Kaninchen IgG (H+L)	Alkalische Phosphatase (AP)	Ziege	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
anti- Maus IgG	Alkalische Phosphatase (AP)	Ziege	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tabelle 4: Bezugsquellen der markierten Antikörper

1.4 Reaktionskits

<i>Kit</i>	<i>Bezugsquelle</i>
BCA Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford (USA)
Original TA Cloning® Kit	Invitrogen BV, Groningen (NL)
Qiagen DNeasy Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen PCR Cloning Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Tabelle 5: Bezugsquellen der Reaktionskits

1.5 Enzyme

<i>Enzyme incl. Reaktionspuffer</i>	<i>Bezugsquelle</i>
AluI, HhaI, HinfI, RsaI	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth
AmpliTaq DNA- Polymerase (LD)	Perkin Elmer Biosystems- Roche, Branchburg (USA)
GL-Taq DNA Polymerase	GL Bio Tech, Bremen
Pronase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protease (Subtilisin A)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Proteinase K	VWR, Darmstadt
Transferase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth
Trypsin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tabelle 6: Bezugsquellen der Enzyme

Alle weiteren verwendeten Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs, Frankfurt bezogen.

1.6 PCR- Primer und Oligonukleotidsonden

Alle verwendeten Primer und Oligonukleotidsonden wurden von der Firma Qiagen GmbH, Hilden bzw. der Firma Metabion GmbH, Martinsried synthetisiert.

1.7 Gase

Alle Gase wurden von Firma Linde Technische Gase GmbH, Höllriegelskreuth bezogen.

1.8 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Cellulose- Filter, Nr. 595	Schleicher& Schuell, Dassel
Centricon YM-30 centrifugal filter devices	Millipore, Schwalbach
Deckgläser für Mikroskopie, 20x 20 mm 24x50mm	P. Marienfeld KG, Lauda- Königshofen Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dialyseschläuche (Visking, 16mm, MWCO 12-14000)	Serva, Heidelberg
DIG Easy Hyb (Hybridisierungspuffer)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Eppendorf- Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Filterpapier Whatman 3MM	Biometra GmbH, Göttingen
Glasperlen, 0,17- 0,18 mm	Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Kanülen	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Kontaminationsfreie Aerosolfilter- Pipettenspitzen	Gilson, Inc., Middleton (USA)
Kupfergrids G400/ G600	Plano, Wetzlar
Microcon 100- Filter	Amicon, Witten
NBT/BCIP stock solution	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Nylon- Membran Biotyne B	Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor (USA)
Objektträger, Epoxidharz beschichtet	P. Marienfeld KG, Lauda- Königshofen
Objektträger, Glas	P. Marienfeld KG, Lauda- Königshofen
Parafilm "M" TM Laboratory Film	American National Can TM , Chicago (USA)
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim
pH- Indikatorstäbchen	VWR, Darmstadt
Phase Lock Gel Light	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Abimed Analysetechnik GmbH, Langenfeld
Plastikpetrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PVDF- Membran Imobilon P	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße (PCR- Cups) 0,2 und 0,6 ml	BIOzym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf
Schraubdeckelreaktionsgefäß (Falcon Tubes TM), 50 und 15 ml	BD GmbH, Heidelberg
Spritzen, steril, 1 ml	Ersta, Maersk (DK)
Sterilfilter (0,1 µm und 0,22 µm Porenweite)	Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor (USA)
Zahnstocher	Fackelmann, Hersbruck

Tabelle 7: Bezugsquellen des Verbrauchsmaterials

1.9 Sonstiges

Sonstiges	Bezugsquelle
Aluminiumringe	Bellco Glass, New Jersey (USA)
Glasgeräte (wenn nicht anders angegeben)	Schott Glas, Mainz
Glaszentrifugenröhrchen	DuPont Instruments, Wilmington (DK)
Gummistopfen	Deutsch & Neumann GmbH, Berlin
Live/ Dead [®] BacLight TM	Molecular Probes Inc. Europe BV, Leiden (NL)
Polyamid- Fäden	Conacord, Lippstadt
Polyethylen- Netze und Fäden	Helac, Kassel
Rollrandgefäße, 5 ml	Macherey & Nagel, Düren
Stahlhaken	Mech. Werkstatt, Uni Regensburg
UZ- Zentrifugenbecher	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Tabelle 8: Sonstige Bezugsquellen

2. Sterilisation

Puffer, Medien, Stammlösungen und original Moorwasser wurden in einem Autoklaven (SANOclav, Wolf, Geislingen) für 20 min bei 121°C und 200 kPa Druck sterilisiert. Glasgeräte, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen usw. wurden unter gleichen Bedingungen 40 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mittels Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm) sterilisiert.

3. Probenahmen und Messungen an sulfidischen Quellen

3.1 Probenahmen

Die Entnahme mikrobieller Perlenketten (Perlendurchmesser: 0,5- 3,0 mm) oder verschiedenartiger Mikrobenmatten aus den sulfidhaltigen Quellen und deren Bachläufen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mittels einer sterilen Pinzette. Gallertartige Strukturen wurden mittels einer sterilen 1 ml Spritze abgesaugt. Die Proben wurden sofort in sterile Eppendorf- Reaktionsgefäße überführt, in die bereits 1 ml Quellwasser vorgelegt worden war. Proben für FISH wurden sofort mit Fixierungslösung versetzt (s. II.13.4; Endkonzentration Formaldehyd: 3%; w/v). Für die Entnahme von Proben für DNA-Isolierungen und phylogenetische Untersuchungen wurden Pinzetten und Probenahmegefäße zuvor mit Chlorbleichlaug (5% HClO₄; w/v) behandelt, um eventuelle Verunreinigungen durch Fremd- DNA zu entfernen. Entnommene Proben wurden kühl (4°C) transportiert und gelagert.

3.2 Messungen

Für die Temperaturmessung von Luft und Wasser wurde ein zu einem Stabthermometer umgebautes Digitalthermometer (GTH1150, Greisinger electronic GmbH, Regenstauf) verwendet. Der Sulfidgehalt des Quellwassers wurde mit einem kolorimetrischen Hydrogensulfidtest (VWR, Darmstadt) ermittelt. Die Bestimmung des pH- Werts erfolgte mit einer pH- Einstabmesskette des Multifunktionsmessgeräts MultiLine P4 (WTW, Weilheim). Die Leitfähigkeitsmessung wurde mit der TetraCon[®] 325 Sonde, die Sauerstoffmessung mit der CelOx 325 Sonde des Multifunktionsmessgeräts MultiLine P4 durchgeführt.

4. Züchtung und selektive Gewinnung des SM1 Euryarchaeons

Bei allen im Labor durchgeführten Schritten wurde auf ausreichende Kühlung der mikrobiellen Proben geachtet. Die Zellsuspensionen wurden entweder auf Eis oder im Kühlraum (10°C) gelagert.

4.1 *In situ*- Kultivierung mikrobieller Perlenkettengemeinschaften

Alle Netze und Fäden wurden, bevor sie in der Umwelt verwendet wurden, mit 70% Ethanol (v/v) behandelt. Netze und Fäden wurden mittels Stahlhaken in der Strömung befestigt. Fäden wurden nur an einem Ende befestigt, so dass sie frei flotierend im Wasserlauf hingen.

Für den Erhalt größerer Mengen an Biomasse wurden Polyethylen- Netze mit einer Gesamtgröße von 10 m² verwendet. Die Netze wurden mehrere Male gefaltet und im sulfidhaltigen Quellwasser quer zum Bachlauf mit Stahlhaken befestigt.

4.2 Ernte und selektive Gewinnung des SM1 Euryarchaeons ('Aufreinigung')

Nach sechs Tagen Inkubation wurde das nun mit mikrobiellen Perlen und Verdickungen überzogene Netz herausgenommen und durch Schütteln mit 1 l sterilem Moorwasser in einer 2 l- Glasflasche abgewaschen und anschließend für 16 h bei 10°C stehend gelagert. Der resultierende Überstand wurde zentrifugiert (Sorvall RC-5C+, SS34- Rotor, 17000 Upm, 15 min, 10°C) und das Pellet in 10 ml sterilem Moorwasser resuspendiert. 1 ml dieser Zellsuspension wurde vorsichtig auf einen Percoll- Gradienten (s. II.4.3) aufgetragen und zentrifugiert (6000 Upm, 15 min). Anschließend wurde der Gradient in 0,5 ml- Portionen fraktioniert und davon jeweils 15 µl für die Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung durch FISH verwendet.

4.3 Herstellung eines Percoll- Gradienten

Percoll wurde mit sterilem Moorwasser gemischt (15% Percoll, v/v) und zu je 10 ml in 15 ml- Glaszentrifugenröhrchen gefüllt. Der Gradient wurde durch Zentrifugation (Sorvall RC-5C+, SS34- Rotor, 12000 Upm, 60 min) etabliert und war - wenn stehend ohne Erschütterung gelagert - für einige Tage im Kühlschrank haltbar.

4.4 Selektive Gewinnung des SM1 Euryarchaeons ohne Percoll

Für die selektive Gewinnung des SM1 Euryarchaeons ohne Verwendung eines Percoll- Gradienten wurden die bewachsenen Polyethylenetze in möglichst geringen Mengen sterilen Moorwassers (ca. 200 ml) ausgewaschen. Die erhaltene Zellsuspension wurde für 16 h bei 10°C gelagert. Der resultierende Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorf- Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (Eppendorf- Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor, 14000 Upm, 10 min, 10°C). Dabei entstand über dem braunen Pellet eine weiße 'Wolke', welche mehr als 95% SM1 Euryarchaeon enthält. Diese Wolke wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und, falls nötig, mit sterilem Moorwasser verdünnt und erneut zentrifugiert.

4.5 SM1 Biofilme

Neben der SM1- Aufreinigung aus Polyethylenetz- Populationen wurden für vergleichende Analysen die erst kürzlich entdeckten, euryarchaeellen SM1 Biofilme herangezogen. Dabei handelt es sich um gallertartige Ansammlungen von SM1 Euryarchaeen, welche besonders im Bereich des Islinger Mühlbachs durch das Aufspannen von Netzen in tieferen Quellbereichen gewonnen werden konnten (Henneberger, 2002; vgl. III.4.3). Die Reinheit der Archaeen beträgt dabei bereits ca. 90%, konnte aber durch Resuspendieren in sterilem Originalwasser und Zentrifugation (Eppendorf- Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor, 14000 Upm, 10 min, 10°C) auf bis zu 95% erhöht werden.

5. Biologische Untersuchungen des SM1 Euryarchaeons

5.1 Lebend-/Tot- Färbung

Die Färbung mit dem Live/ Dead®BacLight™- Farbstoff wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt, jedoch statt bei Raumtemperatur auf Eis. Lebende Zellen konnten mittels Epifluoreszenzmikroskopie durch ihre leuchtend grüne Färbung identifiziert werden, tote Zellen waren rot gefärbt. Die Differenzierung beruht auf der Aktivität des Membranpotentials und damit auf der Intaktheit der Membran.

5.2 Temperatur und Sauerstoff

Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Marcus Koch¹ durchgeführt. Als Medium wurde original Moorwasser verwendet. Für die Herstellung anaerober Medien wurde das Wasser zunächst mit N₂ durchgast und im Anaerobenzelt (Coy, Michigan, USA; Gasgemisch N₂/H₂= 95:5, v/v) zu je 2 ml in 5 ml Rollrandgefäße abgefüllt. Diese wurden anschließend mit einem Gummistopfen verschlossen und mit Aluminiumringen gesichert. Anschließend erfolgte dreimalige Evakuierung und Begasung mit N₂ (1 bar Überdruck). Die Rollrandgefäße wurden nach dem Beimpfen mit 'aufgereinigten' SM1-Zellfraktionen bei verschiedenen Temperaturen (-2 bis 60°C) bzw. Sauerstoffkonzentrationen (0 bzw. 21%) in Wasserbädern inkubiert. Durch regelmäßige Probenahme und deren Analyse mittels Live/Dead®BacLight™- Farbstoff konnten Aussagen über die Temperatur- und Sauerstoffverträglichkeit der SM1 Archaeen getroffen werden.

5.3 pH- Wert

Die Zellen wurden in Moorwasser mit unterschiedlichen pH- Werten (pH 3 bis pH 11, mit HCl bzw. NaOH eingestellt) aufgenommen und bei 10°C üN inkubiert. In gewissen Abständen wurden Proben entnommen und mit Live/Dead®BacLight™- Farbstoff betrachtet.

5.4 SDS

Nach Zugabe von 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1 bzw. 0,5% (w/v) SDS wurden die Zellen bei 10°C inkubiert und nach gewissen Zeitabständen mittels Live/Dead®BacLight™- Farbstoff analysiert.

5.5 Salz

Für den Salzverträglichkeitstest wurde synthetisches Meerwasser (Huber et al., 1990) verwendet, um den Mangel verschiedener Ionen bei der alleinigen Zugabe von NaCl zu verhindern. Die Zellen wurden entweder in entionisiertem Wasser oder Meerwasser in verschiedenen Verdünnungsstufen (0,02- 1x) aufgenommen und mit Live/Dead®BacLight™ untersucht.

5.6 Proteinase K

Die Zellen wurden mit Proteinase K behandelt (0,5- 5 mg/ml) und bei 10°C üN inkubiert. Wiederum

1 Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg

wurden die Zellen mittels Live/Dead®BacLight™ analysiert und zusätzlich einer Immuno- FISH (s. II.15.3) unterzogen.

5.7 EDTA

Die Behandlung der Zellen mit Na₂ EDTA (1 bis 100 mM) wurde ün bei 10°C durchgeführt. Die Auswirkung des Entzugs zweiwertiger Ionen auf die Zellebensfähigkeit wurde mittels Live/Dead®BacLight™- Farbstoff festgestellt.

5.8 Gram- Färbung

Die Gram- Färbung wurde wie bei Rodina (1972) beschrieben durchgeführt.

5.9 Katalase

Der Test auf Katalase wurde laut Stellmach (1988) durchgeführt. Als Vergleichsstämme wurden *Chromobacterium violaceum* (positiv) und *Aeropyrum Gri11 L3A* (negativ) verwendet. Weiterhin wurde eine Nullkontrolle (H₂O) und eine Positivkontrolle (Enzym) eingesetzt.

1,0 ml der Untersuchungslösung wurde zunächst in einem 100 ml- Erlenmeyerkolben auf 37°C temperiert und anschließend mit 5,0 ml H₂O₂- Lösung (0,038%, w/v; 37°C) versetzt. Nach 5 min wurde die Reaktion mit 2 ml 1 N Schwefelsäure abgestoppt. Nach der Zugabe von 1 ml Kaliumiodidlösung (10%, w/v), 1 Tropfen Ammoniumheptamolybdatlösung (x 4 H₂O, 1%, w/v) und 5 Tropfen Stärkelösung (0,5%, w/v) wurde mit Natriumthiosulfatlösung (0,005 N) bis zur Entfärbung titriert.

6. Phasenkontrast- und Epifluoreszenzmikroskopie

Für die Phasenkontrastmikroskopie wurde ein Standard 16 Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) verwendet. Die Epifluoreszenzmikroskopie wurde an einem Olympus BX60- Mikroskop (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg) mit UV- Ausstattung durchgeführt.

Folgende Filtersätze (AHF analysentechnik AG, Tübingen) standen für die Epifluoreszenzmikroskopie zur Verfügung:

<i>Farbstoff</i>	<i>Anregungsfilter</i>	<i>Teilerspiegel</i>	<i>Sperrfilter</i>
CY3	HQ 546/12	Q 560 LP	HQ 585/40
DAPI	BP 360-370	DM 400	BA 420
Rhodamin Green™, FITC	HQ 480/40	Q 505 LP	HQ 527/30
Live/Dead®BacLight™	BP 470- 490	DM 500	BA 515

Tabelle 9: Fluoreszenz- Filtersätze des Olympus BX 60 Phasenkontrastmikroskops

Digitale Aufnahmen wurden mit einer Coolpix990 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) erstellt, welche über einen passenden Adapter (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg) am Mikroskop befestigt wurde.

7. Transmissions- Elektronenmikroskopie (TEM), Cryo- Elektronentomographie und konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM)

7.1 Transmissions- Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen (außer Cryo- Elektronentomographie) wurden an einem Philips CM12 Transmissions- Elektronenmikroskop (FEI Co., Eindhoven, NL) durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung für die durch eine LaB₆- Kathode erzeugten Elektronen betrug 120 kV. Zur Dokumentation wurde eine Slow- Scan- CCD- Kamera (TVIPS- Tietz GmbH, Gauting) verwendet.

7.1.1 Herstellung eines Suspensionspräparats

Für ein Suspensionspräparat wurden 5- 10 µl der jeweiligen Protein- oder Zellsuspension auf ein kohlebeschichtetes, beglimmtes Kupfergrid (G400) pipettiert. Durch Beglimmen (Harrick Plasma Cleaner/Sterilizer, PDC-3xG, Harrick Scientific Corporation, New York, USA) wurde die hydrophobe Oberfläche des Grids hydrophilisiert, so dass eine Benetzung mit wässrigen Lösungen möglich wurde. Nach etwa 1 bis 2 min wurde die Flüssigkeit von der Rückseite des Grids mittels eines Filterpapiers abgezogen. Das Grid wurde anschließend 1-2 mal mit H₂O bidest gewaschen.

7.1.2 Kontrastierung des Suspensionspräparats

Schwermetallbeschattung: Nach Lufttrocknung wurde das Präparat in der Hochvakuum-Bedampfungsanlage (CFE 50, Cressington Ltd., Watford, UK) mit Platin bedampft (1 nm, Winkel: 15°).

Negativkontrastierung: Das Präparat wurde für etwa 20s mit Uranylacetat (3%, w/v) behandelt und anschließend an der Luft getrocknet.

7.1.3 Gefrierätzung

Die Zellsuspension wurde durch Zentrifugation (Sorvall RC-5C+, SS34- Rotor, 15000 Upm, 10 min, 10°C) sehr stark aufkonzentriert. 1 µl dieser Suspension wurde in einen Goldträger (Bal-Tec, Witten/Ruhr) überführt und sofort in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren. Auf eine chemische Vorfixierung der Zellen wurde verzichtet. Die gefrorene Probe wurde sofort in die auf -180°C vorgekühlte Hochvakuum- Bedampfungsanlage (CFE 50, Cressington Ltd., Watford, UK) eingeschleust und auf -97°C erwärmt. Die Probe wurde anschließend mit einem -180°C kalten Messer gebrochen. Danach wurde das gefrorene Oberflächenwasser im Hochvakuum für 4 min sublimiert. Es folgte eine Bedampfung mit 1 nm Platin/ Kohle (45°), zur Stabilisierung wurde eine weitere, senkrechte Bedampfung (10 nm) durchgeführt. Das Metall- Kohle- Replika wurde auf H₂SO₄ (70%, w/v) abflotiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte noch zweimal eine Umsetzung des Replikas auf quartzdestilliertes Wasser und wurde letztendlich auf ein beglimmtes, hexagonales Kupfergrid (G600) aufgebracht.

7.1.4 Einbettung von Zellen und Mikrotomie

Die Zellen wurden in Cellulosekapillaren aufgenommen und in Aceton und OsO₄ gefriersubstituiert. Anschließend wurden die Kapillaren in Epon/ Araldite eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat kontrastiert (Rieger et al., 1995).

7.1.5 Bildverarbeitung elektronenmikroskopischer Daten

Die Bildverarbeitung elektronenmikroskopischer Daten wurde von Dr. Reinhard Rachel² und Dr. Harald Engelhardt³ durchgeführt.

Zur Rekonstruktion des S- Layer⁴ Reliefs wurde eine Bildverarbeitung nach Engelhardt (1988) durchgeführt. Für die Periodizitätsanalyse der Hamistruktur⁵ wurden elektronenmikroskopische Bilder von negativkontrastierten Hami ausgewählt und eine Rauschreduzierung durch Fourier- Filterung durchgeführt (SEMPER image processing system, Saxton, 1996).

7.1.6 EDAX⁶- Analyse

Eine Perle wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig resuspendiert und einzelne sichtbare *Thiothrix*-Flocken herausgepickt. Diese wurden auf beglimmte, kohlebeschichtete Grids aufgebracht und im Transmissions- Elektronenmikroskop (Philips CM30) untersucht. Die Messungen wurden von Jörg Raabe⁷ durchgeführt. Die Detektion der Röntgenstrahlung erfolgte hierbei durch einen Si(Li)-Halbleiterdetektor mit Be- Fenster. Bei der EDAX- Analyse konnten nur Elemente mit Ordnungszahl 11 und höher detektiert werden.

7.2 Cryo- Elektronentomographie

Cryo- Elektronentomographie wurde in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Ariane Briegel³ am MPI für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

5 µl einer Zellsuspension in Original- Moorwasser wurden auf ein mit 5 nm kolloidalem Gold bedecktes Lochgrid aufgetragen. Nach Absaugen überschüssiger Flüssigkeit (Blotten) wurde die Probe durch Schockgefrieren in flüssigem Ethan vitrifiziert (Dubochet et al., 1988).

Die Probe wurde während der Datengewinnung in einem speziellen Probenträger durch flüssigen Stickstoff ständig gekühlt. Die Daten wurden an einem Philips CM300 Transmissions- Elektronenmikroskop aufgezeichnet. Dieses Mikroskop war mit einer Feldemissionskathode und einem Energiefilter ausgestattet und arbeitete mit einer Beschleunigungsspannung von 300 kV. Die Kippserie wurde in einem Bereich von -60° bis +67° und einem Winkelabstand von 1,5° aufgezeichnet. Die Abbildungen wurden mit einer Vergrößerung von 43975 und mit einem Defocus von -12 µm unter Niederdosisbedingungen aufgezeichnet. Die Auswahl der Positionen, an denen Tomogramme

2 Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg

3 Max- Planck- Institut für Biochemie, Abt. Molekulare Strukturbiologie, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried

4 Als S- Layer (Surface Layer) werden Oberflächenproteine von Mikroorganismen bezeichnet, die sich durch eine regelmäßige, kristalline Struktur auszeichnen.

5 Als Hami werden die filamentartigen Oberflächenanhängsel des SM1 Euryarchaeons bezeichnet. S. III.3

6 EDAX: energy dispersive analysis of x- rays

7 Lehrstuhl für angewandte und experimentelle Physik, Universität Regensburg

aufgenommen wurden, musste allein durch den Abstand (ca. 2 μm) von einer SM1- Zelle bestimmt werden, da die Niederdosisbedingung kein unmittelbares Erkennen der Hami erlaubte.

Das Alignment der einzelnen Projektionen erfolgte mit Hilfe der kolloidalen Golpartikel als Marker. Für die Oberflächendarstellung der Hami wurde zunächst der Datensatz mit Hilfe der nichtlinearen, anisotropen Diffusion entrauscht (Frangakis und Hegerl, 2001). Die 3D- Visualisierung wurde mit der AMIRA Software (Indeed- Visual Concepts GmbH, Zuse Institut, Berlin) durchgeführt.

7.3 Konfokale Laserscanning- Mikroskopie (CLSM)

7.3.1 Proben und deren Vorbereitung

Alle mikrobiellen Proben wurden vor der Analyse fixiert und einer FISH in Suspension (s. II.13.6) unterzogen. Während der gesamten Vorbereitung der Proben wurde darauf geachtet, dass keine strukturelle Veränderung auftrat; aus diesem Grund wurde auch keine Dehydratisierung durch Ethanol wie bei herkömmlicher FISH durchgeführt.

7.3.1.1 Mikrobielle Perlenkettengemeinschaft

Ausgewählte Perlen aus dem Sippenauer Moor wurden zunächst mit *Thiothrix*- spezifischen Sonden (TN1) und dem Archaeen- spezifischen ARCHMix (s. II.13) hybridisiert. Anschließend wurden die Perlen mit Einbettungsmedium vermischt (Tissue-Tek, Wiles Inc. Diagnostic Div., USA), auf einen Träger aufgebracht und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mittels eines Kryomikrotoms (Leica CM 3000, Leica Microsystems AG, Wetzlar)⁸ wurden 60 μm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf einen Objektträger (SuperFrost- Objektträger, Fa. Menzel- Gläser, Ratingen) aufgebracht, in Citifluor eingebettet, mit einem Deckglas mit Abstandhaltern abgedeckt und bis zur Analyse bei -20°C im Dunkeln gelagert.

7.3.1.2 SM1 Biofilme

SM1 Biofilme aus dem Sippenauer Moor und dem Islinger Mühlbach wurden zunächst mit Bacteria- (Eub338) und Archaea- (ARCHMix) spezifischen Sonden (s. II.13.5) hybridisiert. Die Biofilme wurden im Flüssigkeitsfilm auf Objektträger übertragen, mit einem Deckglas mit Abstandhaltern bedeckt und sofort analysiert.

7.3.2 Aufzeichnung und Bearbeitung der Daten

Die abschließende Bildverarbeitung und -auswertung wurde jeweils mit dem Zeiss LSM Image Browser Version 3,1,0,97 (Carl Zeiss GmbH, 1997- 2001) durchgeführt.

⁸ freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Lehrstuhl für Zoologie (Prof. Schneuwly), Universität Regensburg

7.3.2.1 Analyse der Perlenkettengemeinschaft

Für die dreidimensionale Analyse der Perlen wurde ein CLSM (LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Oberkochen) freundlicherweise von Fa. Zeiss zur Verfügung gestellt. Es wurden Bilderstapel von bis zu 30 µm Tiefe aufgenommen, der Abstand der einzelnen Bildschnitte lag dabei bei 0,4 µm. Die verwendeten Fluoreszenzfilter waren LP 505 bzw. LP 560 und die Anregungswellenlänge betrug 488 bzw. 543 nm.

7.3.2.2 Analyse der SM1 Biofilme

Die konfokale Laserscanning- Mikroskopie der Biofilme wurde an einem LSM5 Pascal (Carl Zeiss, Oberkochen) in Zusammenarbeit mit Jan Malinski⁹ durchgeführt. Je nach Probenbeschaffenheit wurden Bilder- Stapel von bis zu 50 µm Tiefe aufgenommen. Der Abstand der einzelnen Bildschnitte lag dabei bei 0,5 µm. Als Objektiv wurde Plan- Apochromat 100x/ 1,4 Öl verwendet. Die verwendeten Fluoreszenzfilter waren BP505-530 bzw. LP 585 und es wurde mit den Wellenlängen 488 bzw. 543 nm angeregt.

8. DNA- Isolierung und Konzentrationsbestimmung

8.1 DNA- Isolierung

Die DNA- Isolierung wurde nach Barns et al., 1994 (modifiziert) durchgeführt.

8.1.1 Lösungen

DNA- Isolierungspuffer A

NaCl	100 mM
Tris/HCl, pH 8,0	500 mM
Na ₃ Citrat	1 mM

Alle Bestandteile wurden in hochreinem Wasser (LiChrosolv) unter der Sterilbank gelöst. Alle benötigten Geräte wurden zuvor mit Chlorbleichlauge (5% , w/v) behandelt.

DNA- Isolierungspuffer B

NaCl	100 mM
Tris/HCl, pH 8,0	200 mM
SDS	4% (w/v)

Alle Bestandteile wurden in hochreinem Wasser (LiChrosolv) unter der Sterilbank gelöst. Alle benötigten Geräte wurden zuvor mit Chlorbleichlauge (5% ; w/v) behandelt.

Phenol, puffergesättigt

Zur Neutralisation des sauren, wassergesättigten AquaPhenol™ wurden 5 ml pH Maker™ Lösung (pH 7,5) mit H₂O bidest auf 50 ml aufgefüllt und mit dem Phenol gut vermischt. Nach Trennung der beiden Phasen wurde der wässrigen Phase ein Aliquot zur Kontrolle entnommen, mit H₂O bidest zweifach verdünnt und mit einem pH- Meter kontrolliert. Anschließend wurde das Phenol mit Argon überschichtet und das AquaPhenol™ abgedunkelt bei 4°C aufbewahrt.

9 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Biologischen Fakultät, Universität Regensburg

8.1.2 Durchführung

Mikrobielle Umweltproben wurden zunächst in einem Eppendorf- Reaktionsgefäß bei 20.000 Upm zentrifugiert (Sorvall- Kühlzentrifuge RC5C+, SS34 Rotor, 15 min, 4°C) und der Überstand abgezogen. Das Pellet wurde anschließend in 50- 150 µl Puffer A resuspendiert und mit der gleichen Menge Puffer B versetzt. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die Probe bis zu dreimal bei -80°C (Kelvinator Heraeus HFU 686 Top, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) eingefroren und kurz bei 56°C im Heizblock (Eppendorf Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg) aufgetaut. Die Lyse der Zellen wurde im Lichtmikroskop kontrolliert.

Zur besseren Phasentrennung wurde das Phase Lock Gel Light verwendet. Das Gel wurde direkt vor Gebrauch ca. 20- 30 s bei 14.000 Upm (Eppendorf- Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor, 15°C) pelletiert. Auf dieses so vorbereitete Gel wurde nun das Zell- Lysat gegeben und mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt. Nach vorsichtigem Mischen und Zentrifugation (5 min, 14.000 Upm, 15°C) wurde der resultierende, über dem Gel liegende Überstand mit 1 Volumen einer 1:1- Mischung von Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) gemischt und erneut zentrifugiert (5 min, 14.000 Upm, 15°C). Anschließend wurde die wässrige Phase durch Zugabe von 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 14.000 Upm, 15°C) konnte die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt werden. Zur Fällung wurde die Lösung entweder mit 0,6 Volumen Isopropanol (mind. 1 h, RT) bzw. mit 2 Volumen Ethanol und 1 µl Glykogen (20 mg/ml) pro 1 ml wässrige Phase (mind. 2 h, -20°C) inkubiert. Durch eine Zentrifugation (Sorvall- Kühlzentrifuge RC5C+, SS34 Rotor, 20.000 Upm, 30 min, 4°C) wurde die DNA pelletiert, zweimal mit 1 Volumen eiskaltem Ethanol (70%, v/v) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde anschließend im Exsikkator getrocknet. Die DNA wurde in 10- 25 µl hochreinem Wasser (LiChrosolv) vorsichtig gelöst.

8.2 DNA- Isolierung mit Reaktionskit

Die DNA- Isolierung mit dem Qiagen DNeasy Tissue Kit wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

8.3 Nukleinsäuren- Konzentrationsbestimmung

8.3.1 Photometrische Bestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde mit einem Spektralphotometer DU640 (Beckman Instruments, Fullerton, USA) in einer 100 µl Quarzküvette (Hellma GmbH, Müllheim) die optische Dichte (OD) bei $\lambda = 260$ bzw. 280 nm gemessen. Aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} konnte die Reinheit der Nukleinsäuren abgeschätzt werden (Maniatis et al., 1989; Tab. 10). Die Konzentration der Lösung ließ sich nach folgender Formel berechnen:
Konzentration= Verdünnungsfaktor x OD_{260} x spez. Konzentration.

<i>Nukleinsäure</i>	<i>Spezifische Konzentration (OD₂₆₀= 1)</i>	<i>OD₂₆₀/OD₂₈₀</i>
Genomische DNA	50 µg/ ml	1,8
DNA- Oligonukleotide	20 µg/ ml	1,8
Plasmid- DNA	20 µg/ ml	1,8- 2,0
RNA	33 µg/ ml	2,0

Tabelle 10: Konzentrationsbestimmung nach Maniatis et al., 1989

8.3.2 Bestimmung mittels Ethidiumbromid- Agaroseplatten

EtBr- Agaroseplatten

Agarose (NEEO)	5 g
Tris/HCl, 1M, pH 7,5	5 ml
EDTA, 0,5 M, pH 8,0	1 ml
Ethidiumbromid (10 mg/ ml)	0,25 ml
H ₂ O bidest	ad 500 ml

Die Agarose wurde zunächst durch Erwärmen in H₂O gelöst. Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe der restlichen Bestandteile. Die Lösung wurde so dünn wie möglich in Plastikpetrischalen gegossen und nach dem Erstarren bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Zur schnellen Abschätzung von DNA- Konzentrationen wurde 1 µl der zu untersuchenden Lösung auf die EtBr- Agaroseplatte aufgetüpfelt und nach kurzer Einwirkdauer mit einem bereits vorher aufgebrauchten Standard (je 1 µl Lambda- DNA- Standard: 3, 6, 12, 25, 50, 100 ng/ µl) unter UV- Licht (UV- Schirm, Herolab GmbH, Wiesloch) verglichen.

9. Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

9.1 Lösungen

Nukleotid- Mix

dATP, dCTP, dGTP, dTTP (jeweils 100 mM)	je 10µl
H ₂ O, hochrein (LiChrosolv)	360 µl

TAE- Puffer (1x)

Tris	40 mM
Natriumacetat	20 mM
EDTA (Säure)	2,5 mM

Mit Essigsäure wurde ein pH- Wert von 8,3 eingestellt.

Auftragspuffer

Ficoll	25% (w/v)
Tris/HCl, pH 8,0	40 mM
EDTA (Säure)	20 mM
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

9.2 Primer

<i>Primer</i>	<i>Position*</i>	<i>Sequenz 5'→3'</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Referenzen</i>
8 aF	8	TCYGGTTGATCCTGCC	Archaea	Burggraf et al., 1992
9 bF	9	GRGTTTGATCCTGGCTCAG	Bacteria	Burggraf et al., 1992
109 aF	109	ACKGCTCAGTAACACGT	Archaea	Großkopf et al., 1998
345aF	345	CGGGGYGCASCAGGCGCGAA	Archaea	Burggraf et al., 1997
516uF	516	TGBCAGCMGCCGCGGTAA	universell	Stetter und Burggraf: unpubliziert
1119aR	1119	GGYRSGGGTCTCGCTCGTT	Archaea	Burggraf et al., 1997
1406 uR	1406	ACGGGCGGTGTGTRCAA	universell	Lane, 1991
M13F (-40)	-	GTTTTCCCAGTCACGA	Lac-Operon	-
M13R	-	GGAAACAGCTATGACCATG	Lac-Operon	-
oligoG	-	ATATGGGGGGGGGGGGGGG	-	-

Tabelle 11: Verwendete Primer, Positionen, Sequenzen, Spezifitäten und Referenzen
* Positionen beziehen sich auf die 16S rRNA von *E. coli* (Brosius et al., 1978)

Weitere Primer werden im Anhang angegeben.

9.3 Durchführung der PCR und Gelelektrophorese

Die PCR nach Saiki et al. (1985 und 1988) wurde in 0,2 ml- Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (GeneAmp® PCR- System 9700, Perkin- Elmer Cetus, Norfolk, USA) durchgeführt. Die Ansätze wurden unter einer Sterilbank (Gelaire BSB4A, Flow Laboratories, Opera, Italien) mit kontaminationsfreien Aerosolfilter- Pipettenspitzen nach folgendem Schema pipettiert:

PCR- Ansatz (25 µl)

H ₂ O, LiChrosolv	18,8 µl
PCR- Puffer, incl. MgCl ₂	2,5 µl
Nukleotid- Mix	0,5 µl
F- Primer (25 ng/µl)	1,0 µl
R- Primer (25 ng/µl)	1,0 µl
(LD-) Taq	0,125 µl
DNA (10 ng/µl)	1,0 µl

Für die Amplifikation bakterieller 16S rDNA wurde LD (Low DNA)- Taq verwendet. Für jede Primerkombination wurde eine Nullkontrolle (ohne Zugabe von DNA) und eine Positivkontrolle (*Thermococcus celer* bzw. *Aquifex pyrophilus*) angesetzt. Die PCR- Ansätze wurden erst nach dem Erreichen einer Temperatur von ca. 90°C in den Thermocycler eingesetzt (Hotstart- PCR).

<i>Zyklusanzahl</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur</i>
1	90 s	96°C
10	30 s	96°C
	30 s	60°C / 55°C / 50°C*
	60 s	72°C
25- 30	20 s	94°C
	30 s	60°C / 55°C / 50°C*
	60 s (+2 s pro Zyklus)	72°C
1	10 min	72°C
1	∞	4°C

Tabelle 12: Inkubationstemperaturen, Dauer und Zyklen im Thermocycler

** Die Annealing- Temperatur wurde in Abhängigkeit des Primers bestimmt
(Richtwert: $T = T_m - 5^\circ\text{C}$, T_m ist die Schmelztemperatur des Primers)*

Zur Überprüfung der PCR wurden 3-10 µl des PCR- Produkts mit 2 µl des Auftragspuffers (10x) versetzt und über ein Agarosegel (1% NEEO- Agarose, w/v, in TAE- Puffer) incl. Ethidiumbromid (50 µg/100 ml Gel) aufgetrennt. Als Längenstandard wurden 3 µl von HindIII/EcoRI verdauter Lambda- DNA aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 90 V 30 min in 1x TAE- Puffer durchgeführt (Gelelektrophorese- Apparatur: Desaga, Sarstedt- Gruppe, Frankreich; Gelelektrophoresekammer: Biometra, Göttingen). Die Auswertung erfolgte auf einem UV- Schirm bei $\lambda = 312$ nm und wurde mit dem EasyStore Imaging System (Herolab GmbH, Wiesloch) dokumentiert.

9.4 Ganzzell- PCR

Für die PCR wurden anstatt isolierter DNA Zellen direkt der PCR- Reaktionslösung zugegeben (ca. 10^3 bis 10^4 Zellen/ PCR). Durch den Hitzeschock bei der Hot-Start- PCR lysierten die Zellen und deren DNA wurde freigesetzt.

10. Klonierung von PCR- Produkten

10.1 Lösungen und Puffer

LB Medium / Platten

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ggf. Agar	15 g
H ₂ O bidest	ad 1000 ml

X-Gal- Lösung

X-Gal	40 mg
Dimethylformamid	1 ml

Enzym- Mastermix für Restriktionsverdau

AluI, HhaI, HinfI, RsaI (je 10 U/µl)	je 0,25 µl
Puffer REact 1® 10x (50 mM Tris/HCl, pH 8,0 und 10 mM MgCl ₂)	1 µl

10.2 Durchführung

10.2.1 Reinigung des PCR- Produkts

10.2.1.1 Reinigung mittels Gelelektrophorese

Das zu reinigende PCR- Produkt wurde durch eine Gelelektrophorese (90 min, 70 V) über ein Agarosegel (1% Low melting point Agarose, w/v, incl. 50 µg EtBr pro 100 ml Gel) gereinigt. Die zu klonierende Bande wurde mit einer mit Chlorbleichlaug behandelteten Rasierklinge knapp ausgeschnitten. Das PCR- Produkt wurde mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers eluiert. Die Konzentration der gereinigten PCR- Produkte wurde mittels einer Ethidiumbromidplatte abgeschätzt.

10.2.1.2 Reinigung mittels Microcon 100- Filtern

Die zu klonierenden PCR- Produkte wurden gemäß den Herstellerangaben mit Hilfe von Microcon 100- Filtern von ungebundenen Primern und Nukleotiden gereinigt. Die Konzentration der gereinigten PCR- Produkte wurde mittels Ethidiumbromidplatte abgeschätzt.

10.2.2 Klonierung

Die Klonierung erfolgte mittels Original TA Cloning® Kit nach Anleitung des Herstellers.

Ligationsansatz

PCR- Produkt (frisch, gereinigt)	1-2 µl
Ligationspuffer (10x)	1 µl
pCR®2.1 Vektor (25 ng/µl)	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
LiChrosolv H ₂ O	ad 10 µl

10.2.3 Screening der Klone und Restriktionsverdau (ARDRA)

Die erhaltenen weißen Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern von der LB- Platte abgetupft und in PCR- Lösungen überführt. Um die Klone zu sichern, wurden die Zahnstocher anschließend auf einer LB- Platte (incl. Ampicillin, 100 µl einer 10 mg/ml Lösung) ausgestrichen, welche dann bei 37°C üN inkubiert wurde.

Die Einteilung der Klone anhand des Inserts erfolgte mittels Restriktionsmuster (ARDRA= amplified rDNA restriction analysis, Vaneechoutte et al., 1992): Zu den PCR- Produkten eines Screenings (Primer M13F (-40) und M13R) wurden je 2 µl eines Enzym- Mastermixes (s. II.10.1) gegeben und bei 37°C mind. 3 h inkubiert. Das Ergebnis des Restriktionsverdaus wurde auf einem Agarosegel (3% High Resolution- Agarose 1000, w/v) incl. EtBr (50 µg pro 100 ml Gel) überprüft (Gelelektrophorese: 60 min, 85V). Als Längenstandard wurde eine 25 bp- DNA- Leiter verwendet.

10.2.4 Sichern der Klone

Von jeder der Mustergruppen wurde mindestens ein Klon auf je 10 ml LB- Flüssigmedium mit Ampicillin (0,5 mg/10 ml) überimpft. Nach 15- stündiger Inkubation bei 37°C wurden jeweils 2 ml der Zellkultur abzentrifugiert (13.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Picofuge MC-13), das Pellet mit 500 µl frischem LB- Medium resuspendiert und schließlich mit 600 µl sterilem Glycerin versetzt. Die Glycerinkulturen konnten so bei -80°C (Kelvinator, Heraeus HFU 686 Top, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) aufbewahrt werden.

10.2.5 Isolierung der Plasmid- DNA

Die Plasmid- DNA wurde gemäß Herstellerangaben mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit isoliert.

11. Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR- Produkten sowie der Plasmid- DNA wurde von der Firma Entelechon GmbH (Regensburg) bzw. der Firma Geneart (Regensburg) durchgeführt.

Sequenzieransatz

Plasmid- DNA	300- 500 ng
bzw.	
PCR- Produkt, Microcon- 100 gereinigt	150- 200 ng
Primer (25 ng/µl)	1 µl
H ₂ O (LiChrosolv)	ad 15 bzw. 8 µl

12. Sequenzdatenanalyse

12.1 16S rRNA- Gensequenzen

Zur Analyse der 16S rRNA- Gensequenzen wurde ein Alignment von ca. 11000 homologen Gesamt- und Teilsequenzen, die in öffentlichen Datenbanken zugänglich sind, verwendet (ARB- Projekt, Ludwig, 1995; Ludwig und Strunk, 1997). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des ARB Software- Pakets in das bestehende Alignment eingepasst. Mittels Distance Matrix-, Maximum Parsimony- und Maximum Likelihood (fastDNAmI)- Methoden erfolgte die Baumrekonstruktion. Dazu wurden Termini- Filter sowie spezifische Filter für Archaea und Bacteria verwendet. Für die Baumdarstellung wurden repräsentative Sequenzen ausgewählt. Alle Klonsequenzen wurden vor der phylogenetischen Einordnung einer Analyse durch CHECK-CHIMERA (Ribosomal Database Project; Maidak et al., 2000) unterzogen, um mögliche chimäre Artefakte auszuschließen.

Bakterielle 16S rRNA Gensequenzen wurden bei der EMBL Nukleotid- Sequenzdatenbank hinterlegt. Im Folgenden werden die Datenbankreferenznummern jeweils angegeben.

12.2 Sonstige Gensequenzen

Sonstige Gensequenzen wurden mit Hilfe des Programms BioEdit (Hall, 1999) einem Alignment unterzogen und miteinander verglichen.

13. Ganzzellhybridisierung mit farbstoffmarkierten Oligonukleotidsonden

13.1 Verwendete Oligonukleotidsonden und Fluoreszenzfarbstoffe

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Position*</i>	<i>Sequenz 5'→3'</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Referenzen</i>
EUB338/I	338	GGCTGCCTCCCGTAGGAGT	Bacteria	Amann et al., 1990b
ARCH345	345	TTCGCGCCTGSTGCRCCTCCG	Archaea	Rudolph, 2003
SMARCH714	714	GCCTTCGCCAGATGGTC	SM1- Euryarchaeon	Rudolph, 2003
ARCH915	915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	Archaea	Stahl und Amann, 1991
ARCH1044	1044	GGCCATGCACCWCCTCTC	Archaea	Rudolph, 2003
IMB1-87	87	GCAAGCTTCCTCTCATCG	IMB1/ sipK119	diese Arbeit
TN1	652	CTCCTCTCCACATTCTA	<i>Thiothrix</i>	Wagner et al., 1994a

Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotidsonden, Positionen, Sequenzen, Spezifitäten und Referenzen

** Positionen beziehen sich auf die 16S rRNA von E.coli (Brosius et al., 1978)*

Die hier aufgeführten Sonden ARCH345, ARCH915, ARCH1060 konnten als ARCHMix eingesetzt werden (s. II.13.5). Die verwendeten Sonden wurden entweder mit CY3 oder Rhodamin GreenTM markiert.

<i>Fluoreszenzfarbstoff</i>	<i>Absorption</i>	<i>Emission</i>
CY3 (Indocarbocyanin)	552 nm	565 nm
Rhodamin Green TM	502 nm	527 nm

Tabelle 14: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe, Absorptions- und Emissionswellenlängen

13.2 Sondenkonstruktion

Zur Sondenkonstruktion wurden mit Hilfe des ARB Software- Pakets (s. II.12.1) ca. 11000 16S rRNA-Gensequenzen miteinander verglichen und geeignete Abschnitte bestimmt. Bei der Sondenauswahl wurde die Zugänglichkeit des jeweiligen Sequenzabschnitts der 16S rRNA für Oligonukleotide anhand der bekannten, zweidimensionalen 16S rRNA- Struktur von *E. coli* berücksichtigt (Fuchs et al., 1998). Weiterhin wurde darauf geachtet, dass sich die Sequenzabschnitte in möglichst vielen Basen von allen anderen bekannten 16S rRNA- Gensequenzen unterscheiden.

Die Spezifität der gewählten Oligonukleotide wurden an den jeweiligen Mikroorganismen bzw. Originalproben mit empirisch ermittelten SDS- und Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer überprüft.

13.3 Beschichtung der Objektträger

Gelatine- Lösung

Gelatine	0,1% (w/v)
KCr(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,01% (w/v)

Die epoxidharzbeschichteten Objektträger wurden zunächst mit einer Detergenslösung gereinigt und nach gründlichem Spülen mit H₂O bidest getrocknet. Anschließend wurden sie durch Eintauchen in eine auf 70°C erwärmte Gelatinelösung beschichtet und an einem staubfreien Ort zum Trocknen aufgestellt.

13.4 Fixierung der Zellen

Phosphat- Puffer

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	0,2 M
--	-------

Von beiden Substanzen wurde zunächst eine 0,2 M- Lösung hergestellt. Die Na₂HPO₄- Lösung wurde anschließend gegen die NaH₂PO₄- Lösung bis zu einem pH- Wert von 7,2 titriert.

3x PBS- Puffer

NaCl	390 mM
Phosphat- Puffer, pH 7,2	30 mM

Fixierungslösung

Paraformaldehyd	1,5 g
H ₂ O bidest	3,3 ml
NaOH, 5M	15 µl
3x PBS- Puffer	1,65 ml
HCl, 2M	10-15 µl

Zunächst wurde das Paraformaldehyd mit H₂O und NaOH unter Rühren auf 60° C erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Nach dem Abkühlen auf RT erfolgte die Zugabe von 3x PBS- Puffer. Mit 2M HCl wurde ein pH- Wert von 7 eingestellt und die Lösung durch einen Cellulosefilter filtriert. Die Lösung konnte bei 4°C etwa eine Woche aufbewahrt werden.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen mit 1/10 Volumen Fixierungslösung (Endkonzentration: 3% Formaldehyd, w/v) versetzt und 1 h bei RT bzw. üN bei 4°C inkubiert. Um überschüssiges Formaldehyd zu entfernen, wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal durch Resuspendierung in 1x PBS- Puffer gewaschen (Zentrifugation: Heraeus Picofuge MC-13, 13000 Upm, 10 min, RT).

13.5 Trägergebundene Fluoreszenz- *in situ*- Hybridisierung (FISH)

FISH wurde nach Amann et al., 1990a durchgeführt.

Formamid, entionisiert

Formamid	50 ml
Serdolit MB-1 (20- 50 mesh)	5 g

Das Formamid wurde nach Zugabe von Serdolit (Ionenaustauscher) 30 min bei RT gerührt und anschließend durch einen Cellulosefilter filtriert. Die Lösung wurde portioniert und in Eppendorf- Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert.

Hybridisierungspuffer

NaCl	0,9 M
Tris/HCl, pH 7,2	0,01 M
SDS	0,005- 0,5% (w/v)
Formamid, entionisiert	0- 30% (v/v)

Archaeeller Oligonukleotidsonden- Mix (ARCHMix, Rudolph, 2003)

ARCH345, ARCH915, ARCH1044 (s. II.13.1)	jeweils 50 ng/µl
---	------------------

Waschpuffer

Tris/HCl, pH 7,2	0,01 M
SDS	0,005- 0,5% (w/v)
NaCl	0,11- 0,9 M

Die NaCl- Konzentration des Waschpuffers wurde der Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers wie folgt angepasst:

Formamid- Konzentration (Hybridisierungspuffer)	0	10	20	30%
NaCl- Konzentration (Waschpuffer)	0,9	0,45	0,23	0,11M

DAPI- Lösung

EDTA, Dinatriumsalz (100 mM)	50 µl
Na- Acetat (2M), pH 4,7	30 µl
DAPI (1 mg/5 ml)	10 µl
Optional: SDS (10%, w/v)	10 µl

Die Bedingungen der Ganzzellhybridisierung wurden für jede Oligonukleotidsonde empirisch ermittelt, da die Spezifität der Sondenbindung auch vom Salzgehalt des Waschpuffers oder der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer beeinflusst wird. So wurde die nötige Formamidkonzentration über eine Näherungsformel abgeschätzt:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log M + 0,4 (\% \text{ G+C}) - 820/n - 0,5 (\% \text{ Formamid})$$

Dabei ist T_m die Schmelztemperatur des Oligonukleotids (in °C), M die Konzentration an monovalenten Kationen im Hybridisierungspuffer (in mol/l) und n die Basenzahl des Oligonukleotids (Lathe, 1985; Maniatis et al., 1989).

Zum Aufbringen der Zellen wurden in die Vertiefungen der gelatinebeschichteten Epoxid- Objektträger 1- 10 µl einer Kontroll- bzw. zu untersuchenden Zellsuspension (fixierte und gewaschene Zellen) aufgetragen und bei 42°C (Dri-Block® DB-2D, Techne, Cambridge, Großbritannien) getrocknet. In aufsteigender Ethanolreihe (50%, 80% (jeweils v/v), abs.) wurden die Zellen entwässert. Nach kurzem Trocknen bei RT wurde pro Feld 10 µl Hybridisierungspuffer aufgetragen und der Objektträger in einer feuchten Kammer, bestehend aus einem mit einem feuchten Papiertuch ausgelegten, 50 ml-Schraubdeckelreaktionsgefäß (Falcon Tube™) für 15 min bei 46°C inkubiert (Hybridisierungssofen OV 5, Biometra, Göttingen). Anschließend wurde der Objektträger entnommen, auf einen 37°C Wärmeblock (Bachofor Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) gelegt; pro Feld wurde 1 µl einer entsprechenden Sondenverdünnung (50 ng/µl) möglichst zügig aufgetragen. Die Inkubation bei 46°C wurde nun 2 h fortgesetzt. Zum Waschen des Objektträgers wurde dieser zunächst mit dem auf 48°C vorgewärmten Waschpuffer kurz abgespült und dann senkrecht in ein Schraubdeckelreaktionsgefäß mit vorgewärmtem

Waschpuffer gestellt. Nach leichtem Schütteln (15 min, 48°C) wurde der Objektträger entnommen, sofort mit kaltem, entionisiertem Wasser gespült und mittels Druckluft getrocknet. Optional konnte nun eine DAPI- Färbung angeschlossen werden: Auf jeden Spot wurden ca. 5 µl DAPI- Lösung (1:15 verdünnt in Waschpuffer) aufgetragen und nach 4 min mit entionisiertem Wasser abgespült. Nach erneutem Trocknen unter Druckluft wurden die Zellen zum Schutz der Fluoreszenzfarbstoffe vor Photooxidation in Citifluor eingebettet und mit einem Deckglas (24x 50 mm) abgedeckt.

13.6 FISH in Suspension

SSC- Puffer (10x)

NaCl	0,15 M
Na ₃ - Citrat	1,5 M

Hybridisierungspuffer

NaCl	0,9 M
SSC	1x
SDS	0,001- 1% (w/v)
Formamid (entionisiert)	0- 50% (v/v)

Waschpuffer

NaCl	0,9 M
SSC	1x
SDS	0,001- 1% (w/v)

Die SDS- Konzentration des Waschpuffers wurde der des Hybridisierungspuffers angepasst.

Zur Ganzzellhybridisierung in Suspension wurde ein Heizblock (Dri-Block® DB-2D, Techne, Cambridge, GB) verwendet. Der Reaktionsansatz (0,6 ml- Reaktionsgefäß) bestand aus Zellsuspension (bzw. Zellaggregat) und 50 µl Hybridisierungspuffer. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 46°C wurden jeweils 200- 500 ng der gewünschten Sonde(n) zugegeben. Die gesamte Inkubationsdauer betrug 3 h. Der Hybridisierungsansatz wurde anschließend mit 1 ml warmem Waschpuffer verdünnt und weitere 15 min bei 46°C inkubiert. Im Fall der Hybridisierung von Zellaggregaten wurden diese mit einer sterilen Pinzette oder einer Spritze der Hybridisierungslösung entnommen und in ein neues Cup mit vorgewärmten Waschpuffer überführt.

Die Reaktion wurde auf Eiswasser abgestoppt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (13000 Upm, Eppendorf- Kühlzentrifuge) wurde das Pellet in Citifluor aufgenommen. Zellaggregate wurden ohne Zentrifugation in Citifluor aufgenommen.

14. Proteinbiochemische Methoden

Für präparative Analysen wurde ein physiologischer Puffer (KPH) für die SM1 Euryarchaeen entwickelt. Dabei wurde die Salinität und Ionenzusammensetzung auf Basis der Quellwasseranalysen (Rudolph et al., 2004) ausgewählt.

KPH

NaCl	0,7 mM
MgCl ₂	0,1 mM
CaSO ₄	1,6 mM
optional: Hepes	1,0 mM

Es wurde ein pH- Wert von 7,0 eingestellt.

Die physiologische Wirkung des Puffers auf die Zellen wurde sowohl durch Live/Dead[®]BacLight[™]-Färbung als auch durch Mikroskopie überprüft.

14.1 Proteingewinnung

14.1.1 Gewinnung von Ganzzellextrakten

2 ml einer Fraktion aufgereinigter SM1 Euryarchaeen wurden dem Aufschluss durch eine French Press (French Pressure Cell Press, Aminco, Silver Spring, USA) unterzogen. Um die dabei entstandenen Zelltrümmer zu entfernen, wurde der Aufschluss 15 min bei 14000 Upm (Eppendorf- Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor, 4°C) zentrifugiert und der Überstand anschließend mit dem dreifachen Volumen eiskalten Aceton versetzt. Nach der Fällung (2,5 h, -20°C) wurde die Lösung zentrifugiert (14000 Upm, 4°C, 15 min) und damit die Proteine pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Exsikkator üN getrocknet.

14.1.2 S- Layer- Präparation

MES- Puffer

MES	4,88 g
NaCl	13,85 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,50 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,37 g
H ₂ O bidest	ad 1000 ml

Der pH- Wert wurde mit 1M NaOH auf 5,5 eingestellt.

Die Versuche zur S- Layer- Präparation von SM1 euryarchaeellen Zellen wurden von Kerstin Schuster¹⁰ durchgeführt. Die Zellen wurden in 5 ml MES- Puffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Sonifier 250, Branson, Danbury, USA). Das Lysat wurde mit DNase II (20 µg/ml) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Nach drei Waschrufen (Sorvall RC-5C+, SS34-Rotor, 14000 Upm, 15 min) wurde das Pellet zur Entfernung der Membranlipide mit Detergens (0,5%, (w/v) Triton X-100 in MES- Puffer) behandelt (30- 45 min, RT). Die S- Layer- Fragmente wurden durch Abzentrifugieren und 4- maliges Waschen mit MES- Puffer gewonnen (14000 Upm, 15 min). Das resultierende Pellet wurde in Puffer aufgenommen und für die Elektronenmikroskopie präpariert (Negativkontrastierung mit Uranylacetat).

¹⁰ Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg (2003)

14.1.3 Gewinnung von Hamifractionen

14.1.3.1 Mechanisches Abscheren der Hami

Für die Isolierung der Hami standen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen konnten die Zellen mit einem Ultraturax (Polytron PT1200, Kinematica AG, Littau, CH) behandelt werden (4°C, 6 min). Weiterhin wurde eine Ultraschallbehandlung durchgeführt (35 min, 4°C, 34 kHz; Ultraschallgerät Sonorex super 10P, Bandelin electronic, Berlin). Die Abtrennung der Hami konnte auch mittels Glasperlen durchgeführt werden; dazu wurde 1 Volumen Glasperlen zur Zellsuspension gegeben und bei 4°C 18 h vorsichtig geschüttelt. Die Suspensionen aller Hami-Präparationen wurden zentrifugiert (Sorvall RC-5C+, SS34- Rotor, 17.000 Upm, 30 min, 4°C) und die Zellpellets verworfen. Die Überstände wurden anschließend einer Ultrazentrifugation (Beckman OPTIMA LE 80 K, 70.1 Ti- Rotor, 30.000 Upm, 1 h, 15°C) unterzogen. Das Pellet konnte in KPH- Puffer aufgenommen werden. Die Effizienz und die Qualität der verschiedenen Hami- Präparationsmethoden wurde per Elektronenmikroskop überprüft.

14.1.3.2 SDS- Behandlung

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Hami war die Auflösung der Zellwand der SM1 Euryarchaeen durch SDS. Die SM1- Zellsuspension (gut resuspendiert) wurde mit 0,1% SDS (w/v) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde die Zellsuspension in regelmäßigen Abständen auf einem Vortex (Vibrofix VF1, Janke & Kunkel, Kika Labortechnik) kurz aufgeschüttelt. Anschließend wurde eine Zentrifugation durchgeführt (Sorvall RC-5C+, SS34- Rotor, 17.000 Upm, 30 min) und das erhaltene Pellet verworfen. Der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge (Beckman OPTIMA LE 80 K, 70.1 Ti- Rotor, 30.000 Upm, 1h) abzentrifugiert. Dieses Pellet wurde in KPH- Puffer aufgenommen und enthielt die Hami.

14.2 Proteinreinigung

14.2.1 Saccharose- Gradientenzentrifugation

Eine Reinigung der Hamifractionen war durch Saccharose- Gradientenzentrifugation möglich. Hierzu wurde ein Saccharosegradient (10- 70% Saccharose (w/v) in sterilem KPH) mit der Proteinlösung überschichtet und bei 48.000 Upm (15h, Beckman OPTIMA LE 80 K, SW 60 Rotor) zentrifugiert. Dabei bildete sich im unteren Drittel des Gradienten eine Bande, welche die gereinigten Hami enthielt. Zum Entfernen der Saccharose konnte eine Dialyse angeschlossen werden (s. II.14.2.3).

14.2.2 Ammoniumsulfatfällung

Als alternative Reinigungsmethode wurde die Ammoniumsulfatfällung in Betracht gezogen. Dazu wurde bei 4°C die Proteinlösung unter Rühren nach und nach in kleinen Portionen mit Ammoniumsulfat versetzt, bis nach 1 h die gewünschte Endkonzentration erreicht wurde. Die benötigte Menge war dabei aus folgender Tabelle abzulesen:

<i>Endkonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)</i>	10	20	30	35	40	45	50	55
<i>Zugegebenes Ammoniumsulfat (g/l)</i>	56	114	176	209	243	277	313	351

Tabelle 15: Nomogramm zur Bestimmung der Ammoniumsulfatmenge zur Einstellung einer gewählten Konzentration (Schrumpf, 2002)

Danach wurde die Suspension noch 40 min gerührt und anschließend 20 min bei 15.000 Upm (Sorvall RC-5C+, SS34- Rotor, 4°C) zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in wenig Volumen H₂O bidest bzw. KPH gelöst. Die erhaltene Proteinlösung konnte anschließend einer Dialyse unterzogen werden (s. II.14.2.3).

14.2.3 Dialyse

Vor Benutzung wurden die Dialyseschläuche mit einer 1mM EDTA (Dinatriumsalz)- Lösung incl. 0,1 M NaHCO₃ 15 min gekocht, anschließend dreimal mit H₂O bidest gespült und schließlich 10 min in 0,001 M EDTA ausgekocht. Nun konnten sie in H₂O bidest autoklaviert und gelagert werden. Die Dialyse erfolgte ün bei 4°C unter leichtem Rühren des Dialysepuffers (KPH oder H₂O bidest).

14.3 Analyse von Proteinlösungen

14.3.1 Proteinmengenbestimmung: Bicincholinsäure (BCA)- Test

Der BCA- Test wurde nach Smith et al., 1985 durchgeführt.

Reaktionslösung

BCA- Solution	50 ml
Kupfer(II)sulfat- Lösung	1 ml

Jeweils 1 ml der Reaktionslösung wurde zu 50 µl Untersuchungslösung, Standard bzw. Negativkontrolle (H₂O bidest) pipettiert. Die Lösung wurde gut durchmischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion auf Eis wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen und zur Konzentrationsbestimmung mit den entsprechenden Werten des Standards verglichen.

14.3.2 SDS- PAGE (SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese)

14.3.2.1 Herstellung der Gele und Puffer

APS- Lösung

Das für die Polyacrylamidgele notwendige APS wurde in H₂O bidest gelöst (30%, w/v) und in kleinen Portionen bei -20°C gelagert. Nach einmaligen Auftauen wurde die APS- Lösung verworfen.

Trenngel (für zwei Gele)

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	3 ml
Acrylamid (60%, w/v)	variabel
Bisacrylamid (2,5%, w/v)	variabel
SDS- Lösung (10%, w/v)	80 µl
TEMED	4 µl
APS (30%, w/v)	13 µl
H ₂ O bidest	ad 8 ml

Alle Substanzen wurden unter Rühren in ein Becherglas pipettiert und nach Zugabe von TEMED und APS sofort gegossen. Das Trenngel konnte feucht gehalten im Kühlschrank etwa eine Woche gelagert werden.

Sammelgel (für zwei Gele)

2 M Tris/HCl, pH 6,8	156,25 µl
Acrylamid (60%, w/v)	variabel
Bisacrylamid (2,5%, w/v)	variabel
SDS- Lösung (10%, w/v)	25 µl
TEMED	2,5 µl
APS (30%, w/v)	17,5 µl
H ₂ O bidest	ad 2,5 ml

Das Sammelgel wurde jeweils vor der Gelelektrophorese frisch hergestellt.

Auftragspuffer (5x)

Tris/HCl pH 6,8	250 mM
SDS	10% (v/v)
β- Mercaptoethanol	25% (v/v)
Glycerin	50% (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

Laufpuffer (10x)

Tris	30,3 g
Glycin	144,0 g
SDS	10,0 g
H ₂ O bidest	ad 1000 ml

14.3.2.2 Durchführung

Zur Auftrennung denaturierter Gele wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese mit vertikalen SDS- Polyacrylamidgelen durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration des Trenngels lag im Normalfall bei 10%, die des Sammelgels bei 3%, wurde aber in Abhängigkeit von der Probe variiert. Der Gellauf erfolgte für 40 min in einer Mini-PROTEAN® 3- Cell- Apparatur (Bio-Rad, München) bei 200V. Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit einem Fünftelvolumen Auftragspuffer (5x) versetzt und 7 min im Wasserbad gekocht. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Protein- Leiter als Standard auf das Gel aufgebracht.

14.3.2.3 Coomassie- Färbung und Trocknung von Proteingelen

Zur Färbung und Trocknung von Proteingelen wurde das Gel folgenden Schritten der Reihe nach unterzogen:

Entfernen des Laufpuffers (10 min)

Methanol	50% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

Coomassie- Färbung (15- 30 min)

Coomassie brilliant blue R250	0,2% (w/v)
Methanol	50% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

Waschen (5 sec)

Ethanol	70% (v/v)
---------	-----------

Entfärben (üN)

Methanol	10% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

oder (opt.): Entfärben des Gels in der Mikrowelle: Dazu wurde das Gel nach dem Ethanolwaschschritt in eine Kristallisierschale mit H₂O bidest gegeben und in der Mikrowelle (höchste Stufe) ca. 10 min gekocht.

Trocknung

Das Gel wurde nach der Entfärbung gut gewässert (mind. 15 min), auf Whatman- Papier gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und in einer Trocknerapparatur (Drygel Sr. Slab Gel Dryer Model SE 1160, Hoefer scientific instruments, San Francisco, USA) getrocknet.

14.4 Western Blot

14.4.1 Transfer von Proteinen auf eine PVDF- Membran

Towbinpuffer

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20% (v/v)
H ₂ O bidest	ad 1000 ml

Für den Transfer von Proteinen wurde das SDS- Gel zusätzlich mit einem Prestained- Proteinmarker bestückt. Der Transfer von Protein aus SDS- Polyacrylamidgelen auf eine PVDF- Membran erfolgte mittels elektrischem Feld in einer Blot- Apparatur (Semi- Dry, Bio-Rad, München) gemäß den Angaben des Herstellers. Vor dem Blot musste die kurz in Methanol getauchte Membran gemeinsam mit dem Gel und den benötigten Whatman 3MM- Filterpapieren für 15 min in einem frisch hergestellten, vorgekühlten Towbinpuffer äquilibriert werden. Die Blot- Dauer betrug 45 min bei 15V. Der erfolgreiche Transfer der Proteine wurde durch eine anschließende Coomassie- Färbung oder Ponceau S- Färbung der Membran kontrolliert. Die Membranen konnten bis zum Gebrauch in Plastikfolie verpackt bei -20°C gelagert werden.

14.4.2 Ponceau S- Färbung

Um auf Membranen transferierte Proteinbanden reversibel zu färben, wurden diese eine Minute mit einer Ponceau S- Lösung (0,2%, w/v) in 3% TCA (v/v) gefärbt (Salinovich und Montelaro, 1986). Anschließend wurde durch Waschen mit H₂O bidest der Hintergrund entfärbt (3-20 min). Durch weiteres Waschen konnte die Membran vollständig entfärbt werden.

14.5 Nachweis einer Protein- Glykosilierung

14.5.1 Periodat- Schiff- Färbung

Die Periodat- Schiff- Färbung (PAS- Färbung) wurde wie bei Segrest und Jackson (1972) beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde Avidin verwendet, das in der gleichen Konzentration wie die zu untersuchende Proteinlösung eingesetzt wurde.

14.5.2 PNGase F- Behandlung

PNGase F (N-Glycosidase F) ist ein Enzym, welches nahezu alle Arten von N- Glykanen von Glycoproteinen abspaltet (Maley et al., 1989; Plummer und Tarentino, 1991). Im Fall einer erfolgten Abtrennung von Glykanen würde ein Band- Shift auf dem SDS- PAGE Gel auftreten, da unglykosilierte Proteine im allgemeinen schneller wandern. Die Behandlung der Proteinlösung mit PNGase F wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt; als Positivkontrolle wurde Ovalbumin verwendet.

14.6 Sequenzierung von Proteinen durch Edman- Abbau

Die Sequenzierung der Hami- Proteinbande wurde durch die AG Prof. Dr. Deutzmann (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Regensburg) durchgeführt. Eine direkte, N-terminale Ansequenzierung des Hamiproteins, ausgehend von einer geblotteten Bande, war nicht erfolgreich. Aus diesem Grund musste das Protein nach einem vorgegebenen Protokoll (Deutzmann, pers. Mitt.; modifiziert nach Stone et al., 1989; Allen, 1989) aufgetrennt und tryptisch verdaut werden.

Die Proteine wurden zunächst in einem 10- prozentigen Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt (s. II.14.3.2.3). Die gewünschten Proteinbanden wurden knapp ausgeschnitten, das Volumen der Stücke abgeschätzt und in Eppendorf- Reaktionsgefäßen gesammelt. Anschließend wurden die Gelstücke aufeinanderfolgend mit den angegebenen Substanzen (jeweils 2 ml, jeweils 30 min) unter Schütteln inkubiert: 2x NH₄CO₃ (0,2 M), NH₄HCO₃ (0,2 M)/Acetonitril (25%, w/v), Acetonitril (25%, w/v), Acetonitril (50%), Acetonitril (100%). Danach wurden die Gelstücke bei Raumtemperatur getrocknet und über Nacht bei 37°C mit Trypsin in 0,2M NH₄HCO₃ (1 µg Trypsin pro 100 µl Gel) inkubiert (Gesamtpuffermenge: 1,5 x Ursprungsvolumen der Gelstücke). Die Zugabe dieses Puffers erfolgte dabei in zwei gleich großen Portionen (15 min Abstand), wobei der erste Teil das gesamte eingesetzte Trypsin enthielt. Die Extraktion der entstandenen Spaltprodukte erfolgte durch Zugabe von 500 µl TFA (5%, w/v) für 1 h. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, beim zweiten Mal wurde TFA (5%, w/v) mit Acetonitril (1:1) eingesetzt. Die drei Überstände wurden vereint und

lyophilisiert (Lyophylle Christ Lmc-1 Beta1-16, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode). In einer folgenden HPLC wurden die Peptide aufgetrennt.

15. Immunologische Methoden

15.1 Produktion von spezifischen Antikörpern

SM1 Euryarchaeon- spezifische, polyklonale Antikörper wurden durch die Fa. Davids Biotechnologie (Regensburg) hergestellt. Für die Produktion SM1- spezifischer Antikörper wurde zunächst eine Aufreinigung einer Netzpopulation mittels Percoll- Gradienten durchgeführt (s. II.4). Wie durch FISH nachgeprüft wurde, ergab sich eine Reinheit von 99% der SM1 Euryarchaeen, wobei mehr als 90% der Zellen ein aktives Membranpotential aufwiesen. 2×10^8 Zellen wurden in $3 \times 300 \mu\text{l}$ - Portionen aufgeteilt. Eine Portion wurde sofort einem Huhn gespritzt, die Fraktionen 2 und 3 wurden mit 2% DMSO versetzt und bis zum Verbrauchsdatum tiefgefroren. Die Antikörper wurden mittels DabioPrepI aus 20 Immuneidotern gewonnen. Es konnte nach der Affinitätschromatographie (1ml Azalacton- EMD; VWR, Darmstadt) ein Serum (anti- SM1- Serum) mit 0,7 mg/ml Protein bereitgestellt werden.

Um den Erfolg der Immunisierung zu überprüfen, wurde ein Präimmenserum für dementsprechende Tests zur Verfügung gestellt.

15.2 Lösungen

PBST

PBS- Puffer	1x
Tween20	0,05% (v/v)

TBST

Tris/HCl, pH 7,6	0,242% (w/v)
NaCl	0,8% (w/v)
Tween20	0,1% (v/v)

TBSTB

TBST, incl. 5% Trockenmilchpulver (w/v)

4- Chlornaphtol- Lösung

Tris/HCl, 50 mM, pH 7,5	10 ml
H ₂ O ₂ (30% , w/v)	10 μl
4- Chlornaphtol (30 mg/ml Ethanol)	100 μl

Die Lösung wurde erst kurz vor Verwendung hergestellt. Die 4- Chlornaphtol Stammlösung konnte bei -20°C gelagert werden.

15.3 Immuno- FISH

Im Gegensatz zur Durchführung einer herkömmlichen FISH (s. II.13.5) wurden die Zellen nur mit der halben Menge an Fixierungslösung fixiert. Die Menge an eingesetzten Oligonukleotidsonden wurde hingegen verdoppelt. Nach der Hybridisierung (Dauer: 35 min) wurde der Objektträger mit den Proben wie unter II.13.5 beschrieben 15 min in Waschpuffer gewaschen, mit destilliertem Wasser gespült und mit Hilfe von Druckluft getrocknet. Die Immunmarkierung wurde bei 37°C in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, und alle notwendigen Lösungen wurden vorgewärmt.

Auf jedes Feld des Objektträgers wurden zunächst 16 µl PBST- Puffer (Blocking- Schritt) aufgetragen. Nach 15 min wurde der Puffer mit Hilfe einer Pipette abgezogen und durch 16 µl einer Primäantikörperverdünnung in PBST ersetzt. Die optimale Verdünnungsstufe der Primäantikörper wurde durch eine Verdünnungsreihe (1:100 bis 1:20000) bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde der Objektträger in PBST gewaschen (15 min), mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet. Anschließend erfolgte die Markierung mit einem sekundären, fluoreszenzfarbstofftragenden Antikörper (anti- Huhn IgY, CY3 oder FITC markiert). Auch in diesem Fall musste die optimale Antikörper-Verdünnung durch eine Reihe (1:500- 1:10000) bestimmt werden. 16 µl einer solchen Lösung wurden wiederum für 1 h zur Inkubation auf die Spots gegeben. Danach wurde der Objektträger zweimal 15 min in PBST gewaschen. Nach Abspülen und Trocknung wurde der Objektträger mit Citifluor überschichtet und mikroskopiert.

Als Negativkontrolle wurden die Zellen ausschließlich mit sekundären Antikörpern inkubiert.

15.4 Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie

Um Immunreaktionen an Zellen für das Elektronenmikroskop sichtbar zu machen, wurden goldmarkierte anti- Huhn- Antikörper verwendet. Die Zellen (in KPH) wurden mit der entsprechenden Verdünnung des primären Antikörpers versetzt und 2 h bei 4°C unter sanfter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation 1x gewaschen (Eppendorf- Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor 14000 Upm, 10 min, 4°C). Es folgte eine Markierung mit den sekundären Antikörpern (anti- Huhn IgY 12 nm Gold, 2h, 4°C). Der anschließende Waschschrift wurde 2x durchgeführt. Die markierten Zellen wurden nun für die Elektronenmikroskopie präpariert (s. II.7.1).

15.5 Immuno- Blot

Die zu untersuchenden Proteine wurden zunächst einem Western Blot unterzogen (s. II.14.4). Für den Blocking- Schritt wurden die Membranen kurz in Methanol regeneriert und anschließend bei 4°C für 14 h in TBSTB inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal in TBST (jeweils 10 min) gewaschen und daraufhin in TBSTB überführt, der die primären Antikörper (Verdünnung 1:10000) enthielt. Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 20°C. Nach wiederum drei Waschschriften mit TBST, wurde die Membran für 2 h (20°C) mit einer 1:10000 Verdünnung von sekundären, mit Merrettich- Peroxidase markierten Antikörpern (in TBSTB) behandelt. Die Membran wurde erneut dreimal in TBST gewaschen und die proteingebundenen Antikörper wurden mittels einer 4- Chlornaphtol- Lösung detektiert. Die Einwirkdauer betrug zwischen 10 und 30 min und war abhängig von der entwickelten Farbintensität. Die Färbung wurde durch Waschen in destilliertem Wasser gestoppt. Bei der Verwendung von sekundären Antikörpern mit alkalischer Phosphatase wurde die Farbentwicklung durch NBT/BCIP- Detektionspuffer (s. II.17.5.3) hervorgerufen.

15.6 Antikörper- Affinitätsreinigung

Für die Affinitätsreinigung wurde zunächst Hami- Protein vom SDS- PAGE- Gel auf PVDF- Membranen geblottet (s. II.14.4). Das 120 kDa Hami- Protein wurde durch Färbung mit Ponceau S identifiziert und präzise ausgeschnitten. Die erhaltenen Membranstücke wurden in einem Eppendorf- Reaktionsgefäß gesammelt. Als Negativkontrolle diente ein leeres Membranstück entsprechender Größe. Für das Blocking wurden die Membranstücke in TBSTB (14h, 4°C) inkubiert und anschließend mit anti- SM1- Serum (1:1000 in TBSTB) behandelt (3 h, 20°C). Nach dreimaligem Waschen in TBST (je 10 min) wurden die Membranstücke zur Ablösung der Antikörper in ein Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt, welches 1 ml 100 mM Triethylamin (pH 11,5) enthielt. Nach 15 min wurde die Lösung durch die Zugabe von 0,1 ml 1M Tris/HCl (pH 8,0) neutralisiert. Eine Ablösung der Antikörper durch 3M MgCl₂ oder 100 mM Glycin/HCl (pH 2,5) brachte nicht den gewünschten Erfolg.

Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden durch die Verwendung von Centricon YM-30- Filtern gemäß Herstellerangaben konzentriert und gewaschen.

16. Physikalisch- biochemische Untersuchungen zur Hamistabilität

Adhäsionskraftstudien einzelner Zellen wurden mittels eines computergestützten inversen Mikroskops durchgeführt, das mit einem Nd:YAG- Laser ausgestattet war. Die Emissionswellenlänge des Lasers lag bei 1064 nm und die maximale Ausgangsleistung bei 2,5 Watt (Huber et al., 1995; Huber und Stetter, 2001). Durch ein Öl- Immersionsobjektiv kann der Laserstrahl auf eine Größe von weniger als 1 µm fokussiert werden. Dadurch ist es möglich, Zellen im Lichtstrahl einzufangen und einzelne Zellen dreidimensional im Raum zu manipulieren ('optische Pinzette'; Ashkin und Dziedzic, 1987; Ashkin et al., 1987).

Bind- Silan- Lösung

Bind- Silan	15 µl
Ethanol	12 ml
Essigsäure (10%, w/v)	375 µl

Für Zelladhäsionsstudien wurden Glasobjektträger verwendet, welche mit Polylysin, Polyglutamat, Gelatine, BSA, Laminin, Fibronectin (jeweils 0,1%, w/v Endkonzentration in KPH) oder einer Bind- Silan- Lösung beschichtet wurden. 10 µl einer SM1- Zellsuspension wurden auf jedes Oberflächenmaterial gespottet und nach kurzer Sedimentationsdauer mit einem Deckglas bedeckt. Die Glasobjektträger wurden auf einer speziellen Halterung des Lasermikroskops befestigt und einzelne, adhärenierte Zellen im Laserstrahl gefangen. Zur Analyse der Stabilität isolierter Hami wurden diese zunächst 1h bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Der Einfluss hoher oder niedriger pH- Werte wurde bei RT untersucht; nach der Inkubationszeit wurde der pH- Wert der Proben wieder auf 7,0 zurückgestellt. Der Effekt verschiedener Behandlungen wurde elektronenmikroskopisch überprüft. Der Effekt von Proteinase K, Protease (Subtilisin A), Pronase und Trypsin wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Dazu wurden Hami- Präparationen mit diesen Enzymen inkubiert (1h bei 37°C für Proteinase K, Protease und Pronase bzw. bei 25°C für Trypsin); als Positivkontrolle wurde BSA verwendet.

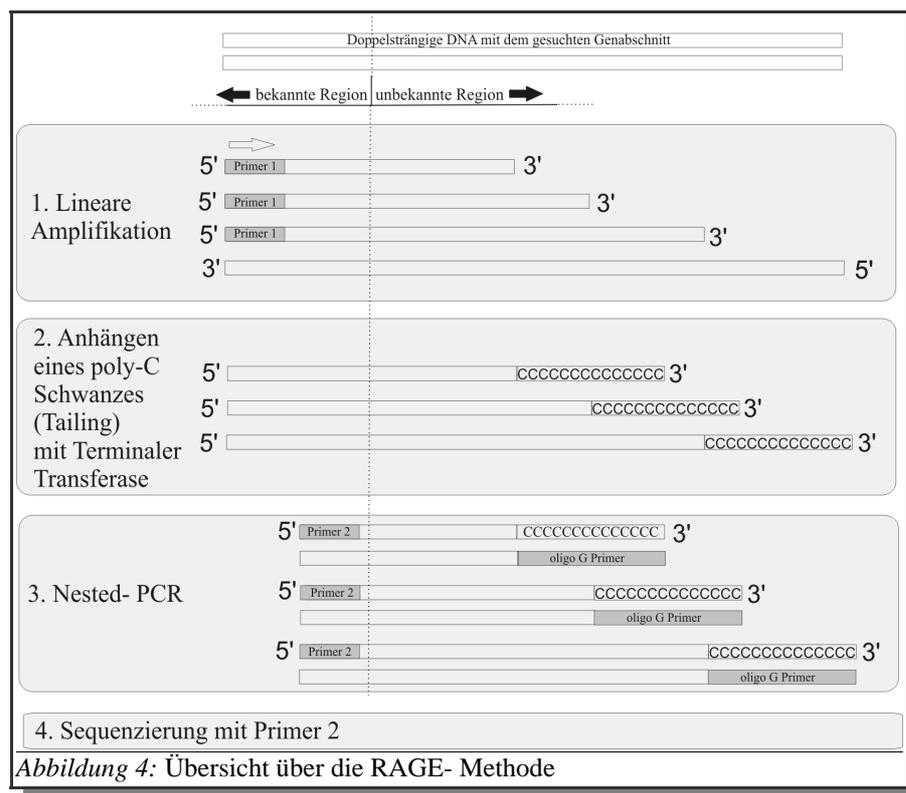
17. Molekulargenetische Methoden

17.1 Primerkonstruktion

Die Analyse und Sequenzierung von Genen erfordert die Konstruktion stets neuer und spezifischer Primer. Dafür wurden mittels Datenvergleich im Software- Programm BioEdit (Hall, 1999) Sequenzabschnitte ausgewählt, welche mindestens 18 Nukleotide lang waren und einen G+C- Gehalt von 40- 60% aufwiesen. Die Spezifität der Primer wurde durch die Bearbeitung sich überlappender Sequenzbereiche sichergestellt.

17.2 RAGE (Rapid Amplification of Genomic Ends, modifiziert)

Auf der Grundlage einer Methode, welche für die Klonierung von Sequenzflanken beschrieben wurde (Rudi et al., 1999; Cormack und Somssich, 1997), wurde ein Protokoll entwickelt, das unabhängig von Restriktionsverdau und Klonierung die Erfassung unbekannter up- und downstream- gelegener Sequenzen erlaubt. Dabei werden, ausgehend von einer kurzen, bekannten genomischen Sequenz die flankierenden Seiten durch ein Primerwalking ohne spezifischen Gegenprimer erfasst (Abb. 4).



17.2.1 Lineare Amplifikation

Für diesen Vorgang wurde eine Standard- PCR (s. II.9) mit 30 Zyklen durchgeführt, jedoch wurde nur ein Primer eingesetzt. Das Ergebnis dieser PCR wurde auf einem Gel überprüft und war als unscharfe Bande darauf erkennbar. Anschließend wurde das PCR- Produkt mittels Microcon- Filtern gereinigt (s. II.10.2.1.2).

17.2.2 Transferase- Reaktion

Zur Addition eines Poly- C- Schwanzes an die Enden der PCR- Amplifikate wurde folgender Ansatz pipettiert:

5x Transferase- Reaktionspuffer	1 μ l
PCR- Produkt	2- 5 μ l
dCTP (2,5 mM)	0,5 μ l
Transferase	1,5 μ l (30 U)
LiChrosolv H ₂ O	ad 15 μ l

Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C und anschließend, zum Abstoppen der Reaktion, 10 min bei 70°C inkubiert.

17.2.3 Nested PCR

Zur Amplifikation wurden nun ein polyG- (s. II.9.2) und ein weiter innen liegender Primer (Nested Primer) verwendet. Durch die Verwendung dieses zweiten Primers wurde eine spezifische Reaktion gewährleistet.

Es wurde eine Standard- PCR (s. II.9) durchgeführt; für die Amplifikation wurden 2,0 bis 5,0 μ l des Transferase- Produkts eingesetzt. Das Produkt wurde anschließend gelelektrophoretisch überprüft, über Microcon 100- Filter gereinigt (s. II.10.2.1.2) und die Konzentration mittels Ethidiumbromidplatte (s. II.8.3.2) bestimmt. Zur Sequenzierung wurde der Nested Primer verwendet.

17.3 Restriktionsverdau der DNA

Die DNA- Isolierung erfolgte wie unter II.8.2 beschrieben. Die hochmolekulare Struktur der DNA wurde auf einem 1- prozentigen Agarosegel überprüft (s. II.9.3). Für den Restriktionsverdau wurde die DNA für ca. 3 h bei 37°C mit folgenden Enzymen behandelt: TspI, NarI, AvrII, PruII, SpHI, BglII, BsaHI, BspEI, BspDI, NcoI, NdeI, EcoRI, SacI, KpnI, BsrGI, NheI, XbaI, XhoI, EcoRV, HincII, PstI, PvuI, BsaHI, HaEII, SnaBI. Der Erfolg des Restriktionsverdaus wurde auf einem Agarosegel (1%, w/v) überprüft.

17.4 Southern- Blot

17.4.1 Vorbehandlung des Gels

Denaturierungslösung

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Neutralisierungslösung

NaCl	1,5 M
Tris/HCl, pH 7,2	0,5 M
EDTA, pH 8,0	1 mM

Das Gel mit den aufgetrennten DNA- Fragmenten und einem DIG- markierten Standard wurde zunächst dokumentiert (EasyStore Imaging System, Herolab GmbH, Wiesloch). Zur Depurinierung der DNA wurde das Gel zunächst 15 min in 0,25 M HCl unter leichtem Schütteln inkubiert (RT) und anschließend 30 min mit Denaturierungslösung geschüttelt. Danach wurde es mit Neutralisierungslösung 2x 15 min inkubiert.

17.4.2 Kapillarblot

20x SSC- Puffer

NaCl	3 M
Na ₃ - Citrat, pH 7,0	0,3 M

Für den Southern- Blot wurden zunächst zwei Lagen Filterpapier (Whatman 3MM) mit 20x SSC befeuchtet und als 'Brücke' über eine Glasplatte gelegt; dabei tauchten beide Enden des Papiers in ein mit 20x SSC gefülltes Pufferreservoir ein. Nun wurde das Gel auf das feuchte Filterpapier gelegt und seine Ränder mit Parafilm abgedeckt. Es wurde ein zurecht- geschnittenes Stück Nylonmembran auf das Gel gelegt (luftblasenfrei), hierauf 2- 4 Filterpapiere, ein Stapel Papierhandtücher, eine Glasplatte und ein 1-2 kg schweres Gewicht. Der Transfer erfolgte dann ca. 16- 24 h bei RT. Anschließend wurde die Membran bei RT getrocknet und zur Fixierung 5 min mit der DNA- Seite nach unten auf einen UV- Schirm gelegt.

17.5 DNA- Hybridisierung mit DIG- markierten Sonden

17.5.1 Herstellung DIG- markierter Sonden

Während der PCR kann Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP) durch die Taq- Polymerase in das entstehende PCR- Produkt eingebaut werden. Durch den Einsatz genspezifischer Primer können Sonden produziert werden, welche eine qualitativ und quantitativ hochwertige Markierung erlauben. Zur Herstellung einer gewünschten DNA- Sonde wurde eine Standard- PCR pipettiert (s. II.9) und lediglich 0,5 µl einer DIG- dUTP- Lösung zugegeben.

Nach Durchführung der Amplifikation wurde das Ergebnis auf einem 1- prozentigen Agarosegel (incl. EtBr) überprüft. Die Bande des PCR- Produkts mit eingebautem DIG- dUTP zeigte dabei einen Bandshift: Sie lag höher als die des PCR- Produkts ohne dUTP. Die DIG- markierten PCR- Produkte wurden bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

17.5.2 DNA- Hybridisierung

2x Waschlösung

SSC- Puffer	2x
SDS	0,1% (w/v)

0,5x Waschlösung

SSC- Puffer	0,5x
SDS	0,1% (w/v)

Für die Prähybridisierung wurde die Membran in 20 ml DIG Easy Hyb- Hybridisierungspuffer gelegt und für 1h bei 40°C in einem verschlossenen Plastikgefäß unter Schütteln inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die DIG- markierte Sonde in einem kochenden Wasserbad 10 min denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Ablauf der Inkubationszeit (1 h) wurde der Prähybridisierungspuffer durch 10 ml eines vorgewärmten DIG Easy Hyb- Hybridisierungspuffers (incl. 50 ng DIG- markierter Sonde) ersetzt. Die Hybridisierung wurde üN bei 40°C durchgeführt. Anschließend wurde

die Membran zweimal 5 min in 2x Waschlösung geschüttelt (RT), um ungebundene Sonden abzuspülen. Abschließend wurde die Membran zweimal für 15 min in 0,5x Waschlösung bei 68°C geschüttelt.

17.5.3 Detektion mittels anti- DIG- AP- Antikörpern

NBT/BCIP- Detektionspuffer

Tris, pH 9,5	0,1 M
MgCl ₂	0,05 M
NaCl	0,1 M

10 ml dieser Lösung wurden frisch mit 75 µl NBT/BCIP Stammlösung versetzt.

Nach der Hybridisierung und den Waschschritten wurde die Membran in TBST- Puffer (s. II.15.5) kurz äquilibriert und anschließend in TBSTB- Puffer (s. II.15.5) unter leichtem Schütteln ün bei 4°C geblockt. Nach einem kurzen Waschschriff (10 min, RT, TBST) wurde die Antikörperreaktion in TBSTB- Puffer (Antikörperverdünnung 1:10000) 1h lang bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min in TBST- Puffer (RT) geschüttelt, um ungebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Detektion erfolgte mittels NBT/BCIP; dabei wurde die Membran möglichst ohne Schütteln bis zur vollständigen Entwicklung der Banden in NBT/BCIP- Detektionspuffer bei RT inkubiert (ca. 1-7 h).

17.6 Analyse des mRNA- Pools

17.6.1 Isolierung der RNA

Die Isolierung des RNA- Pools aus SM1 Euryarchaeon- Fraktionen wurde mittels RNeasy Mini Kit durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die mikrobielle Probe möglichst frisch verarbeitet wurde. Während der Isolierungsprozedur wurde ein DNA- Verdau mit DNaseI durchgeführt, wodurch sichergestellt werden konnte, dass keine DNA- Fragmente das Ergebnis beeinträchtigen.

17.6.2 Amplifikation von RNA (RT- PCR, Reverse Transkription)

Die cDNA- Erststrangsynthese wurde mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit nach Anweisung des Herstellers durchgeführt:

RNA	4 µg
Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl)	1 µl
LiChrosolv H ₂ O	ad 12 µl

Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt, kurz anzentrifugiert, anschließend bei 70°C für 5 min inkubiert und danach auf Eis abgekühlt.

Dem Ansatz wurden folgende Substanzen zupipettiert:

5x Reaktionspuffer	4 µl
Ribonclease Inhibitor (20U/µl)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	2 µl

Wieder wurde gut durchmischt und kurz anzentrifugiert. Nach einer Inkubationsdauer von 5 min bei 25°C, wurde

RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (200U/µl)	1 µl
---	------

zugegeben. Die Mixtur wurde 10 min bei 25°C und anschließend für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Aufheizen auf 70°C (10 min) abgestoppt. Diese cDNA konnte nun direkt für eine Amplifikation durch PCR eingesetzt werden.

Als Primer wurden die im Kit enthaltenen Random Hexamer Primer verwendet, welche eine cDNA-Synthese über die gesamte Länge der RNA ermöglichen.

17.6.3 PCR zur Detektion gesuchter RNA- Abschnitte

Die erhaltene cDNA wurde zur Amplifikation gesuchter Genabschnitte verwendet. Dazu wurde eine Standard- PCR (s. II.9) mit genspezifischen Primern durchgeführt. Das Ergebnis wurde auf einem 1-prozentigen Agarosegel (w/v) überprüft und sequenziert.

18. Klonierung und Expression

18.1 Klonierung von DNA- Fragmenten für die Expression

18.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

TFB1

KAc	1,472 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,0 g
RbCl	6,046 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,15 g
Glycerin	15,0 ml
H ₂ O bidest	ad 500 ml

Der pH- Wert wurde mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

TFB2

MOPS	1,075 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5,5 g
RbCl	0,605 g
Glycerin	75 ml
H ₂ O bidest	ad 500 ml

Der pH- Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Der gewünschte *E. coli*- Stamm wurde in 100 ml LB- Medien bis zu einer OD₅₅₀ von ungefähr 0,5 bei 37°C gezogen. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (Sorvall RC-5C+, SS34-Rotor, 2500 Upm, 5 min, 4°C). Das resultierende Pellet wurde anschließend in 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer aufgenommen und 90- 120 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 2000 Upm (5 min) wurden die Zellen vorsichtig in 4 ml TFB2- Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 60 µl DMSO in 100 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

18.1.2 Einführung von Restriktionsschnittstellen

Zur Konstruktion von Expressionsklonen mussten die gewünschten DNA- Fragmente in einem definierten Leseraster in entsprechende Expressionsvektoren eingebracht werden. Dazu wurden neue Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'- Ende des proteinkodierenden DNA- Abschnitts eingeführt. Zu diesem Zweck wurden Primer konstruiert, die die gewünschte Restriktionsschnittstelle (in diesem Fall für NdeI und EcoRI) im richtigen Raster enthielten (s. Anhang). Um Fehler durch Taq- Polymerase erzeugte Basenaustausche auszuschließen, wurden die in die Vektoren eingefügten PCR- Produkte sequenziert.

18.1.3 Ligation und Klonierung

Zunächst wurde von genomischer SM1- DNA das Gen für eine Amplifikation mit den Restriktionsschnittstellen- tragenden Primern (khookrevlo und khookf, s. Anhang) abgegriffen. Das erhaltene PCR- Produkt wurde mittels des Qiagen PCR- Cloning Kits gemäß Herstellerangaben in den Vektor pDrive kloniert. Durch ein Blau- Weiß- Screening wurden positive Klone identifiziert. Die Länge deren Inserts wurde durch ein PCR- Screening überprüft. Über die Sequenzierung des Plasmidinserts wurde ein Klon ausgewählt, welcher die richtige und vollständige Sequenz des Gens trug. Ausgehend von der Plasmid- DNA dieses Klons wurde durch die Restriktionsenzyme NdeI und EcoRI das Gen- Sequenzstück ausgeschnitten, über ein Agarosegel (1%, w/v) gereinigt und mittels Qiaquick Gel Extraction Kit eluiert.

Dieses Stück wurde nun mit Hilfe des Quick- Ligations Kits nach Anweisungen des Herstellers in den Expressionsvektor pET28a ligiert und dadurch mit einem C- und N- terminalen His- Tag fusioniert. Für die Transformation (s. II.18.1.4) wurde *E. coli*- Stamm JM109 (Promega, Madison, USA) verwendet. Für die Plattierung und Anzucht der Klone in Flüssigmedium wurde dem LB- Medium 0,1% Glucose (w/v, zur Unterdrückung einer geringen Expression) und Kanamycin (selektiver Faktor für pET28a, 30µg/ml) zugesetzt. Positive Klone wurden durch PCR- Screening identifiziert. Gewonnene Plasmid- DNA einer ausgewählten Klonkultur wurde für die Transformation in die Expressionsstämme verwendet.

18.1.4 Transformation von *E. coli*

SOC- Medium

Trypton- Pepton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,186 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Das Medium wurde abgefüllt und autoklaviert. Direkt vor Gebrauch wurden 10 mM MgCl₂ und 20 mM Glucose (Stammlösungen jeweils 1 M, sterilfiltriert) zugegeben.

Die kompetenten Zellen (100µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid- DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock bei 42°C (90s) wurden die Zellen erneut 5 min auf Eis inkubiert, dann mit 500 µl warmem SOC- Medium versetzt und für 1h bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. 100 µl der Suspension wurden nun auf LB- Platten ausgespatelt, auf die vorher eine vektorentsprechende Antibiotikallösung aufgebracht worden war (Ampicillin für Vektor pDrive bzw. Kanamycin für Vektor pET28a), und üN bei 37°C inkubiert. Positive Klone wurden durch PCR- Screening (s. II.10.2.3) mit Insert- spezifischen Primern erfasst. Plasmid- DNA wurde aus LB- Flüssigkulturen wie unter II.10.2.5 angegeben isoliert.

18.2 Expression von Proteinen in *E. coli*

18.2.1 Verwendetes Expressionssystem

Zur Expression wurde das pET Vektor- System verwendet. Das zu exprimierende Gen wird hier unter die transkriptionelle Kontrolle des T7- Promotors kloniert, der von T7- RNA- Polymerase erkannt wird. Durch die Zugabe von IPTG ins Medium (Induktion) wird die Expression von T7- RNA- Polymerase ausgelöst, was wiederum die Expression des eingeschleusten Fremdgens zur Folge hat.

Zur Transformation wurden die *E. coli*- Stämme BL21 (DE3) paCYC- RIL, C43 (DE3) paCYC- RIL und C43 (DE3) WALKER verwendet. Diese Stämme wurden von Dr. Sonja Koning und Christina Moulakakis¹¹ zur Verfügung gestellt.

18.2.2 Durchführung der Proteinexpression

NZA- Medium

Casamino acids	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	7,5 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Zur Expression wurden 50 ml NZA- Medium mit Kanamycin (30 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml, bei paCYC- tragenden *E. coli* Stämmen) mit 2 ml einer frischen Transformandenkultur (O.D. 0,6) beimpft und bei 37° bzw. 23°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde mit 1mM IPTG (Endkonzentration) induziert und stündlich eine Probenentnahme, zur Messung der OD und Mikroskopie, durchgeführt. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden abzentrifugiert (8000 Upm, 5 min, 4°C, Sorvall RC-5C+, SS34- Rotor) und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

¹¹ Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg

III. Ergebnisse

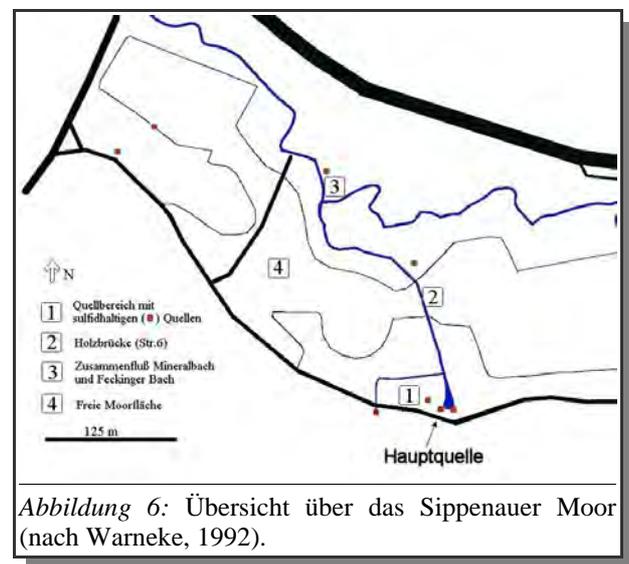
1. Zusammensetzung und Aufwuchsverhalten der mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft des Sippenauer Moors

1.1 Probenahmeort: Sippenauer Moor

Die Probenahme mikrobieller Perlenkettengemeinschaften und anderer Mikrobenverbände wurde im Bereich der Hauptquelle des Sippenauer Moors durchgeführt (Abb. 5 und 6, Probenahmeort: Str.1). Die Hauptquelle A (Abb. 7) bildet zusammen mit den beiden Nebenquellen (B1 und B2, Abb. 7, Rudolph, 2003) einen kleinen Bachlauf, der nach ca. 5 m in den großen Quelltopf mündet. Sobald das sulfidische Quellwasser durch Bodenunebenheiten verwirbelt und damit mit Sauerstoff angereichert wird, entstehen sichtbare mikrobielle Beläge an Steinen, Ästen, dem Bachbett und anderem festen Material. Diese Matten und Biofilme erscheinen meistens weiß, z.T. weiß-grün oder weiß-grau in ihrer Farbe.

Oft flottieren Streamer (Büschel von fädigen Mikroorganismen) von 0,5- 30 cm Länge (Abb. 8) und perlenkettenähnliche Strukturen

(s. Einleitung) im gesamten Quellbereich. Trotz der relativ konstanten chemischen und physikalischen Parameter des Quellwassers (Tab. 16) unterliegt die Bioaktivität in diesem Bereich großen Schwankungen: Quantität und Morphologie der mikrobiellen Matten sind jahreszeitlichen und klimatischen Änderungen unterworfen (Moissl, 2000).



<i>Parameter</i>	<i>Hauptquelle Sippenauer Moor</i>
Temperatur	10- 11°C
pH	~ 7,3
S ²⁻	0,5- 1,0 mg/l
O ₂	1,4 mg/l*
Leitfähigkeit	536 µS/cm*

*Tabelle 16: Parameter des Quellwassers,
* Daten aus Rudolph et al., 2004*



Abbildung 7: Übersicht über den Hauptquellbereich des Sippenauer Moors. Roter Kreis: Quelle A, grüner Kreis: Zusammenfluss von Quellen B1 und B2. Im Gegensatz zu den Quellen A und B2 wird bei Quelle B1 das sulfidhaltige Wasser ohne Verwirbelungen aus dem Erdreich an die Oberfläche gedrückt.



Abbildung 8: Flottierender Streamer im Hauptquellbereich des Sippenauer Moors. Länge ca. 25 cm.

1.2 Molekularbiologische Untersuchungen der bakteriellen Partner des SM1 Euryarchaeons in der mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft

In vorausgegangenen Untersuchungen wurden neben der SM1 Mikrokolonie bakterielle Filamentbildner als Hauptbestandteil der mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft nachgewiesen (Rudolph et al., 2001). Um einen besseren Einblick in die mikrobielle Diversität, Zusammensetzung und Architektur einzelner Perlen und derer Verbindungsfäden zu erhalten, wurden die bakteriellen Partner des SM1 Euryarchaeons mit einer Kombination aus Phasenkontrastmikroskopie, EDAX, phylogenetischen 16S rRNA- Gensequenzanalysen und FISH genauer untersucht.

1.2.1 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen und EDAX- Analysen

Einzelne Perlen wurden aus ihrem Biotop entnommen und im Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

Neben der archaeellen Mikrokolonie dominierten immer stäbchenförmige, unbewegliche, filamentbildende Mikroorganismen, die einen Zelldurchmesser von etwa 2 μm aufwiesen. Typisch für diese Organismen waren eine rosettenartige Wuchsform und die Einlagerung von großen Mengen lichtbrechender Granula (Abb. 9). Mittels Transmissions- Elektronenmikroskopie, kombiniert mit EDAX- Analysen, konnte nachgewiesen werden, dass es sich dabei um amorphen¹² Schwefel handelte (J. Raabe, pers. Mit.). Die gleiche Schwefelmodifikation konnte in den Zellen eines ebenfalls aus dem Sippenauer Moor stammenden *Thiothrix fructosivorans*- Isolats detektiert werden.

Neben den rosettenförmig angeordneten Mikroorganismen konnten durch Phasenkontrastmikroskopie weitere, morphologisch unterschiedliche Mikroben als Bestandteil einer Perle identifiziert werden. Jedoch machten diese nur einen geringen Anteil aus.

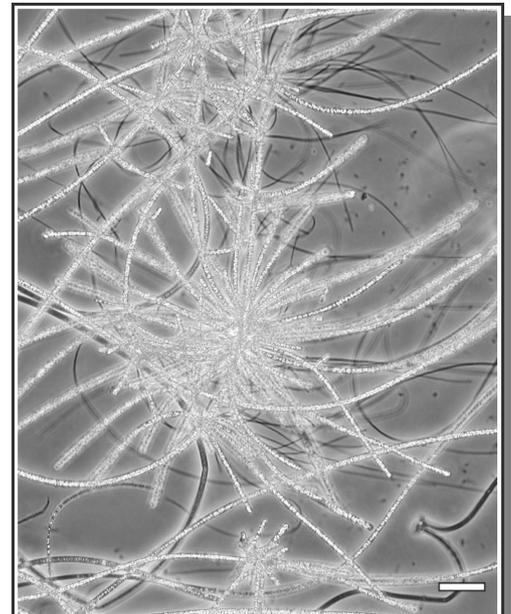


Abbildung 9: Phasenkontrastaufnahme des äußeren Teils einer Perle. Filamentöse, schwefeleinlagernde Mikroorganismen bilden eine Rosette. Maßstab: 20 μm . Aus: Moissl et al., 2002.

¹² amorph: regellos, nicht im Kristallzustand

1.2.2 Klonierung und phylogenetische Analyse des bakteriellen 16S rRNA-Genpools einer Perle

Bereits in Vorarbeiten wurde aus einer Perle die genomische DNA isoliert und einer detaillierten archaeell- phylogenetischen Analyse unterzogen (Rudolph et al., 2001; Rudolph, 2003). Diese Phylogenie hatte die Existenz eines einzigen archaeellen Phylotyps (SM1) gezeigt (Rudolph et al., 2001; vgl. Einleitung).

Zu Vergleichszwecken wurde dieselbe DNA für die bakteriell- phylogenetischen Analysen verwendet. Die Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA- Gene erfolgte mittels der Primer 9bF und 1406uR. Die erhaltenen Amplifikate wurden kloniert und letztendlich einer ARDRA unterzogen.¹³

Insgesamt wurden 134 Klone analysiert, welche über ARDRA und Sequenzierung 19 unterschiedlichen 16S rRNA- Gensequenzen zuzuordnen waren. Für die Sequenzierung wurden die Primer 9bF, 516uF und 1406uR verwendet.

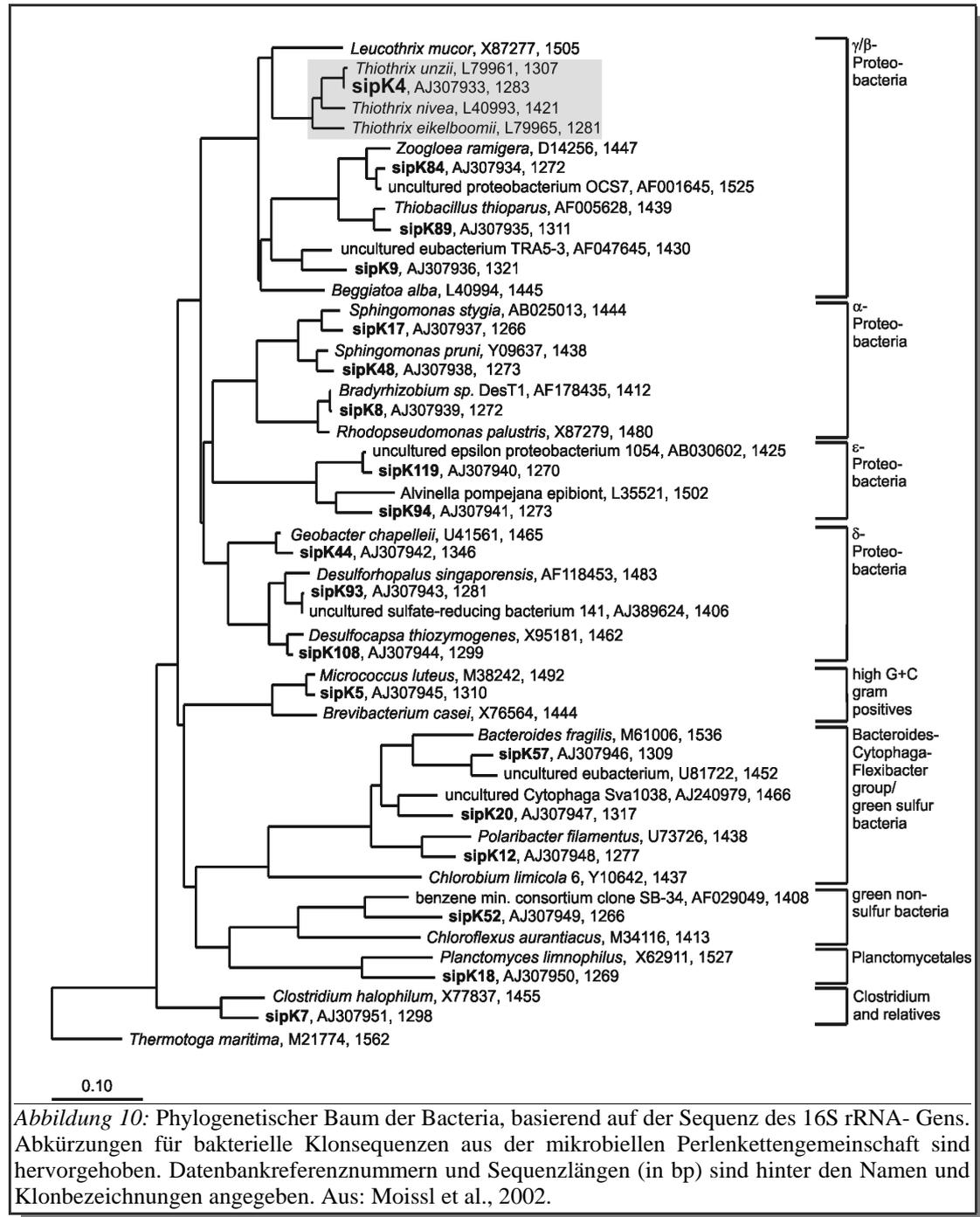
Nach der Einordnung der erhaltenen Sequenzen in einen phylogenetischen Stammbaum zeigte sich deren Zuordnung zu verschiedenen bakteriellen Phyla (Tab. 17).

<i>Anteil an Gesamt-Klonsequenzen</i>	<i>Phylogenetische Einordnung</i>
1,5%	Grüne Nicht- Schwefel- Bakterien (<i>Chloroflexaceae</i>)
2,2%	<i>Clostridium</i> und Verwandte
3,0%	β - <i>Proteobacteria</i>
3,0%	Gram- positive, High G+C
4,5%	ϵ - <i>Proteobacteria</i>
5,2%	δ - <i>Proteobacteria</i>
5,2%	α - <i>Proteobacteria</i>
6,0%	<i>Planctomycetales</i>
8,2%	<i>Bacteroides- Cytophaga- Flexibacter</i> Gruppe / grüne Schwefel- Bakterien (<i>Chlorobiaceae</i>)
61,2%	γ - <i>Proteobacteria</i>

Tabelle 17: Phylogenetische Verteilung der bakteriellen Klonsequenzen

Diese phylogenetische Position aller Klonsequenzen wurde durch drei verschiedene Baumrekonstruktionsmethoden verifiziert. Das Ergebnis der Maximum Parsimony- Analyse wird in Abbildung 10 gezeigt.

¹³ Diese Vorarbeiten wurden bereits in der Diplomarbeit (Moissl, 2000) durchgeführt, die eigentliche Analyse und Sequenzierung erfolgten jedoch erst in dieser Arbeit.



Die mit ca. 60% klar vorherrschende bakterielle Klonsequenz SipK4 konnte innerhalb der γ -Proteobacteria eingeordnet werden und wies große Verwandtschaft zu *Thiothrix unzii* auf. Unabhängige phylogenetische Untersuchungen einer zweiten Perle (etwa ein Jahr später) zeigten wiederum eine vergleichbare Dominanz dieser *Thiothrix*- Sequenz.

Da aus PCR- basierenden Daten keine Rückschlüsse auf die reale Quantität von *Thiothrix* SipK4 innerhalb der Perle gezogen werden können (Amann et al., 1995; von Wintzingerode et al., 1997; Cottrell und Kirchmann, 2000), mussten diese Ergebnisse durch FISH mit gattungsspezifischen Oligonukleotidsonden verifiziert werden.

1.2.3 Analyse des Aufbaus der mikrobiellen Perlenkettenstruktur mittels FISH

Auf Grundlage der erhaltenen *Thiothrix*- Sequenz wurde eine passende, gattungsspezifische Oligonukleotidsonde ausgewählt (TN1; Wagner et al., 1994a). Mit dieser Sonde wurden kleine Perlen (\varnothing bis 3,0 mm) untersucht. In Übereinstimmung mit den erhaltenen mikroskopischen Beobachtungen und phylogenetischen Daten zeigte die Mehrzahl der Bakterien mit dieser Sonde ein positives Hybridisierungssignal und gleichzeitig eine *Thiothrix*- typische, filamentöse Morphologie. Eine vergleichende DAPI- Färbung machte deutlich, dass die meisten Bakterien, die sich in direkter Umgebung zur archaeellen Mikrokolonie befanden, der Gattung *Thiothrix* zuzuordnen waren (Abb. 11). Ca. 30 einzelne Perlen wurden über den Zeitraum von etwa einem halben Jahr durch FISH untersucht und zeigten immer die selbe charakteristische Zusammensetzung aus kokkoiden SM1 Euryarchaeen und *Thiothrix* SipK4 als dem vorherrschenden Bakterium. Auch an und in den mikrobiellen Fäden, welche die einzelnen Perlen miteinander verbanden, war *Thiothrix* SipK4 häufig bestandsbildend.

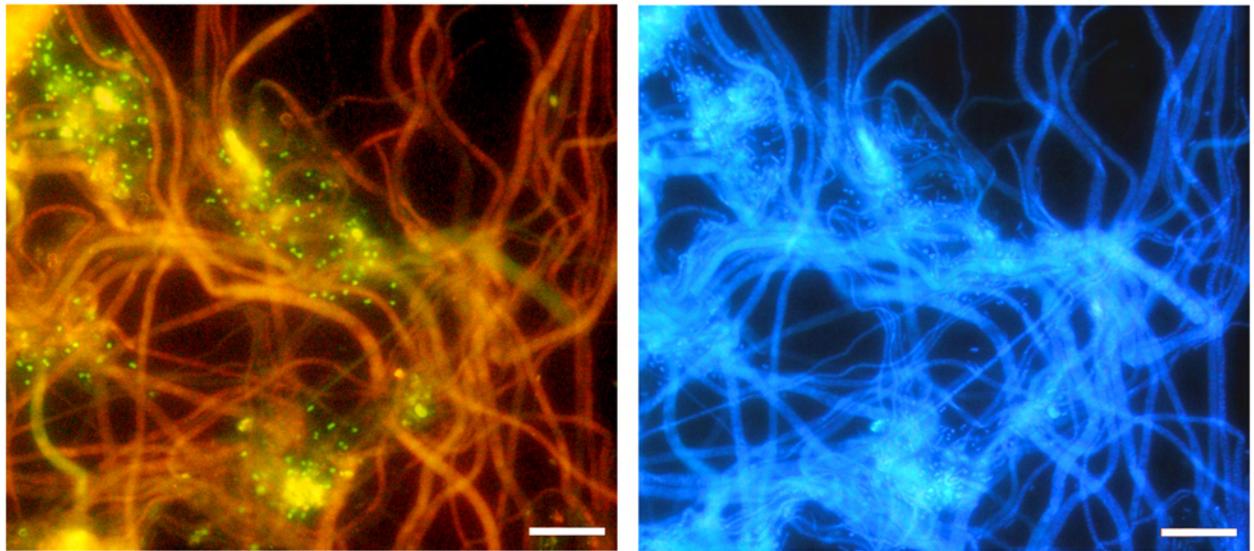


Abbildung 11: FISH eines Teils einer Perle.

Links: Epifluoreszenzaufnahme einer Zweifach- Hybridisierung mit einer mit Rhodamin- Green markierten archaeellen Oligonukleotidsonde (ARCH915) und einer CY3- markierten *Thiothrix*- spezifischen Sonde (TN1). Die archaeellen Kokken färben grün, *Thiothrix* färbt rot.

Rechts: Zugehörige DAPI- Färbung. Maßstab: 10 μ m. Aus: Moissl et al., 2002.

1.2.4 Analyse des dreidimensionalen Aufbaus einer Perle mittels CLSM

Für die Analyse des dreidimensionalen Aufbaus einer Perle wurde die konfokale Laserscanning- Mikroskopie herangezogen. Diese Methode eignet sich sehr gut für die Untersuchung biologischer Präparate, ohne deren Struktur und dreidimensionale Anordnung zu beeinträchtigen. Bei dieser Art der Mikroskopie werden 'out of focus'- Schichten ausgeblendet und dadurch optische Schnitte durch das Präparat angefertigt. Das Ergebnis sind leuchtkraftstarke Abbildungen dünner Schichten innerhalb eines Präparats. Weiterhin ist es möglich, durch die Anwendung von fluoreszenzfarbstofftragenden Sonden und Antikörpern gesuchte Mikroorganismen zu lokalisieren und die dreidimensionale Verteilung spezifischer Populationen zu untersuchen (Caldwell et al., 1993).

Für die Untersuchung einer FISH-gefärbten mikrobiellen Perle aus dem Sippenauer Moor wurde diese schon vorher unter strukturerhaltenden Bedingungen in 60 µm dicke Scheiben geschnitten, da eine Analyse der gesamten, 2 mm großen, kompakten Perle aufgrund zu hoher Lichtstreuung nicht möglich gewesen wäre.

Auch in diesem Fall konnte die räumliche Nähe der SM1-euryarchaeellen Mikrokolonie und *Thiothrix* sp. innerhalb einer Perle nachgewiesen werden (Abb. 12). Das filamentöse Bakterium umgab die archaeelle Mikrokolonie, welche den Kern der Perle bildete.

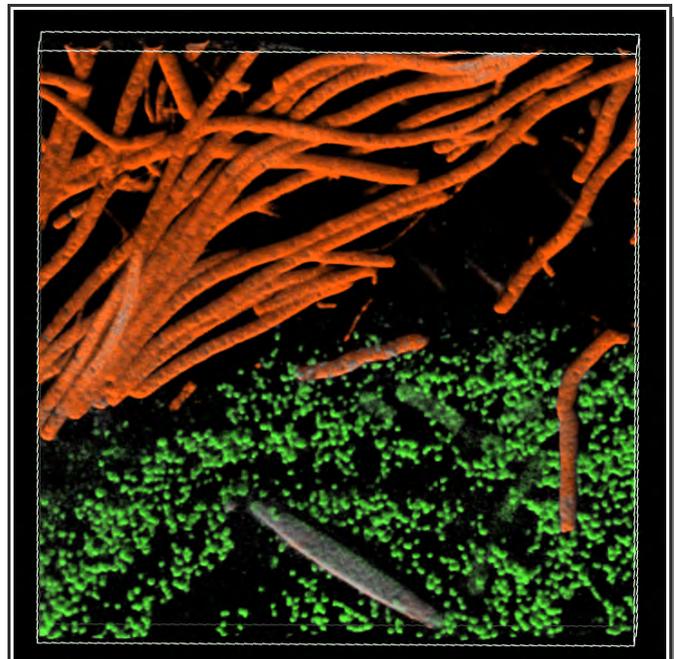


Abbildung 12: Projektion von CLSM- Aufnahmen (39,8x 36,9x 21,4 µm) aus dem inneren Bereich (ca. 200 µm unter der Oberfläche) einer Perle. *Thiothrix* ist durch eine spezifische Oligonukleotidsonde (TN1) rot gefärbt, die SM1 Euryarchaeen sind durch ARCHMix- Sonden grün gefärbt. Deutlich zeigt sich die räumlich nahe Beziehung der strukturbildenden mikrobiellen Partner.

1.2.5 Beteiligung weiterer Organismen an der Perlenkettengemeinschaft

Neben *Thiothrix* SipK4 konnten durch phylogenetische Analysen des 16S rRNA- Genpools weitere Bakterien nachgewiesen werden (s. III.1.2.2). Bis auf eine Ausnahme (s.u.) wurde deren Rolle und Quantität innerhalb einer Perle nicht weiter bestimmt; es ist auch ungeklärt, ob es sich bei diesen Organismen um Partner des SM1 Euryarchaeons bzw. von *Thiothrix* SipK4 handelt oder ob sie selbst bzw. deren DNA bei der Probenahme lediglich der Perle anhafteten.

Morphologisch auffällig waren jedoch sehr dünne, ebenfalls filamentbildende Bakterien (Durchmesser etwa 0,5 µm), welche mit der *Thiothrix*- Sonde nicht hybridisierten und keine sichtbaren Zelleinschlüsse aufwiesen. In kleinen Perlen war ihr Anteil gering (< 5%), er stieg jedoch mit anwachsender Größe (> 3,0 mm) und damit Alterung einer Perle, während der Anteil von *Thiothrix* sp. zurückging.

Durch die erfolgreiche Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde IMB1-87 konnten diese dünnen, leicht gewellten Bakterien der Klonsequenz sipK119 und damit den ε- Proteobacteria zugeordnet werden (vgl. auch III.4.2). Über die physiologischen Eigenschaften des Organismus sipK119 kann nur spekuliert werden; jedoch wurde für unkultivierte Verwandte (s. III.4.2; Engel et al., 2003) ein anaerober, sulfidoxidierender Stoffwechsel postuliert.

Weiterhin konnte in den Perlen und v.a. in deren Verbindungsfäden häufig eine eukaryotische Alge mikroskopisch nachgewiesen werden (Moissl, 2000), bei der es sich vermutlich um einen Vertreter der Ulotrichales (*Ulothrix* sp.) handelt. Sie könnte als Anheftungsoberfläche für die mikrobielle Perlenkettengemeinschaft dienen.

1.3 Entwicklung eines *in situ*- Kultivierungssystems für die mikrobielle Perlenkettengemeinschaft

Die gesamte mikrobielle Biomassenproduktion im Quellbereich des Sippenauer Moors ist Schwankungen unterworfen, welche auf verschiedene Umweltparameter zurückzuführen sind (vgl. Moissl, 2000). Auch das mikrobielle System der Perlenkettengemeinschaft ist quantitativ von diesen Änderungen abhängig, was eine regelmäßige und zuverlässige Probenahme erschwert. Da die Kultivierung des SM1 Euryarchaeons und seiner Partner im Labor bisher ohne Erfolg geblieben war, sollte ein (Kultivierungs-) System geschaffen werden, welches eine zuverlässige Probenahme erlaubt und eine für mikrobiologische Studien notwendige Mindestmenge an Biomasse garantiert.

Es wurde vermutet, dass die nachgewiesene eukaryotische Alge (s. III.1.2.5) als Anheftungsoberfläche für die Perlenkettengemeinschaft dient, da in aquatischen Umgebungen die

Assoziation an Oberflächen die bevorzugte Lebensweise von mikrobiellen Gemeinschaften ist (Brock, 1967; Watnick und Kolter, 2000). Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zum Aufwuchs solcher Gemeinschaften an verschiedenen eingebrachten Materialien durchgeführt.

1.3.1 *In situ*- Kultivierung der Perlenkettengemeinschaft in ihrem Biotop

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten von mikrobiellen Perlenkettengemeinschaften an natürlichen (unbehandelte Wollfäden) und synthetischen Fasern (Polyamid oder Polyethylen) untersucht. Dazu wurden entsprechende Fäden in den Bachlauf direkt unterhalb der Hauptquelle des Sippenauer Moors flottierend ausgebracht. Bereits nach einem Tag Inkubation im 10°C kalten Quellwasser waren v.a. die synthetischen Fäden mit einem weiß-grauen Belag überzogen, was auf die Besiedlung mit filamentösen Bakterien zurückzuführen war. Nach zwei bis drei Tagen hatten sich viele weiße Perlen und Verdickungen (Durchmesser bis zu 3 mm) an den synthetischen Fäden entwickelt (Abb. 13). Wie durch FISH gezeigt werden konnte, enthielt jede Perle bzw. Verdickung eine archaeelle Mikrokolonie, in der die Organismen in regelmäßigen Abständen dreidimensional angeordnet waren. Nach einer Woche Inkubation im natürlichen Biotop hatten sich die Perlen bis zu einem Durchmesser von etwa 12 mm vergrößert. In Korrelation dazu stieg auch der Anteil der Archaeen stetig an (bis ca. 30% der Gesamtpopulation). Zu diesem Zeitpunkt waren die Archaeen im Innern der Perle jedoch nicht mehr in ihre Mikrokolonie eingeschlossen, sondern lagen frei und zufällig verteilt vor und konnten dadurch aus dem mikrobiellen Verband herausgelöst werden.

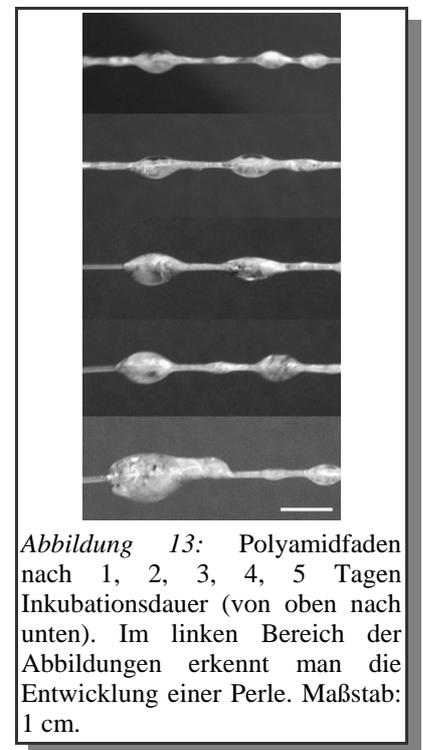


Abbildung 13: Polyamidfäden nach 1, 2, 3, 4, 5 Tagen Inkubationsdauer (von oben nach unten). Im linken Bereich der Abbildungen erkennt man die Entwicklung einer Perle. Maßstab: 1 cm.

Die vergleichenden Studien hatten gezeigt, dass synthetische Fasern sehr viel besser als natürliche Fäden als Anheftungs- und Aufwuchsmaterial für mikrobielle Perlenkettengemeinschaften geeignet waren. Um größere Mengen dieser Populationen zu gewinnen wurden Polyethylenetze, welche eine bedeutend größere Oberfläche für die Zelladhäsion zur Verfügung stellten, im Quellwasser exponiert. Hier konnte ein vergleichbar gutes Wachstum von Perlenkettengemeinschaften festgestellt werden: Während einer eintägigen Inkubation in dem Quellbecken wurden die Netze durch den mikrobiellen Belag weißlich und nach vier bis sechs Tagen hatten sich viele Perlen und Verdickungen mit einem Durchmesser bis zu 12 mm

daran entwickelt (Abb. 14). Durch die Anwendung der SM1- spezifischen SMARCH714- Oligonukleotidsonde (Rudolph, 2003) konnten die Archaeen der am Netz aufgewachsenen Perlen als SM1 Euryarchaeen identifiziert werden. Neben diesen Organismen wurden vorwiegend filamentöse Bakterien beobachtet, welche *Thiothrix*- und sipK119- Morphologien aufwiesen.

Es war also gelungen, mit Hilfe dieser Polyethylenetze, die mikrobielle Perlenkettengemeinschaft auf künst-

lichen Oberflächen im eigenen Biotop zu züchten. Die Probenahme konnte nun regelmäßig (einmal pro Woche) und zuverlässig durchgeführt werden. Die erntbare Biomasse war stets von gleicher Qualität und Quantität und unabhängig von Schwankungen der natürlichen Biomasse im Quellbereich.

Netze und Fäden wurden an verschiedenen Stellen des Bachlaufs (bis zum Probenahmeort Str. 6, s. Abb. 6) inkubiert und deren Aufwuchs auf das Wachstum von SM1 Euryarchaeen hin überprüft. Die Inkubation im Bereich des Fließwassers der Hauptquelle lieferte jedoch stets die größte mikrobielle Biomasse. Um genügend Zellmaterial für die folgenden Untersuchungen zu erhalten, wurden die mikrobiellen

Perlenkettengemeinschaften in größerem Maßstab an Netzen mit einer Gesamtgröße von etwa 10 m² gezüchtet. Die Netze wurden mehrfach gefaltet und mit Metallspießen im Bereich der Hauptquelle befestigt (Abb. 15). Somit konnten pro Woche ca. 10.000 Perlen geerntet werden.

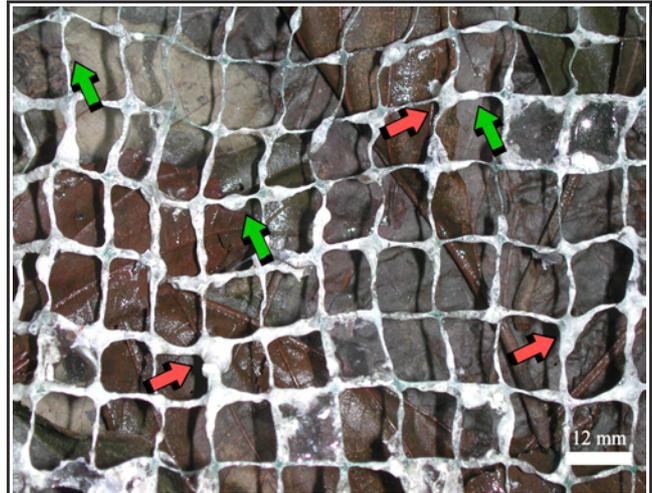


Abbildung 14: Mikrobielle Perlenkettengemeinschaften, gewachsen in ihrem Biotop an einem Polyethylenetz nach 6 Tagen Inkubation (10°C). Die Pfeile zeigen auf Verdickungen (rot) und Perlen (grün). Aus: Moissl et al., 2003.



Abbildung 15: Inkubation der Netze im Fließwasser der Hauptquelle. Die Netze wurden mittels Edelstahlhaken quer zur Strömung aufgespannt.

1.3.2 Selektive physikalische Abtrennung des SM1 Euryarchaeons

Nach sechs Tagen *in situ*- Inkubation eines Polyethylennetzes im sulfidischen Bachlauf wurde die mikrobielle Netzpopulation durch Abschütteln und Auswringen des Netzes in sterilem Moorwasser geerntet (s. II.4). FISH- Analysen der erhaltenen Zellsuspension mit der spezifischen SMARCH714- Oligonukleotidsonde zeigten, dass die Gesamtpopulation aus etwa 30% SM1 Euryarchaeen bestand (Abb. 16). Durch vergleichende FISH- Analysen mit dem archaeellen Sondenmix konnten neben den SM1 Euryarchaeen keine weiteren Archaeen detektiert werden. Einen weiteren großen Bestandteil stellten morphologisch unterschiedliche, aber vorwiegend filamentbildende Bakterien dar (Abb. 16), die nicht weiter charakterisiert wurden.

Aus der vom Netz abgewaschenen Zellmischung (ca. 30% SM1 Euryarchaeon; Abb. 16), konnten die Archaeen durch Sedimentation und Zentrifugation aufgereinigt werden (bis 50% SM1 Euryarchaeen; Abb. 17). Mit Hilfe einer Percoll- Dichtegradientenzentrifugation konnte der Gehalt an Archaeen nochmals stark erhöht werden. Die SM1 Euryarchaeen sammelten sich stets in den obersten 2 ml des Percoll- Gradienten und lagen schließlich in einer Reinheit von ca. 98% vor (2% Bakterien; Abb. 18).

Da ein negativer Einfluss des nur unvollständig entfernbaren Percolls auf weiterführende Versuche nicht auszuschließen war, wurde eine zweite Aufreinigungsmethode ohne Percoll etabliert. Durch verschiedene aufeinander folgende Zentrifugationsschritte konnten die SM1 Euryarchaeen in vergleichbarer Reinheit gewonnen werden (s. II.4.4).

Die SM1 Euryarchaeen zeigten nach der Aufreinigung sowohl mit als auch ohne Percoll eine Lebensfähigkeit von ca. 90%, was auf die relativ sanfte Behandlung zurückzuführen ist.

Die Kombination aus Züchtung an Polyethylennetzen und physikalischer Abtrennung des SM1 Euryarchaeons aus der Zellsuspension erlaubte nun das Studium eines im Labor unkultivierten, kälteliebenden Archaeons. Aufgrund der hohen Reinheit, der hohen Lebensfähigkeit und der ausreichend gewinnbaren Menge an Zellen (mind. 1×10^9 Zellen pro Reinigung) konnte die erhaltene, natürlich gewachsene SM1- Fraktion wie eine Laborkultur verschiedensten Untersuchungen unterzogen werden. Im Einzelnen wurden 16S rRNA- Gensequenzanalysen sowie strukturelle, immunologische, biochemische und genetische Untersuchungen zur Charakterisierung herangezogen.

Mikrobielle Polyethylenetz-
population nach der Ernte durch
Waschen des Netzes in
Moorwasser.
Bakterien (rot gefärbt): ca. 70%
Archaeen (grün gefärbt): ca. 30%

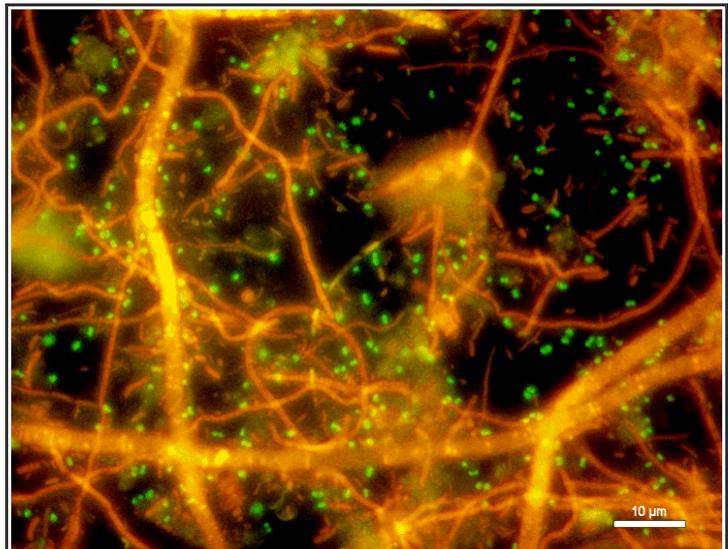


Abbildung 16: Netzpopulation. Aus: Moissl et al., 2003.

Angereicherte SM1 Euryarchaeen
nach Sedimentation und
Zentrifugation.
Bakterien (rot gefärbt): ca. 50%
Archaeen (grün gefärbt): ca. 50%

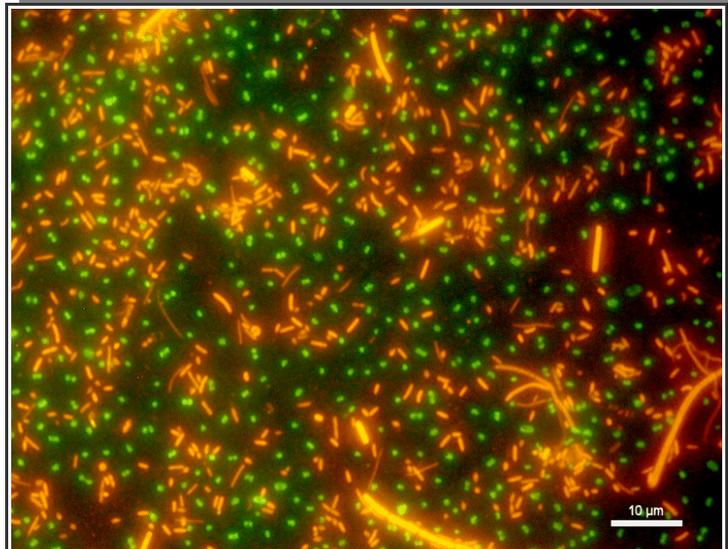


Abbildung 17: Vorgereinigte Fraktion. Aus: Moissl et al., 2003.

Stark angereicherte SM1
Euryarchaeen nach Percoll-
Dichtegradientenzentrifugation.
Bakterien (rot gefärbt): ca. 2%
Archaeen (grün gefärbt): ca. 98%

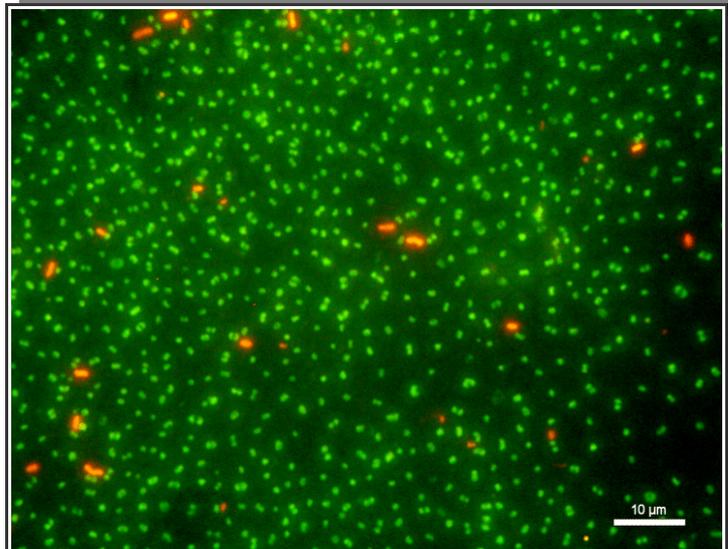


Abbildung 18: Hochreine Fraktion. Aus: Moissl et al., 2003.

1.3.3 Phylogenetische Untersuchungen der aufgereinigten SM1 Euryarchaeen-Fraktion

Mit der aus III.1.3.2 erhaltenen Fraktion der SM1 Euryarchaeen wurde zunächst eine phylogenetische Analyse des 16S rRNA- Genpools durchgeführt, um Hinweise auf die archaeelle Reinheit zu erhalten.

Parallel zu einer Ganzzell- PCR mit den archaeellen Primern 344aF und 1119aR wurde die bakterielle Primerkombination 9bF und 1406uR verwendet. Dabei konnte ein archaeelles, jedoch aber kein bakterielles Signal erhalten werden, was auf eine sehr hohe archaeelle Reinheit hindeutet. Mit den archaeellen Amplifikaten wurde eine Klonierung durchgeführt. 28 Klone wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen und resultierten in einem identischen Restriktionsmuster. Zwei Klone wurden repräsentativ sequenziert. Die Sequenzdatenanalyse ergab eine völlige Übereinstimmung der Sequenzen mit der bereits hinterlegten Sequenz des 16S rRNA- Gens des SM1 Euryarchaeons (Rudolph et al., 2001). Gleiche Ergebnisse wurden erzielt, wenn statt ganzer Zellen, isolierte genomische DNA dieser SM1- Fraktion in die PCR eingesetzt wurde (Henneberger, 2002).

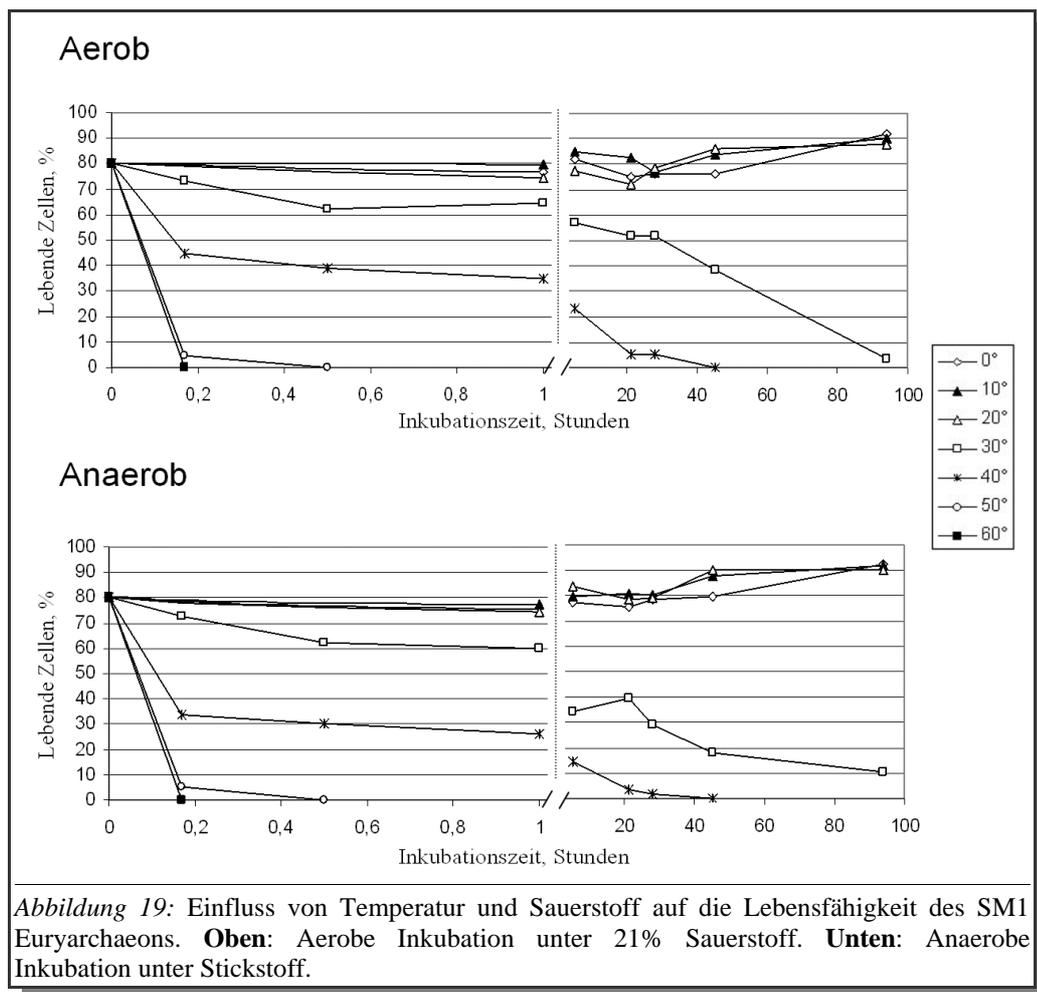
2. Untersuchungen zur Biologie des SM1 Euryarchaeons

2.1 Allgemeine Untersuchungen zur Physiologie

Da die Zellen der aufgereinigten SM1- Fraktion eine hohe Lebensfähigkeit aufwiesen (ca. 90%, s. III.1.3.2), konnten physiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Dazu wurden die Zellen unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt und ihre Lebensfähigkeit bzw. Morphologie regelmäßig überprüft. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen in sterilem original Moorwasser bei 10°C inkubiert.

2.1.1 Einfluss von Temperatur und Sauerstoff

Die SM1 Euryarchaeen wurden bei verschiedenen Temperaturen (-2 bis +60°C) und unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen inkubiert (0 bzw. 21% Sauerstoff). Unter anaeroben und aeroben (21% Sauerstoff) Bedingungen wurden eine ähnliche Vitalität beobachtet (Abb. 19): Alle Zellen blieben nach vier Tagen Inkubation bei den Temperaturen 20, 10 und 0°C lebensfähig. Sogar bei -2°C konnte im gleichen Zeitraum keine Abnahme der Lebensfähigkeit beobachtet werden. Im Gegensatz dazu nahm die Absterberate bei 30°C stark zu; bei 40°C waren die Zellen nach 2 Tagen Inkubation bereits tot. Bei 50 und 60°C trat ein sehr rascher Zelltod innerhalb von 30 bzw. 10 min ein (Abb. 19).



2.1.2 Einfluss des pH- Werts

Innerhalb eines pH- Bereichs von 5 bis 9 war keine negative Auswirkung auf die Zellebensfähigkeit zu beobachten. Bei pH- Werten von 4 und 10 ging die Lebensfähigkeit der Zellen innerhalb von 24 Stunden langsam zurück. Bei den pH- Werten 3 bzw. 11 wurden die SM1 Euryarchaeen innerhalb von Minuten abgetötet.

2.1.3 Einfluss der Ionenkonzentration

SM1 Euryarchaeen zeigten sich empfindlich gegenüber höheren Salzkonzentrationen. Für die Versuche wurde synthetisches Meerwasser verwendet. Im Bereich von 1:50 bis 1:2 verdünntem synthetischen Meerwasser (Huber et al., 1990) änderte sich die Morphologie der SM1 Euryarchaeen innerhalb von wenigen Minuten zu irregulären Kokken. Resuspendierung in unverdünntem synthetischen Meerwasser (2,7% NaCl, w/v; Huber et al., 1990) führte zu sofortigem Zelltod. Im Gegensatz hierzu führte die Aufnahme der Zellen in entionisiertem Wasser weder zu Änderungen in der Morphologie noch zur Beeinträchtigung des Membranpotentials.

2.1.4 Einfluss von Proteinase K

Die Zugabe von Proteinase K in höheren Konzentrationen (1- 5 mg/ml) führte innerhalb von Minuten zur Änderung der Zellmorphologie: Die Zellen wurden hyalin und ihr Volumen nahm zu. Weiterhin wurde eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit beobachtet.

2.1.5 Einfluss von Na₂ EDTA

Die Behandlung mit 1 mM Na₂EDTA zeigte auch nach einem Tag Inkubation keinen Einfluss auf die SM1 Euryarchaeen. Bei Konzentrationen zwischen 10 und 100 mM Na₂ EDTA zeigte sich jedoch eine Deformation der Kokken und eine deutliche Abnahme der Lebensfähigkeit.

2.1.6 Einfluss von SDS

Ab einer Konzentration von 0,1% SDS trat bereits nach wenigen Minuten vollständige Zellyse der SM1 Euryarchaeen auf. Sogar niedrigere Konzentrationen (> 0,005%) zeigten deutlich negative Auswirkungen auf die Zellstabilität und Lebensfähigkeit.

2.1.7 Nachweis von Katalase

Es konnte keine Katalaseaktivität festgestellt werden.

2.2 Untersuchungen zur Struktur der SM1 Euryarchaeen

2.2.1 Phasenkontrastmikroskopie

Bei der mikroskopischen Betrachtung der SM1 Euryarchaeen erschienen die Zellen als einzelne, kleine Kokken. Viele von ihnen befanden sich in der Teilungsphase. Auffällig war das flottierende Treiben der Zellen und ihre geringe Tendenz sich auf dem Glasobjektträger abzusetzen.

2.2.2 Gram- Färbung

Die SM1 Euryarchaeen zeigten eine positive Gram- Reaktion. Dies kann als Hinweis auf eine rigide, dichte Zellwand gewertet werden.

2.2.3 Transmissions- Elektronenmikroskopie und Cryo- Elektronentomographie

Um Einblicke in den strukturellen Aufbau des SM1 Euryarchaeons zu gewinnen, wurden verschiedene Zell- Präparationsmethoden für die Transmissions- Elektronenmikroskopie angewendet. Neben Suspensions- und Ultradünnschnittpräparaten wurden Gefrierätzungen und S-Layer- Präparationen angefertigt. Eine gute Möglichkeit zur genauen Darstellung dreidimensionaler Strukturen ohne Beeinflussung der biologischen Präparate durch z.B. Dehydratation oder der Verwendung von Kontrastmitteln stellt die Cryo- Elektronentomographie dar (Baumeister, 2002). Die Ergebnisse aus beiden elektronenmikroskopischen Methoden wurden verglichen und zur Interpretation ergänzend herangezogen.

2.2.3.1 Allgemeine Beobachtungen

Transmissions- elektronenmikroskopische Untersuchungen von Platin/Kohle- bedampften SM1 Euryarchaeen ließen kokkoide Zellen mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 0,6- 0,7 μm erkennen. Jede Zelle war umgeben von etwa 50- 100 dünnen Zellanhängseln, welche in der Zellwand verankert und gleichmäßig über die Oberfläche verteilt waren. Diese Zellfortsätze hatten einen Durchmesser von etwa 7 nm und eine Länge von ca. 1- 3 μm . Sie waren auf der Oberfläche von Zellen jedes Wachstumsstadiums erkennbar (Abb. 20). Für eine genauere strukturelle Aufklärung dieser ungewöhnlichen Zellfortsätze wurde eine Negativkontrastierung mit Uranyl- Acetat durchgeführt (s. III.3).

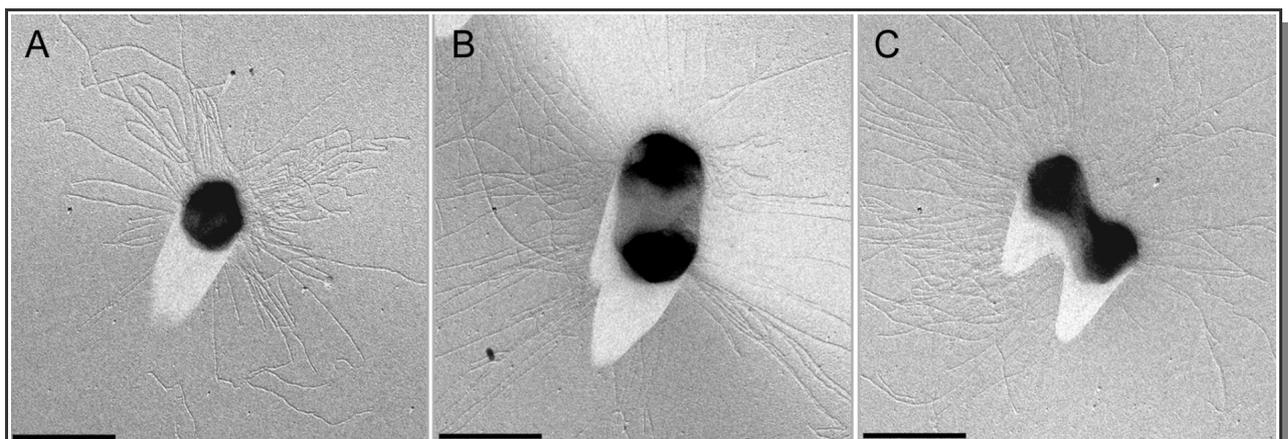


Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von drei einzelnen SM1- Zellen in verschiedenen Stadien der Zellteilung (A-C). Jede Zelle zeigt Zellfortsätze, welche über die gesamte äußere Zelloberfläche verteilt sind. Maßstab: 1 μm . Aus: Moissl et al., 2003.

Durch Cryo- Elektronentomographie konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Die Zellanhängsel des SM1 Euryarchaeons traten über die ganze Oberfläche aus der Zelle aus und waren nicht in einem Schopf gebündelt.

Auch mit Hilfe der Gefrierätzung konnten die Zellanhängsel dargestellt werden. Bei dieser Methode bleiben die Zellproteine durch eine kontrollierte Sublimation des gefrorenen Wassers im Hochvakuum teilweise im hydratisierten Zustand erhalten. Aus diesem Grund erschienen die Zelloberflächenstrukturen von SM1 mit dieser Methode dicker und unstrukturierter (Abb. 21).

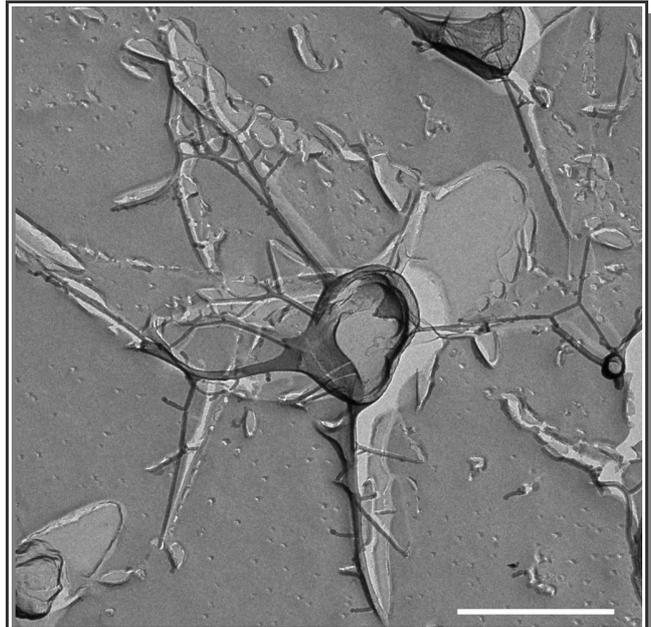


Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gefrierätzung einer SM1- Zelle. Gut erkennbar sind die Zelloberflächenanhängsel, welche mit ihrer Hydrathülle hier dicker erscheinen. Maßstab: 1 μm .

2.2.3.2 Aufbau der Zellwand

2.2.3.2.1 Ultradünnschnitte

Bereits bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung von Ultradünnschnitten durch Zellen des SM1 Euryarchaeons zeigte sich die Komplexität der Zellwand. Diese war zumindest aus zwei Schichten aufgebaut: Das Cytoplasma der Zelle war von einer Cytoplasmamembran umschlossen, auf die eine dicke periplasmatische Schicht aufgelagert war (Abb. 22). Eine kontrastreiche Schicht schloss die Zellen nach außen hin ab. Die Vermutung lag nahe, dass es sich bei dieser Schicht um einen sogenannten S-Layer (regelmäßiges Oberflächen-gitter aus Proteinen) handelte. In seltenen Fällen konnte unterhalb der Cytoplasmamembran eine weitere, kontrastreiche Schicht identifiziert werden. Die Breite des Periplasmas war für die Ultradünnschnitte mit etwa 20 nm anzugeben.

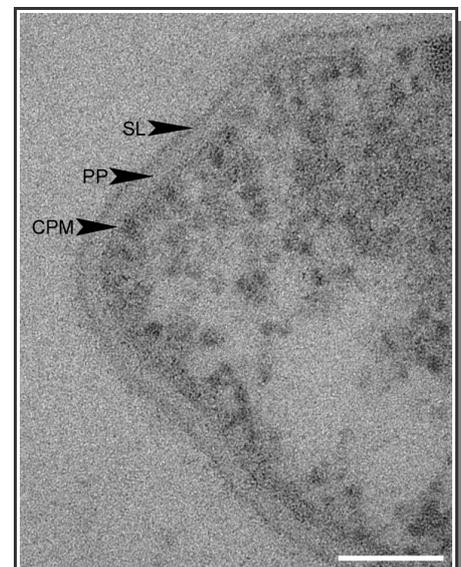


Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnitts durch eine Zelle des SM1 Euryarchaeons. Bei den dunkleren Bereichen innerhalb der Zelle handelt es sich vermutlich um Ribosomen. **SL**: vermutlicher S-Layer, **PP**: Periplasmatischer Raum, **CPM**: Cytoplasmamembran. Maßstab: 100 nm.

2.2.3.2.2 Gefrierätzung

Gefrierätzungen von intakten Zellen zeigten ebenfalls die Existenz einer dicken Zellwand (Abb. 23); jedoch konnte mit dieser Präparationsmethode kein Hinweis bezüglich eines S-Layers gewonnen werden, da auf der Oberfläche der SM1 Euryarchaeen kein regelmäßiges Proteingitter detektierbar war.

Die Dicke des periplasmatischen Raums betrug auch in diesem Fall etwa 20 nm. Bei den Euryarchaeota weist der

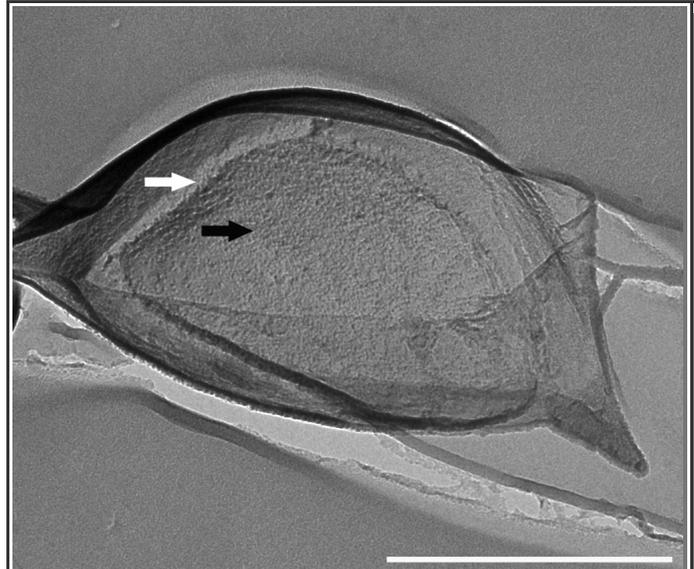


Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gefrierätzung einer SM1- Zelle. Gut erkennbar ist der Bruch durch die Cytoplasmamembran (schwarzer Pfeil) und durch die dicke Zellwand (weißer Pfeil). Maßstab: 500 nm.

periplasmatische Raum im Allgemeinen eine Breite von bis zu 15 nm auf, liegt aber meist zwischen 5 und 10 nm (Rachel, 2004).

2.2.3.2.3 Isolierung des Oberflächenpolymers

Durch eine Behandlung der Zellen mit Triton X-100 konnten Teile der Zellwand mit regelmäßiger Anordnung der molekularen Bausteine isoliert werden (Abb. 24). Vermutlich handelt es sich um einen S- Layer, der laut Fourierspektrum¹⁴ (Abb. 25) eine p4- Symmetrie¹⁵, jedoch eine Gitterkonstante¹⁶ von nur 9 nm aufweist (pers. Mitt. R. Rachel¹⁷).

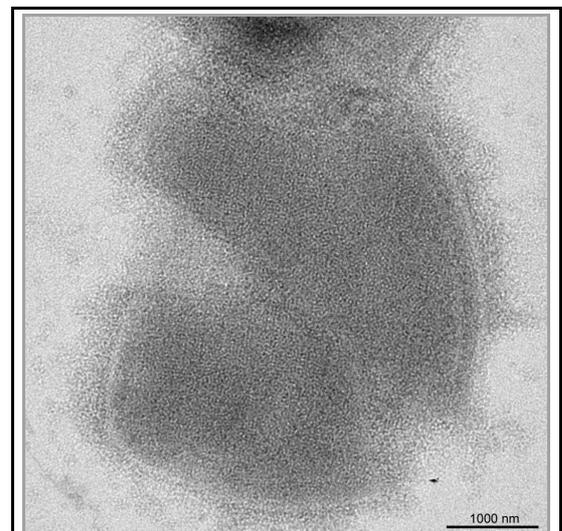


Abbildung 24: Isolierter SM1- S- Layer, Negativkontrastierung. Regelmäßige Strukturen sind bereits mit bloßem Auge erkennbar.

¹⁴ Eine Fourier- Analyse dient der Darstellung und Visualisierung periodischer Funktionen.

¹⁵ Anordnung von Proteinuntereinheiten bezüglich der Symmetrieachsen

¹⁶ 'center-to-center'- Abstand zweier (Protein-)Komplexe

¹⁷ Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg

Archaeelle S- Layer mit p4-Symmetrien wurden innerhalb der *Desulfurococcales*, bei *Ferroglobus* und *Picrophilus* identifiziert (Rachel, 2004). Interessanterweise würde die Gitterkonstante des SM1-S- Layers die niedrigste bisher gemessene darstellen. In vergleichbarer Größenordnung liegen nur die *Methanococcales* mit einem Gitterabstand ihres sechszähligen S- Layers von 11- 12 nm (Rachel, 2004).

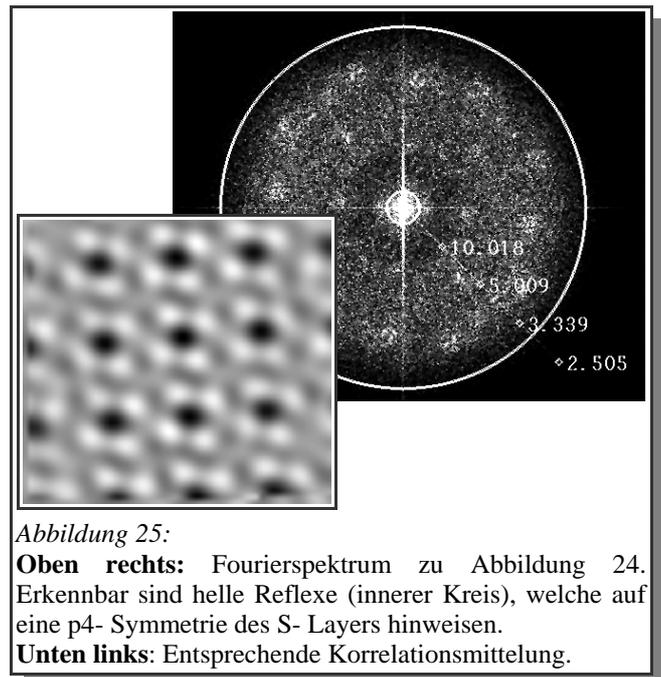


Abbildung 25:

Oben rechts: Fourierspektrum zu Abbildung 24. Erkennbar sind helle Reflexe (innerer Kreis), welche auf eine p4- Symmetrie des S- Layers hinweisen.

Unten links: Entsprechende Korrelationsmittelung.

2.2.3.2.4 Cryo- Elektronentomographie

Die Cryo- Elektronentomographie wurde in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Ariane Briegel¹⁸ durchgeführt.

Durch die Cryo- Elektronentomographie konnte im Wesentlichen der Aufbau der Zellwand bestätigt werden. Die Breite des periplasmatischen Raums wurde wieder mit etwa 20 nm angegeben. Interessant gestaltete sich jedoch die Untersuchung der deutlich nachzuweisenden dritten Schicht unterhalb der Cytoplasmamembran. Sie war etwa 1,6 nm dick und zog sich im Abstand von etwa 33 nm zur Membran wie ein Band um das Cytoplasma der Kokke (Abb. 26, 27). Diese identifizierte dritte Schicht der SM1- Zellwand erinnerte stark an Chemorezeptor- Cluster, welche in Organismen wie *Escherichia coli* und *Thermotoga maritima* vorwiegend an den Zellpolen gefunden wurden (pers. Mitt. Ariane Briegel; Maddock und Shapiro, 1993). Diese beschriebenen Cluster aus MCPs (methylated chemotactic proteins) liegen dabei wenige nm unterhalb der Cytoplasmamembran und erscheinen im Transmissions- Elektronenmikroskop als dünne Schicht (Maddock und Shapiro, 1993; Weis et al., 2003).

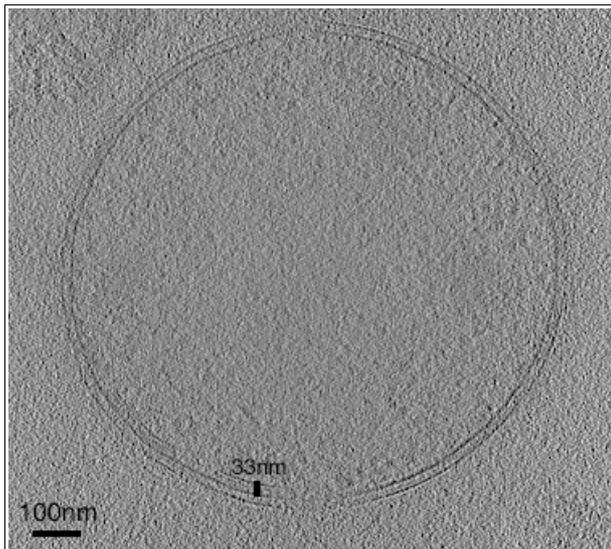


Abbildung 26: Tomogramm einer SM1- Zelle. Unterhalb der Cytoplasmamembran liegt im Abstand von 33 nm eine kontrastreiche Schicht.

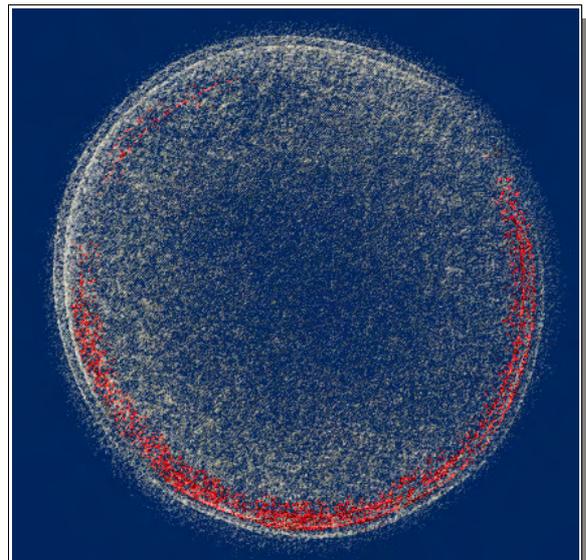


Abbildung 27: Volumengerederte Darstellung einer SM1- Zelle. Die dritte Schicht (vermutlich Chemorezeptor- tragend) ist rot hervorgehoben.

Aus Immuno- Blot- Untersuchungen des SM1- Gesamtproteins mit Trg¹⁹- spezifischen Antikörpern²⁰ konnten ebenfalls Hinweise auf die Existenz von Chemorezeptoren gewonnen werden. Es wurde eine starke und spezifische Reaktion eines ca. 28 kDa Proteins gezeigt. Bei längerer Inkubationszeit in der Färbelösung ließ sich eine weitere Bande (ca. 65 kDa) nachweisen (Abb. 28).

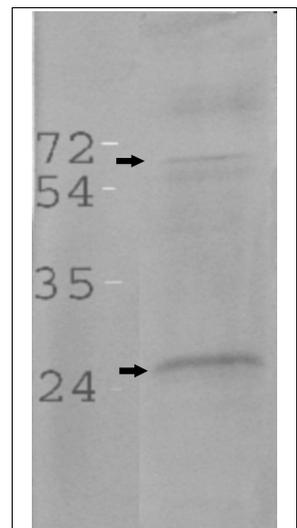


Abbildung 28: Immuno-Blot des SM1- Gesamtproteins, Reaktion mit anti- Trg- Antikörpern. **Links:** Angabe der Proteinmasse in kDa.

19 Der Trg- Rezeptor ist ein häufiger Bestandteile bakterieller und archaeeller Chemorezeptorencluster. Vgl. Diskussion.

20 freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Briegel.

2.2.3.3 Weitere strukturelle Besonderheiten

Zusätzlich zu den dünnen Zelloberflächenanhängseln konnte bei einigen SM1- Zellen sowohl in Suspensionspräparaten (nicht gezeigt) als auch in Gefrierätzungen ein dickeres (ca. 22 nm), fadenförmiges Zelloberflächenorgan nachgewiesen werden (Abb. 29). Dieses war häufig als Verbindung zwischen zwei Zellen anzutreffen oder, wie in Abb. 29, als vermutlich abgerissenes Organ.

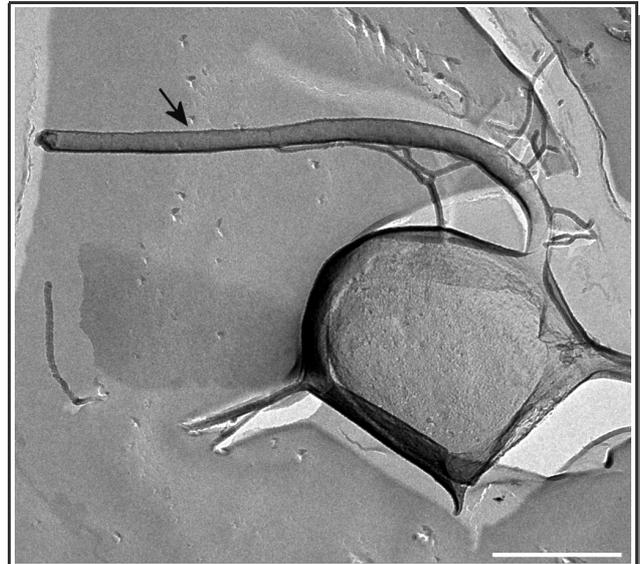


Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gefrierätzung einer SM1- Zelle mit dickem Zelloberflächenorgan (Pfeil). Maßstab: 500 nm

2.3 Immunologische Untersuchungen

2.3.1 Immuno- FISH

Die Aktivität und Spezifität der gegen die SM1- Zellen produzierten Antikörper (anti- SM1 Serum) wurde mittels Immuno- FISH (nach Aßmus et al., 1997, modifiziert) überprüft. Diese neue kombinierte Anwendung einer spezifischen Oligonukleotidsonde und der Antikörper bestätigte deren Spezifität und ermöglicht die Identität eines Organismus gleichzeitig auf genetischer und immunologischer Ebene festzustellen. Die gebundenen primären Antikörper wurden durch die Reaktion mit einem sekundären, fluoreszenzfarbstofftragenden Antikörper visualisiert. Nach der Immuno- FISH- Prozedur zeigten die FISH- gefärbten SM1 Euryarchaeen (SMARCH714- Sonde) eine leuchtende, immunfluoreszente, strahlenförmige Korona (Abb. 30).

Dieses Phänomen war auf die Reaktion der primären Antikörper mit den Zellanhängseln des SM1 Euryarchaeons (s. Abb. 20) zurückzuführen. Behandelte man die SM1 Euryarchaeen vor Immuno- FISH mit Proteinase K in einer Konzentration von 0,5 mg/ml, führte dies zum Verlust der immunfluoreszenten Korona, was auf den Abverbau der SM1- Zellanhängsel zurückzuführen war. Durch die Kombination zweier unabhängiger, hochspezifischer molekularer Methoden (FISH und Antikörperfärbung, Immuno- FISH) konnte die monophyletische Natur des SM1 Euryarchaeons bewiesen werden, da alle FISH- gefärbten Zellen eine Reaktion mit den Antikörpern zeigten.

Die Antikörpermarkierung konnte auch an herausgelösten SM1 euryarchaeellen Zellen der natürlich vorkommenden mikrobiellen Perlenkettengemeinschaften erfolgreich durchgeführt werden. Zellen, welche noch in die euryarchaeelle Mikrokolonie eingeschlossen waren, ließen sich nur schwach mit den Antikörpern anfärben, was auf eine dichte Packung der Zellen bzw. eine zu hohe lokale Antigenkonzentration hindeuten könnte (vgl. III.4.4.4).

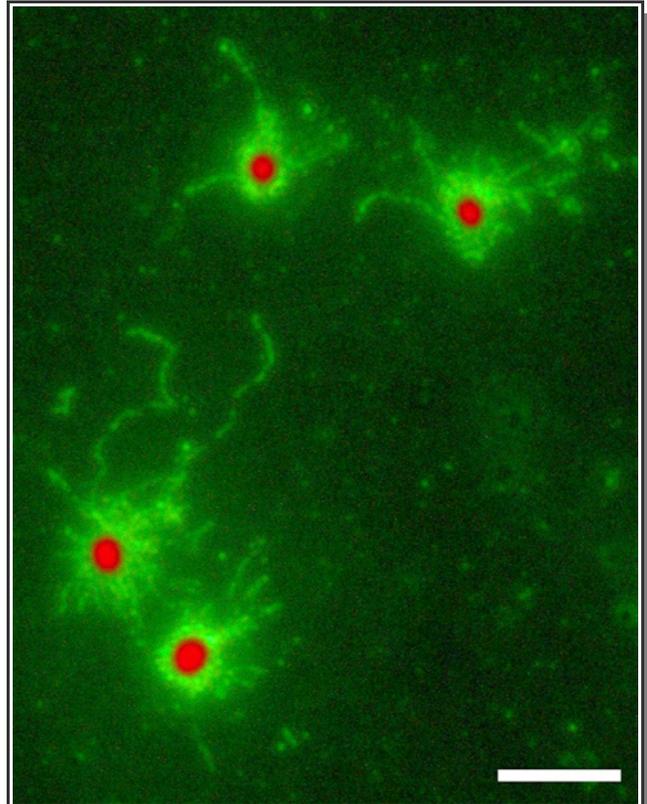


Abbildung 30: Epifluoreszenzaufnahme von ImmunofISH-gefärbten Zellen des SM1 Euryarchaeons. Die Zellen sind durch die CY3-markierte SMARCH714-Hybridisierungssonde rot gefärbt und zeigen eine grüne, immunfluoreszente Corona (FITC-markierte sekundäre Antikörper). Maßstab: 5 μ m. Aus: Moissl et al., 2003.

2.3.2 Immunogold- Markierung

Durch die Markierung der primären Antikörper mit goldpartikeltragenden sekundären Antikörpern kann eine erfolgreiche Bindung auch für das Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Dabei zeigte sich, dass die Antikörper nahezu ausschließlich mit den Zellanhängseln der SM1 Euryarchaeen reagierten (Abb. 31).

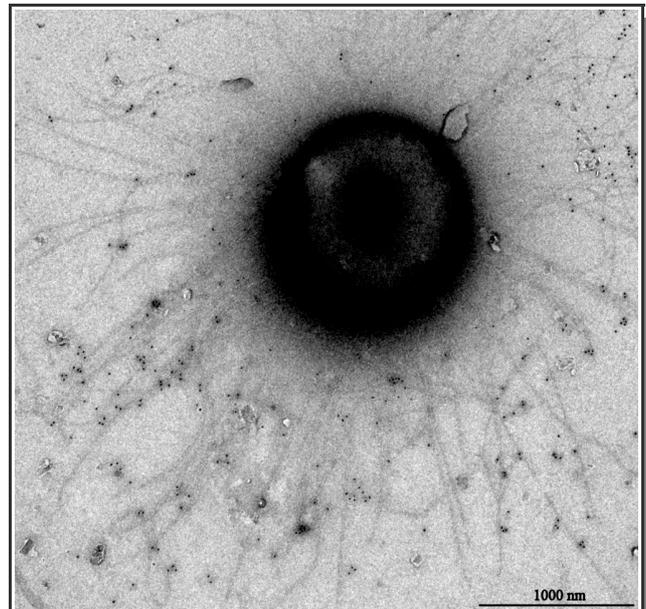


Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Antikörpermarkierung des SM1 Euryarchaeons mit anti-SM1-Serum. Die Zelloberflächenstrukturen der Zelle zeigen eine starke und spezifische Reaktion, die durch die sekundären, goldmarkierten Antikörper in Form schwarzer Partikel visualisiert wurde.

3. Untersuchungen zur Charakterisierung der neuartigen SM1-Zelloberflächenstrukturen ('Hami')

3.1 Transmissions- Elektronenmikroskopie

3.1.1 Mikroskopische Untersuchungen zur Feinstruktur

3.1.1.1 Uranylacetat- Kontrastierung

Genauere strukturelle Untersuchungen der SM1- Zelloberflächenstrukturen wurden mittels Transmissions- Elektronenmikroskopie durchgeführt. Dabei wurde eine Negativkontrastierung durch Uranylacetat der Schwermetallbedampfung vorgezogen.

Eine nähere Betrachtung der Zellanhängsel zeigte deren außergewöhnliche und neuartige Architektur. Jedes Filament ist exakt strukturiert und weist eine definierte Basis- Spitze-Orientierung auf (Abb. 32- 34). Generell kann jedes Zellanhängselfilament (\emptyset 7-8 nm) in zwei Abschnitte gegliedert werden:

a) den zentralen Teil, die sogenannte *Stachelregion* ('Prickle- region', Abb. 34), welcher aus einem komplexen, stacheldrahtähnlich aufgebautem Filament besteht: In regelmäßigen Abständen von ca. $46 \pm 1,4$ nm ($n= 53$) treten wiederkehrende Einheiten von drei Stacheln aus dem Filament hervor; diese sind dünner als das Filament (etwa 4 nm) und durchschnittlich 30 ± 3 nm ($n= 48$) lang. Ausgehend von der Zelloberfläche bilden bis zu 60 dieser 46 nm- Einheiten ein Filament.

b) den 152 ± 3 nm ($n=55$) langen, endständigen Teil, die sogenannte *Hakenregion* ('Hook- region', Abb. 34), welcher aus einem nackten Filament mit einem dreiteiligen Ende besteht und eine komplexe, einzigartige Struktur aufweist. Das Filament teilt sich in drei einzelne Arme mit je 4 nm Durchmesser und 50 nm Länge. Dabei formt jeder Arm einen charakteristischen 180° - Bogen, so dass seine Spitze wieder in Richtung Zelle gewandt ist. Am Ende jedes Arms sitzt eine hakenförmige Verdickung, weshalb die gesamte endständige Struktur einem mit Widerhaken besetzten Enterhaken ähnelt.

Die Zelloberflächenanhängsel des SM1 Euryarchaeons unterscheiden sich deutlich von allen bisher beschriebenen, prokaryotischen Zellanhängseln. Sie repräsentieren eine neue Klasse von Zelloberflächenstrukturen, die in ihrer Komplexität und ihrem Aufbau einzigartig unter den Mikroorganismen ist. Um der neuartigen Struktur dieser molekularen Enterhaken gerecht zu werden und sie von anderen Zelloberflächenanhängseln abzugrenzen, wurde die Bezeichnung '**Hamus**' (Plural '**Hami**', lateinisch für Haken, Widerhaken oder Angel) eingeführt.

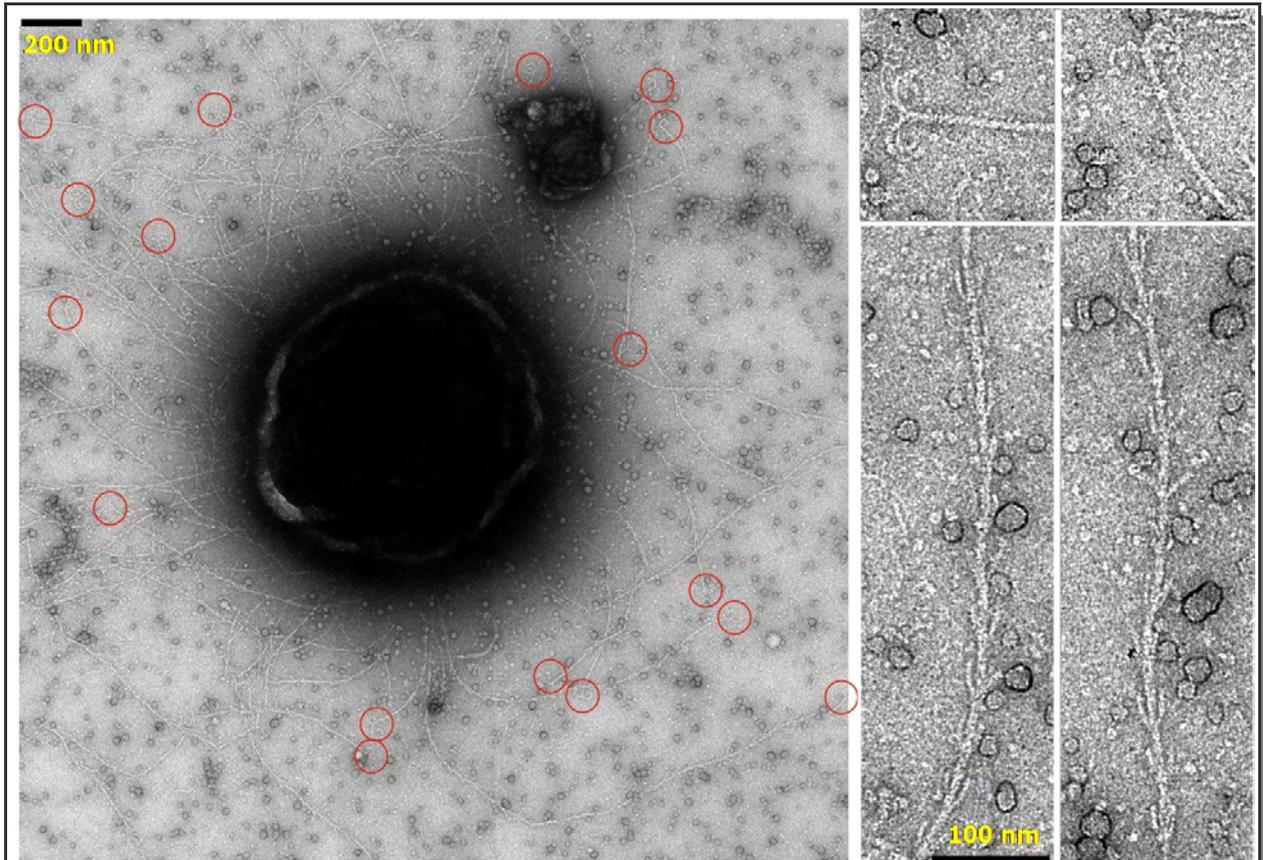


Abbildung 32: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle des SM1 Euryarchaeons mit Hami, negativ kontrastiert. Bei den kleinen erkennbaren Kügelchen im Hintergrund handelt es sich um Percoll.

Links: Zelle mit Hami. Die Kreise deuten auf endständige Enterhaken.

Rechts: Vergrößerte Ausschnitte der Hami.

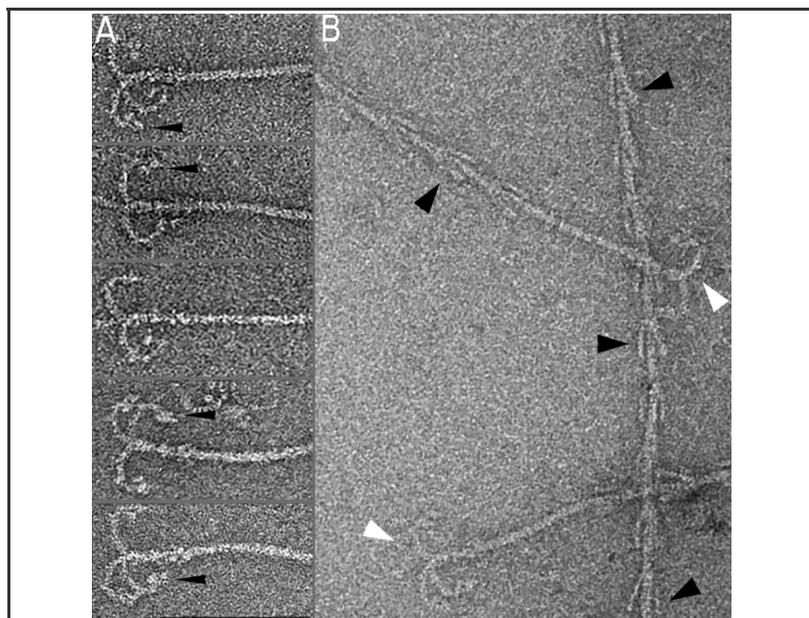


Abbildung 33: Ultrastruktur der Hami des SM1 Euryarchaeons, Negativkontrastierung. Maßstab: 100 nm. Aus: Moissl et al., 2004.

A: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Enterhaken am distalen Ende der Hami. Die Pfeile zeigen auf die Widerhaken.

B: Elektronenmikroskopische Aufnahme von hochstrukturierten SM1-Hami. Die Pfeile zeigen auf Stacheln (schwarz) und Enterhaken (weiß).

3.1.1.2 Phosphorwolframsäure- Kontrastierung

Eine unabhängige, ultrastrukturelle Untersuchung der Hami wurde durch Prof. Dr. Gerhard Wanner²¹ durchgeführt. In diesem Fall wurden die Zellen mit Phosphorwolframsäure kontrastiert und anschließend im Elektronenmikroskop betrachtet.

Auch bei dieser Präparationsmethode zeigte sich der typische Aufbau der SM1- Hami und deren strukturelle Differenzierung in Stachel- und Hakenregion (Abb. 35).

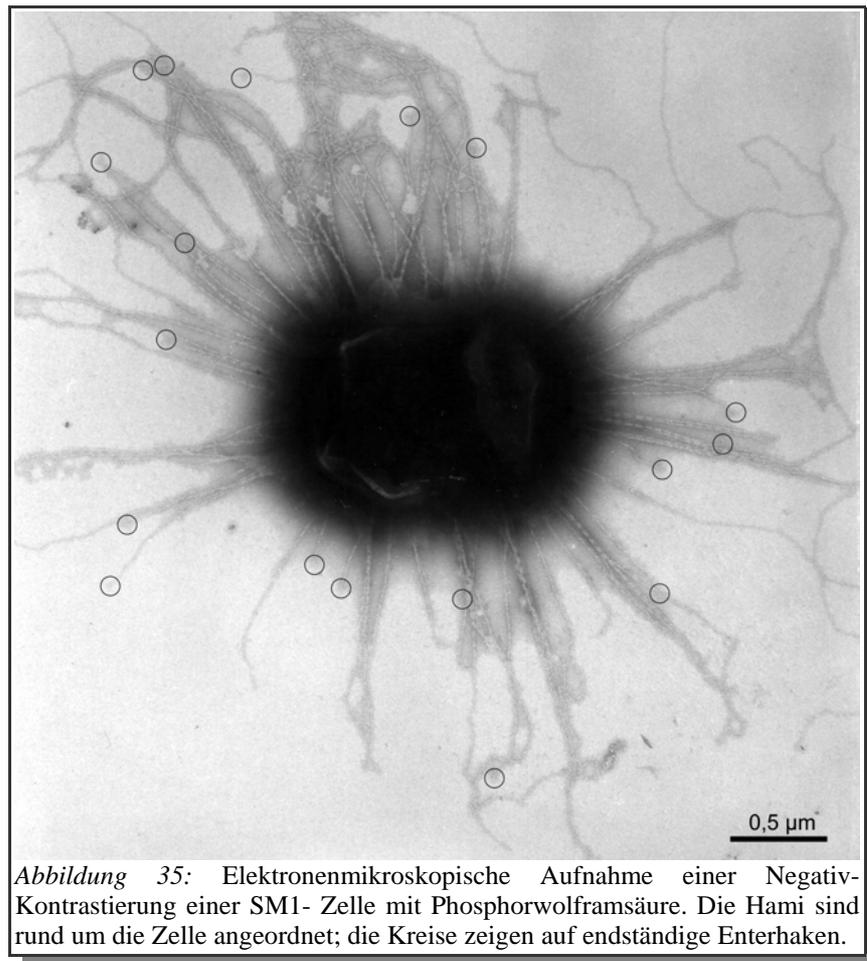


Abbildung 35: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Negativ-Kontrastierung einer SM1- Zelle mit Phosphorwolframsäure. Die Hami sind rund um die Zelle angeordnet; die Kreise zeigen auf endständige Enterhaken.

3.1.2 Periodizitätsanalysen

Als Grundlage für die Periodizitätsanalysen, durchgeführt von Dr. Harald Engelhardt²² und Dr. Reinhard Rachel, dienten negativ- kontrastierte Hami- Filamente (Abb. 36A).

Aus den Fourier- Spektren konnten Hinweise auf eine helikale Architektur der Hamus-Filamente gewonnen werden: Die aus der Filterung resultierenden Abbildungen (Abb. 36B, 36C) deuten auf einen Twist des Filaments hin und zeigen, dass die helikale Periodizität mit der regelmäßigen Anordnung der Stacheln am Filament korreliert.

21 Botanisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, 80638 München

22 Max- Planck- Institut für Biochemie, Martinsried

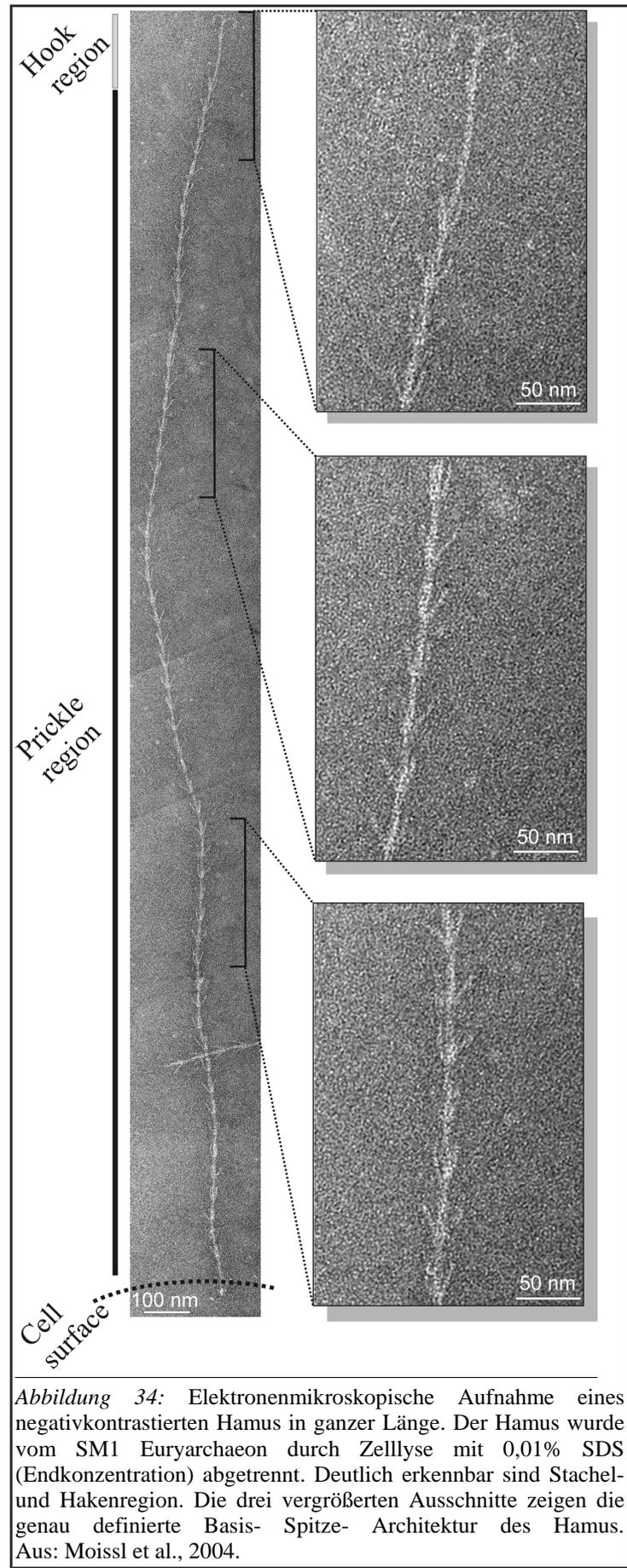


Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines negativkontrastierten Hamus in ganzer Länge. Der Hamus wurde vom SM1 Euryarchaeon durch Zellyse mit 0,01% SDS (Endkonzentration) abgetrennt. Deutlich erkennbar sind Stachel- und Hakenregion. Die drei vergrößerten Ausschnitte zeigen die genau definierte Basis- Spitze- Architektur des Hamus. Aus: Moissl et al., 2004.

Das Fourier- Spektrum zeigt starke Reflexe in regelmäßigen Abständen zwischen $1/46 \text{ nm}^{-1}$ und $1/4,6 \text{ nm}^{-1}$ (Abb. 36D), was den Abständen der repetitiven Stachelanheftungsstellen (46 nm) und der Größe der kleinsten sichtbaren strukturellen Einheiten (4,6 nm) entspricht. Die Daten deuten darauf hin, dass 10 aneinandergereihte Einheiten ein Segment eines Protofilaments aufbauen und dass drei verdrehte Protofilamente den filamentösen Kern des Hamus bilden. 46 nm entsprechen damit der Ganghöhe der Tripel- Helix.

Die Filterung des endständigen, stachelfreien Stücks des Hamus (Hakenregion) zeigte wiederum die helikale Anordnung von 4,6 nm großen Untereinheiten im Filament, jedoch keine weiteren strukturellen Details.

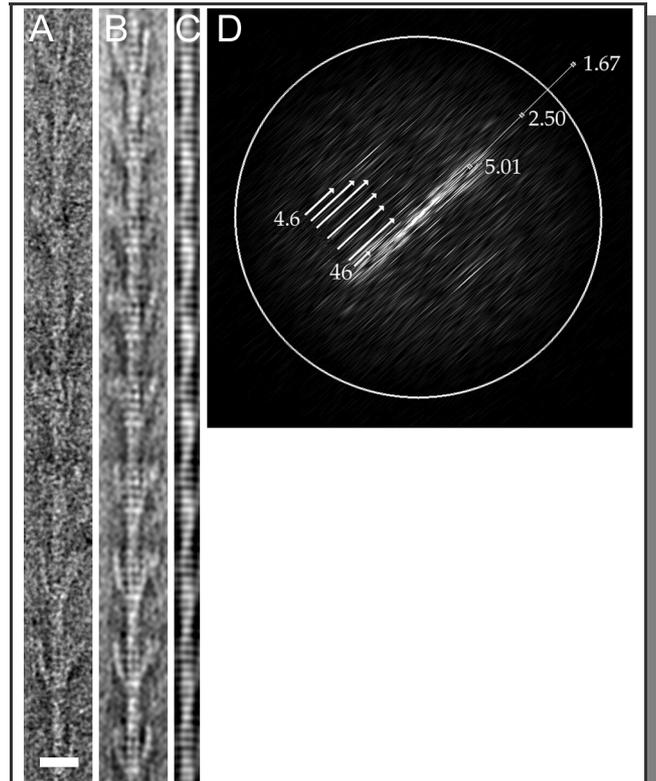


Abbildung 36: Fourier- Filterung eines Hamus in der Stachelregion. Aus: Moissl et al., 2004.

A: Originalabbildung einer negativkontrastierten Präparation. Maßstab: 20 nm.

B: Rauschreduzierte, gefilterte Abbildung derselben Hamus- Region.

C: Stärker gefilterte Abbildung des zentralen Filaments; die helikale Anordnung der strukturellen Einheiten ist gut erkennbar.

D: Innerer Bereich eines Fourier- Spektrums des Hamus im Originalbild. Die Pfeile zeigen auf starke Reflexe bei $1/46 \text{ nm}^{-1}$, $2/46 \text{ nm}^{-1}$, $4/46 \text{ nm}^{-1}$, $6/46 \text{ nm}^{-1}$, $8/46 \text{ nm}^{-1}$, $9/46 \text{ nm}^{-1}$, $10/46 \text{ nm}^{-1} = 1/4,6 \text{ nm}^{-1}$ (in der Abbildung sind die wirklichen Abstände in nm angegeben). Der Kreis bezeichnet die Position von Daten bei 2 nm Auflösung.

3.1.3 Untersuchungen zur Verankerung der Hami

Um Hinweise auf die Verankerung und damit auf den Synthesort der Hami zu erhalten, wurden die Hami durch die SDS- Lyse- Methode isoliert (s. II.14.1.3.2). Wie durch Elektronenmikroskopie nachgewiesen, wurde durch SDS die Zellwand und damit die Zellen fast vollständig zerstört, während die Hami nicht beeinträchtigt wurden. Diese Methode sollte ein mehr oder weniger sanftes Herauslösen der Hami ermöglichen und dabei die beteiligten angebundene Proteinstrukturen erhalten.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der intrazellulären Enden der Hami zeigten, dass sie in den meisten Fällen eine deutliche Verdickung aufwiesen (Abb. 37). Häufig waren diese Strukturen umgeben von fibrillärem Material, das an die Protofilamente der Hami erinnerte.

Aufnahmen von strukturell sehr stark beeinträchtigten Zellen (nach SDS- Behandlung) zeigten, dass die Hami in der Cytoplasmamembran verankert waren und durch den periplasmatischen Raum nach außen ragten (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung befindet sich im Einklang mit Ergebnissen aus der Cryo- Elektronentomographie, welche die Verankerung in der Cytoplasmamembran bestätigte und sogar eine (kurze) Fortsetzung der Hami ins Cytoplasma vermuten lässt (Ariane Briegel, pers. Mitt.). Bei dieser Verlängerung könnte es sich um die transmissions- elektronenmikroskopisch detektierten Verankerungs- verdickungen (Abb. 37) handeln.



Abbildung 37: Elektronen- mikroskopische Aufnahme der vermutlichen Verankerungs- strukturen der Hami (Pfeile), Negativkontrastierung. Maßstab: 100 nm.

3.2 Cryo- Elektronentomographie

Die Cryo- Elektronentomographie wurde in Zusammenarbeit mit Ariane Briegel (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

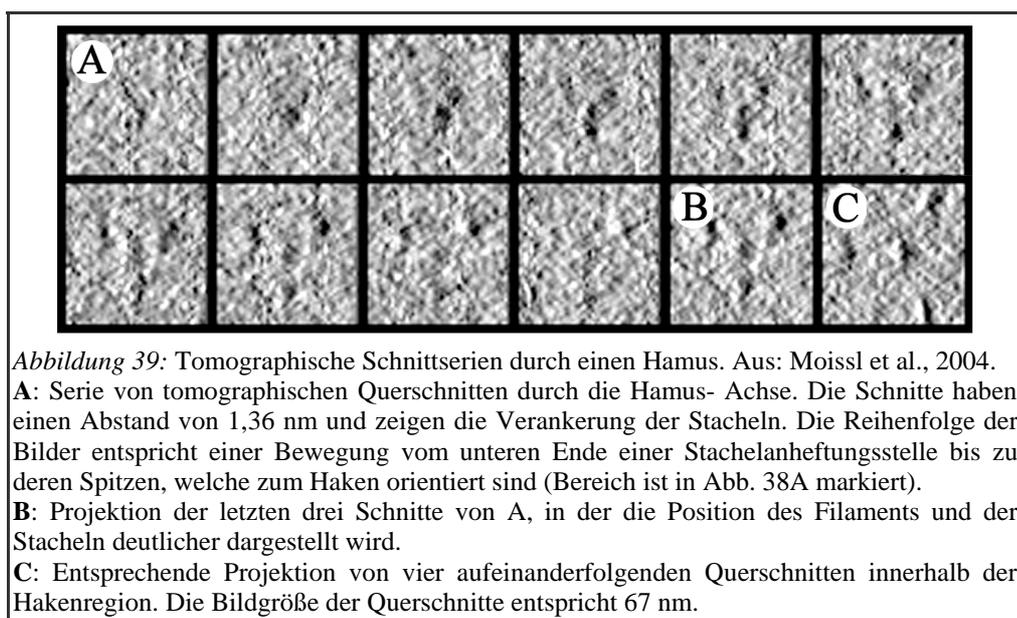
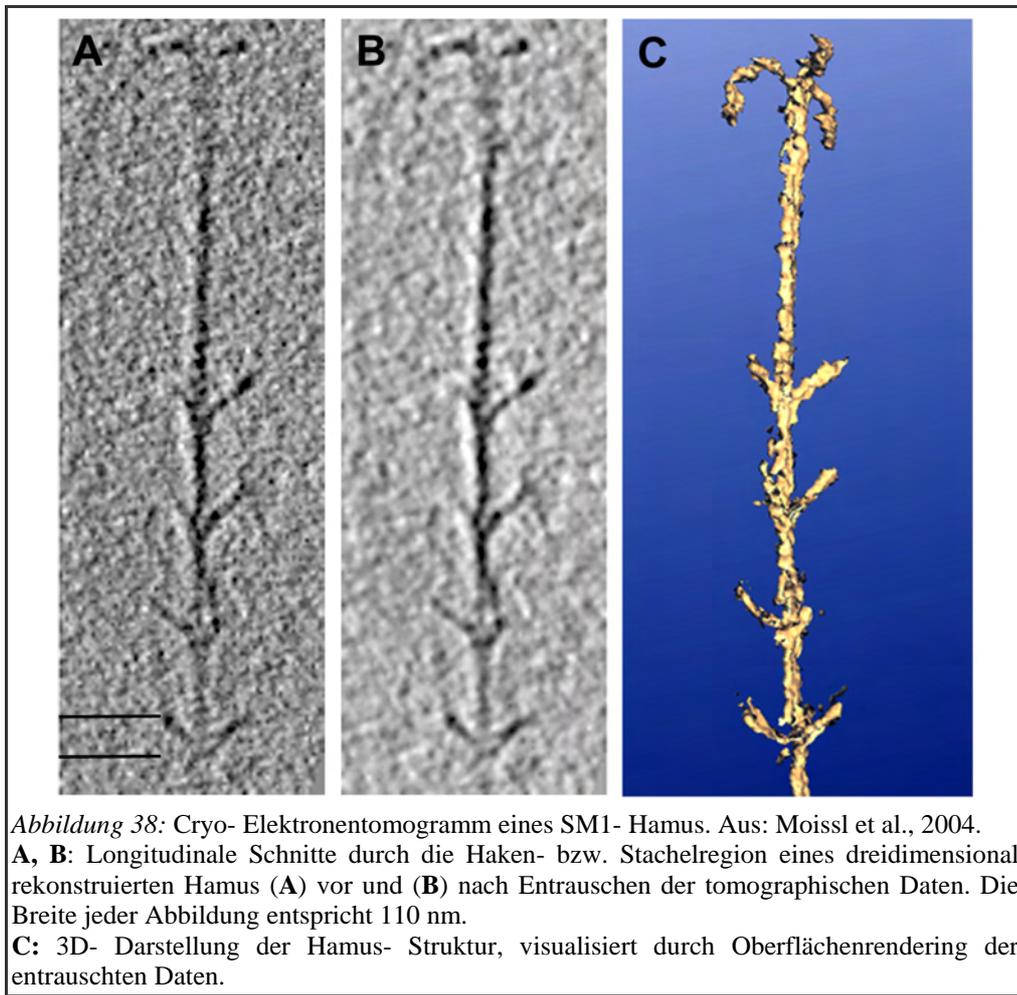
Die frisch gewonnenen SM1 Zellen wurden form- und strukturerhaltend in original Moorwasser für die Cryo- Elektronentomographie präpariert.

Zunächst wurde der räumliche Aufbau der Hami und die Anordnung der Stacheln und Haken genauer analysiert. Tomogramme der Stachelregionen einzelner Hami zeigten, dass jeweils drei Stacheln aus dem zentralen Filament heraustreten; die Anzahl der Stacheln war in negativkontrastierten Präparaten nicht eindeutig bestimmbar gewesen. Wie aus longitudinalen und transversalen Schnitten des rekonstruierten Hamus ersichtlich wurde (Abb. 38), liegen die Ansatzpunkte eines Stacheltripels nicht exakt auf der gleichen Höhe des Filaments, sondern können um etwa 2- 5 nm zueinander versetzt sein (Abb. 39). Bezüglich der Filamentachse nehmen die Stacheln einen Winkel von ca. 45- 60° ein und zeigen in Richtung des endständigen Hakens. Die Stacheln beschreiben zueinander einen Winkel von 120°.

Die gleiche Anordnung wurde für die drei Arme des Hakens beobachtet, was auf eine dreifache reguläre Grundstruktur des zentralen Filaments schließen lässt. Auch durch Cryo- Elektronentomographie konnte die Biegung der Hakenarme und deren verdickte Spitze gezeigt werden.

Ebenso bestätigen die Aufnahmen, dass die Stacheln dünner sind als das helikale Filament: Die Dicke liegt zwischen 3,5 bis 4,5 nm, während das zentrale Filament einen Durchmesser von etwa 7 nm besitzt. Die Untereinheiten der Stacheln scheinen eine Größe von 4,6 nm aufzuweisen, welche entlang der Stachelachse aneinander gereiht sind. Dabei ist eine strukturelle Ähnlichkeit

zu den Hamus- Protofilamenten offensichtlich. Jeder Stachel ist vermutlich aus 5 bis 7 solcher Untereinheiten aufgebaut, was in einer Stachellänge von etwa 30 nm resultiert.



3.3 Entwicklung eines Modells

Die Hami aller, über einen längeren Zeitraum in verschiedensten Experimenten untersuchten Zellen, zeigten die gleiche grundlegende Architektur, die gleichen Abmessungen und Proportionen. Die einzige detektierbare Variation war die Gesamtlänge der Hami, welche von etwa 1 bis zu 3 μm reichte und durchschnittlich 2 μm betrug. Alle Beobachtungen und Daten wurden zur Erstellung eines Hamus- Modells verwendet (Abb. 40, 41).

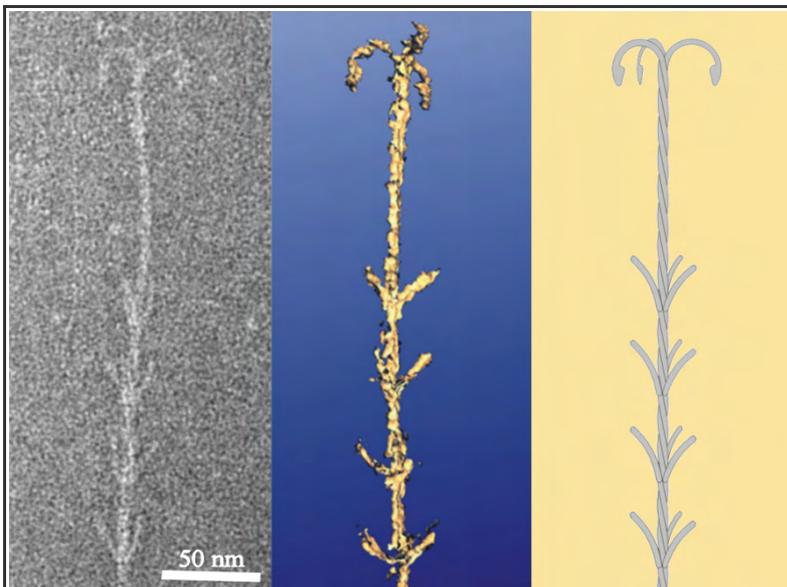


Abbildung 41: Vergleich des Modells (rechts) mit elektronenmikroskopischer Aufnahme eines Hamus (links, Negativkontrastierung) und Cryo- elektronenmikroskopischer Rekonstruktion (Mitte) im selben Maßstab.

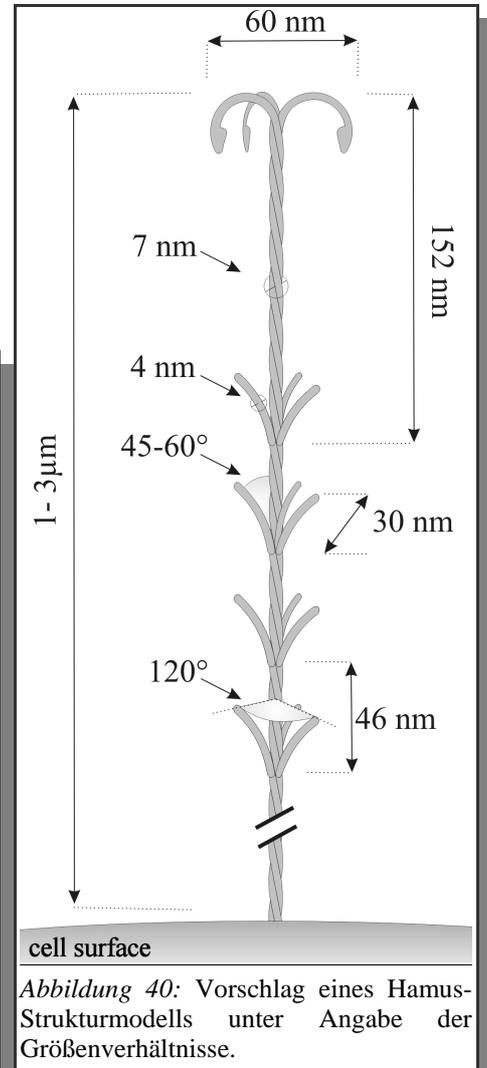


Abbildung 40: Vorschlag eines Hamus-Strukturmodells unter Angabe der Größenverhältnisse.

3.4 Untersuchungen zur Adhäsion(skraft) der SM1- Hami

Aufgrund der strukturellen Beschaffenheit der SM1- Hami kann eine adhäsive Funktion vermutet werden. Bereits in elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die Verknüpfung zweier Zellen durch Haken/Haken- oder Haken/Stachelregion- Kontakt nachgewiesen (Abb. 42). Im Folgenden sollten Funktionsstudien zur Adhäsionskraft und -fähigkeit durchgeführt werden.

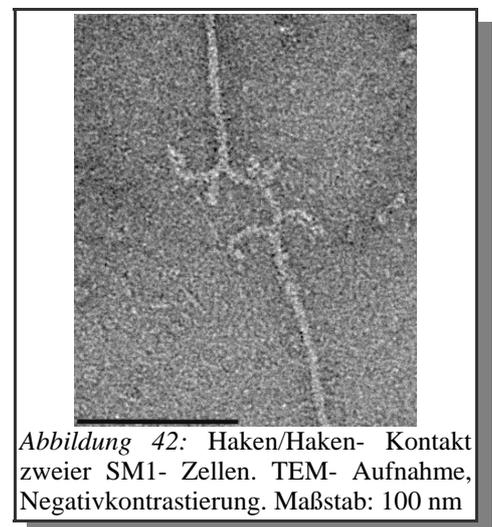


Abbildung 42: Haken/Haken- Kontakt zweier SM1- Zellen. TEM- Aufnahme, Negativkontrastierung. Maßstab: 100 nm

3.4.1 Experimente mit der optischen Laserpinzette

Für die Adhäsionsexperimente mit SM1 Hami wurde eine optische Laserpinzette (Ashkin et al., 1987; Huber et al., 1995) verwendet, welche ohne Schädigung der Zelle deren dreidimensionale Manipulation im Medium erlaubt.

Zunächst wurden mit unterschiedlichen Chemikalien (Polylysin, Polyglutamat, Gelatine, Rinderserumalbumin, Laminin, Fibronectin, Bind- Silan) beschichtete Oberflächen für die Adhäsion bereitgestellt. Alle Beschichtungsmaterialien förderten die starke Adhäsion der Archaeen. Sobald sie sich einmal auf einer Oberfläche festgesetzt hatten, waren sie - selbst unter Verwendung der maximalen Ausgangsleistung der optischen Laserpinzette (Huber et al., 1995; Huber und Stetter, 2001) - nicht mehr ablösbar.

In weiteren Adhäsionsstudien wurden zunächst in Lösung befindliche SM1- Zellen auf einer Oberfläche (Rinderserumalbumin beschichtet) fixiert. Anschließend wurden einzelne, suspendierte archaeelle Zellen mittels Laserstrahl eingefangen und auf die bereits fixierten Zellen gesetzt. Alle Versuche, die so entstandenen Zellpaare durch die Laserpinzette wieder voneinander zu trennen, schlugen fehl. Diese Beobachtungen lassen auch zwischen den Zellen große Adhäsionskräfte vermuten, welche durch die Hami vermittelt werden.

3.4.2 Inkubationsstudien zur Adhäsion

Wurde eine Suspension einzeln in Lösung vorliegender SM1- Zellen über Nacht unter einer leichten Drehbewegung inkubiert, bildete sich ein flockenförmiger 'Biofilm' (Abb. 43). Die Adhäsion der Zellen kann hierbei auf die Einwirkung der physikalischen Drehung zurückgeführt werden: Die Hami der Zellen verhaken sich ineinander und führen zu einer elektronenmikroskopisch nachgewiesenen festen, regelmäßig gestalteten Verbindung zwischen den SM1

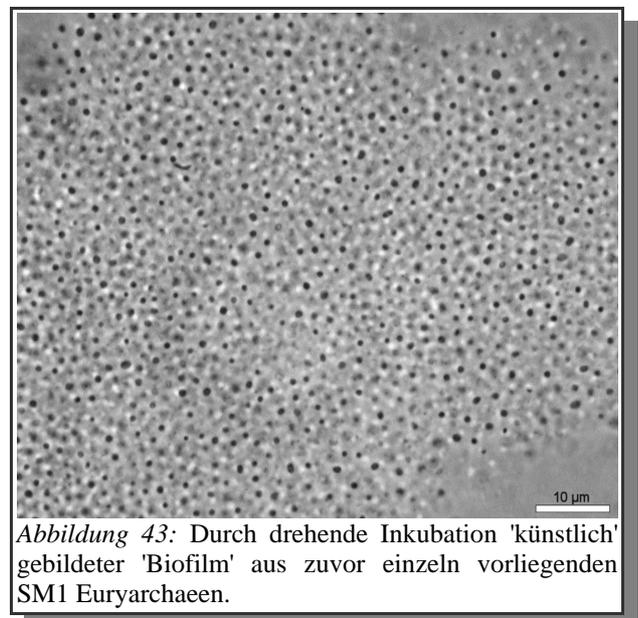


Abbildung 43: Durch drehende Inkubation 'künstlich' gebildeter 'Biofilm' aus zuvor einzeln vorliegenden SM1 Euryarchaeen.

Euryarchaeen. Die räumliche Architektur des künstlich gebildeten 'Biofilms' erinnerte stark an den Aufbau der archaeellen Mikrokolonie im Inneren der mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft, woraus sich eine strukturbildende Funktion der Hami ableiten lässt.

3.5 Proteinbiochemische und immunologische Untersuchungen

3.5.1 Abtrennung und Reinigung der SM1- Hami

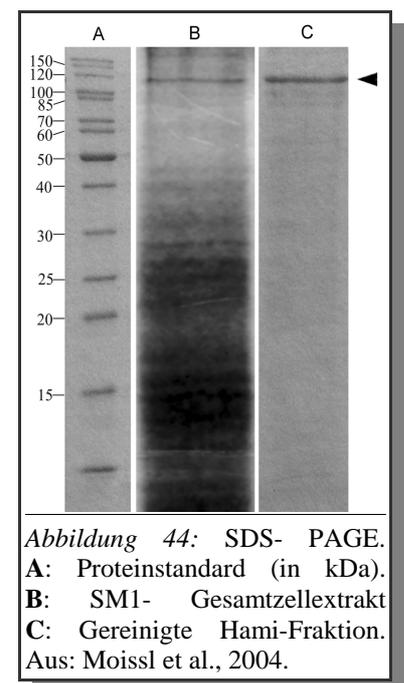
Um die Hami biochemisch charakterisieren zu können, mussten sie zunächst in möglichst reiner Form gewonnen werden. Dazu wurden SM1 Zellen mit verschiedenen mechanischen Methoden, wie Ultraturrax, Ultraschall oder Glasperlen, behandelt (s. II.14.1.3). Transmissions-Elektronenmikroskopie der unterschiedlichen Hami- Präparationen zeigte, dass bei der Glasperlenextraktion die besten Resultate bezüglich Quantität und Qualität erhalten wurden. Es konnten signifikante Mengen an Hami gewonnen werden (bis zu 40 µg Protein pro Hamipräparation), während die Zellen nur minimal lysierten. Die Präparationen bestanden fast ausschließlich aus Hami und wurden deshalb meist ohne weitere Reinigung für die Experimente verwendet. Alternativ konnten Hami durch eine sanfte Lyse der Zellen (Zugabe von SDS, 0,01% (w/v) Endkonzentration) isoliert werden.

Eine weitere Reinigung der Hamifraktion (v.a. notwendig bei der Isolierung der Hami durch SDS) konnte durch Dichtegradientenzentrifugation in einer Saccharoselösung (s. II.14.2.1) erreicht werden. Die Hami bildeten dabei im unteren Drittel des Zentrifugenröhrchens eine gut sichtbare Bande, die durch Anstechen mit einer Kanüle gezapft werden konnte. Falls nötig, wurde die Saccharose durch eine anschließende Dialyse entfernt. Eine Fällung mittels Ammoniumsulfat hingegen (10- 50% Sättigung) erbrachte nicht den gewünschten Reinigungseffekt.

3.5.2 Biochemische Analysen

3.5.2.1 SDS- PAGE

In vorhergehenden Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass Proteinase K die Hami der SM1 Euryarchaeen abspaltet (s. III.2.3.2), diese also vorwiegend aus Proteinen aufgebaut sein müssen. Um ihre Zusammensetzung dahingehend zu untersuchen, wurden SDS- PAGE- Experimente durchgeführt. Unter reduzierenden Bedingungen dissoziierten die gereinigten Hami zu einer Hauptuntereinheit mit einer apparenten Masse von etwa 120kDa (Abb. 44). Diese dominierende Bande war bereits im präparierten SM1-Zellextrakt deutlich erkennbar (Abb. 44B).



3.5.2.2 Nachweis einer Glykosilierung

Geißel- und S-Layer- Proteine zeigen innerhalb der Archaea typischerweise eine signifikante N- Glykosilierung (Jarrell et al., 2001; Upreti et al., 2003; Eichler, 2004). Aus diesem Grund wurde das 120kDa Protein bezüglich eines möglichen Kohlehydratanteils überprüft. Jedoch erbrachten beide angewendeten Methoden (PAS- Färbung und Verdau mit PNGaseF) keine Hinweise auf eine Glykosilierung.

3.5.2.3 Immunologische Untersuchungen

Für immunologische Experimente wurde das anti- SM1- Serum verwendet (s. II.15.1). Um die Zielmoleküle genauer spezifizieren zu können, wurden Immunoblot- Experimente mit Ganzzellextrakten und Hami- Präparationen durchgeführt. Die Analysen zeigten, dass in beiden Fällen die Antikörper stark mit dem 120kDa Protein reagierten (Abb. 45). Um zu verifizieren, dass das identifizierte 120kDa Protein einen grundlegenden Teil der Hami darstellt, wurden mehrere SDS- PAGE- Gele von Hami- Präparationen gebロットet, die 120kDa Proteinbanden ausgeschnitten und für eine Affinitätsreinigung der Antikörper verwendet. Die erhaltenen Antikörper zeigten in Immunoblots eine spezifische Reaktion gegen das 120kDa Protein. Weiterhin wurden die affinitätsgereinigten Antikörper für Immunogold- Markierungen verwendet. Elektronenmikroskopisch wurde nachgewiesen, dass diese Antikörper ausschließlich an die Hami der SM1 Euryarchaeen binden (Abb. 46). Die Bindungsspezifität wurde in unabhängigen Immuno-FISH- Studien bestätigt. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass das 120kDa Protein eine Hauptkomponente der SM1- Hami ist.

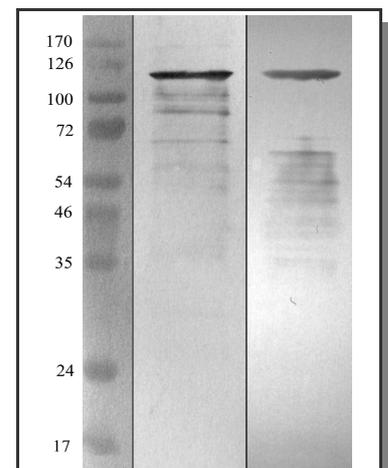


Abbildung 45: Abbildung eines Immunoblot- Experiments.

Links: Proteinstandard (in kDa)

Mitte: SM1- Gesamtzellextrakt

Rechts: Gereinigte Hami.

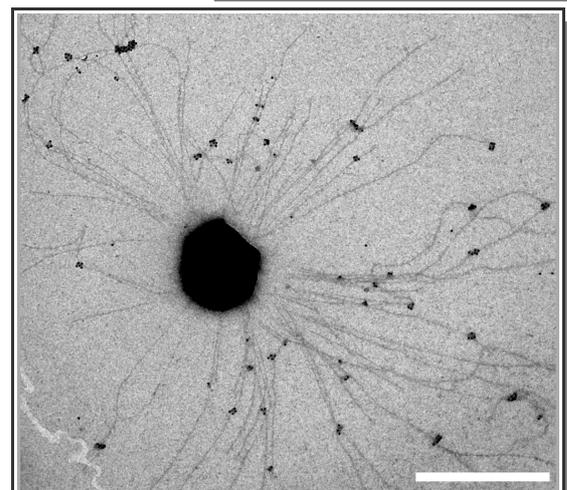


Abbildung 46: Immunogold- Markierung der Hami einer SM1 euryarchaeellen Zelle mit affinitätsgereinigten Antikörpern. Um vollständige Bedeckung der Hami zu verhindern, wurden die Immunogold- Antikörper stark verdünnt. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Negativkontrastierung. Maßstab: 1µm. Aus: Moissl et al., 2004.

3.5.2.4 Untersuchungen zur Stabilität

Die Hami zeigten sich sehr resistent gegenüber physikalischer und chemischer Behandlung. Wie durch Elektronenmikroskopie nachgewiesen wurde, blieb ihre Ultrastruktur sogar nach einstündiger Inkubation bei Temperaturen zwischen 0 und 70°C und bei pH- Werten zwischen 0,5 und 11,5 stabil. Erst bei Temperaturen über 80°C oder pH größer 12,5 konnten die Hami in elektronenmikroskopischen Präparaten nicht mehr in ihrer ursprünglichen Form detektiert werden.

Als Folge ihrer auf Proteinen basierenden Struktur waren die Hami sehr sensitiv gegenüber enzymatischen Behandlungen mit Proteinase K, Protease, Pronase und Trypsin, was durch ein Verschwinden der typischen 120kDa Proteinbande auf dem SDS-PAGE gezeigt werden konnte.

3.5.3 Sequenzierung des Proteins

Zunächst wurde versucht, die N-terminale Sequenz des 120kDa Proteins durch Edman-Abbau zu bestimmen. Dieses Experiment war nicht erfolgreich, was darauf hindeuten könnte, dass das Protein am N- Terminus modifiziert sein könnte (Frost et al., 1983; Lévesque et al., 2001). Deshalb war es notwendig, das Protein zunächst tryptisch zu verdauen, die Peptide mittels HPLC zu trennen und dadurch interne Teilsequenzen des Proteins mittels Edman-Abbau zu gewinnen (Tab. 18).

Peptid 1	DFVXDANXNPNVHIVV
Peptid 2	LQISSAGAGTEPTL(P)Q
Peptid 3	MAYFHEGK
Peptid 4	LDEGAYELDE/GLF/GLIGN

Tabelle 18: Interne Proteinteilsequenzen des 120kDa Hami- Proteins

3.5.4 Konstruktion von Primern auf der Grundlage der Peptidsequenzen

Die Proteinteilsequenzen wurden als Grundlage für die Konstruktion von Primern verwendet. Da über den Codon- Gebrauch des SM1 Euryarchaeons bisher nichts bekannt war, mussten sog. Wobble- Primer konstruiert werden (Tab. 19).

Peptid 1 wurde für die Konstruktion von Primern vernachlässigt, da dessen Sequenz nicht vollständig auswertbar war. Ausgehend von den übrigen drei Sequenzen wurde jeweils der entsprechende Vorwärts- und Rückwärtsprimer konstruiert, da die Reihenfolge bzw. Anordnung dieser Sequenzen innerhalb des Gens nicht bekannt war.

<i>Bezeichnung des Primers</i>	<i>Sequenz 5' -> 3'</i>	<i>Grundlegende Proteinsequenz</i>
hook I f	CARATHAGYAGYGCNGGNGC	LQISSAGAGTEPT, Peptid 2
hook I r	GCNCCNGCRCTRCTDATYTG	(revers komplementär)
hook II f	ATGGCNTAYTTYCAYGARGG	MAYFHEGK, Peptid 3
hook II r	CCYTTCRTGRAARTANGCC	(revers komplementär)
hook III f	GAYGARGGNGCNTAYGARYTNGA	LDEGAYELDE/GLF/GLIGN, Peptid 4
hook III r	TCNARYTCRTANGCNCCYTCRTC	(revers komplementär)

Tabelle 19: Primersequenzen, abgeleitet von den Peptidsequenzen.
Grau markiert: Teil der Peptidsequenz, der als Grundlage für die Primerkonstruktion verwendet wurde.

3.5.5 PCR zur Amplifikation von Teilen des Hami- Gens

Um mit den Wobble- Primern PCR- Produkte erhalten zu können, mussten bei der Standardamplifikation (s. II.9) die Konzentrationen erhöht werden (ca 1,5 µg pro PCR-Ansatz). Dabei wurden sämtliche Kombinationen von Vorwärts- und Rückwärtsprimern permutiert (Abb. 47). Die benötigte DNA wurde aus hochreinen Fraktionen der SM1 Netzpopulation gewonnen.

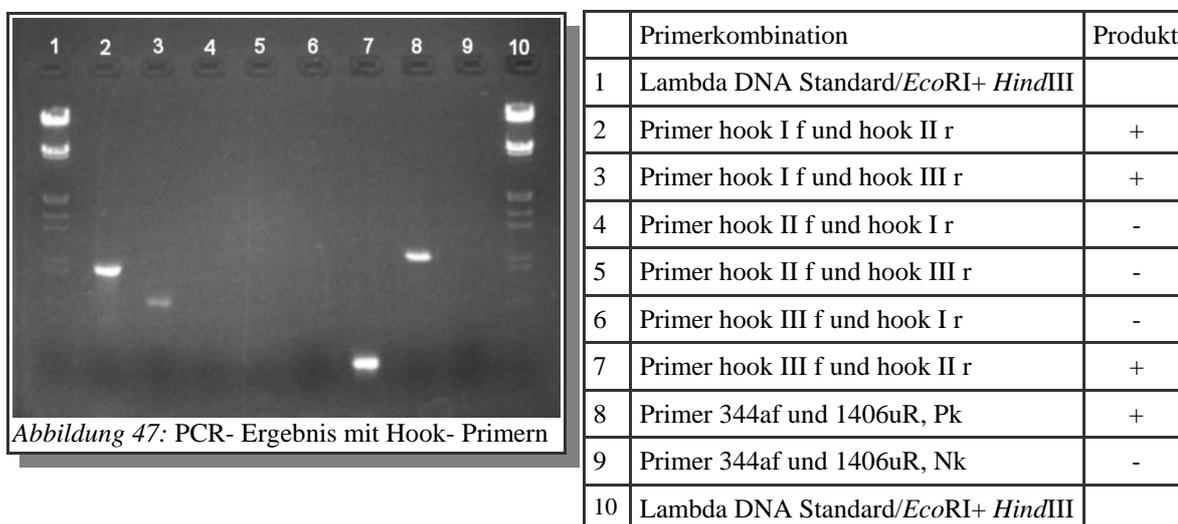


Abbildung 47: PCR- Ergebnis mit Hook- Primern

Aus der abgeschätzten Länge der jeweiligen Amplifikate ergab sich für die Anordnung der Primersequenzen im Gen folgendes Bild (Abb. 48):

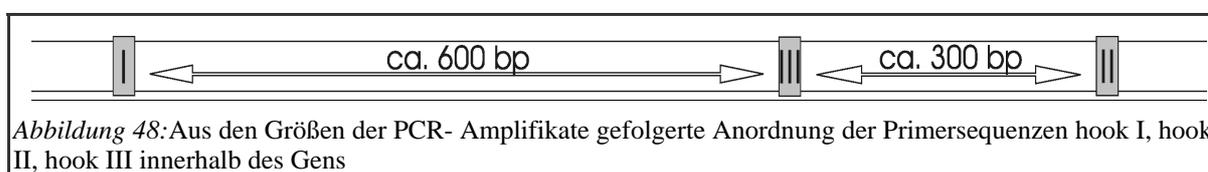


Abbildung 48: Aus den Größen der PCR- Amplifikate gefolgerte Anordnung der Primersequenzen hook I, hook II, hook III innerhalb des Gens

Die erhaltenen PCR- Produkte wurden sequenziert und mit Hilfe von BioEdit (Hall, 1999) einem Alignment unterzogen und ausgewertet (s. Anhang). Der Datenbankvergleich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ergab keine signifikanten Ergebnisse bezüglich einer Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten bzw. annotierten Genen.

3.5.6 Vorversuche und Sequenzierung des Hami- Gens

Ein weiteres Ziel war nun, das Hami- Gen in seiner Sequenz vollständig zu erfassen. Dazu wird die genomische DNA mittels geeigneter Restriktionsenzyme verdaut, das gentragende Stück durch Southern Blot identifiziert und in einen Vektor kloniert. In den Vektor eingebunden kann durch klassisches 'Primer- Walking' nach und nach die vollständige Gensequenz gewonnen werden.

3.5.6.1 Restriktionsverdau genomischer SM1- DNA

Ausgehend von 25 verwendeten Restriktionsendonukleasen konnte lediglich durch die Enzyme HincII, EcoRV und - wie erst später festgestellt - KpnI ein Verdau der DNA erreicht werden. HincII und EcoRV haben zudem die Eigenschaft, stumpfe Enden ('blunt ends') zu schneiden, was eine erfolgreiche Klonierung erschwert.

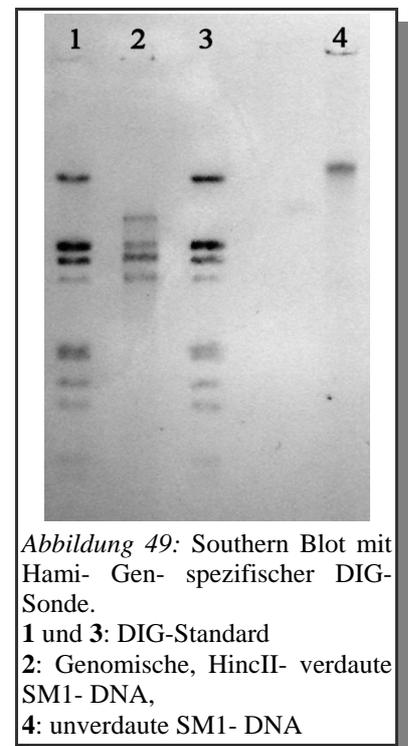
3.5.6.2 Detektion des Hami- Gens durch Southern Blot

Für die Southern- Blot- Analysen wurde HincII verdaute SM1- DNA auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer DIG- markierten, Hami- Gen- spezifischen Sonde hybridisiert.

Diese Sonde (ca. 570 bp lang) wurde durch eine Amplifikation (s. II.17.5.1) mit den Primern pili 1 f und pili 2 r (s. Anhang) aus genomischer DNA gewonnen.

Mit der Sonde reagierten 4 Banden (Spur 2, Abb. 49), was auf die Existenz mehrerer Kopien des Hami- Gens im SM1- Genom hindeutet.

Der Versuch, ein auf diese Weise identifiziertes Fragment in einen Vektor zu klonieren, schlug fehl.



3.5.6.3 'Primer- Walking' mittels RAGE und Erfassung der Gensequenz

Da die Übertragung des Hami- Gens in einen Vektor nicht erfolgreich und aufgrund der begrenzten Auswahl aktiver Restriktionsenzyme ein weiteres Vorgehen nach dieser Methode nicht zielführend war, musste eine Alternative entwickelt werden, welche die Sequenzierung des Hami- Gens ermöglichte.

In der Literatur wurde bereits eine Methode (RAGE) beschrieben, welche die genomischen Flanken eines bekannten Sequenzstücks erfassen lässt, jedoch dessen Klonierung erfordert (Cormack und Somssich, 1997; Rudi et al., 1999). Auf dieser Basis wurde nun eine Methode zur schrittweisen, direkten Sequenzierung der flankierenden, gesuchten Sequenzen entwickelt (s. II.17.2).

Die aus der RAGE erhaltenen Sequenzen wurden in das bestehende Alignment eingerechnet und als Grundlage für die Konstruktion neuer Primer verwendet. Mit jedem RAGE- Durchgang konnten bis zu 500 bp der unbekanntem Gensequenz erhalten werden. Alle Bereiche der Gensequenz wurden mindestens zweimal sequenziert, um Fehler auszuschließen.

Dadurch konnte das Hami- Gen vom putativen Start- Codon bis zum Stop- Codon sequenziert werden (s. Anhang).

3.5.6.4 Theoretische Eigenschaften des Hami- Gens

Mit Hilfe einer Datenbankanalyse (www.expasy.com) konnten - ausgehend von der Hami- Gensequenz - Informationen über die Eigenschaften des Hami- Gens und des daraus resultierenden Proteins gewonnen werden.

Erneut konnten keine signifikanten Homologien zu bereits hinterlegten Gen- und Proteinsequenzen detektiert werden.

Das theoretisch berechnete Molekulargewicht des zugehörigen Proteins beträgt 40.158 Da; dieser Wert entspricht einem Drittel der Molekülgröße des 120kDa Proteins, welches auf dem SDS- PAGE detektiert wurde. Im nativen Zustand ist das Protein also vermutlich ein Trimer oder ein heterogen zusammengesetztes Protein, welches durch die herkömmliche SDS- PAGE nicht in Untereinheiten zerkleinert werden konnte. Da das Protein laut Datenbankrecherche hydrophilen Charakter besitzt, handelt es sich vermutlich um ein extrazelluläres Protein. Es wurde keine Transmembrandomäne detektiert. Jedoch könnte um Position 32 ein Signalpeptid zu erwarten sein.

3.5.7 Klonierung des Hami- Gens und Expression

Das Hami- Gen konnte erfolgreich in den Expressionsvektor pET28a kloniert werden.

Nach Transformation des konstruierten Expressionsplasmids in die *E. coli*- Stämme BL21 (DE3) paCYC- RIL, C43 (DE3) paCYC- RIL und C43 (DE3) WALKER und Induktion mit IPTG konnte sowohl bei 37°C als auch bei 23°C eine Expression des Hami- Gens durch SDS-PAGE und Immuno- Blot mit anti- His- Tag- Antikörpern nachgewiesen werden.

Bei den Stämmen B21 und C43 kam es sowohl bei 37°C als auch bei 23°C zur Bildung von 'inclusion bodies'.

Die Expressionszellen wurden elektronenmikroskopisch untersucht und zeigten keine äußeren morphologischen Veränderungen.

3.5.8 Detektion der mRNA des Hami- Gens in der natürlichen SM1 Population

Zunächst wurde RNA aus möglichst frischen Proben des SM1 Euryarchaeons gewonnen. Eine DNA- Kontamination wurde durch einen DNase- Verdau während der Isolierung der RNA ausgeschlossen. Die RNA wurde in cDNA transkribiert und mit sequenzspezifischen Primern (pili 1 f und pili 2 r) in einer Standard- PCR amplifiziert. Das Amplifikat zeigte auf dem Gel die gleiche Größe wie das Amplifikat aus genomischer DNA und erwies sich nach Sequenzierung als identisch.

Dadurch konnte die natürliche Expression des Hami- Gens nachgewiesen werden. Weiterhin kann gefolgert werden, dass die RNA, zumindest in dem kurzen, untersuchten Bereich, keinerlei Modifikationen unterzogen wird.

4. Mikroskopische und phylogenetische Untersuchungen zur Biologie des SM1 Euryarchaeons in einem weiteren Biotop: Islinger Mühlbach

4.1 Probenahmeort: Islinger Mühlbach

Die sulfidhaltige Quelle am Islinger Mühlbach befindet sich westlich des Regensburger Stadtteils Burgweinting (Abb. 50). Zusammen mit einer anderen Quelle bildet sie zunächst den Graben in der Au, der nach etwa 400 m in den Islinger Mühlbach mündet. Die Quelle entspringt einem metallgefassten Bohrloch und geht direkt an der Oberfläche in einen kleinen Bachlauf über (Abb. 51). Schon kurz nach der Austrittsstelle sind verschiedenste mikrobielle Matten (vorwiegend grau-weiß und grün) sichtbar. In einem Bereich von ca. 10 m entlang des Bachlaufs sind mikrobielle Beläge und kleine Streamer mit perlenartigen Verdickungen zu erkennen.

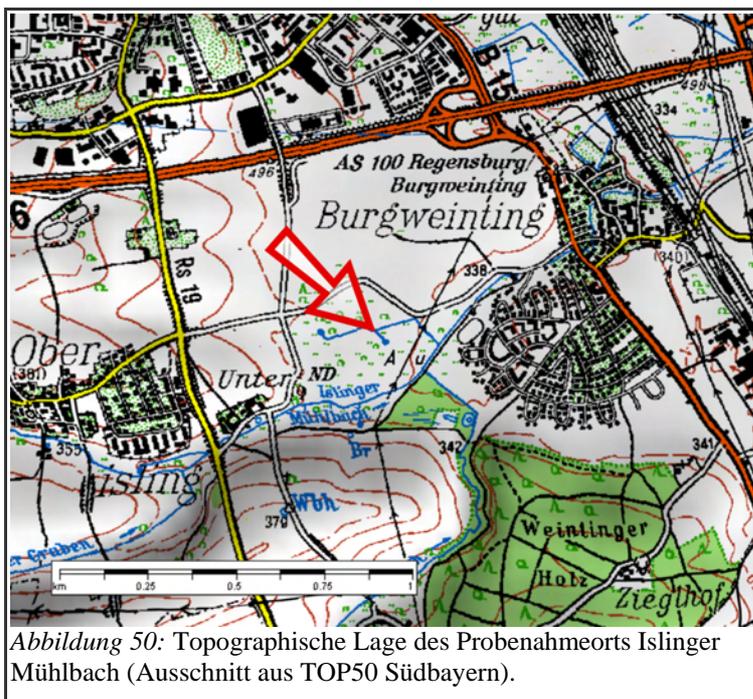


Abbildung 50: Topographische Lage des Probenahmeorts Islinger Mühlbach (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern).

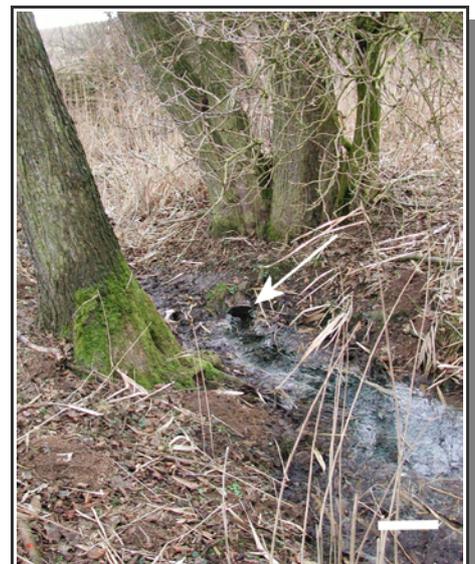


Abbildung 51: Übersicht über die Quelle am Islinger Mühlbach. Der weiße Pfeil deutet auf das Bohrloch. Maßstab: 0,5 m. Aus: Henneberger, 2002.

<i>Parameter</i>	<i>Quelle Islinger Mühlbach</i>
Temperatur	10°C
pH	7,2
S ²⁻	0,5 mg/l
O ₂	0,13 mg/l*
Leitfähigkeit	685 µS/cm*

Tabelle 20: Parameter des Quellwassers,
* Daten aus Rudolph et al., 2004

4.2 Allgemeine Untersuchungen zu den Perlenkettengemeinschaften im Islinger Mühlbach

Im Rahmen umfassender archaeell- ökologischer Untersuchungen von (bayerischen) Schwefelquellen wurden in einer sulfidischen Quelle des Islinger Mühlbachs bei Regensburg SM1 Euryarchaeen in perlenkettenartigen mikrobiellen Verbänden nachgewiesen (Rudolph et al., 2004, Abb. 52). Phylogenetische Analysen bewiesen die vollständige Sequenzidentität der SM1 Euryarchaeen aus Sippenauer Moor und Islinger Mühlbach bezüglich 16S rRNA- Gen- und 16- 23S- Interspacer- Sequenz (Rudolph et al., 2004). Darüberhinaus wiesen die Archaeen aus dem Islinger Mühlbach ähnliche strukturelle Eigenschaften wie die SM1 Euryarchaeen aus dem Sippenauer Moor auf (z.B. Wachstum in Mikrokolonie mit regelmäßigen Abständen der Kokken). Sie konnten ebenfalls erfolgreich mit der SM1- spezifischen Sonde hybridisiert werden (Rudolph et al, 2004).



Abbildung 52: Aufnahme einer im Biotop Islinger Mühlbach flottierenden Perlenkette. Die gelben Pfeile zeigen auf Perlen, die grünen Pfeile auf die Verbindung zwischen den Perlen. Die roten Pfeile zeigen auf typische Mikrobengbüschel (Streamer). Maßstab: 2 cm. Aus: Rudolph et al., 2004.

Wie jedoch mit dem bloßen Auge

erkennbar ist, unterscheiden sich die Perlen des Islinger Mühlbachs deutlich von den kompakten, weißen Perlen aus dem Sippenauer Moor: Sie erscheinen in ihrer Farbe grauer und ihrer Morphologie 'flauschiger' (Abb. 52, Abb. 53).



Abbildung 53: Detailaufnahme einer mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft aus dem Biotop. Gut erkennbar sind die unterschiedlich großen Perlen in regelmäßigen Abständen. Maßstab: 1cm.

Mikroskopische Untersuchungen von Perlen des Islinger Mühlbachs belegten - analog zum Sippenauer Moor - das Vorkommen filamentöser Mikroben: Neben der SM1- Mikrokolonie traten am häufigsten dünne, leicht gewellte Mikroorganismen auf, die keine sichtbaren Einlagerungen in ihren Zellen besaßen. Weiterhin wurden - wenn auch eher selten - *Thiothrix*-

ähnliche, rosettenbildende, filamentöse Organismen gefunden, welche viele lichtbrechende Einschlüsse aufwiesen.

4.2.1 Bakterielle Phylogenie

Für die Untersuchung des 16S rRNA- Genpools wurde eine Perle im Biotop ausgewählt. Eine Hälfte der Perle wurde zunächst einer FISH- Untersuchung mit bakteriellen und archaeellen Sonden unterzogen, welche die Existenz einer archaeellen Mikrokolonie im Inneren zeigte. Die genomische DNA der zweiten Hälfte der Perle wurde einer archaeellen Phylogenie, in der die Sequenz des SM1 Euryarchaeons nachgewiesen wurde (Rudolph et al, 2004), und einer bakteriellen Phylogenie (Primer 9bF und 1406uR) unterzogen.

Insgesamt wurden 103 Klone analysiert, die über ARDRA und Sequenzierung einer einzigen bakteriellen 16S rRNA- Gensequenz (IMB1) zuzuordnen waren (Abb. 54). Darüberhinaus zeigte diese Sequenz eine vollständige Übereinstimmung mit der Klonsequenz sipK119, die in der Analyse des bakteriellen 16S rRNA- Genpools der Perle aus dem Sippenauer Moor nachgewiesen wurde (s. III.1.2.2). Diese Sequenz ist einem Organismus der ϵ -Proteobakterien zuzuordnen und weist große phylogenetische Abstände zu bisher kultivierten Vertretern dieses Phylums auf. Die Sequenz des sog. IMB1 ϵ -Proteobakteriums clustert zusammen mit kürzlich identifizierten Klonsequenzen mikrobieller Matten der Lower Kane Kave, Wyoming (LKC1; Engel et al., 2003).

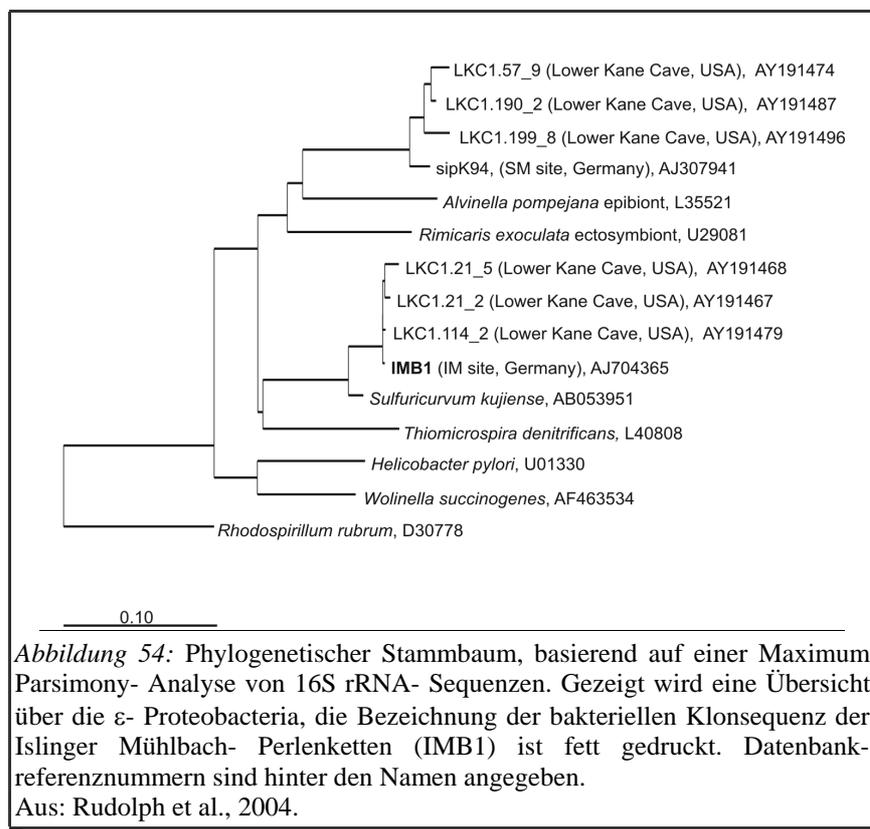


Abbildung 54: Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf einer Maximum Parsimony- Analyse von 16S rRNA- Sequenzen. Gezeigt wird eine Übersicht über die ϵ - Proteobacteria, die Bezeichnung der bakteriellen Klonsequenz der Islinger Mühlbach- Perlenketten (IMB1) ist fett gedruckt. Datenbankreferenznummern sind hinter den Namen angegeben.

Aus: Rudolph et al., 2004.

In einer vorausgegangenen bakteriellen Phylogenie einer Perle aus dem Islinger Mühlbach konnte ebenfalls die Vorherrschaft dieser Sequenz gezeigt werden. Außerdem wurde dabei im Unterschuß eine 16S rRNA- Gensequenz eines Vertreters der Gattung *Thiothrix* detektiert, die große Sequenzähnlichkeit zur bereits erhaltenen SipK4- Sequenz aus dem Sippenauer Moor (s. III.1.2.2) aufwies.

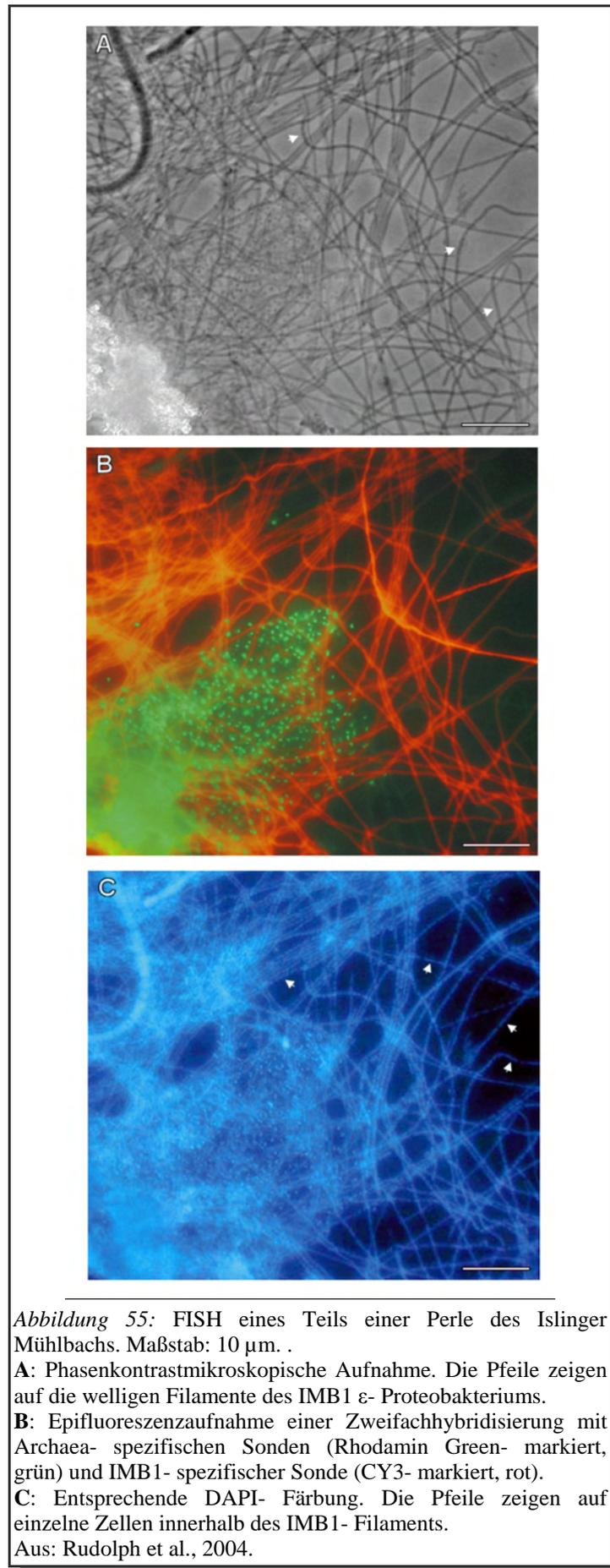
4.2.2 FISH- Analysen und Untersuchung der bakteriellen Partner

Zunächst wurden FISH- Analysen mikrobieller Perlenkettengemeinschaften des Islinger Mühlbachs mit Archaea-, und Bacteria- sowie der SM1- spezifischen Sonde durchgeführt. Die Hybridisierungen zeigten, dass die euryarchaeelle SM1- Mikrokolonie von filamentbildenden Bakterien umgeben war (ca. 95% aller bakteriellen Morphotypen). Die vorherrschenden Filamente wiesen eine wellenförmige Morphologie auf, hatten einen Durchmesser von etwa 0,5 μm und zeigten keine sichtbaren Zelleinschlüsse. Weiterhin konnten vereinzelt bakterielle *Thiothrix*- ähnliche, rosettenbildende, dickere ($\text{\O} 2 \mu\text{m}$) Filamentbildner mit großen Mengen refrakter Einschlüsse beobachtet werden. Zur genaueren Charakterisierung wurden die spezifische *Thiothrix*- Sonde sowie eine neu entworfene, IMB1- spezifische Oligonukleotidsonde verwendet (IMB1-87, s. II.13.1).

Damit konnten die dünneren, wellenförmigen Filamentbildner dem IMB1 ϵ -Proteobakterium und die dickeren Filamente der Gattung *Thiothrix* zugeordnet werden. Regelmäßig durchgeführte FISH- Analysen verschiedenster Perlen zeigten, dass die äußere Hülle der Islinger Mühlbach- Perlen fast ausschließlich durch das IMB1 ϵ -Proteobakterium aufgebaut wurde (ca. 90% IMB1, 2% *Thiothrix*, 8% Bakterien unterschiedlicher Morphologien, Abb. 55). Wie durch DAPI- Färbung deutlich erkennbar, ist das IMB1- Filament aus kleineren Zellen von ca. 1-2 μm Länge aufgebaut (Abb. 55C).

Die Dominanz des IMB1 ϵ -Proteobakterium wurde auch als Ursache für die 'flauschigere' Erscheinung der Islinger Mühlbach- Perlen angesehen.

Es ist offensichtlich, dass nicht *Thiothrix* sp., sondern das IMB1 ϵ -Proteobakterium den bakteriellen Partner des SM1 Euryarchaeons in den mikrobiellen Perlenkettengemeinschaften des Islinger Mühlbachs darstellt (vgl. III.1.2).



4.3 *In situ*- Kultivierung der Perlenkettengemeinschaften an Polyethylenetzen und Entdeckung einer anderen Lebensform des SM1 Euryarchaeons

Durch das Ausbringen von Polyethylenetzen in der Strömung des sulfidischen Islinger Mühlbachs war es möglich, mikrobielle Perlenkettengemeinschaften zu züchten und regelmäßig zu ernten. Aus dieser Netzpopulation konnte - analog zu den Perlenkettengemeinschaften im Sippenauer Moor - das SM1 Euryarchaeon selektiv physikalisch angereichert werden (vgl. Henneberger, 2002).

Wurden die Polyethylenetze so tief wie möglich im Quellbohrloch versenkt (Abb. 56), konnte eine weitere, fundamental unterschiedliche Lebensform des SM1 Euryarchaeons detektiert werden: An den Netzen hatten sich schleimartige Strukturen angeheftet, in denen das SM1-Euryarchaeon bis zu 95% der Gesamtpopulation ausmachte (Abb. 56, Henneberger, 2002). Diese Biofilme stellten dabei keinen Aufwuchs an den Netzen dar, sondern wurden mit der Wasserströmung aus tieferen Schichten hochgespült und blieben an den Netzen schon nach kurzer Inkubationszeit haften. Aufgrund der Reinheit dieser Population konnte gefolgert werden, dass das SM1 Euryarchaeon in der Tiefe vermutlich partnerunabhängig

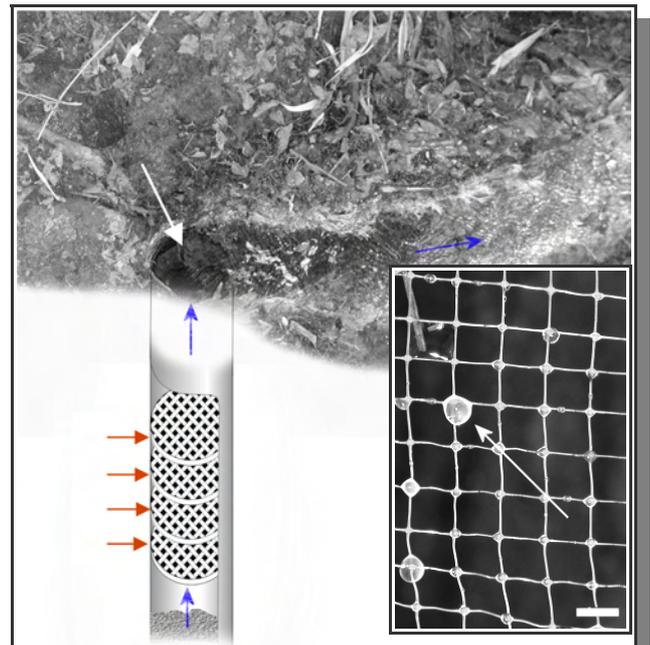


Abbildung 56: Schema des Versuchsaufbaus am Islinger Mühlbach: Polyethylenetze (rote Pfeile) werden in einer Haltevorrichtung so tief wie möglich in der Quelle inkubiert. Durchmesser des Bohrlochs (weißer Pfeil): 18,5 cm. Die Strömung des Wassers wird durch die blauen Pfeile angegeben.

Rechts: Abbildung eines euryarchaeellen SM1 Biofilms, anhaftend an einem Polyethylenetz (Pfeil). Maßstab: 5 mm. Aus: Henneberger, 2002.

wachsen kann (Henneberger, 2002). Die Analyse des 16S rRNA- Gens und der 16S- 23S- Interspacer- Region ergab eine völlige Sequenzidentität mit dem im Sippenauer Moor identifizierten SM1 Euryarchaeon (Henneberger, 2002).

Der SM1 Biofilm konnte auch in tiefen, anaeroben Quellen des Sippenauer Moors (z.B. Quelle B1) gefunden werden, jedoch unterschieden sich die Biofilme in ihrer Konsistenz und Mikrobendichte (Henneberger, 2002).

Im Folgenden sollte der archaeelle Biofilm des Islinger Mühlbachs bakteriell- phylogenetisch und strukturell genauer untersucht werden.

4.4 Bakteriell- phylogenetische und mikroskopische Untersuchungen des euryarchaeellen SM1 Biofilms

4.4.1 Bakterielle Phylogenie

Um Rückschlüsse auf Herkunft, Physiologie und weitere Eigenschaften des SM1 Euryarchaeons zu gewinnen, wurden seine morphologisch diversen, bakteriellen Begleitorganismen im Biofilm phylogenetisch untersucht.

Dazu wurde eine Klonierung der bakteriellen 16S rRNA- Gensequenzen durchgeführt (Primer 9bF und 1406uR). 44 Klone wurden analysiert und nach ARDRA und Sequenzierung 9 verschiedenen Sequenzen zugeordnet. Nach deren phylogenetischer Einordnung ergab sich folgendes Bild (Abb. 57):

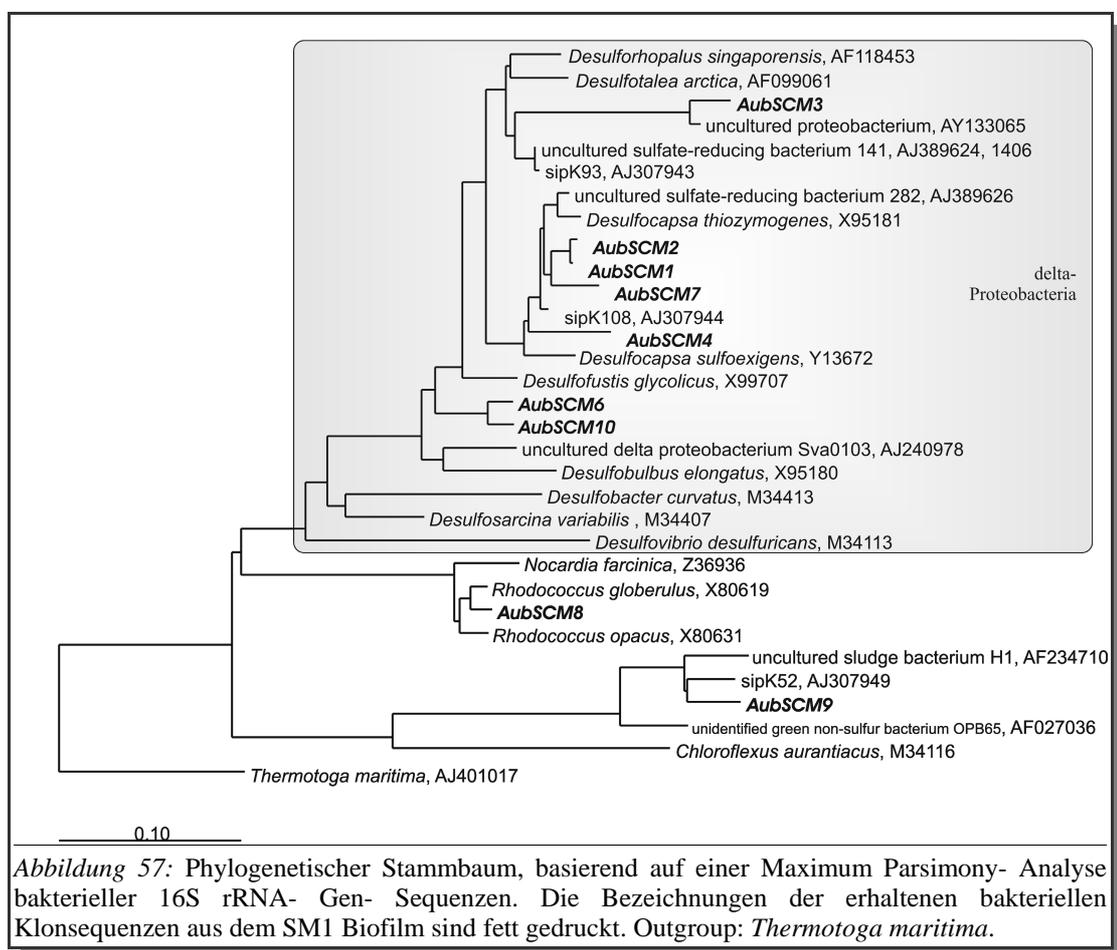


Abbildung 57: Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf einer Maximum Parsimony- Analyse bakterieller 16S rRNA- Gen- Sequenzen. Die Bezeichnungen der erhaltenen bakteriellen Klonsequenzen aus dem SM1 Biofilm sind fett gedruckt. Outgroup: *Thermotoga maritima*.

Interessanterweise clustern die meisten erhaltenen Klonsequenzen (93,2%) innerhalb der δ -Proteobacteria. Diese Gruppe kann als physiologisch einheitliche Gruppe betrachtet werden und schließt morphologisch unterschiedliche, sulfatreduzierende Organismen ein. Die auf Basis der 16S rRNA- Gensequenz nachgewiesene Dominanz sulfatreduzierender Bakterien im SM1 Biofilm deckt sich mit Daten aus FISH- Untersuchungen unter Verwendung einer

Sulfatreduzierer- spezifischen Sonde (SRB385, Amann et al., 1990b; Sonnleitner, 2004).

4.4.2 Strukturelle Untersuchungen des SM1 Biofilms mittels TEM

Der SM1 Biofilm wurde zusammen mit R. Henneberger durch Transmissions-Elektronenmikroskopie strukturell genauer untersucht. Dabei wurden sowohl Gefrierätzungen (Abb. 58) als auch Uranylacetat- Kontrastierungen von Suspensionspräparaten angefertigt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die SM1 Euryarchaeen auch im Biofilm Hami besitzen, welche ebenso wie unter III.3 beschrieben strukturiert waren. Zusätzlich zu den Hami war jedoch eine bisher nicht beobachtete Korona um die Zellen zu erkennen (Abb. 59), die auf die Existenz eines weiteren Biopolymers, z.B. einer zuckerhaltigen Matrix, hindeutet. Zwischen den Zellen war meist ein ungeordnetes Geflecht von Hami zu entdecken, die aber bei sich vermutlich teilenden Zellen - auch linearer angeordnet sein konnten (Abb. 60; vgl. Henneberger, 2002).

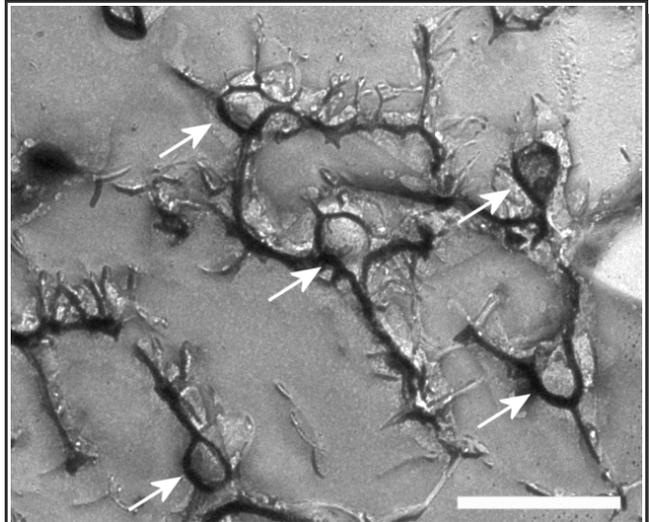


Abbildung 58: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gefrierätzung des SM1- Biofilms. Die Pfeile deuten auf SM1- Zellen. Maßstab: 2,5 μm .

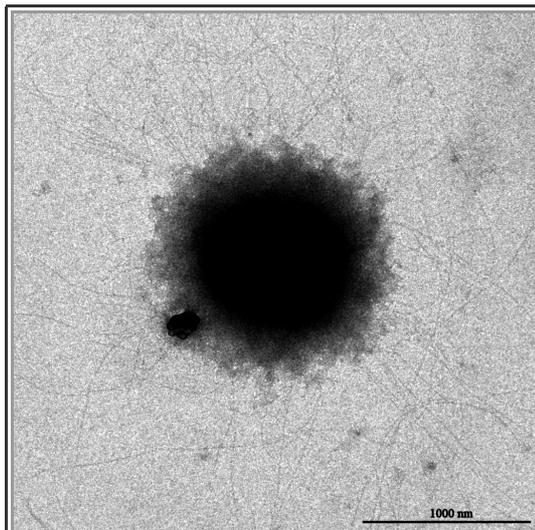


Abbildung 59: Transmissions- elektronenmikroskopische Aufnahme einer euryarchaeellen Zelle aus dem SM1 Biofilm des Islinger Mühlbachs, Negativkontrastierung. Auffällig sind die stark kontrastierte Korona um die Zelle und die Hami- Filamente.

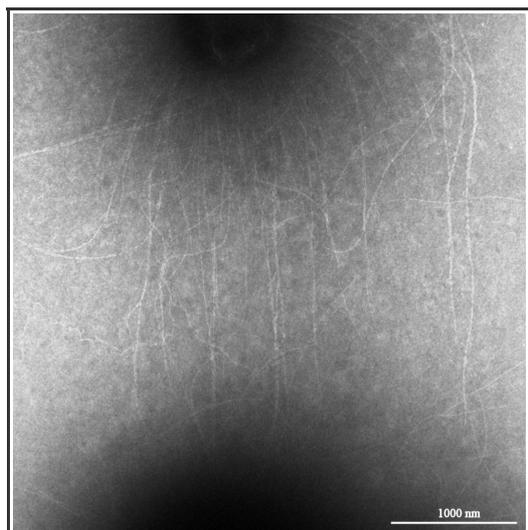


Abbildung 60: Transmissions- elektronenmikroskopische Aufnahme von euryarchaeellen Zellen aus dem SM1 Biofilm des Islinger Mühlbachs, Negativkontrastierung. Erkennbar sind Hami, die zwischen den Zellen mehr oder weniger parallel angeordnet sind.

4.4.3 Strukturelle Untersuchungen mittels CLSM

Für diese Analysen wurden optische Schnitte durch den intakten SM1 Biofilm angefertigt und ausgewertet. Die Biofilme wurden vor der Untersuchung einer Flüssigphasenhybridisierung unterzogen, so dass die vorhandenen Archaea und Bacteria gut zu lokalisieren waren. Eine Dehydratisierung während der Präparation wurde vermieden und das Hybridisierungsprotokoll entsprechend angepasst. Auf eine Fixierung der Zellen wurde hingegen nicht verzichtet, da eine Formaldehydbehandlung die dreidimensionale Struktur von Biofilmen nicht beeinflusst (Thurnheer, 2004).

Während der Mikroskopie konnte im optimalen Fall bei einer Ganghöhe von ca. 0,5 μm ohne größere Intensitätsverluste eine Schnitttiefe von 48 μm in den Biofilm erreicht werden. Diese Tatsache belegte eine geringe Trübung innerhalb des Biofilms. Es konnten auch keine Hinweise auf eingeschlossene Kristalle oder Gasblasen entdeckt werden.

Die SM1 Euryarchaeen zeigten zueinander einen sehr regelmäßigen Abstand von mindestens 4 μm (Abb. 61), der lediglich bei sich teilenden Zellen unterschritten wurde. Dies ist ein Hinweis auf die Existenz einer extrazellulären Matrix, die mit dieser Methode jedoch nicht weiter spezifizierbar war.

Interessanterweise beträgt die gemessene Hami-Durchschnittslänge auch im euryarchaeellen SM1 Biofilm 2 μm (vgl. III.3), was in einem Zell- Zell-Abstand von 4 μm resultiert. In den äußeren Bereichen des Biofilms sitzen die Zellen in ähnlich regelmäßigen Abständen, jedoch mit einzelnen größeren Lücken (bis zu 7 μm), die sich auch im Innern des Biofilms wiederfinden (Abb. 62). Es könnte sich hierbei um sogenannte 'Wasserkanälchen' handeln, die für den Stoffaustausch und für die Durchströmung mit Umgebungswasser genutzt werden könnten (Massol- Deyá, 1995).

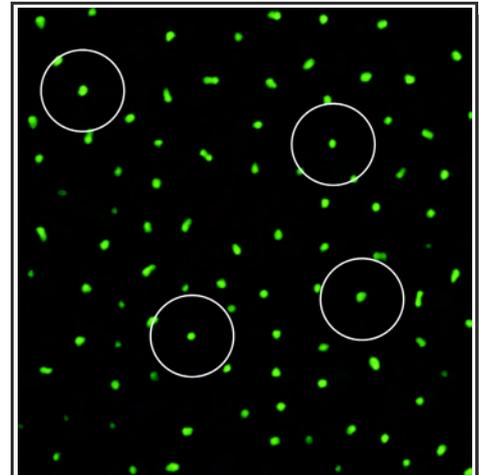


Abbildung 61: Optischer Schnitt durch eine Ebene eines SM1 Biofilms vom Islinger Mühlbach, Flüssigphasen-Hybridisierung. Die regelmäßige Anordnung der Archaea (grün gefärbt) wird durch die Kreise (\varnothing 8 μm) angedeutet.

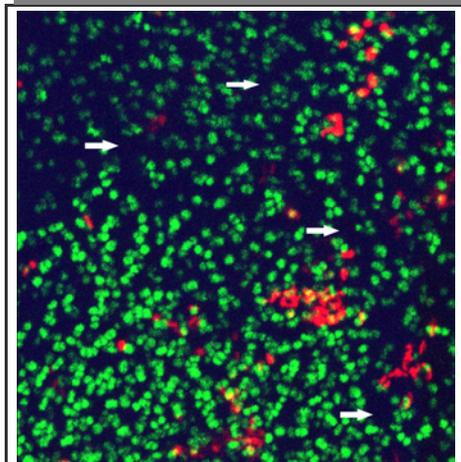


Abbildung 62: Darstellung einer Projektion (46x 46x 48 μm) einzelner Schnittebenen durch einen Biofilm, welcher durch FISH eingefärbt wurde. Archaea färben grün, Bacteria rot. Die Pfeile deuten auf Beispiele 'organismenfreier' Bereiche (Wasserkanälchen). Die Breite der Abbildung entspricht 46 μm .

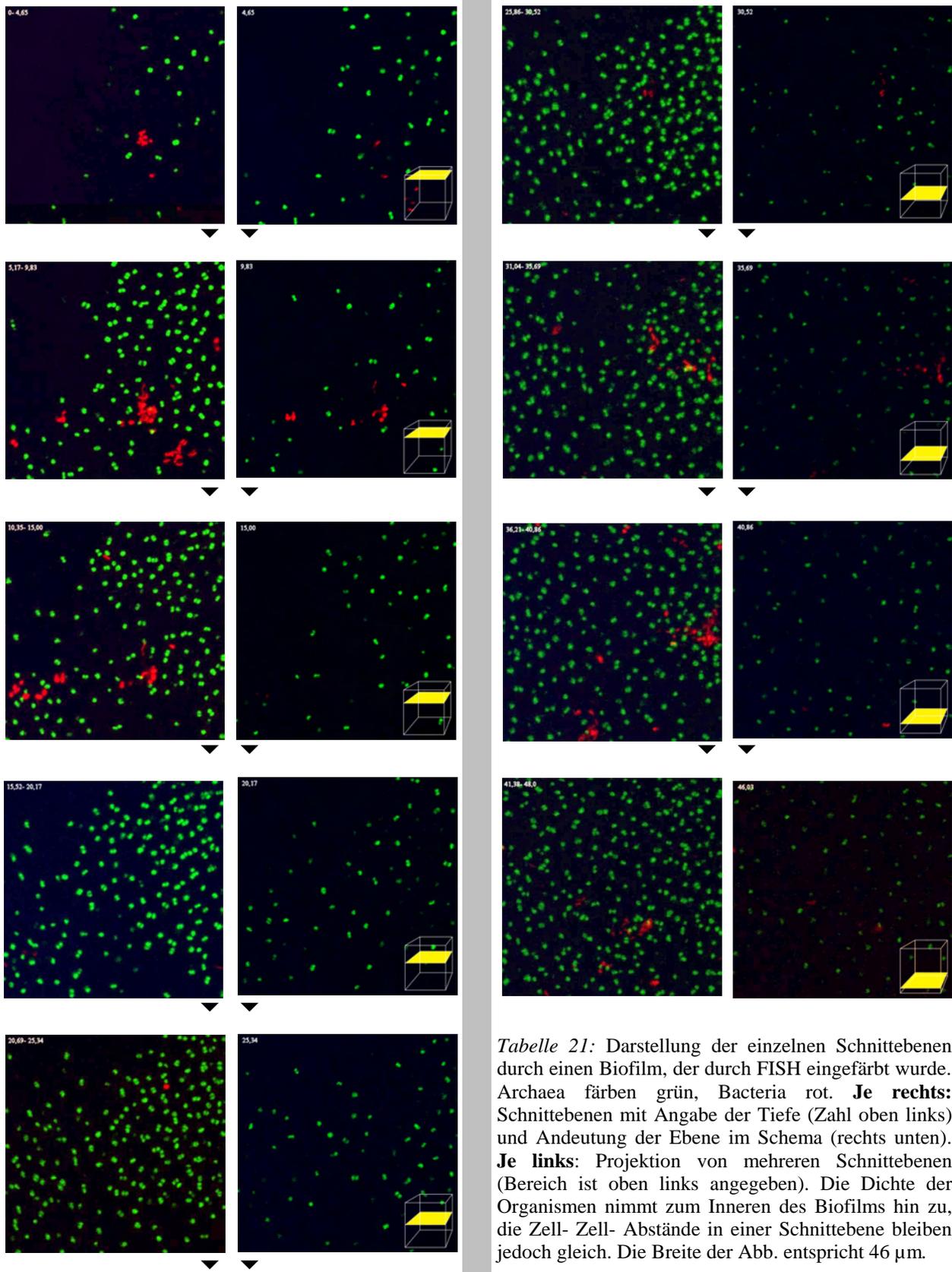


Tabelle 21: Darstellung der einzelnen Schnittebenen durch einen Biofilm, der durch FISH eingefärbt wurde. Archaea färben grün, Bacteria rot. **Je rechts:** Schnittebenen mit Angabe der Tiefe (Zahl oben links) und Andeutung der Ebene im Schema (rechts unten). **Je links:** Projektion von mehreren Schnittebenen (Bereich ist oben links angegeben). Die Dichte der Organismen nimmt zum Inneren des Biofilms hin zu, die Zell- Zell- Abstände in einer Schnittebene bleiben jedoch gleich. Die Breite der Abb. entspricht 46 µm.

Die Archaeen und Bakterien in tieferen Schichten des Biofilms ließen sich gleichermaßen gut mit den Hybridisierungssonden anfärben, was für eine gute physiologische Konstitution der Mikroorganismen spricht.

Die Bakterien schienen über alle Schichten des SM1 Biofilms verteilt zu sein und bildeten kleine Kolonien zwischen den archaeellen Kokken.

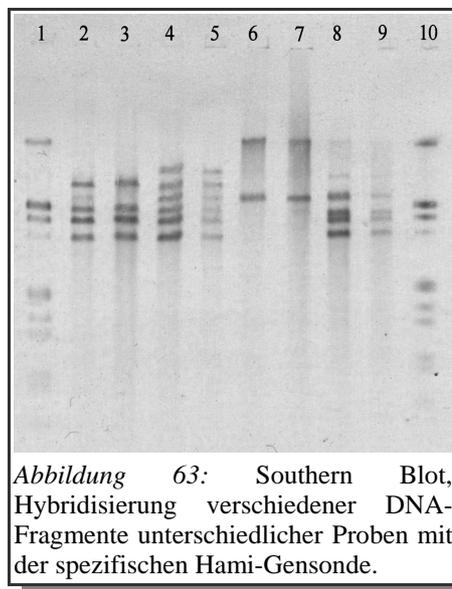
Die Untersuchung der SM1 Biofilme des Sippenauer Moors ergab - verglichen mit denen des Islinger Mühlbachs - keine augenfälligen Unterschiede bezüglich der Organismenverteilung und der dreidimensionalen Abstände der Archaeen zueinander. Diese Biofilme neigten allerdings eher zur Kristalleinlagerung. Dabei ist bisher ungeklärt, ob die Kristalle bereits in natürlicher Umgebung oder während der Prozedur der Flüssigphasenhybridisierung entstanden.

4.4.4 Immunologische Untersuchungen

Behandelte man aus dem Biofilm herausgelöste SM1 Euryarchaeen mit den spezifischen Antikörpern (anti- SM1- Serum, s. II.15.1), konnte eine deutliche Reaktion nachgewiesen werden. SM1 Euryarchaeen im Biofilm zeigten hingegen nur eine schwache Immun-Fluoreszenz. Diese Beobachtung war vermutlich auf das elektronenmikroskopisch nachgewiesene zusätzliche Polymer oder auf die hohe lokale Antigenkonzentration (bedingt durch die hohe Zelldichte im Biofilm) zurückzuführen.

4.4.5 Detektion des Hami- Gens in SM1- Populationen des Islinger Mühlbachs

Neben dem strukturellen und immunologischen Nachweis der Hami bei den SM1 Euryarchaeen des Islinger Mühlbachs gelang dieser auch auf genetischer Ebene mittels Southern Blot- Analysen. Die SM1 Genome der Populationen aus dem Sippenauer Moor und Islinger Mühlbach zeigten jedoch nach Restriktionsverdau und Hybridisierung mit spezifischen Hami- Gensonden ein unterschiedliches Muster: Sowohl bei Proben des SM1 Biofilms aus dem Islinger Mühlbach als auch der von dort stammenden SM1 Netzpopulationen zeigten sich im Vergleich zu den Populationen aus dem Sippenauer Moor mehr definierte Banden auf dem Blot (Abb. 63). Dies bedeutet, dass hier eine höhere Kopienanzahl des Gens vorliegt bzw. das Schnittmuster des Genoms anders ist.



	Probe	Enzym	detektierte Kopien des Hami-Gens
1	DIG- Standard	-	-
2	Sippenauer Moor: SM1- Biofilm	HincII	4, evtl. 5
3	Sippenauer Moor: SM1- Netzpopulation	HincII	4
4	Islinger Mühlbach: SM1- Biofilm	HincII	6
5	Islinger Mühlbach: SM1- Netzpopulation	HincII	6
6	Sippenauer Moor: SM1- Biofilm	KpnI	2
7	Sippenauer Moor: SM1- Netzpopulation	KpnI	2
8	Islinger Mühlbach: SM1- Biofilm	KpnI	5
9	Islinger Mühlbach: SM1- Netzpopulation	KpnI	5
10	DIG- Standard	-	-

Weiterhin ergab auch die Sequenzierung des Hami- Gens von Islinger Mühlbach-Netzpopulationen Unterschiede zur SM1 Population aus dem Sippenauer Moor: An Position 425 konnte ein kurzes Insert entdeckt werden (s. Anhang).

5. Tabellarischer Vergleich des SM1 Euryarchaeons und seiner Lebensgemeinschaften im Sippenauer Moor und Islinger Mühlbach

5.1 Natürliche, mikrobielle Perlenkettengemeinschaften

Vergleich der Perlenkettengemeinschaften	Sippenauer Moor	Islinger Mühlbach
Makroskopische Erscheinung	Weißer, kompakte Perlen (Ø ca. 0,5- 3,0 mm)	Graue, 'flauschige' Perlen (Ø ca. 0,5- 3,0 mm)
Archaeelle 16S rRNA-Gensequenz	SM1 Euryarchaeon vorherrschend	SM1 Euryarchaeon vorherrschend (Sequenzidentität)
Archaeelle 16S- 23S rDNA-Interspacer- Region	SM1 Euryarchaeon	SM1 Euryarchaeon (Sequenzidentität)
Bakterielle 16S rRNA Gensequenz	<i>Thiothrix</i> SipK4 vorherrschend	IMB1 ε- Proteobakterium vorherrschend
Archaeelle FISH	SM1 Euryarchaeon vorherrschend	SM1 Euryarchaeon vorherrschend
Morphologie und Anordnung des SM1 Euryarchaeons	Mikrokolonien kleiner Kokken, dreidimensional regelmäßig angeordnet im Perleninneren	Mikrokolonien kleiner Kokken, dreidimensional regelmäßig angeordnet im Perleninneren
Bakterielle FISH	<i>Thiothrix</i> sp. vorherrschend	IMB1 ε- Proteobakterium vorherrschend
Phasenkontrastmikroskopie des vorherrschenden Perlenbakteriums	Rosettenbildende, gerade Filamente (Ø 2 µm) mit großen Mengen von lichtbrechenden Einschlüssen aus amorphem Schwefel	Filamentbildende Stäbchen mit einer welligen Form (Ø 0,5 µm) ohne sichtbare Zelleinschlüsse

Tabelle 22: Tabellarischer Vergleich der Perlenkettengemeinschaften aus den verschiedenen Biotopen. Aus: Rudolph et al., 2004.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, unterscheiden sich die Perlenkettengemeinschaften der beiden Biotope bezüglich des bakteriellen Partners des SM1 Euryarchaeons deutlich voneinander. Während im Sippenauer Moor der bakterielle Part ausschließlich von *Thiothrix* sp. gestellt wird, bildet im Islinger Mühlbach das IMB1 ε- Proteobakterium den spezifischen Partner des SM1 Euryarchaeons. Interessanterweise wurde für beide Organismen ein sulfidoxidierender Stoffwechsel nachgewiesen (Strohl und Schmidt, 1984) bzw. postuliert (Engel et al., 2003). Auch der Sauerstoffbedarf dieser beiden Organismen befindet sich im Einklang mit der natürlichen O₂- Konzentration vor Ort.

5.2 Polyethylenetzpopulationen

<i>Vergleich der SM1 Netzpopulationen und deren Aufreinigung</i>	<i>Sippenauer Moor</i>	<i>Islinger Mühlbach</i>
<i>Makroskopische Erscheinung der Netzpopulation</i>	regelmäßige und unregelmäßige Perlen am Polyethylenetz, weiß bis hellgrau	unregelmäßige, graue Perlen am Polyethylenetz, 'flauschigere' Erscheinung
<i>Vorkommen der Netzpopulation</i>	aerobe Bereiche der Quelle bis zum Quelltopf	aerobe Bereiche der Quelle bis ca. 10 m nach Austritt*
<i>Mikrobieller Aufbau der Netzpopulation</i>	ca. 30% SM1 Euryarchaeon (freiliegend), ca. 70% vorwiegend filamentöse Bacteria	ca. 40% SM1 Euryarchaeon (freiliegend), ca. 60% vorwiegend filamentöse Bacteria*
<i>Reinheit des SM1 Euryarchaeons nach sanfter physikalischer Separation</i>	bis zu 99% (FISH)	bis zu 95% (FISH)*
<i>Archaeelle 16S rRNA-Gensequenz der aufgereinigten Fraktion</i>	ausschließlich SM1 Euryarchaeon	ausschließlich SM1 Euryarchaeon* (Sequenzidentität)
<i>Archaeelle 16S- 23S rDNA-Interspacer- Region der aufgereinigten Fraktion</i>	vorwiegend SM1 Euryarchaeon	vorwiegend SM1 Euryarchaeon* (Sequenzidentität)
<i>Hami, aufgereinigte Fraktion</i>	vorhanden, Struktur wie beschrieben	vorhanden, Struktur wie beschrieben
<i>Hami- Gen, aufgereinigte Fraktion</i>	nachgewiesen	nachgewiesen, mehr Kopien als bei Netzpopulation des Sippenauer Moors, besitzt Insert an Pos. 425
<i>Reaktion mit Hami-spezifischen Antikörpern</i>	deutliche spezifische Reaktion	deutliche spezifische Reaktion

Tabelle 23: Tabellarischer Vergleich der SM1 Netzpopulationen der beiden Biotope und deren Aufreinigungen;
* Daten aus: Henneberger, 2002.

Beim Vergleich der Netzpopulationen aus Sippenauer Moor und Islinger Mühlbach zeigen sich nur wenige Unterschiede (morphologische Erscheinungsform, Kopienanzahl des Hami- Gens, Insert). Die Züchtung an den Netzen, sowie die Untersuchung der aufgereinigten SM1 Fraktion war an Mikrobenpopulationen des Sippenauer Moors etabliert worden, weshalb diese Organismen auch Gegenstand der detaillierten, in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren (s. III.1.3).

5.3 Natürlicher, euryarchaeeller SM1 Biofilm

Vergleich der SM1 Biofilme	Sippenauer Moor	Islinger Mühlbach
Makroskopische Erscheinung	gallertartige, viskose Struktur; farblos bis milchig trüb*	gallertartige, viskose Struktur; meist milchig trüb*
Vorkommen	vorwiegend: anaerobe Bereiche der Quelle B1*	anaerobe Bereiche der Quelle*
Archaeelle 16S rRNA-Gensequenz	ausschließlich SM1 Euryarchaeon*	ausschließlich SM1 Euryarchaeon (Sequenzidentität)*
Archaeelle 16S- 23S rDNA - Interspace-Region	SM1 Euryarchaeon vorherrschend*	SM1 Euryarchaeon vorherrschend (Sequenzidentität)*
Bakterielle 16S rRNA Gensequenz	n.u.	93,2% δ - Proteobacteria (Sulfatreduzierer)
Archaeelle FISH	75- 95% SM1 Euryarchaeon*	70- 90% SM1 Euryarchaeon*
Bakterielle FISH	morphologisch diverse Bacteria (Filamente, Kurzstäbchen, Kokken)*; nicht weiter eingeordnet	morphologisch diverse Bacteria (Filamente, Kurzstäbchen, Kokken)*; davon die meisten Sulfatreduzierer*
Morphologie und Anordnung des SM1 Euryarchaeons bzw. strukturelle Eigenschaften des Biofilms	SM1 Euryarchaeon dreidimensional regelmäßig angeordnet, Zell- Zell-Abstand: 4 μ m, Kristalle detektiert, vermutlich Kanälchen vorhanden, gute physiologische Konstitution der Zellen im Biofilm-Inneren	SM1 Euryarchaeon dreidimensional regelmäßig angeordnet, Zell- Zell-Abstand: 4 μ m, keine Kristalle oder Gasblasen detektiert, vermutlich Kanälchen vorhanden, gute physiologische Konstitution der Zellen im Biofilm- Innern
Hami bzw. Zelloberfläche	Dichtes Netzwerk von Hami nachgewiesen, Hami zeigen typischen Aufbau	Dichtes Netzwerk von Hami nachgewiesen, Hami zeigen typischen Aufbau, auf der Zelloberfläche weiteres Biopolymer unbekannter chemischer Zusammensetzung nachgewiesen
Hami- Gen	nachgewiesen	nachgewiesen, mehr Kopien als beim SM1 Biofilm des Sippenauer Moors vorhanden

Tabelle 24: Tabellarischer Vergleich der SM1 Biofilme der beiden Biotope; n.u. = nicht untersucht

*Daten aus: Henneberger, 2002

*Daten aus: Sonnleitner, 2004

Die SM1 Biofilme aus Islinger Mühlbach und Sippenauer Moor weisen nur wenige Unterschiede auf. Dazu zählen das zusätzlich detektierte Oberflächenpolymer der Islinger Mühlbach- SM1 Biofilme, sowie die Unterschiede in der Anzahl der nachgewiesenen Hami- Gene im Genom.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse einer tiefer greifenden molekularbiologischen und strukturellen Charakterisierung eines neuartigen, kälteliebenden, bisher unkultivierten Euryarchaeons und seiner Lebensgemeinschaften präsentiert.

Dieses als SM1 bezeichnete Euryarchaeon wurde in sulfidhaltigen Quellen des Regensburger Raums entdeckt (Rudolph et al., 2001). Im dortigen, 10°C kalten Fließwasser bildet es zusammen mit filamentösen Bakterien eine außergewöhnliche, morphologisch auffällige mikrobielle Perlenkettengemeinschaft. Das Innere einer Perle wird dabei von einer Mikrokolonie des neuartigen SM1 Euryarchaeons gebildet, welche von filamentösen Bakterien umhüllt ist (Rudolph et al., 2001).

Bakteriell- phylogenetische Analysen einer Perle aus dem Sippenauer Moor zeigten die Vorherrschaft (ca. 60% aller Klonsequenzen) eines Phylotyps (SipK4) mit sehr naher Verwandtschaft zu dem filamentösen, sulfidoxidierenden Bakterium *Thiothrix unzii* (Howarth et al., 1999). Diese Dominanz wurde durch FISH- Analysen von über 30 verschiedenen Perlen über einen längeren Zeitraum bestätigt. In allen Fällen konnte neben der archaeellen Mikrokolonie die Vorherrschaft von *Thiothrix* sp. als bakterieller Partner des SM1 Euryarchaeons in Perlen des Sippenauer Moors gezeigt werden.

Als aerobes, sulfidoxidierendes Bakterium ist *Thiothrix* ausgezeichnet an Süßwasserbiotope wie das Sippenauer Moor angepasst (Brigmon et al., 1994). Mit seinen Fimbrien und seinem 'Adhäsions'-Material ('holdfast material'; Williams et al., 1987) ist es befähigt, sich in Fließwasserumgebungen an verschiedenste organische und anorganische Oberflächen anzuheften. *Thiothrix* könnte deshalb an der initialen Besiedlung beteiligt sein und möglicherweise mit seiner Adhäsion den ersten Schritt zur Bildung einer mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft auslösen. Weiterhin ist anzunehmen, dass *Thiothrix* maßgeblich an der Bildung und Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur des äußeren Teils der Perle und der Verbindungsfäden zwischen den Perlen beteiligt ist.

Aufgrund der stets beobachtbaren Koexistenz von SM1 und *Thiothrix* SipK4 im Sippenauer Moor, sowie ihrer räumlichen Nähe innerhalb einer Perle, erscheint eine zufällige Konstitution sehr unwahrscheinlich, zumal spezifische Gemeinschaften für die beteiligten Organismen im Allgemeinen viele Vorteile bieten. So werden z.B. milieubedingte Schwankungen abgepuffert und horizontale Gentransfers ermöglicht (Abella et al., 1998; Ben- Ari, 1999; Nisbet und Fowler, 1999; Davey und O'Toole, 2000). Der größte Gewinn beim Zusammenleben in einer engen Gesellschaft liegt jedoch in der erleichterten Aufnahme und Bereitstellung von Nährstoffen (Schink, 1992 und 2002). Diese sogenannten syntrophen oder sogar symbiontischen Wechselwirkungen zwischen Organismen (Schink, 1992; Saffo, 2001) könnten auch im Fall der mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft eine große Rolle spielen.

Die Organismen der Gattung *Thiothrix* bilden durch aerobe Sulfidoxidation Sulfat als Stoffwechselprodukt (Strohl und Schmidt, 1984). Dabei wird dem Milieu Sauerstoff entzogen und Sulfat dem vermutlich anaerob wachsenden SM1 Euryarchaeon als möglicher Elektronenakzeptor zur Verfügung gestellt. Dieser Organismus könnte nun - im Fall einer Sulfatreduktion - Sulfid freisetzen, das wiederum von *Thiothrix* verstoffwechselt werden würde. Dieses Konzept stützt die Idee eines internen, geschlossenen Schwefelzyklus. Darüberhinaus werden beim Wachstum von *Thiothrix* verschiedenste weitere C- und Energiequellen in die direkte Umgebung freigesetzt (Strohl und Schmidt, 1984; McGlannan und Makemson, 1990), welche ebenfalls von den Archaeen verbraucht werden könnten. Ähnliche Mechanismen wurden für das enge Zusammenleben verschiedener mariner Eukaryonten mit bakteriellen Sulfidoxidierern berichtet (Brigmon und de Ridder, 1998; Millikan et al., 1999).

Je nach Organisationsgrad mikrobieller Gemeinschaften unterscheidet man **Biofilme** (Costerton et al., 1994; Moller et al., 1996; Stickler, 1999; O'Toole et al., 2000; Watnick und Kolter, 2000), **mikrobielle Matten** (Stal und Caumette 1993; Krumbein und Villbrandt, 1994; Ward et al., 1998) und **Konsortien** (Buder, 1914; Pfennig, 1980; Fröstl und Overmann, 1998; Overmann et al., 1998; Fröstl und Overmann, 2000), welche in natürlichen aquatischen Systemen (Cohen und Rosenberg, 1989; Javor, 1989; Krumbein und Villbrandt, 1994), in künstlichen medizinischen Umgebungen (Chicurel, 2000;) oder epibzw. endolithisch (Cohen et al., 1984; Javor, 1989) vorkommen. Demnach ist die Perlenkettengemeinschaft aus dem Sippenauer Moor aufgrund ihrer strukturellen Komplexität und stabilen Konstitution den Konsortien zuzuordnen. Im Vergleich zu anderen mikrobiellen Konsortien stellt diese Assoziation eine sehr außergewöhnliche Gemeinschaft zwischen definierten Gruppen von Mikroorganismen dar. Die Partner gehören verschiedenen Domänen des Lebens an und sind dennoch spezifisch aneinander gebunden. Hier kann eine gewisse Ähnlichkeit zu dem von Boetius et al. (2000, vgl. Einleitung) beschriebenen Methanoxidierer-konsortium jedoch nicht von der Hand gewiesen werden: Auch in diesem Fall sind (sulfatreduzierende) Bakterien um ca. 100 (methanoxidierende) Archaeen angeordnet und die physiologische Abhängigkeit der Organismen voneinander gilt sogar als bewiesen (Abb. 64).

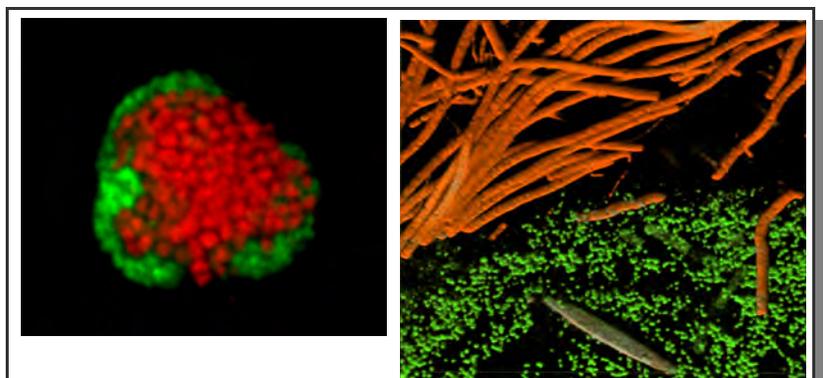


Abbildung 64: **Links:** Abbildung des Methanoxidierer-konsortiums (Quelle: www.mpi-bremen.de). Archaea sind rot gefärbt, bakterielle Sulfatreduzierer grün. **Rechts:** CLSM-Aufnahme eines inneren Teils einer Perle der mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft aus Sippenauer Moor; *Thiothrix* ist rot gefärbt, die SM1 Euryarchaeen grün (Auswahl: 39,8x 36,9x 21,4 µm).

Im Rahmen phylogenetischer Analysen bayerischer Schwefelquellen wurde die beschriebene Perlenkettengemeinschaft in einem weiteren Biotop in der Nähe von Regensburg entdeckt (Islinger Mühlbach, Rudolph et al., 2004). Auch hier wurden Perlen mit einer SM1 euryarchaeellen Mikrokolonie im Inneren und filamentösen Bakterien in der äußeren Schicht nachgewiesen. Vergleichende archaeell- phylogenetische Analysen der Archaeen aus dem Sippenauer Moor und Islinger Mühlbach bewiesen deren Sequenzidentität bezüglich 16S rRNA- Gen- und 16-23S Interspacer-Sequenz (Rudolph et al., 2004). Wie jedoch mit dem bloßen Auge erkennbar ist, unterscheiden sich die Perlen des Islinger Mühlbachs deutlich von denen des Sippenauer Moors. Sie erscheinen in ihrer Farbe grauer und in ihrer Morphologie flauschiger. Tatsächlich stellte man durch phylogenetische und FISH-Analysen die Vorherrschaft eines neuartigen, filamentösen ϵ - Proteobakteriums (IMB1) fest, welches die äußere Hülle der Islinger Mühlbach- Perlen aufbaut. Es liegt damit ein deutlicher Unterschied zu den Perlen des Sippenauer Moors vor, bei denen *Thiothrix* SipK4 bakterieller Partner des SM1 Euryarchaeons ist. Das unterschiedliche Aussehen der Perlen ist somit auf die verschiedene Morphologie der strukturbildenden filamentösen Bakterien zurückzuführen: Die IMB1- Filamente sind sehr viel dünner und gewellter als *Thiothrix* sp. und besitzen nicht die Eigenschaft, Rosetten zu bilden und lichtbrechende Schwefelgranula einzulagern (vgl. Williams und Unz, 1985; vgl. Engel et al., 2003).

Es stellt sich die Frage, was diesen Austausch der bakteriellen Partner in Abhängigkeit vom Biotop auslöst, zumal - jedoch in sehr geringem Maß- das IMB1 ϵ - Proteobakterium auch in Perlen des Sippenauer Moors nachgewiesen wurde (sipK119, vgl. III.1.2.5) . Vergleicht man die Geochemie der beiden Probenahmeorte, so findet man den augenfälligsten Unterschied im Sauerstoffgehalt des Quellwassers (Sippenauer Moor: 1,4 mg/l, Islinger Mühlbach: 0,13 mg/l). *Thiothrix* bevorzugt höhere Konzentrationen an Sauerstoff (aerober Stoffwechsel; Strohl und Schmidt, 1984) und dominiert vermutlich deshalb bei diesen Bedingungen in den Perlen. Im Einklang damit wurde für unkultivierte nahe Verwandte des IMB1- Proteobakteriums ein sulfidoxidierender, allerdings anaerober Stoffwechsel postuliert und zudem eine Verdrängung von *Thiothrix* bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen beobachtet (Engel et al., 2003). Ein geschlossener S- Zyklus innerhalb einer Perle scheint also sowohl bei niedrigen (Islinger Mühlbach) als auch bei höheren Sauerstoffkonzentrationen (Sippenauer Moor) möglich zu sein.

Für die genauere Untersuchung weiterer, noch ungeklärter Aspekte ist die Kultivierung der betreffenden Organismen von entscheidendem Vorteil. Jedoch ist es trotz unterschiedlichster Versuche bisher nicht gelungen, das SM1 Euryarchaeon oder seine Partner als Reinkultur im Labor zu züchten. Die Gründe hierfür können vielfältiger Natur sein. Vermutlich sind häufig gerade synergistische Effekte zwischen Mikroorganismen (Schink, 2002) der Auslöser für die problematische Zucht in Reinkultur. Unzulänglichkeiten bei der Nachbildung stabiler physikalisch- chemischer Gradientensysteme können sich ebenfalls negativ auswirken (Pringault et al., 1996). Limitierend für die erfolgreiche Kultivierung im Labor scheint auch oftmals der überlebensstrategische **Viable-but-Non-Culturable** (VBNC, 'Lebend,

aber nicht kultivierbar')- Zustand zu sein (Besnard et al., 2000): Metabolisch aktive Zellen (aktive Atmungskette, Zellelongation) sind unfähig sich zu teilen und auf eigentlich geeignetem Medium zu wachsen (Roszak und Colwell, 1987; Rodriguez et al., 1992; Besnard et al., 2000). Die Mikroorganismen verändern sich, wenn sie in den VBNC- Zustand übertreten und unterscheiden sich sogar bezüglich ihres Proteoms von ihren wachsenden Artgenossen (Heim et al., 2002). Diese Reaktion wird bei den Prokaryonten häufig durch schockartige, milieubedingte Veränderungen (pH- Änderungen, osmotischer Stress) ausgelöst (Besnard et al., 2000). Es ist denkbar, dass allein die Probenahme bei empfindlichen Mikroorganismen den Übergang in einen solchen Zustand bewirkt. Häufig ist aber bei vermeintlich Unkultivierbaren das Wachstum im Anreicherungsmedium auch nur schwierig zu detektieren: Einerseits kann es sehr langsam vor sich gehen und sich über mehrere Wochen oder Monate erstrecken. Andererseits übersteigt oft die Gesamtzellzahl trotz Wachstum eine gewisse Nachweisgrenze nicht und bleibt damit im Mikroskop unentdeckt ($< 10^3$ - 10^4 Zellen/ml; Fox, 2003).

Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, ist die Inkubation bzw. Zucht der Mikroorganismen im natürlichen Biotop (Fox, 2003). Die Nährstoffe werden hier den Organismen in gewohnter Art und Menge zur Verfügung gestellt, die physikalisch- chemischen Gradientensysteme sind stabil, und lebensnotwendige Partnerschaften können aufrecht erhalten werden.

In dieser Arbeit wurde eine solche *in situ*- Kultivierungsmethode für die mikrobielle Perlenkettengemeinschaft entwickelt, welche sich das Biotop Sippenauer Moor als 'natürlichen Chemostaten' zu Nutze macht. Polyethylenetze mit insgesamt bis zu 10 m² Größe wurden als Anheftungs- und Aufwuchsmaterial für die Perlenkettengemeinschaften zur Verfügung gestellt. Bereits nach wenigen Tagen hatten sich daran Verdickungen und Perlen der üblichen Zusammensetzung gebildet. Während natürlich vorkommende Perlen ab einem Durchmesser von etwa 3 mm zu altern beginnen (Auflösung der dreidimensionalen Struktur, Besiedlung durch andere (sekundäre) Mikroorganismen; Koch, 2001), wuchsen die Perlen an den Netzen bis zu 12 mm Größe heran. Auffällig war weiterhin, dass die SM1 Euryarchaeen im Inneren der Perlen nach einer Woche nicht mehr in ihre Mikrokolonie eingeschlossen waren, sondern frei verteilt vorlagen und somit herauslösbar waren.

Es stellte sich heraus, dass die Methode der *in situ*- Kultivierung bestens geeignet ist für eine schnelle, kontrollierte und verlässliche Züchtung dieser mikrobiellen Population, die deshalb wöchentlich geerntet werden konnte. Diese Umstände ermöglichten es, die molekularbiologischen Untersuchungen der Gemeinschaft und v.a. des SM1 Euryarchaeons weiter voranzutreiben.

„So you thought uncultivated microorganisms were uncultivable.”

(ASM Meeting 2003)

Ausgehend von der Polyethylenetzpopulation war es gelungen, durch verschiedene schonende Sedimentations- und Zentrifugationsschritte die natürlich gewachsenen SM1 Euryarchaeen physikalisch bis zu einer Reinheit von ca. 98% von sonstiger mikrobieller Begleitflora zu separieren. Wie bei einer im Labor gezüchteten Reinkultur konnten mit dieser hochreinen SM1 Euryarchaeenfraction verschiedenste Untersuchungen durchgeführt und erstmals Einblicke in die Struktur, Biochemie und Genetik eines unkultivierten, kälteliebenden Archaeons gewonnen werden.

Die hohe Zellebensfähigkeit des separierten SM1 Euryarchaeons ermöglichte zudem physiologische Untersuchungen. Deren Ergebnisse lassen vermuten, dass das Archaeon in seinem Biotop zwar verschiedene Sauerstoffkonzentrationen tolerieren kann, das Fehlen einer Katalase ist aber eher als Hinweis auf einen anaeroben Stoffwechsel zu werten. Weiterhin bevorzugt SM1 Temperaturen zwischen ≤ -2 und $+20^{\circ}\text{C}$, was auf eine psychrophile oder psychrotolerante Lebensweise hindeutet (Morita, 1975) und seiner natürlichen Umgebungstemperatur entspricht. Der Organismus ist auf einen neutralen Umgebungs- pH- Wert angewiesen und zeigt sich empfindlich gegenüber höheren Salzkonzentrationen im Milieu. Im Rahmen weiterer Analysen zur Biologie des SM1 Euryarchaeons konnte aufgrund des Fehlens des Coenzym F_{420} eine nähere Verwandtschaft zu den Methanogenen ausgeschlossen werden (Rudolph, 2003). Die Analyse der Lipidstrukturen des SM1 Euryarchaeons wies das weit verbreitete Membranlipid Archaeol als substantiellen Bestandteil nach (Rudolph, 2003); der G+C- Gehalt des SM1- Genoms lag bei 35 mol% (Rudolph, 2003).

Die hohe Reinheit der SM1- Zellfraktion erlaubte eine erstmalige Gewinnung spezifischer Antikörper gegen einen unkultivierten Mikroorganismus. Durch eine neu überarbeitete, gleichzeitige Zellmarkierung mit spezifischen Gensonden und den erhaltenen Antikörpern (Immuno- FISH) konnte die Monophylie der SM1- Zellfraktion nachgewiesen werden.

Strukturelle Studien der SM1 Euryarchaeen, welche mit Ausnahme der Nanoarchaeota (Huber et al., 2002) zu den kleinsten bekannten archaeellen Kokken zählen, wiesen einen interessanten Aufbau der Zellwand nach. Neben einem ungewöhnlichen S-Layer, besitzen die SM1 Euryarchaeen eine dritte, unterhalb der Cytoplasmamembran gelegene, dünne Schicht. Wie durch Cryo- Elektronentomographie gezeigt wurde, zieht sich diese bandförmig um das Cytoplasma der Zelle und erinnert dabei an MCP²³- Chemorezeptorencluster (Maddock und Shapiro, 1993). Die bei stäbchenförmigen Mikroorganismen an den Zellpolen gelegenen MCP spielen die zentrale Rolle bei der Chemotaxis und ragen vom Inneren des Cytoplasmas in das Periplasma, wo sich die Rezeptoren für verschiedene chemische Stoffe befinden (Webre et al., 2003). Bei *E. coli* wurden bisher fünf verschiedene MCP- Rezeptoren²⁴ nachgewiesen (Webre et al., 2003). Durch spezifische Antikörper konnten die sogenannten Trg- Rezeptoren im Proteom von 26 Bacteria und einem Archaeon (*Halobacterium halobium*) gefunden werden (Morgan et

23 'methylated chemotactic proteins'

24 Am häufigsten kommen Tar (Aspartat, Glutamat und Maltose) und Tsr (Serin) vor, seltener Trg (Ribose, Galaktose), Tap (Dipeptide) und Aer (Sauerstoff).

al., 1993). Auch im Fall des SM1 Euryarchaeons konnte mit diesen Antikörpern eine starke Reaktion eines 28kDa Proteins nachgewiesen werden. Es handelt sich also vermutlich bei den elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Strukturen um Trg- Rezeptor tragende Cluster. Eine genaue örtliche Zuordnung des 28kDa- Proteins wäre in weiteren Versuchen durch eine Immunogold-Markierung für die Elektronenmikroskopie möglich, wie es z.B. schon für die Tsr- Rezeptoren von *E. coli* durchgeführt wurde (Weis et al., 2003). Sollten sich die Vermutungen wie erwartet bestätigen, wäre dies der erste strukturelle Nachweis einer solchen Chemorezeptorenschicht bei den Archaea.

Die Verwendung der Polyethylenetze ermöglichte neben der Züchtung der Perlenketten- Konsortien auch die Entdeckung einer weiteren, grundlegend unterschiedlichen, außergewöhnlichen Lebensform des SM1 Euryarchaeons: den SM1 Biofilm (Henneberger, 2002). Bringt man Polyethylenetze so tief wie möglich in die Quelle am Islinger Mühlbach ein, so haften daran bereits nach kurzer Inkubationszeit gallertartige Strukturen, welche bis zu 95% aus SM1 Euryarchaeen bestehen. Es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um einen in tieferen Schichten wachsenden archaeellen Biofilm, der durch das strömende Quellwasser nach oben gespült wird (Henneberger, 2002). Da eine Biofilmbildung bei Archaeen bisher nur in Kultur induziert und beobachtet werden konnte (z.B. bei *Archaeoglobus fulgidus*; LaPaglia und Hartzell, 1997), stellt dieser Mikrobenverband den ersten beschriebenen, natürlich vorkommenden archaeellen Biofilm dar (Henneberger, 2002).

Für die strukturelle Untersuchung von Biofilmen wird häufig die konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) herangezogen. Sie erlaubt einen Einblick in tiefere Schichten komplexer biologischer Verbände, erfordert dabei aber keine strukturverändernden Eingriffe (Caldwell et al., 1993; Neu und Lawrence, 1997). In diesem Fall konnte durch CLSM gezeigt werden, dass das SM1 Euryarchaeon prinzipiell einen für Mikroorganismen typischen Biofilm bildet: Die SM1- Zellen und ihre Begleitorganismen sind - wie aus ihrer regelmäßigen Anordnung zu folgern ist - in eine extrazelluläre EPS- Matrix eingebettet (EPS: extracellular polymer substances; Flemming et al., 1998), die vermutlich schwammartig aufgebaut ist (Decho, 1990).

In der Literatur wird die typische EPS- Matrix als sehr heterogen aufgebaut beschrieben. Im Allgemeinen ist sie aus Proteinen (10-40%), Huminstoffen (30-60%), Polysacchariden (10-20%) und DNA (10-20%) zusammengesetzt (Flemming et al., 1998). Auch durch elektronenmikroskopische Analysen des SM1 Biofilms konnte neben filamentartigen, aus Proteinen bestehenden Zelloberflächenanhängseln, eine kontrastreiche Polymerhülle um die archaeellen Zellen nachgewiesen werden. Diese 'Kapsel' ist, wie vorausgegangene Studien vermuten lassen, aus Polysacchariden und kleinen Proteinen aufgebaut (Amann, 2003). Ähnlichkeiten mit der für *Salmonella typhimurium* beschriebenen

„Not just slime.”

(Ben- Ari, 1999)

Polysaccharidkapsel sind augenfällig: Dieser Organismus trägt lange, undifferenzierte, filamentartige Pili auf seiner Oberfläche, die über die Kapsel hinausragen (Grund, 1991).

Die EPS- Matrix ist auch der Grund für die Fähigkeit der Biofilme viel Wasser zu binden (im Normalfall bis zu 97%, beim SM1 Biofilm bis zu 99,6%; Zhang et al., 1998; Amann, 2003) und wirkt damit einer Dehydratisierung entgegen. Um eine Versorgung weiter innen liegender Organismen zu gewährleisten, ist die Matrix häufig von sogenannten (Wasser-) Kanälchen durchzogen (Massol- Deya, 1995; Fletcher und Decho, 2001), wie sie auch für den SM1 Biofilm nachgewiesen werden konnten. Der so mögliche Flüssigkeitsstrom transportiert Nährstoffe an, schwemmt hemmende Endprodukte aus (Costerton et al., 1994) und erlaubt damit eine Stoffwechselaktivität in allen Bereichen des Biofilms. Eine gute physiologische Konstitution der Organismen sogar in tieferen Schichten des SM1 Biofilms konnte indirekt über die gute Anfärbbarkeit mit Hybridisierungssonden nachgewiesen werden. Die gebundene Menge an Sonde korreliert nämlich mit dem Gehalt zellulärer rRNA, welcher wiederum ein gutes Maß für die gesamte Stoffwechselaktivität und Wachstumsrate darstellt (Wallner et al., 1993; Wagner et al., 1994b).

Für eine genaue strukturelle und biochemische Analyse des SM1 Biofilms sind jedoch weitere Studien vonnöten. Die in der konfokalen Laserscanning- Mikroskopie zur spezifischen Markierung von Zuckern häufig eingesetzten Lectine (Neu et al., 2001, Strathmann et al., 2002) könnten die Polysaccharidzusammensetzung der EPS- Matrix aufklären.

Eine für natürliche Biofilme ungewöhnliche Eigenschaft ist die hohe Reinheit des SM1 Biofilms. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Partnerschaften des SM1 Euryarchaeons (Perlenketten- gemeinschaften des Sippenauer Moors und des Islinger Mühlbachs), in welchen das Verhältnis Archaea:Bacteria bei ca. 1:1 liegt, dominieren im SM1 Biofilm eindeutig die Archaea (bis zu 95%). Aus diesem Grund ist seine Bezeichnung als Monospezies- Biofilm, die in natürlichen Umgebungen eher die Ausnahme darstellen, gerechtfertigt (Sutherland, 2001). Die hohe Reinheit des Biofilms lässt eine Konkurrenz zwischen dem SM1 Euryarchaeon und den beteiligten Bakterien vermuten, in der SM1 die Oberhand behält. Möglicherweise werden andere Organismen durch die Abgabe von wachstumshemmenden Stoffen wie z.B. Archaeozinen unterdrückt (O'Connor und Shand, 2002). Weiterhin ist denkbar, dass ein sehr schnelles Wachstum der Archaea für die hohe Reinheit des Biofilms verantwortlich ist. Dadurch würden zwar vereinzelt Bakterien in die Matrix eingeschlossen, diese könnten aber aufgrund einer (Nährstoff-) Konkurrenz nur zu den beobachteten Mikrokolonien heranwachsen.

„What is the matrix?“

(Neo, ca. 2199 in: "Matrix", Warner Bros. Pictures)

Um die Begleitorganismen phylogenetisch einordnen zu können, wurde eine Analyse des bakteriellen 16S rRNA- Genpools des SM1 Biofilms durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Mehrzahl der erhaltenen bakteriellen Klonsequenzen in die physiologisch einheitliche, sulfatreduzierende Gruppe der δ - Proteobacteria einzuordnen ist (Kerstens et al., 2001). Dieses Ergebnis konnte bezüglich der realen Verhältnisse durch FISH- Analysen mit einer Sulfatreduzierer- spezifischen Sonde bestätigt werden (Sonnleitner, 2004). Interessanterweise besitzen damit die im SM1 Biofilm eingeschlossenen Bakterien einen im Vergleich zu *Thiothrix* sp. und IMB1 gegenläufigen Stoffwechsel. Da auch für SM1 ein sulfatreduzierender Stoffwechsel postuliert wurde (s.o.), stützt dieses Ergebnis die Theorie einer Konkurrenz innerhalb des SM1 Biofilms.

Interessanterweise wird die Entstehung des Sulfids in schwefelhaltigen Gewässern auf mikrobielle Sulfatreduktion zurückgeführt (Wallhäuser und Puchelt, 1966; Puchelt, 1967). Da eine Stimulierung der Atmungskette von SM1 durch S- Derivat- reiche Braunkohle nachgewiesen wurde (Rudolph, 2003), kann eine ökologische Signifikanz der SM1 Biofilme in diesem Bereich vermutet werden.

Bezüglich der erntbaren Menge an Biomaterial sind die aus der Tiefe angespülten Biofilme eine gute Alternative zur Gewinnung von SM1 Euryarchaeen aus oberirdisch gewachsenen Polyethylenetzpopulationen. Jedoch ist die mechanische Stabilität des Biofilms und das Aneinanderhaften der Organismen durch die extrazelluläre Matrix häufig ein Problem bei der genauen (strukturellen) Untersuchung. Im Gegensatz dazu lassen sich die SM1 Euryarchaeen aus Polyethylenetzpopulationen einfach aus ihrem Zellverband herauslösen und separieren und ermöglichen so charakterisierende Analysen einzelner Zellen. Dies könnte ein Hinweis auf die Existenz sessiler (in Biofilm bzw. Mikrokolonie) oder motiler Formen (frei vorliegend) des SM1 Euryarchaeons sein, wie sie auch für Biofilm- bildende Bakterien nachgewiesen wurden (O'Toole et al., 2000).

Unabhängig von der Wachstumsform und -phase zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von schwermetallbedampften SM1 Euryarchaeen, dass die Zellen auf ihrer Oberfläche lange, pili- ähnliche Strukturen tragen. Dies ist auf den ersten Blick nicht ungewöhnlich, da viele Prokaryonten auf ihrer Zelloberfläche Strukturen für die Kontaktaufnahme zur Umwelt ausbilden.

Innerhalb der bakteriellen Domäne wurden verschiedene Oberflächenstrukturen beobachtet und beschrieben: Pili (Fimbrien) sind Zellanhängsel aus Proteinen, welche der Adhäsion, Biofilmbildung, dem DNA- Transfer, der Bakteriophageninfektion und, in geringerem Maße, der Fortbewegung dienen (Soto und Hultgren, 1999; Skerker und Shapiro, 2000). Hauptsächlich wird die Bewegungsarbeit jedoch von Geißeln übernommen, welche unter den Zelloberflächenstrukturen die komplexeste Struktur

**„Microbial biology can now be a whole science;
the organism can be studied in the ecosystem.”**

(Pace, 1997)

aufweisen. Ihr Aufbau und ihre Funktion für die Zellbewegung wurden bereits gründlich untersucht (Leifson, 1960; Adler, 1966; Berry, 2001).

Interessanterweise ist aber innerhalb der archaeellen Domäne recht wenig über die verschiedenen Oberflächenanhängsel bekannt. Die am genauesten studierte Struktur ist die archaeelle Geißel, die sich von den bakteriellen Geißeln in Aufbau, Zusammensetzung und Synthesemechanismus vollständig unterscheidet (Faguy et al., 1996; Jarrell et al., 1996; Jarrell et al., 2001; Cohen-Krausz und Trachtenberg, 2002), aber Gemeinsamkeiten mit den bakteriellen Typ IV Pili besitzt (Bayley und Jarrell, 1998; Cohen-Krausz und Trachtenberg, 2002). Eine andere Oberflächenstruktur wurde bei Archaeen der Gattung *Pyrodictium* beobachtet: Die sogenannten Cannulae (hohle, helikal aufgebaute Proteinröhren) bilden ein extrazelluläres Netzwerk, das die einzelnen Zellen miteinander verbindet (Stetter et al., 1983).

Von Pili- ähnlichen Fasern bei Archaea wurde jedoch nur selten berichtet (Zillig et al., 1983; Leadbetter und Breznak, 1996; Miroshnichenko et al., 1998). Die wenigen erwähnten Fimbrien wurden als einfach im Aufbau beschrieben, ihre Biochemie und Ultrastruktur nicht genauer untersucht. Eine mögliche Funktion wurde bisher nur für die Fasern von *Methanobrevibacter* sp. vorgeschlagen, welcher sich damit vermutlich mit dem Darmepithel seines Wirts, der Termiten *Reticulitermis flavipes*, assoziiert (Leadbetter und Breznak, 1996).

Vor diesem Hintergrund war bereits die Entdeckung der auf den ersten Blick an Pili erinnernde Zelloberflächenanhängsel beim SM1 Euryarchaeon ungewöhnlich und weckte das Interesse an deren ausführlicher struktureller und biochemischer Untersuchung.

Bei der genaueren elektronenmikroskopischen Betrachtung der Zelloberflächenstrukturen des SM1 Euryarchaeons stellte sich bald heraus, dass diese eine außergewöhnlich hohe, bei Prokaryonten bisher nie entdeckte Komplexität mit einer genau definierten Basis- Spitze Organisation aufweisen. Jedes Filament zeigt eine stacheldrahtähnliche Morphologie und trägt einen dreizähligen, mit Widerhaken besetzten Enterhaken an seinem Ende. Aufgrund dieser komplexen Architektur und der offensichtlichen Andersartigkeit bezüglich aller bekannten bakteriellen und archaeellen Zellanhängsel wurde die Bezeichnung '**Hamus**' (Plural '**Hami**', lateinisch für Haken, Widerhaken, Angel) für diese neue Klasse von Zelloberflächenstrukturen vorgeschlagen.

„All things great and small.”

(Fraser, 2004)

Die Hami erinnern in ihrer Hakenregion stark an handelsübliche Fisch- bzw. Enterhaken oder Anker und implizieren eine Funktion für die Zellverankerung oder Adhäsion (Abb. 65). Eine starke adhäsive Fähigkeit der Hami konnte durch Experimente mit der optischen Pinzette (Huber et al., 1995) tatsächlich nachgewiesen werden.



Abbildung 65: Vergleich der Hakenregion der SM1- Hami (**links**: Modell, **Mitte**: 3D- Rekonstruktion) mit einem handelsüblichen Angelhaken („Drilling“, **rechts**).

Die Stachelregion der Hami weist verblüffende Ähnlichkeiten zu einem herkömmlichen Stacheldraht auf (Abb. 66). Da die Stacheln in Richtung des endständigen Hakens gewandt sind, kann eine adhäsive Funktion nahezu ausgeschlossen werden. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die Stachelregion als Abstandhalter zu Artgenossen oder anderen Organismen fungiert. Vermutlich ist die in den meisten Fällen konstant $4 \mu\text{m}$ betragende, regelmäßige dreidimensionale Anordnung der SM1

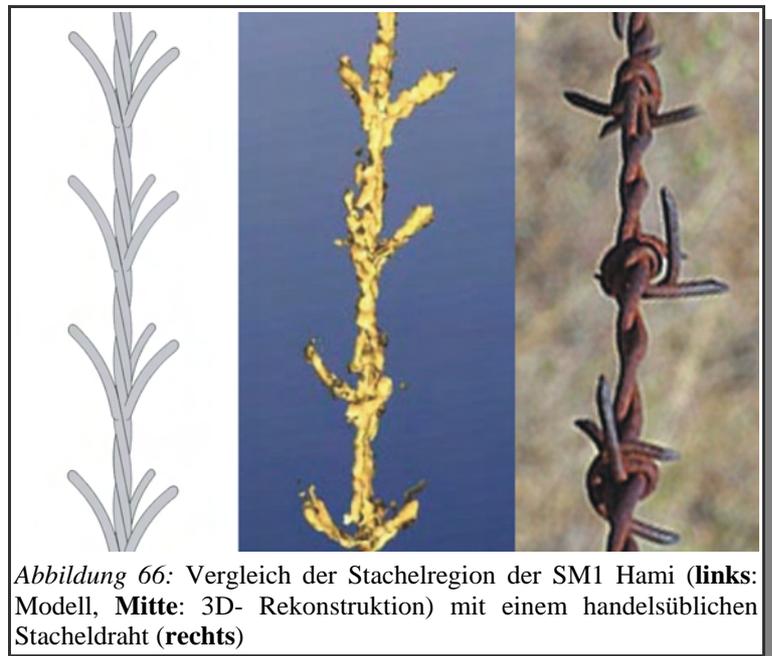


Abbildung 66: Vergleich der Stachelregion der SM1 Hami (**links**: Modell, **Mitte**: 3D- Rekonstruktion) mit einem handelsüblichen Stacheldraht (**rechts**)

Euryarchaeen innerhalb der Perlenmatrix und des Biofilms auf diese Hami- Strukturen zurückzuführen.

Mit den Hami hat die Natur im Lauf der Evolution ein perfektes mechanisches Nano- Werkzeug geschaffen, das schon allein durch seine Winzigkeit beeindruckt: Im Vergleich ist ein menschliches Haar etwa 15.000x dicker als das Hamus- Filament, ein typischer Angelhaken 250.000x größer als der Nano- Enterhaken des SM1 Euryarchaeons. Die morphologischen Parallelen der Nano- Enterhaken und Nano- Stacheldrähte zu Gegenständen des menschlichen Gebrauchs sind auch für die wissenschaftlichen Felder der Bionik und Biomimetik (Dickinson, 1999; Ball, 2001; Sarikaya et al., 2003) von großem Interesse.

Im Gegensatz zur Hami- Architektur erscheinen prokaryotische Anhängsel wie Pili oder Geißeln deutlich einfacher in ihrer Filamentstruktur. Sie bilden Röhren oder helikale Fasern ohne weitere morphologische Differenzierung (Fernández und Berenguer, 2000; Jarrell et al., 2001; Hahn et al., 2002). Von bakteriellen Geißeln unterscheiden sich die Hami auch bezüglich des Filamentdurchmessers signifikant: 7 nm stehen 24 nm gegenüber (Yonekura et al, 2003). Hier ähneln sie mehr bakteriellen Pili und archaeellen, pili-ähnlichen Fasern mit Durchmessern von 5-6 bzw. 3-5 nm (Doddema et al, 1979; Leadbetter und Breznak, 1996; Miroshnichenko et al, 1998; Fernández und Berenguer, 2000). Wie auch bei archaeellen Geißeln und bakteriellen Pili (Cohen- Krausz und Trachtenberg, 2002) wurde - soweit es aus den tomographischen Rekonstruktionen gefolgert werden kann - kein Hinweis auf die Existenz eines zentralen Tunnels in den Hami- Filamenten entdeckt. Es erscheint damit unwahrscheinlich, dass die Hami auf dieselbe Art und Weise wie bakterielle Geißeln an der Filamentspitze synthetisiert werden. Vermutlich werden stattdessen neue Untereinheiten an der Basis des Filaments angebaut, ähnlich wie es auch für bakterielle Pili gezeigt und für archaeelle Geißeln postuliert wurde (Li und Mobley, 2001; Jarrell et al, 2001; Bardy et al., 2003).

Bis dato ist nicht erklärbar, wie die Stachelstrukturen synthetisiert oder an das Filament angeheftet werden und durch welchen Mechanismus die regelmäßige Anordnung kontrolliert wird. Gleiches gilt für die endständige Hakenregion der Hami. Ihre außergewöhnliche Architektur lässt vermuten, dass der Syntheseprozess ungewöhnliche Koordination und Kontrolle erfordert. Er könnte durch ein (noch) komplizierteres Multikomponentensystem gesteuert werden, als es bei der bakteriellen Pili- Biosynthese der Fall ist (Li und Mobley, 2001).

Die Entdeckung der Hami wirft Fragen bezüglich ihrer ökologischen Bedeutung auf. Ihre auf den ersten Blick offensichtliche adhäsive Funktion konnte experimentell nachgewiesen werden: Die Hami vermitteln eine starke Anheftung einzelner Zellen aneinander und an Oberflächen verschiedener chemischer Natur. Aufgrund der wohl vorwiegend mechanischen Adhäsion der Hami durch ein 'Verhaken', scheint - im Gegensatz zu in der Literatur beobachteten Phänomenen - die Anheftung mehr oder weniger unabhängig von der Oberflächenbeschaffenheit sowie von der Wachstumsphase der Zellen zu sein (Cutter et al., 2003).

Im Allgemeinen basiert die Adhäsion von Mikroben auf physikochemischen Wechselwirkungen (z.B. van-der-Waals-Kräfte) mit geeigneten Oberflächen (möglichst hydrophil und ohne eigene Hydrathülle; Fletcher und Decho, 2001). Die Anheftung wird dabei meist von Pili und 'nonpilus- adhesins' (v.a. Kapselpolymere) vermittelt, in manchen Fällen sind aber auch Geißeln beteiligt (Soto und Hultgren, 1999; Fletcher und Decho, 2001). Häufig wurden bei den meist komplizierten Mechanismen der initialen Adhäsion synergistische Effekte zwischen Mikroben beobachtet (O' Toole et al., 2000). Aus diesem Grund ist es weiterhin gut denkbar, dass die Hami eine wichtige Rolle in der Bildung der mikrobiellen Perlenkettengemeinschaft einnehmen, indem sie die erste Anheftung an die bakteriellen

Gegenspieler und an andere Oberflächen vermitteln (Rudolph et al., 2001; Moissl et al., 2003; Rudolph et al., 2004). Da die Partnerschaft von SM1 Euryarchaeon und *Thiothrix* bzw. IMB1- Proteobakterium hochspezifisch zu sein scheint, könnte man sogar vermuten, dass die Hami während der ersten Erkennungsvorgänge grundlegend für die Zell- Zell- Kommunikation der Partner zuständig sind.

Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft der Hami ist die Stabilität der dreidimensionalen Struktur innerhalb eines sehr breiten pH- und Temperaturspektrums. Sie sind erstaunlicherweise sogar noch bei einer Temperatur von 70°C stabil, obwohl sie bei einer Temperatur von 10°C, der natürlichen Wachstumstemperatur des SM1 Euryarchaeons, synthetisiert worden waren. Auch gegenüber physikalischen Kräften zeigt sich die Festigkeit der Hami, was vermutlich auch auf eine starke Verankerung zurückzuführen ist. Dafür konnten im Rahmen dieser Arbeit sogar erste Hinweise durch die Identifizierung von Verdickungen an den cytoplasmatischen Enden der Hami gewonnen werden. Ob diese jedoch alleine die außerordentliche Festigkeit verursachen ist unklar. Die Bestimmung der Basalstruktur in der Nähe der Membran und innerhalb des Cytoplasmas könnte durch eine Identifizierung und Isolierung von beteiligten Genen bzw. Proteinen kombiniert mit Cryo-Elektronentomographie diese Frage genauer beantworten (Baumeister und Steven, 2000).

Über die Verankerungsstrukturen archaeeiler Oberflächenanhängsel ist nur wenig beschrieben. Bei den archaeeellen Geißeln konnten erste Hinweise auf unterschiedliche Verankerungskomplexe gewonnen werden: In manchen Fällen erinnern sie an die Verankerung bakterieller Geißeln (ringförmiger Basalkörper in der Zellwand; Bardy et al., 2003), oft wird auch von Türknauf- ähnlichen Strukturen berichtet ('knob'; Thomas et al., 2001). Bakterielle Pili sind häufig über kleine Proteinkomplexe an die innere oder äußere Membran der Zellwand gebunden (Soto und Hultgren, 1999)

Wie durch Gelelektrophorese und immunologische Experimente gezeigt wurde, scheinen die Hami aus einem Hauptprotein, dem 120kDa Protein, zu bestehen. Vielleicht sind jedoch weitere Proteinarten der gleichen Größe oder mehrere Proteine in niedrigeren Mengen involviert, wie schwache Banden auf dem SDS- PAGE Gel vermuten lassen. Die elektronenmikroskopischen Daten bezüglich der Hami zeigen jedoch deutlich, dass die strukturellen Komponenten des Hamus- Filaments und der Stacheln von gleicher Größe sind. Ob sie strukturell nah verwandt oder sogar identisch sind, bleibt zu untersuchen. Typischerweise wurde bei bakteriellen Pili die Zusammensetzung aus unterschiedlichen Proteinen (Piline) berichtet, auch die meisten archaeeellen Geißeln sind aus 2-5 unterschiedlichen, meist glykosilierten Proteinuntereinheiten (Flagelline) aufgebaut (Jarrell et al., 1996; Soto und Hultgren, 1999). Eine Ausnahme stellt *Thermoplasma volcanium* dar, dessen Geißeln lediglich aus einem Flagellin gebildet werden (Faguy et al., 1996).

„Small is beautiful”

(Ball, 2001)

Das dem 120kDa Hami- Protein zugehörige Gen konnte durch eine Kombination aus verschiedenen, teilweise neu modifizierten Methoden erfasst werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit konnten auch das Start- und Stop- Codon identifiziert werden; eine genauere Bestimmung des Operons ist jedoch erst durch umfassende genetische Studien, z.B. im Rahmen einer Gesamtgenomsequenzierung, möglich. Ein Datenbankvergleich mit der identifizierten Sequenz ließ keine Homologien zu bisher annotierten Genen und Proteinen entdecken. Interessanterweise kodiert das Gen für ein 40kDa Protein, was auf einen trimeren Charakter des Hami- Proteins deuten könnte. Auch das auf den ersten Blick strukturell ähnliche Aktin bildet ein Trimer aus seinen 42kDa- Untereinheiten als Grundlage für die Polymerisation zum Filament. Dieses Biopolymer unterscheidet sich aber aufgrund seiner Abmessungen deutlich von den Hami: Die zwei helikal gewundenen Stränge des Aktins sind mit 9- 10 nm dicker als die Hami (7 nm). Weiterhin liegen im Vergleich die Bindungsstellen für die 'Ärmchen' (Myosin bzw. Stacheln) näher zusammen (5,5 nm bzw. 46 nm; Milligan et al., 1990, Alberts et al., 1995; Holmes et al., 2003).

Interessanterweise hat die Analyse der Hami auf genetischer Ebene einige neue Aspekte eröffnet: Scheinbar liegt das Gen für das 120kDa Protein in mehrfachen Kopien im Genom des SM1 Euryarchaeons vor. Weiterhin lassen sich bezüglich Gensequenz und Kopienanzahl Unterschiede in der SM1 euryarchaeellen Population des Sippenauer Moors und des Islinger Mühlbachs detektieren. Es kann also postuliert werden, dass obwohl eine Sequenzidentität der SM1 Euryarchaeen in 16S rRNA- Gen und 16S-23S- Interspacer- Region nachgewiesen wurde, doch deutliche Unterschiede im genetischen Pool der Organismen vorhanden sind. Dies widerspricht der Vermutung, dass die Archaeen aus dem Sippenauer Moor und Islinger Mühlbach aus einem gemeinsamen (endemischen) Biotop in tieferen Schichten stammen könnten. Folglich ist die Existenz weiterer unabhängiger SM1- Biotope durchaus wahrscheinlich.

Zum Ende dieser Arbeit konnte das für das Hami- Protein codierende Gen sogar erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Dies bildet die Grundlage für mögliche Rekonstitutionsversuche, wie sie auch für die Cannulae von *Pyrodictium abyssi* durchgeführt wurden (Mai, 1998). Da komplexe, nanostrukturierte Oberflächen - welche hauptsächlich von Biomolekülen in biologischen Systemen gebildet werden - einzigartige physikalische und chemische Eigenschaften besitzen, könnte sogar eine technologische Anwendung der Hami in Betracht gezogen werden (Sleytr und Messner, 1983; Roukes, 2002; Ricca und Cutting, 2003). Als weiteres Beispiel für die Verbindung von High- Tech und 'High-Nature' eröffnet die Entdeckung dieser ungewöhnlichen Zellanhängsel möglicherweise neue Felder im wachsenden Gebiet der Nanobiotechnologie (Roukes, 2002). Aufgrund ihrer einzigartigen, dreidimensionalen Struktur mit Nano- Stacheldraht und Nano- Enterhaken könnten die Hami in der Zukunft als perfektes Nano- Werkzeug für Medizin, Physik und Naturwissenschaften verwendet werden. Beispielsweise könnten sie auf der Suche nach geeigneten Nano- Klettverschlüssen hilfreich sein ('Nano- Velcro', Ball, 2003) und dabei ähnliche Erfolge wie die industrielle Anwendung des Lotus-Effekts erzielen (Nachtigall und Blüchel, 2000).

Durch die Etablierung der *in situ*- Kultivierung und der damit möglichen spezifischen Gewinnung eines bisher im Labor unzüchtbaren, kälteliebenden Archaeons in hoher Reinheit konnten überraschende Einblicke in dessen faszinierende Biologie gewonnen werden. Dieses SM1 Euryarchaeon mit seinen außergewöhnlichen Eigenschaften steht stellvertretend für eine nach wie vor größtenteils verborgene, jedoch ubiquitäre und ökologisch signifikante mikrobielle Welt. Die Erforschung der Strukturen, der Molekularbiologie und der Ökologie der weiten prokaryontischen Diversität verspricht noch große Entdeckungen und erstaunliche Einblicke in die Verborgenheiten der Natur.

V. Zusammenfassung

Extreme Biotope mit z.B. hoher Salinität, extremen pH- Werten und hohen Temperaturen wurden lange Zeit als typisches Habitat für Archaea angesehen. Kultivierungs- unabhängige molekulare Untersuchungen auf Basis ribosomaler RNA- Gensequenzen haben jedoch ihre globale Verbreitung in Nieder- bis Moderattemperatur- Biotopen bewiesen. Bis heute sind diese Archaea quasi nicht kultivierbar und ihre offensichtliche ökologische Signifikanz bleibt nach wie vor verborgen.

Vor kurzem entdeckten Mitarbeiter der AG Prof. Dr. Robert Huber im Regensburger Raum ein einzigartiges archaeell/bakterielles Konsortium, welches in Form makroskopisch sichtbarer, neuartiger, mikrobieller Perlenketten in kaltem (10°C), sulfidhaltigen Quellwasser vorkommt. Im Inneren einer Perle formt das neuartige SM1 Euryarchaeon eine Mikrokolonie, die äußere Hülle wird durch filamentöse S- oxidierende Bakterien aufgebaut. Unter aeroben Bedingungen (Sippenauer Moor) bildet das SM1 Euryarchaeon zusammen mit *Thiothrix* sp., bei geringeren Sauerstoffkonzentrationen (Islinger Mühlbach) zusammen mit dem neuartigen ϵ - Proteobakterium IMB1 eine, vielleicht sogar auf eine Symbiose basierende, stabile Gemeinschaft.

Durch eine neu etablierte Methode, der *in situ*- Kultivierung, ist es gelungen, diese mikrobiellen Perlenkettengemeinschaften schnell und zuverlässig in größeren Mengen an Polyethylnetzen direkt im natürlichen Biotop ('natürlicher Chemostat') zu züchten. Aus ca. 10.000 Perlen, die nun wöchentlich geerntet werden konnten, wurde das SM1 Euryarchaeon durch verschiedene physikalische Sedimentations- und Zentrifugationsschritte bis zu einer Reinheit von ca. 98% von Begleitorganismen separiert. Aufgrund dieser hohen Reinheit, der guten Lebensfähigkeit und der ausreichend gewinnbaren Menge an Zellen konnte die erhaltene, natürlich gewachsene SM1- Fraktion wie eine im Labor züchtbare (Rein-)Kultur biologisch detailliert untersucht werden.

Auf diesem Weg konnten z.B. die optimalen physiologischen Bedingungen für das SM1 Euryarchaeon (Temperatur: -2°C bis +30°C; neutraler pH, Niedersalz) bestimmt und die Monophylie der aufgereinigten SM1- Zellen durch Immuno- FISH gezeigt werden.

Im Rahmen struktureller Untersuchungen wurden auf der Zelloberfläche jeder der nur etwa 0,6 μm großen SM1- Zellen ca. 100 filamentöse Anhängsel mit einer ungewöhnlich komplexen Struktur entdeckt: nanometerdicke, stacheldrahtartige, in der Zellwand verankerte Filamente tragen an ihren Enden winzige, mit Widerhaken besetzte Tripel- Haken (\emptyset 60 nm). Da diese Struktur innerhalb der Prokaryonten eine neue Klasse filamentöser Zellanhängsel repräsentiert, wurde für sie die Bezeichnung 'Hamus' (lateinisch für: Haken, Widerhaken, Angel; Plural: 'Hami') vorgeschlagen. Die über eine breite pH- und Temperaturspanne stabilen Hami sind hauptsächlich aus einem 120 kDa Protein aufgebaut, das auch auf genetischer Ebene erfasst werden konnte. Dieses perfekte mechanische Nano- Werkzeug, welches die Natur im Laufe der Evolution für die Zelladhäsion geschaffen hat, könnte sich sogar auf dem Gebiet der Nanobiotechnologie als nützlich erweisen.

Das aus dieser Arbeit gewonnene Wissen erweitert unser Verständnis bezüglich unkultivierter, kälte- liebender Archaea als wichtiger Bestandteil von mikrobiellen Gemeinschaften in nicht extremen Ökosystemen.

VI. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

<i>Abkürzung</i>		<i>Abkürzung</i>	
a	archaeell	MOPS	4- Morpholinpropansulfonsäure
Abb.	Abbildung	N	normal
abs.	absolut	NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ad	zu	Nd:YAG	Neodym: Yttrium- Aluminium- Granat
al.	alii	NK	Negativkontrolle
AP	alkalische Phosphatase	Nr.	Nummer
APS	Ammoniumperoxodisulfat	OD	optische Dichte
ARDRA	amplified rDNA restriction analysis	opt.	optional
b	bakteriell	p. a.	zur Analyse
BCA	Bicincholinsäure	Pa	Pascal
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat	PAS	Periodat- Schiff
bidest	zweifach destilliert	PCR	polymerase chain reaction (Polymerase- Ketten- Reaktion)
bp	Basenpaare	pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
BSA	Rinderserumalbumin	pH	pondus hydrogenii (negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
bzw.	beziehungsweise	PK	Positivkontrolle
ca.	circa	Pos.	Position
cDNA	komplementärer DNA- Strang	PVDF	Polyvinylidenfluorid
CLSM	konfokale Laserscanning- Mikroskopie	R	rückwärts
CY3	Indodicarbocyanine 3-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-di-isopropyl)-phosphoramidit	RAGE	rapid amplification of genomic ends
d.h.	das heißt	Rhodamin Green	Rhodamin Green (5(6)-carboxyodamin succinimidyl ester)
Da	Dalton (= 1,66018x 10 ⁻²⁴ g)	RNA	Ribonukleinsäure
DAPI	4,6 Diamidino-2-Phenylindol	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat	RT	Raumtemperatur
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat	RT- PCR	Reverse- Transkription- PCR
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat	s	Sekunde
DIG	Digoxigenin	s.	siehe
DMSO	Dimethylsulfoxid	S	Sedimentationskoeffizient nach Svedberg
DNA	Desoxyribonukleinsäure	S.	Seite(n)
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat	s.o.	siehe oben
EDAX	Energy dispersive analysis of X- rays	sog.	sogenannt
Ed.	Editor(en)	sp.	species
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	spez.	spezifisch
evtl.	eventuell	Tab.	Tabelle
F	vorwärts	TCA	Trichloressigsäure
FFH	Flora- Fauna- Habitat	TEM	Transmissions- Elektronenmikroskop(ie)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
FITC	Fluorescein Isothiocyanat	TFA	Trifluoressigsäure
g	Gramm	T _m	Schmelztemperatur der DNA
ggf.	gegebenenfalls	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
G+C	Guanin+ Cytosin	U	Units
GDGT	Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraether	u	universell
h	Stunde	üN	über Nacht
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Upm	Umdrehungen pro Minute
Hz	Hertz	UV	Ultraviolett(strahlung)
incl.	inklusive	V	Volt
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	v.a.	vor allem
kDa	Kilo- Dalton	v/v	Volmen pro Volumen
l	Liter	vgl.	vergleiche
M	molar	w/v	Gewicht pro Volumen
m	Meter	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
MCP	methylated chemotactic proteins	z.B.	zum Beispiel
min	Minute(n)	z.T.	zum Teil
mind.	mindestens		

Tabelle 25: Abkürzungsverzeichnis

Symbole

<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>
%	Prozent	®/™	eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius	∅	Durchmesser
λ	Wellenlänge		

Tabelle 26: Symbole und ihre Bedeutung

Einheiten

<i>Präfix</i>	<i>Symbol</i>	<i>Faktor</i>	<i>Präfix</i>	<i>Symbol</i>	<i>Faktor</i>
centi	c	10 ⁻²	nano	n	10 ⁻⁹
milli	m	10 ⁻³	pico	p	10 ⁻¹²
mikro	μ	10 ⁻⁶	kilo	k	10 ³

Tabelle 27: Präfixe für Einheiten, Symbole und Faktor

IUPAC- Code für Nucleotide

<i>Code</i>	<i>Nucleotid(e)</i>	<i>Code</i>	<i>Nucleotid(e)</i>
A	Adenin	N	A/C/G/T
B	G/C/T	R	A/G
C	Cytosin	S	G/C
D	A/G/T	T	Thymin
G	Guanin	U	Uracil
H	A/C/T	V	A/G/C
K	G/T	W	A/T
M	A/C	Y	C/T

Tabelle 28: IUPAC- Code für Nucleotide

IUPAC- Code für Aminosäuren

<i>Code</i>	<i>Aminosäure</i>	<i>Code</i>	<i>Aminosäure</i>
Ala	Alanin	Leu	Leucin
Arg	Arginin	Lys	Lysin
Asn	Asparagin	Met	Methionin
Asp	Asparaginsäure	Phe	Phenylalanin
Cys	Cystein, Cystin	Pro	Prolin
Glu	Glutaminsäure	Ser	Serin
Gln	Glutamin	Thr	Threonin
Gly	Glycin	Trp	Tryptophan
His	Histidin	Tyr	Tyrosin
Ile	Isoleucin	Val	Valin
		U	Selenocystein

Tabelle 29: IUPAC- Code für Aminosäuren

Chemische Elementsymbole wurden gemäß den IUPAC- Richtlinien verwendet.

VII. Literaturverzeichnis

A

- Abella, C.A., X.P. Cristina, A. Martinez, I. Pibernat und X. Vila.** 1998. Two new motile phototrophic consortia: "*Chlorochromatium lunatum*" and "*Pelochromatium selenoides*". Arch. Microbiol. **169**:452-459.
- Adler, J.** 1966. Chemotaxis in bacteria. Science **153**:706-716.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J.D. Watson.** 1995. Molekularbiologie der Zelle, L. Jaenicke (Ed. der Übersetzung). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Allen, G.** 1989. Sequencing of proteins and peptides. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, R. Burdon und P. Knippenberg (Ed.). Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford.
- Amann, R.I., L. Krumholz und D.A. Stahl.** 1990a. Fluorescent- oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. **172**:762-770.
- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux und D.A. Stahl.** 1990b. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. **56**:1919-1925.
- Amann, R.I., W. Ludwig und K.H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**:143-169.
- Amann, T.** 2003. Biochemische und physiologische Untersuchungen neuartiger Archaeen sulfidischer Gewässer. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.
- Ashkin, A., J.M. Dziedzic und T. Yamane.** 1987. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. Nature **330**:769-771.
- Ashkin, A. und J.M. Dziedzic.** 1987. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. Science **235**:1517-1520.
- Aßmus, B., M. Schloter, G. Kirchhof, P. Hutzler und A. Hartmann.** 1997. Improved *in situ* tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA targeted oligonucleotides. Microb. Ecol. **33**:32-40.
- ### B
- Ball, P.** 2001. Life's lessons in design. Nature **409**:413-416.
- Ball, P.** 2003. Super- strong adhesive planned with hooked carbon strands. Nature News Service **22**. <http://www.nature.com/nsu/031020/031020-5.html>
- Bardy, S.L., S.Y.M. Ng und K.F. Jarrell.** 2003. Prokaryotic motility structures. Microbiology **149**:295-304.
- Barns, S.M., R.E. Fundyga, M.W. Jeffries und N.R. Pace.** 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**:1609-1613.
- Baron, D., V. Blüm, G. Czihak, G. Gottschalk, B. Hassenstein, C. Hauenschild, W. Haupt, J. Jacobs, G. Kümmel, O.L. Lange, H. Langer, H.F. Linskens, W. Nachtigall, D. Neumann, G. Osche, W. Rathmayer, W. Rautenberg, K. Sander, P. Schopfer, P. Sitte, H. Walter, F. Weberling, W. Wieser, H. Ziegler und V. Ziswiler.** 1992. Biologie. G. Czihak, H. Langer und H. Ziegler (Ed.). Springer- Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Baumeister, W. und A.C. Steven .** 2000. Macromolecular electron microscopy in the era of structural genomics. TIBS **25**:624-631.

- Baumeister, W.** 2002. Electron tomography: towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**:679-684.
- Bayley, D.P. und K.F. Jarrell** . 1998. Further evidence to suggest that archaeal flagella are related to bacteria type IV pili. *J. Mol. Evol.* **46**:370-373.
- Ben-Ari, E.T.** 1999. Not just slime. *Bioscience* **49**:689-695.
- Béjà, O., M.T. Suzuki, E.V. Koonin, L. Aravind, A. Hadd, L.P. Nguyen, R. Villacorta, M. Amjadi, C. Garrigues, S.B. Jovanovich, R.A. Feldman und E.F. DeLong.** 2000. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ. Microbiol.* **2**:516-529.
- Berry, R.M.** 2001. Bacterial flagella: flagellar motor. *Nature Encyclopedia of Life Sciences* . Nature Publishing Group, London.<http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0000744]
- Besnard, V., M. Federihi und J.M. Cappelier.** 2000. Evidence of viable but non- culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC- DAPI double staining. *Food Microbiol.* **17**:697-704.
- Bintrim, S.B., T.J. Donohue, J. Handelsman, G.P. Roberts und R.M. Goodman.** 1997. Molecular phylogeny of archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:277-282.
- Boetius, A., K. Ravenschlag, C. J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gieseke, R. Amann, B.B. Jorgensen, U. Witte und O. Pfannkuche.** 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**:623-626.
- Boschker, H.T.S., S.C. Nold, P. Wellsbury, D. Bos, W. de Graaf, R. Pel, R.J. Parkes und T.E. Cappenberg.** 1998. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C- labelling of biomarkers . *Nature* **392**:801-805.
- Bresinsky, A.** 1991. Flora und Vegetation der ältesten Schutzgebiete im Umkreis von Regensburg. *Hoppea, Denkschr. Regensb. Ges.* **50**:121-150.
- Bresinsky, A.** 1999. Die Verteidigung des Naturschutzgebietes Sippenauer Moor. *Hoppea, Denkschr. Regensb. Ges.* **60**:691-724.
- Bresinsky, A.** 2001. Das Schicksal des Sippenauer Moores nach Abschluss des Verfahrens vor dem Bayerischen Verwaltungsgerichtshof. *Hoppea, Denkschr. Regensb. Ges.* **62**:367-391.
- Brigmon, R.L., H.W. Martin, T.L. Morris, G. Bitton und S.G. Zam.** 1994. Biogeochemical ecology of *Thiothrix* spp. in underwater limestone caves. *Geomicrobiol. J.* **12**: 141-159.
- Brigmon, R.L. und C. de Ridder.** 1998. Symbiotic relationship of *Thiothrix* ssp. with an echinoderm. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3491-3495.
- Brock, T. D.** 1967. Life at high temperatures. *Science* **158**:1012-1019.
- Brosius, J., L. Palmer, J.P. Kennedy und H.F. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 4801- 4805.
- Buder, J.** 1914. *Chloronium mirabile*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **31**:80-97.
- Burggraf, S., G.J. Olsen, K.O. Stetter und C.R. Woese.** 1992. A phylogenetic analysis of *Aquifex pyrophilus*. *System. Appl. Microbiol.* **15**:352-356.
- Burggraf, S., H. Huber und K.O. Stetter.** 1997. Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S ribosomal RNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:657-660.

C

- Caldwell, D.E., D.R. Korber und J.R. Lawrence.** 1993. Analysis of biofilm formation using 2D vs 3D digital imaging. *J. Appl. Bacteriol.* **74**:52S-66S.
- Chicurel, M.** 2000. Slimebusters. *Nature* **408**:284-286.
- Cohen, Y., R.W. Castenholz und H.O. Halvorson.** 1984. *Microbial mats- stromatolites.* Alan R. Liss Incor., New York.
- Cohen, Y. und Rosenberg, E.** 1989. *Microbial mats: Physiological ecology of benthic microbial communities.* ASM , Washington.
- Cohen-Krausz, S. und S. Trachtenberg.** 2002. The structure of the archaeobacterial flagellar filament of the extreme halophile *Halobacterium salinarium* R1M1 and its relation to eubacterial flagellar filaments and type IV pili. *J. Mol. Biol.* **321**:383-395.
- Colwell, R.R.** 1997. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**:302-307.
- Cormack, R.S. und I.E. Somssich.** 1997. Rapid amplification of genomic ends (RAGE) as a simple method to clone flanking genomic DNA. *Gene* **194**:273-276.
- Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D. De Beer, D.E. Caldwell, D.R. Korber und G. Jander.** 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* **176**:2137-2142.
- Cottrell, M.T. und D.L. Kirchmann.** 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridisation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5116-5122.
- Curtis, T.P. und W.T. Sloan.** 2004. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:221-226.
- Cutter, L.A., P.M. van Schie und M. Fletcher.** 2003. Adhesion of anaerobic microorganisms to solid surfaces and the effect of sequential attachment on adhesion characteristics. *Biofouling* **19**: 9- 18.

D

- Davey, M.E. und G.A. O'Toole.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:847-867.
- Decho, A.W.** 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **28**:73-153.
- DeLong, E.F.** 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5685-5689.
- DeLong, E.F., K.Y. Wu, B.B. Prézelin und R.V.M. Jovine.** 1994. High abundance of archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**:695-697.
- DeLong, E.F. und N.R. Pace.** 2001. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* **50**:470-478.
- DeLong, E.F.** 2003. Oceans of archaea. *ASM News* **69**:503-511.
- DeLong, E.F.** 2004. Reconstructing the wild types. *Nature* **428**: 25-26.
- Dickinson, M.H.** 1999. Bionics: Biological insight into mechanical design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:14208-14209.
- Doddema, H.J., J.W.M. Derksen und G.D. Vogels.** 1979. Fimbriae and flagella of methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **5**:135-138.

Dubochet, J., M. Adrian, J.J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A.W. McDowell und P. Schultz. 1988. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* **21**:129-228.

E

Eichler, J. 2004. Facing extremes:archaeal surface- layer (glyco)proteins. *Microbiology* **149**:3347-3351.

Engel, A.S., N. Lee, M.L. Porter, L.A. Stern, P.C. Bennett und M. Wagner. 2003. Filamentous Epsilonproteobacteria dominate microbial mats from sulfidic cave springs. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5503-5511.

Engelhardt, H. 1988. Correlation averaging and 3-D reconstruction of 2-D crystalline membranes and macromolecules, S. 357-413. In: *Methods of microbiology*, F. Mayer (Ed.). Academic Press, London.

F

Faguy, D.M., D.P. Bayley, A.S. Kostyukova, N.A. Thomas und K.F. Jarrell. 1996. Isolation and characterization of flagella and flagellin protein from the thermoacidophilic archaea *Thermoplasma volcanium* and *Sulfolobus shibatae*. *J. Bacteriol.* **178**:902-905.

Fernández, L.A. und J. Berenguer. 2000. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **24** :21-44.

Flemming, H.-C., J. Wingender und C. Mayer. 1998. Extracellular polymeric substances - the material which forms the biofilm. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **63**:1129-1136.

Fletcher, M. und A.W. Decho. 2001. Biofilms. *Nature Encyclopedia of Life Sciences* . Nature Publishing Group, London. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0000342]

Forterre, P. 1997. Archaea: what can we learn from their sequences? *Curr. Opin. Gen. Develop.* **7**:764-770.

Fox, J. L. 2003. Determined microbiologists bring culture to the "uncultured". *ASM News* **69**:370-371.

Frangakis, A.S. und R. Hegerl. 2001. Noise reduction in electron tomographic reconstructions using nonlinear anisotropic diffusion. *J. Struct. Biol.* **135**:239-250.

Franzmann, P.D., N. Springer, W. Ludwig, E. Conway de Macario und M. Rohde. 1992. A methanogenic archaeon from Ace Lake, Antarctica. *Methanococoides burtonii* sp. nov.. *System. Appl. Microbiol.* **15**:573-581.

Franzmann, P.D., Y. Liu, D.L. Balkwill, H.C. Aldrich, E. Conway de Macario und D.R. Boone. 1997. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **47**:1068-1072.

Fraser, C.M. 2004. All things great and small. *Trends Microbiol.* **12**: 7-8.

Fröstl, J.M. und J. Overmann. 1998. Physiology and tactic response of the phototrophic consortium "*Chlorochromatium aggregatum*". *Arch. Microbiol.* **169**:129-135.

Fröstl, J.M. und J. Overmann. 2000. Phylogenetic affiliation of the bacteria that constitute phototrophic consortia. *Arch. Microbiol.* **174**: 50-58.

Frost, L.S., G.D. Armstrong, B.B. Finlay, B F.P. Edwards und W. Paranchych. 1983. N-terminal amino acid sequencing of EDP208 conjugative pili. *J. Bacteriol.* **153**:950-954.

Fuchs, B.M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schippel, W. Ludwig und R. Amann. 1998. Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4973-4982.

Fuhrman, J.A., K. McCallum und A.A. Davis. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**:148-149.

G

- Graf, J. B.** 1805. Versuch einer pragmatischen Geschichte der baierischen und oberpfälzischen Mineralwässer. Lindauer und Lentner, München.
- Großkopf, R., S. Stubner und W. Liesack.** 1998. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4983-4989.
- Grund, S.** 1991. Slime capsule and fimbriae on *Salmonella typhimurium var. cop.* - electron microscopic study. *J. Vet. Med.* **38**:3-16.
- Gupta, R., Q.K. Beg und P. Lorenz.** 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**:15-32.

H

- Hahn, E., P. Wild, U. Hermanns, P. Sebbel, R. Glockshuber, M. Häner, N. Taschner, P. Burkhard, U. Aebi und S.A. Müller.** 2002. Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J. Mol. Biol.* **323**:845-857.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- Heim, S., M. Del Mar Lleo, B. Bonato, C.A. Guzman und P. Canepari.** 2002. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J. Bacteriol.* **184**:6739-6745.
- Henneberger, R.** 2002. Molekulare und physiologische Untersuchungen an mikrobiellen Lebensgemeinschaften an trägergebundenen Materialien. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.
- Hershberger, K.L., S.M. Barns, A.-L. Reysenbach, S.C. Dawson und N.R. Pace.** 1996. Wide diversity of crenarchaeota. *Nature* **384**:420.
- Hinrichs, K.U., J.M. Hayes, S.P. Sylva, P.G. Brewer und E.F. DeLong.** 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**:802-805.
- Hoehler, T.M., M.J. Alperin, D.B. Albert und C.S. Martens.** 1994. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: Evidence for a methanogenic-sulfate reducer consortium. *Glob. Biochem. Cycles* **8**:451-463.
- Holmes, K.C., I. Angert, F.J. Kull, W. Jahn und R.R. Schröder.** 2003. Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* **425**: 423-427
- Howarth, R., R.F. Unz, E.M. Seviour, R.J. Seviour, L.L. Blackall, R.W. Pickup, J.G. Jones, J. Yaguchi und I.M. Head.** 1999. Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater- treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1817-1827.
- Huber, H., M.J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V.C. Wimmer und K.O. Stetter.** 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**:63-67.
- Huber, R., C.R. Woese, T.A. Langworthy, J.K. Kristjansson und K.O. Stetter.** 1990. *Fervidobacterium islandicum* sp. nov., a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the "Thermotogales". *Arch. Microbiol.* **154**:105-111.
- Huber, R., S. Burggraf, T. Mayer, S. M. Barns, P. Rossnagel und K.O. Stetter.** 1995. Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by *in situ* RNA analysis. *Nature* **376**:57-58.
- Huber, R.** 1999. Die Laserpinzette als Basis für Einzelzellkultivierungen. *BIOspektrum* **5**:289-291.

Huber, R. und K. O. Stetter. 2001. Discovery of hyperthermophilic microorganisms, S. 11-24. In: Methods in Enzymology, M. W. W. Adams und R. M. Kelly (Ed.). Academic Press, London.

J

Javor, B. 1989. Hypersaline environments: microbiology and biochemistry. In: Brock/ Springer series in contemporary bioscience. T. D. Brock (Ed.). Springer-Verlag, Berlin.

Jarrell, K.F., D.P. Bayley und A.S. Kostyukova. 1996. The archaeal flagellum: a unique motility structure. J. Bacteriol. **178**:5057-5064.

Jarrell, K.F., D.P. Bayley, J.D. Correia und N.A. Thomas. 2001. Archaeal flagella. In: Nature Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0000386]

Jurgens, G., F.-O. Glöckner, R. Amann, A. Saano, L. Montonen, M. Likolammi und U. Münster. 2000. Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent *in situ* hybridization. FEMS Microbiol. Ecol. **34**:45-56.

K

Karner, B.M., E.F. DeLong und D.M. Karl. 2003. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. Nature **409**:507-510.

Kersters, K., P. De Vos, M. Gillis und J. Swings. 2001. Proteobacteria. In: Nature Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0000465]

Koch, M. 2001. Verbreitung und molekulare Analysen von charakteristisch strukturierten mikrobiellen Lebensgemeinschaften. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.

Krumbein, W.E. und M. Villbrandt. 1994. Biofilme und Mikrogenmatten extremer Lebensräume., S. 113-139. In: Extremophile, K. Hausmann und B. P. Kremer (Ed.). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokyo.

Kudo, Y., S. Shibata, T. Miyaki, T. Aono und H. Oyaizu. 1997. Peculiar archaea found in Japanese paddy soils. Biosci. Biotech. Biochem. **61**:917-920.

L

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, S. 115-175. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt und M. Goodfellow (Ed.). John Wiley & Sons, Chichester, England.

LaPaglia, C. und P.L. Hartzell. 1997. Stress-Induced Production of Biofilm in the Hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3158-3163.

Lathe, R. 1985. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. J. Mol. Biol. **183**:1-12.

Leadbetter, J.R. und J.A. Breznak. 1996. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. Appl. Environ. Microbiol. **62**:3620-3631.

Leifson, E. 1960. Atlas of bacterial flagellation. Academic press, London.

Lévesque, C., C. Vadeboncoeur, F. Chandad und M. Frenette. 2001. *Streptococcus salivarius* fimbriae are composed of a glycoprotein containing a repeated motif assembled into a filamentous nondissociable structure. J. Bacteriol. **183**:2724-2732.

Li, X. und H.L.T. Mobley. 2001. Bacterial pili and fimbriae. In: Nature Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0000304]

Ludwig, W. 1995. Sequence databases (3.3.5), S. 1-22. In: Molecular microbial ecology manual, A. D. L. Akkermans, J. D. Van Elsas und F. J. De Bruijn (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.

Ludwig, W. und O. Strunk. 1997. ARB: A software environment for sequence data. www.arb-home.de

M

MacGregor, B.J., D.P. Moser, E.W. Alm, K.H. Neelson und D.A. Stahl. 1997. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1178-1181.

Maddock, J.R. und L. Shapiro. 1993. Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* **259**:1717-1723.

Mai, B. 1998. In vitro Untersuchungen zum extrazellulären Netzwerk von *Pyrodictium abyssi* TAG11. Dissertation. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.

Maidak, B.L., J. R. Cole, T.G. Lilburn, C.T.J. Parker, P.R. Saxman, J.M. Stredwick, G.M. Garrity, B. Li, G.J. Olsen, S. Pramanik, T.M. Schmidt und J.M. Tiedje. 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* **28**:173-174.

Maley, F., R.B. Trimble, A.L. Tarentino und T.H.Jr. Plummer. 1989. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* **180**:195-204.

Maniatis, T., E.F. Fritsch und J. Sambrook. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Massana, R., A.E. Murray, C.M. Preston und E.F. DeLong. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *archaea* in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:50-56.

Massol- Deyá, A.A., J. Whallon, R.F. Hickey und J.M. Tiedje. 1995. Channel structures in aerobic biofilms of fixed- film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:769-777.

McGlannan, M.F. und J.C. Makemson. 1990. HCO₃⁻ fixation by naturally occurring tufts and pure cultures of *Thiothrix nivea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:730-738.

McInerney, J.O., M. Wilkinson, J.W. Patching, T.M. Embley und R. Powell. 1995. Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a Deep-Sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1646-1648.

Milligan, R.A., M. Whittaker und D. Safer. 1990. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature* **348**: 217-221

Millikan, D.S., H. Felbeck und J.-L. Stein. 1999. Identification and characterization of a flagellin gene from the endosymbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3129-3133.

Miroshnichenko, M.L., G.M. Gongadze, F.A. Rainey, A.S. Kostyukova, A.M. Lysenko, N.A. Chernyh und E.A. Bonch-Osmolovskaya. 1998. *Thermococcus gorgonarius* sp. nov. and *Thermococcus pacificus* sp. nov.: heterotrophic extremely thermophilic archaea from New Zealand submarine hot vents. *Int J Syst Bacteriol* **48**:23-29.

Moissl, C. 2000. Ökophysiologische Untersuchungen an Populationen neuartiger Mikroorganismen in sulfidhaltigen Quellen. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.

Moissl, C., C. Rudolph und R. Huber. 2002. Natural communities of novel archaea and bacteria with a string-of-pearls-like morphology: molecular analysis of the bacterial partners. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:933-937.

- Moissl, C., C. Rudolph, R. Rachel, M. Koch und R. Huber.** 2003. *In situ* growth of the novel SM1 euryarchaeon from a string-of-pearls-like microbial community in its cold biotope, its physical separation and insights into its structure and physiology. *Arch. Microbiol.* **180**:211-217.
- Moissl, C., R. Rachel, A. Briegel, H. Engelhardt und R. Huber.** 2004. The unique structure of archaeal "hami", highly complex cell appendages with nano-grappling hooks. *Molecular Microbiology*, im Druck.
- Moller, S., A.R. Pedersen, L.K. Poulsen, E. Arin und S. Molin.** 1996. Activity and three- dimensional distribution of toluene- degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative *in situ* hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4635-4640.
- Morgan, D. G., J. W. Baumgartner und G.L. Hazelbauer.** 1993. Proteins antigenically related to methyl-accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli* detected in a wide range of bacterial species. *J. Bacteriol.* **175**: 133-140.
- Morita, R. Y.** 1975. Psychrophilic Bakteria. *Bact. Rev.* **39**:144-167.

N

- Nachtigall, W. und K.G. Blüchel.** 2000. Das große Buch der Bionik, W. Nachtigall (Ed.). Deutsche Verlags- Anstalt, Stuttgart/ München.
- Nauhaus, K., A. Boetius, M. Kruker und F. Widdel.** 2002. In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulfate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environ. Microbiol.* **4**: 296- 305.
- Neu, T.R. und J.R. Lawrence.** 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**:11-25.
- Neu, T.R., G.D.W. Swerhone und J.R. Lawrence.** 2001. Assessment of lectin- binding analysis for *in situ* detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology* **147**:299-313.
- Nielsen, H.** 1981. Schwefelisotope und ihre Assage zur Entstehung der Schwefelquellen, S. 99-107. In: Die Thermal und Schwefelwasservorkommen von Bad Gögging, G. Andres und H. Wirth (Ed.). Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
- Nisbet, E.G. und C.M.R. Fowler.** 1999. Archaeal metabolic evolution of microbial mats. *Proc. R. Soc. Lond.* **266**:2375-2382.

O

- O'Connor, E.M. und R.F. Shand.** 2002. Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**:23-31.
- O'Toole, G.A., H.B. Kaplan und R. Kolter.** 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:49-79.
- Olsen, G. J.** 1994. Archaea, Archaea, everywhere. *Nature* **371**:657-658.
- Orphan, V.J., C.H. House, K.-U. Hinrichs, K.D. McKeegan und E.F. DeLong.** 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7663-7668.
- Overmann, J., C. Tuschak und J.M. Fröstl.** 1998. The ecological niche of the consortium " *Pelochromatium roseum*". *Arch. Microbiol.* **169**:120-128.
- Ovreas, L., L. Forney, L.F. Daae und V. Torsvik.** 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradientgel electrophoresis of PCR-amplified gene fragment coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3367-3373.

P

- Pace, N.R.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**:734-740.

- Pearson, A., A.P. McNichol, B.C. Benitez- Nelson, J.M. Hayes und T.I. Eglinton.** 2001. Origins of lipid biomarkers in Santa Monica Basin surface sediment: a case study using compound-specific $\Delta^{14}\text{C}$ analysis. *Geochimica* **65**:3123-3137.
- Pedersen, K.** 2000. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**:9-16.
- Pfennig, N.** 1980. Syntrophic mixed cultures and symbiotic consortia with phototrophic bacteria., S. 127-131. In: *Anaerobes and anaerobic infections*, G. Gottschalk, N. Pfennig und H. Werner (Ed.). Fischer, Stuttgart-New York.
- Plummer, T.H.Jr. und A.L. Tarentino.** 1991. Purification of the oligosaccharide- cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycobiology* **1**:257-263.
- Preston, C.M., K.Y. Wu, T.F. Molinski und E.F. DeLong.** 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:6241-6246.
- Pringault, O., R. de Wit und P. Caumette.** 1996. A benthic gradient chamber for culturing phototrophic sulfur bacteria on reconstituted sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**:237-250.
- Puchelt, H.** 1967. Schwefelisotopenuntersuchungen an österreichischen und deutschen Schwefelquellen. *Arch. physikal. Ther.* **3**:357-365.
- ## R
- Rachel, R.** 2004. Heiße Mikroorganismen und "coole" Präparationsmethoden: Ultrastruktur, Oberflächen, Volumina und Interaktionen hyperthermophiler Bakterien und Archaeen. Habilitationsschrift. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.
- Radajewski, S., P. Ineson, N.R. Parekh und C. Murrell.** 2000. Stable- isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**:646-649.
- Reeve, J.** 1999. Archaeobacteria then... Archaea now (Are there really no archaeal pathogens?). *J. Bacteriol.* **181**:3613-3617.
- Ricca, E. und S.M. Cutting.** 2003. Emerging applications of bacterial spores in nanobiotechnology. *Journal of Nanobiotechnology* **1**.
- Rieger, G., R. Rachel, R. Hermann und K.O. Stetter.** 1995. Ultrastructure of the hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*. *Journal of Structural Biology* **115**:78-87.
- Rodina, A. G.** 1972. *Methods in aquatic microbiology*. University Park Press, Baltimore.
- Rodriguez, G.G., D. Phipps, K. Ishiguro und H.F. Ridgeway.** 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1801-1808.
- Rondon, M.R., P.R. August, A.D. Bettermann, S.F. Brady, T.H. Grossman, M.R. Liles, K.A. Loiacono, B.A. Lynch, I.A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M.S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman und R. M. Goodman.** 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2541-2547.
- Roszak, D.B. und R.R. Colwell .** 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2889-2983.
- Rothschild, L.J. und R.L. Mancinelli.** 2001. Life in extreme environments. *Nature* **409**:1092-1101.
- Roukes, M. L. F.** 2002. *Understanding nanotechnology*. Warner Books, New York.
- Rudi, K., T. Fossheim und K.S. Jakobsen.** 1999. Restriction cutting independent method for cloning genomic DNA segments outside the boundaries of known sequences. *BioTechniques* **27**:1170-1177.

- Rudolph, C.** 1998. Weiterführende Untersuchungen zur Mikrobenpopulation der Schwefelquellen des Sippenauer Moors. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.
- Rudolph, C., G. Wanner und R. Huber.** 2001. Natural communities of novel archaea and bacteria growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2336-2344.
- Rudolph, C.** 2003. Molekularbiologische Untersuchungen zur Verbreitung und Physiologie neuartiger, unkultivierter Archaeen in kalten Schwefelquellen. Dissertation. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.
- Rudolph, C., C. Moissl, R. Henneberger und R. Huber.** 2004. Ecology and microbial structures of archaeal/bacterial strings-of-pearls communities and archaeal relatives thriving in cold sulfidic springs. *FEMS Microbiol. Ecol.*, im Druck.
- S**
- Saffo, M.B.** 2001. Mutualistic Symbioses. In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London. <http://www.els.net/> [doi:doi:10.1038/npg.els.0003281]
- Saiki, R.K., S.J. Scharf, Faloona S.J., K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich und N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of β - globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis und H. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Salinovich, O. und R.C. Montelaro.** 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**:341-347.
- Sarikaya, M., C. Tamerler, A. K.J. Jen, K. Schulten und F. Baneyx.** 2003. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nature Materials* **2**:577-585.
- Saxton, W.O.** 1996. Distortion compensation, selective averaging, 3-D reconstruction, and transfer function correction in a highly programmable system. *J. Struct. Biol.* **116**:230-236.
- Schink, B.** 1992. Syntrophism among Prokaryotes, S. 276-299. In: *The Prokaryotes*, A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (Ed.). Springer-Verlag, New York, Berlin.
- Schink, B.** 2002. Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:257-261.
- Schleifer, K.-H.** 2004. Microbial diversity: facts, problems and prospects. *System. Appl. Microbiol.* **27**:3-9.
- Schleper, C., E.F. DeLong, C.M. Preston, R.A. Feldman, K.Y. Wu und R.V. Swanson.** 1998. Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J. Bacteriol.* **180**:5003-5009.
- Schouten, S., E.C. Hopmans, R.D. Pancost und J.S.S. Damsté.** 2000. Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: Evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:14421-14426.
- Schrimpf, G.** 2002. Gentechnische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Segrest, J.P. und R.D. Jackson.** 1972. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate., S. 54-63. In: *Methods in Enzymology*, V. Ginsburg (Ed.). Academic Press, London.
- Simankova, M.V., S.N. Parshina, T.P. Tourova, T. V. Kolganova, A.J. Zehnder und A.N. Nozhevnikova.** 2001. *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments. *System. Appl. Microbiol.* **24**:362-367.

- Sinninghe Damsté, J.S., S. Schouten, Hopmans, E.C., A.C.T. van Duin und J.A.J. Geenevasen.** 2002. Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *J. Lipid Res.* **43**:1641-1651.
- Skerker, J.M. und L. Shapiro.** 2000. Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J.* **19**:3223-3234.
- Sleytr, U.B. und P. Messner.** 1983. Crystalline surface layers on bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 311- 339.
- Sonnleitner, M.** 2004. Anpassung und Anwendung von Gradientensystemen zur Kultivierung kälteliebender Mikroorganismen. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.
- Soto, G.E. und S.J. Hultgren.** 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* **181**:1059-1071.
- Stahl, D.A. und R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, S. 205-248. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stackebrandt und M. Goodfellow (Ed.). John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Stal, L.J. und P. Caumette.** 1993. Preface. In: *Microbial Mats- Structure. Development and Environmental Significance*, L. J. Stal und P. Caumette (Ed.). Springer- Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo.
- Stellmach, B.** 1988. Bestimmungsmethoden Enzyme für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin. Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- Stetter, K.O., H. König und E. Stackebrandt.** 1983. *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulfur reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. *System. Appl. Microbiol.* **4**: 631-636.
- Stickler, D.** 1999. Biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:270-275.
- Stone, K., M. LoPresti, M. Crawford, R. DeAngelis und K. Williams.** 1989. Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptid isolation. In: *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing*, P. Matsudaira (Ed.). Academic Press Inc.
- Strathmann, M., J. Wingender und H.-C. Flemming.** 2002. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Met.* **50**:237-248.
- Strohl, W.R. und T.M. Schmidt.** 1984. Mixotrophy of the colorless, sulfide- oxidizing gliding bacteria *Beggiatoa* and *Thiothrix.*, S. 79-95. In: *Microbial chemoautotrophy*, W. R. Strohl und O. H. Tuovinen (Ed.). Ohio State University Press, Columbus, Ohio.
- Sutherland, I.W.** 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**:3-9.
- T**
- Thomas, N.A., S.L. Bardy und K.F. Jarrell.** 2001. The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 147- 174
- Thurnheer, T., R. Gmür und B. Guggenheim.** 2004. Multiplex FISH analysis of a six- species bacterial biofilm. *J. Microbiol. Met.* **56**: 37- 47
- Torsvik, V., L. Ovreas und T.F. Thingstad.** 2002. Prokaryotic diversity- magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* **296**:1064-1066.
- Tyson, G.W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E.E. Allen, R.J. Ram, P.M. Richardson, V.V. Solovyev, E.M. Rubin, D.S. Rokhsar und J.F. Banfield.** 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*.

U

- Ueda, T., Y. Suga und T. Matsuguchi.** 1995. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. *European Journal of Soil Science* **46**:415-421.
- Upreti, R.K., M. Kumar und V. Shankar.** 2003. Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications. *Proteomics* **3**:363-379.

V

- Valentine, D. L.** 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:271-282.
- Vaneechoutte, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys und K. Kersters.** 1992. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**:227-234.
- Venter, J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K.E. Nelson, W. Nelson, D.E. Fouts, S. Levy, A.H. Knap, M.W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y.-H. Rogers und H.O. Smith.** 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea. *Science* **304**:66-75.
- Vetriani, C., A.-L. Reysenbach und J. Doré.** 1998. Recovery and phylogenetic analysis of archaeal rRNA sequences from continental shelf sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**:83-88.
- von Wintzingerode, F., U.B. Göbel und E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:213-229.

W

- Wagner, M., R. Amann, P. Kämpfer, B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler, N. Springer und K. H. Schleifer.** 1994a. Identification and *in situ* detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* **17**:405-417.
- Wagner, M., B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler und R. Amann.** 1994b. *In situ* analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. *J. Microscopy* **176**: 181- 187.
- Wallhäuser, K.H. und H. Puchelt.** 1966. Sulfatreduzierende Bakterien in Schwefel- und Grubenwässern Deutschlands und Österreichs. *Contr. Miner. and Petrol.* **13**:12-30.
- Wallner, G., R. Amman und W. Beisker.** 1993. Optimizing Fluorescent *In Situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometrie* **14**:136-143.
- Ward, D. M., M. J. Ferris, S. C. Nold und M. M. Bateson.** 1998. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1353-1370.
- Warneke, M.** 1992. Die Flora und Vegetation des Naturschutzgebietes "Sippenauer Moor" im Landkreis Kelheim. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Botanik, Universität Regensburg.
- Warneke, M.** 1993. Die Flora und Vegetation des Naturschutzgebietes Sippenauer Moor im Landkreis Kelheim. *Hoppea, Denkschr. Regensb. Ges.* **54**:7-78.
- Watnick, P. und R. Kolter.** 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**:2675-2679.
- Webre, D.J., P.M. Wolanin und J.B. Stock.** 2003. Bacterial chemotaxis. *Curr. Biol.* **13**: R47-R49.
- Weis, R.M., T. Hirai, A. Chalah, M. Kessel, P.J. Peters und S. Subramaniam.** 2003. Electron microscopic analysis of membrane assemblies formed by the bacterial chemotaxis receptor Tsr. *J. Bacteriol.* **185**: 3636-3643.

- Whitman, W.B., D.C. Coleman und W.J. Wiebe.** 1998. Prokaryotes: the unseen majority. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**:6578-6583.
- Williams T.M. und R.F. Unz.** 1985. Filamentous sulfur bacteria of activated sludge: Characterization of *Thiothrix*, *Beggiatoa*, and Eikelboom Type 021 strains. Appl. Env. Microbiol. **49**: 887-898.
- Williams T.M., Unz R.F. und J.T. Doman.** 1987. Ultrastructure of *Thiothrix* ssp. and "Type 021N" bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **53**:1560-1570.
- Winogradsky, S.** 1887. Ueber Schwefelbakterien. Botanische Zeitung **45**:513-559.
- Winogradsky, S.** Heft I: Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien. 1888. Leipzig, Verlag von Arthur Felix. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bacterien.
- Woese, C.R. und G.E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5088-5090.

Y

- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura und K. Namba.** 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. Nature **424**:643-650.

Z

- Zhang, X.Q., P.L. Bishop und M.J. Kupferle.** 1998. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. Water Sci. Technol. **37**: 345-348.
- Zillig, W., A. Gierl, G. Schreiber, S. Wunderl, D. Janekovic, K.O. Stetter und H.P. Klenk.** 1983. The archaeobacterium *Thermofilum pendens* represents a novel genus of the thermophilic, anaerobic sulfur respiring *Thermoproteales*. System. Appl. Microbiol. **4**:79-87.

VIII. Anhang

Primer

<i>Primerbezeichnung</i>	<i>Bindestelle innerhalb Hami- Gen</i>	<i>Sequenz</i>
pili 1 f	+221	CAGCATCAAAACAGGCGGGTGC
pili 2 r	+761	G TTCCTCTGAATTTGTATACGG
pili 3 r	+386	TTAACTCTCCATCCGTCTTG
pili 4 r	+93	TGCACCCGCGCTACTTATATG
pili 5 f	+585	GGTTTGTTCAGGCGGAAGTGA
pili 6 f	+740	CCGTATACAAATTCAGAGGAA
pili 7 f	+964	ATGGCATATTTCCACGAAGGTAAG
pili 8 f	-75	GGTGAATTCCTGTAGCAA

Tabelle 30: Primer für die Sequenzierung des Hami- Gens mit Angabe der Bindestelle

<i>Primerbezeichnung</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>
khookrevlo	CCCCGAATTCGAAGCAAATGTAGTTAATGTTGCATTG
khookf	CCCCCATATGGGTTCAAATGAATAT

Tabelle 31: Primer mit Restriktionsschnittstellen für die Klonierung des Gens
(die Schnittstellen- Erkennungssequenzen für die Enzyme EcoRI bzw. NdeI sind markiert)

Gensequenzen

Im Folgenden wird die soweit identifizierte Sequenz des SM1- Hami- Gens gezeigt. Als Quelle der genomischen DNA dienten Polyethylenetzpopulationen aus Sippenauer Moor (sip con) und Islinger Mühlbach (isl con). Als Quelle für die RNA wurden Populationen aus dem Sippenauer Moor verwendet (RNA con). Unterschiede zwischen sip con und aub con sind hervorgehoben.

	5	15	25	35	45	55
sip con	ATGGGTTCAA	ATGAATATTT	TGTTAATGGC	TTGGACAAGA	CCTACATTGT	CTTGCCAAAA
isl con	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~AAA
RNA con	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	65	75	85	95	105	115
sip con	GGTGAAAAAT	TACATATAAG	TAGCGCGGGT	GCAACAGAAC	CGGCATTGTC	ACAGTTACAA
isl con	GGTGAAAAAT	TACATATAAG	CAGCGTGGGT	GCAACAGAAC	CGACATTGCC	AGAGTTACGG
RNA con	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	125	135	145	155	165	175
sip con	GGATATAAAT	TCAAATTACT	TAAAACAATT	CAGGCTTACG	GAAACGATGC	AGGAGTTATA
isl con	GGATATAAAT	TCAAATTACT	TAAAACAATT	CAGGCTTATG	GAAAAGATGT	GGGAGTTGTA
RNA con	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	185	195	205	215	225	235
sip con	ATAGAAATTG	AAAGACCAGA	TGGAACAAC	ATTCAGGCAA	CAGCATCAAA	ACAGGCAGGT
isl con	ATAGAAATTG	AAAGACCAGA	TGGAACAAC	GTTTCAGGCAA	CAGCATCAAA	ACAGGCAGGT
RNA con	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~AGCATCAAA	ACAGGCAGGT

	245	255	265	275	285	295
sip con	GCTTCTCTTG	GAACGGACGC	AAATGGTCAC	AAGATACAAA	TACAGGCATT	CCATGTTATA
isl con	GCTTCTCTTG	GAACGGACGC	AAATGGTCAC	AAGATACAAA	TACAGGCATT	CCAGGTTATA
RNA con	GCTTCTCTTG	GAACGGACGC	AAATGGTCAC	AAGATACAAA	TACAGGCATT	CCATGTTATA

	305	315	325	335	345	355
sip con	GGAAACAAAG	CAAGTATAAT	TGTTTATGAT	ATGAGTACAC	GGTACAAATT	AGAAAATAAT
isl con	GGAAACAAAG	CAAGTATAAT	TGCTTATGAT	ATGAGCACAC	AGTACAAATT	AGAAAATAAT
RNA con	GGAAACAAAG	CAAGTATAAT	TGTTTATGAT	ATGAGTACGC	GGTACAAATT	AGAAAATAAT

	365	375	385	395	405	415
sip con	GAAAAGCAAG	ACGGATGGAG	AGTTAAAATA	AACAATGCCA	AGTGTAAATA	TGTAGGTATA
isl con	AAAAAGCAAG	ACGGATGGAG	AGTTAAAATA	GACCATGACT	ATTGTAATAA	TGTAGGTATA
RNA con	GAAAAGCAAG	ACGGATGGAG	AGTTAAAATA	AACAATGCCA	AGTGTAAATA	TGTAGGTATA

	425	430	440	450	460	
sip con	GAGGATTAT~	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	~~~~~TTGGTT	CCAAATGCTG	CAAACAAATA	TTGTCTGACA
isl con	GAAGATTATG	GAACACCTAC	TAATCCGATT	GGAAATGCTG	CAAACAAATA	TTGTCTGACA
RNA con	GAGGATTAT~	~~~~~	~~~~~TTGGTT	CCAAATGCTG	CAAACAAATA	TTGTCTGACA

	470	480	490	500	510	520
sip con	AAGTTAACAT	TGACACAGGA	AGATGCTCAA	ACATTAAATG	TCGGAGATAC	TGTATATTTT
isl con	AAGTTAACAT	TGACACAGGA	AGATGCTCAA	ACATTAAATG	TCGGAGATAC	TGTATATTTT
RNA con	AAGTTAACCT	TGACACAGGA	AGATGCTCAA	ACATTAAATG	TCGGAGATAC	TGTATATTTT

	530	540	550	560	570	580
sip con	CCGACAAAAG	CAGTAAAGTT	TTCATTTAAG	GGCTTTAAAA	ATGAGGATTT	CGGAGATATG
isl con	CCGACAAAAG	CAGTAAAGTT	TTCATTTTAG	GGCTTTAAAA	ATGAGGATTT	CCGAGATATA
RNA con	CCGACAAAAG	CAGTAAAGTT	TTCATTTAAG	GGCTTTAAAA	ATGAGGATTT	CGGAGATATG

	590	600	610	620	630	640
sip con	GTTTGTTTCAG	GCGGAAGTGA	TAAAATAAAG	ATAGAGACAA	GTGATAATCG	TAAAGTAATG
isl con	GTTTGTTTCAC	GCGGAAGTGA	TAAAATAAAG	ATAGAGACAA	GTGATAATCG	TAAAGTAATA
RNA con	GTTTGTTTCAG	GCGGAAGTGA	TAAAATAAAG	ATAGAGACAA	GTGATAATCG	TAAAGTAATG

	650	660	670	680	690	700
sip con	TTGAGCTTTA	CTACAAGAGA	CGGAGAACGA	CTGAATAATG	TCAGATTGGA	TGAAGGTGGT
isl con	TTGAGCTTTA	CTACAAGAGA	CGGAGAACGA	CTGAATAATG	TCAGATTGGA	TGAAGGTGGT
RNA con	TTGAGCTTTA	CTACAAGAGA	CGGAGAACGA	CTGAATAATG	TCAGATTGGA	TGAAGGTGGT

	710	720	730	740	750	760
sip con	TATGAACTTG	ACGAGTTATT	CCTGATAGGA	AATACCGTAT	ACAAATTCAG	AGGAACAGAA
isl con	TATGAACTTG	ACGAGTTATT	CCTGATAGGA	AATACCGTAT	ACAAATTCAG	AGGAACAGAA
RNA con	TATGAACTTG	ACGAGTTATT	CCTGATAGGA	AATACCGTAT	ACAAATTC..

	770	780	790	800	810	820
sip con	GATATTAATA	ACGATGAAAA	TCATGTAAAA	TTGTTGCTGA	CTGATGTTAG	TAATGCAAAC
isl con	GATGTTAATA	ACGATGAAAA	TCATATAAAA	TTATTACTGA	CTGATGTTAG	TAATGCAAAC
RNA con

	830	840	850	860	870	880
sip con	GACTTTGAAG	CAACACTTAC	AAAATTAAGC	ACAAGTTTTG	CAGGATTTAA	TTTACTTAC
isl con	GACTTTGAAT	CAACACTTAC	AAAATTAAGC	ACAAGTTTTG	CAGGATTTAA	TTTACTTAC
RNA con

	890	900	910	920	930	940
sip con	TTTGACCATT	ATAGTGTAAG	TAAGGAAAAT	CAGTGCAGTC	CTCCATGTTT	TACATATAAT
isl con	TTTGACCATT	ATAGCGCGAG	TAAGGACAAT	CCGTGCAGTC	CTCCATGTTT	TACATATAAT
RNA con

	950	960	970	980	990	1000
sip con	GCGACAGTAT	TAGGAGTAAT	GGCATATTTT	CACGAAGGTA	AGTTATGGAT	GGTACTGGA
isl con	GCGACAGTAT	TAGGGGTAAT	GGCATATTTT	CACGAAGGTA	AGTTATGGAT	GGTACTGGA
RNA con

	1010	1020	1030	1040	1050	1060
sip con	AATGATAGTA	AAATTGGCTT	AAATAATATT	GCTTTAAAAA	ATATTCAGAA	TGATAACTGC
isl con	AATGATAGTA	AAATTGGCTT	AAATAATATT	GCTT.....
RNA con
			
	1070	1080	1090			
sip con	AATGCAACAT	TAACCTCCATT	TGCTTGA			
isl con			
RNA con			

Erläuterungen zum beigelegten Videomaterial (s. beigelegte DVD)

Auf dieser DVD sind kurze Filme zusammengefasst, die folgende strukturelle Verhältnisse verdeutlichen sollen:

- CLSM Perle:** Animation zu Abbildung 12.
Durch konfokale Laserscanning- Mikroskopie wurde die Nähe von *Thiothrix* und SM1 Euryarchaeon im Inneren einer Perle des Sippenauer Moors visualisiert.
Thiothrix ist durch spezifische Oligonukleotidsonden rot gefärbt, die SM1 Euryarchaea grün.
- CLSM Biofilm:** Animation zu Abbildungen 61- 63, Ausschnitt.
Der SM1 Biofilm aus dem Islinger Mühlbach wurde vor der Analyse durch FISH gefärbt: Bakterien färben rot, SM1 Euryarchaeen färben grün. Deutlich erkennbar ist die regelmäßige Anordnung der Archaea zueinander. Die Bakterien bilden vorwiegend kleine Mikrokolonien.
- Hamus:** Animation zu Abbildung 34.
Scan über einen Hamus in voller Länge (transmissions-
elektronenmikroskopische Daten).
- SM1 Zellwand:** Animation zu Abbildungen 26 und 27.
Gezeigt wird ein Scan durch eine SM1 Zelle, Tomographie.
Gekennzeichnet ist die dritte Schicht (Chemorezeptorencluster) unterhalb der Cytoplasmamembran (Pfeile).
- Hamus, Tomographie:** Animation zu Abbildung 38.
Darstellung der Rohdaten und dreidimensionale Verrechnung der tomographischen Daten.

Viele haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

... **Herrn Prof. Dr. Robert Huber**, für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten. Vielen Dank für die hilfreichen Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen während der gesamten wunderbaren Zusammenarbeit. Durch das Vertrauen und die Unterstützung bei der Verwirklichung eigener Ideen hat er meine Arbeit voran gebracht. Vielen Dank für die gemeinsame Zeit für Veröffentlichungen und Anträge, die Ausdauer und Ermutigung bei Niederschlägen und die Freude bei Erfolgen. Die gemeinsame Begeisterung für Archaeen und Angelhaken und sein offenes Ohr in allen Situationen waren mir stets Motivation und Ansporn.

... **den Herren Prof. Dr. K.O. Stetter und Prof. Dr. M. Thomm**, für die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl, für die Anregungen, Diskussionen und Gespräche.

... **Herrn Prof. Dr. Andreas Bresinsky**, für sein Interesse an unserer Arbeit und den unermüdlichen Einsatz für den Erhalt des Sippenauer Moors.

... **Ariane Briegel** vom MPI für Biochemie, Martinsried für die Erstellung der großartigen Cryo- elektronen-tomographischen Daten und deren Verarbeitung. Für die Erfahrung, dass auch "Blind"- Tomographieren zum Erfolg führen kann (2 µm- passt!) und für die gemeinsame Begeisterung für neue Bilder und Filmchen. Vielen Dank für die Zeit in den Kellern von Martinsried- mit niemanden hätte ich lieber die heißen Sommerwochenenden dort verbracht! Vielen Dank auch an **Dr. Harald Engelhardt** (ebenfalls MPI), für die professionelle und produktive Zusammenarbeit und für das lächelnde Ertragen der Sektdusche.

... **dem Elektronenmikroskopie- Team** des Lehrstuhls, für die Möglichkeit selbständig am Elektronenmikroskop zu arbeiten, für die Gefrierätzungen, Bedampfungen und für die Einweisung. Vielen Dank an **Reinhard Rachel** für die Unterstützung in der Datenanalyse während der letzten Monate. Großen Dank an **Peter Hummel**, der bei kleinen Problemen ständig für mich da war und mich mit Kohlefolie versorgt hat. Vielen Dank auch an **Kerstin Schuster** für die S- Layer- Präparation und die netten Gespräche.

... **Jan Malinski** für die Einweisung und die Datenaufzeichnung am CLSM, Prof. Dr. G. **Wanner** für die elektronenmikroskopische Bestätigung unserer Ultrastruktur- Ergebnisse.

... **Jörg Raabe** und **Werner Cebulla** für die Durchführung der EDAX- Analysen und fachübergreifende Diskussionen.

... **Dr. Sonja Koning** für die nette Einführung in die phantastische Welt der Expression.

... **den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Robert Huber** für das wunderbare Arbeitsklima und die Unterstützung. **Christian Rudolph** für die geniale Einführung in das Thema, die interessanten und produktiven Diskussionen um Wissenschaft und darüber hinaus und die professionelle Zusammenarbeit. **Marietta Bock** für das geduldige, (meist) wortlose Trinken meines viel zu starken Kaffees, die Gespräche und die Hilfe in allen Labor- und Lebenslagen. **Marcus Koch** für die gemeinsamen Moor- Fahrten, für wissenschaftliche und Flieger- Gespräche und seine bodenlose Süßigkeitenschublade. **André Antunes** für sein fröhliches, portugiesisches Temperament, die gemeinsame Freude an Erdbeerlimes und angeregte wissenschaftliche Diskussionen. **Ruth Henneberger** für die deutsch- australische Freundschaft und die interkontinentalen Diskussionen über die Wissenschaft, über Männer und vieles mehr. **Tom Amann** für die wunderbare, unkomplizierte Zusammenarbeit und die gemeinsame Fahrt nach Bielefeld. **Maria Sonleitner** für die längst überfällige weibliche Unterstützung in 1134 und für ihr "sonniges" Gemüt. **Steffen Krauss** für die salzigen Gespräche und den nachfolgenden osmotischen Ausgleich mit Bier und Caipirinha. **Michi Hannig**, dem bayerischen Muschelschubser, für die Unterstützung im Labor und darüber hinaus.

... **allen Korrekturlesern dieser Arbeit** für die Ausdauer beim Ausmerzen kleiner und großer Fehler. Und für den Versuch, einem Naturwissenschaftler "guthes deutsch" oder zumindest "german english" beizubringen.

... **allen Mitgliedern des Lehrstuhls** für ihre (wissenschaftliche) Unterstützung und die gemeinsamen (Margaritas-) Abende. Besonders **Elisabeth Nagelfeld** für das Bewahren eines kühlen Kopfes in heißen Situationen und **Gabi Gmeinwieser** für Hilfe hier und da.

... **meinen Freunden** für ihr offenes Ohr, ihre Hilfe und Unterstützung. Und natürlich für die Ablenkungen...

... **meinen Eltern Gertrud** und **Johann Moissl** für die finanzielle, geistige, liebevolle und aufmunternde Unterstützung. Meinen Geschwistern **Manuela** und **Martin** für ihr Da- Sein, für (kurze) Emails und für aufschlussreiche gemeinsame Gespräche bei einem, zwei oder mehr Cocktails.

... **meinem Markus** für Unterstützung, Interesse, Hilfe, Aufmunterung, Geduld, Freundschaft... - einfach für alles. LD!

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

Regensburg, Juli 2004