



Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

**Strukturuntersuchungen an Prokaryonten mit
Kryo-Elektronentomographie**

Ariane Briegel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Wolfgang Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf (schriftliche Beurteilung)
Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 22.12.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 13.04.2005 angenommen.

„We are all conscious today that we are drowning in a sea of data
and starving for knowledge“
(Sydney Brenner, Nobel price-lecture 2002)

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNGVI

1. EINLEITUNG..... 1

2. GRUNDLAGEN 4

2.1. DIE ELEKTRONENMIKROSKOPIE 4

2.1.1. DAS ELEKTRONENMIKROSKOP 4

2.1.2. DIE BILDENTSTEHUNG 5

2.1.3. KRYOPRÄPARATION 7

2.1.4. TOMOGRAPHIE 8

2.2. DIE PROKARYONTEN 10

2.2.1. DIE BAKTERIEN 13

2.2.2. DIE ARCHAEEN 13

3. MATERIAL UND METHODEN..... 15

3.1. MEDIEN FÜR DIE ZELLZUCHT 15

3.1.1. MEDIUM FÜR THERMOTOGA MARITIMA 15

3.1.2. DAS ANAEROBENZELT 17

3.1.3. DIE GASSTATION 17

3.1.4. MEDIEN FÜR ESCHERICHIA COLI (B R/K) 18

3.2. UNTERSUCHTE ORGANISMEN..... 19

3.3. DIE PROBENPRÄPARATION..... 19

3.3.1. DIE VORBEREITUNG DER OBJEKTTRÄGER (‘GRIDS’) 19

3.3.2. DIE VORBEREITUNG DER PROBEN 20

3.3.3. DIE KRYO-PRÄPARATION 20

3.3.4. MILCHSÄUREBEHANDLUNG DER ÄUßEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI..... 21

3.3.5. FLUORESCENZFÄRBUNG DER CHEMOREZEPTOREN VON ESCHERICHIA COLI..... 21

3.3.6. IMMUNOGOLD-MARKIERUNG DER CHEMOREZEPTOREN VON ESCHERICHIA COLI..... 22

3.3.7. POLYMYXIN-BEHANDLUNG DER THERMOTOGA MARITIMA ZELLEN 22

3.4. DAS MIKROSKOP..... 23

3.5. DIE REKONSTRUKTION DER TOMOGRAMME 23

3.6. BILDAUSWERTUNG DURCH DREIDIMENSIONALE KORRELATIONSMITTELUNG 23

ERGEBNISSE 25

4. CHEMOTAXIS: DIE CHEMOREZEPTORCLUSTER DER PROKARYONTEN..... 25

4.1. GRUNDLAGEN DER CHEMOTAXIS..... 25

4.1.1. DIE MCPS 26

4.1.2. DIE CLUSTERBILDUNG DER CHEMOREZEPTOREN AN DEN ZELLPOLEN 29

4.2. ERGEBNISSE	34
4.2.1. DIE CHEMOREZEPTORCLUSTER VON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	35
4.2.2. KRYO-ELEKTRONENTOMOGRAPHIE DER CHEMOREZEPTOREN VON <i>THERMOTOGA MARITIMA</i>	44
4.3. DISKUSSION ZUR KRYO-ELEKTRONENTOMOGRAPHIE DER CHEMOREZEPTOR-CLUSTER	49
4.3.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	49
4.3.2. <i>THERMOTOGA MARITIMA</i>	51
<u>5. DER FLAGELLENMOTOR VON <i>THERMOTOGA MARITIMA</i></u>	<u>53</u>
5.1. DAS FILAMENT	53
5.2. DER HAKEN	54
5.3. DER FLAGELLENMOTOR	55
5.4. DIE ASSEMBLIERUNG	56
5.5. ERGEBNISSE	58
5.5.1. DIE RINGE DES FLAGELLENMOTORS	61
5.5.2. VISUALISIERUNG DES FLAGELLENMOTORS	63
5.5.3. DER ZYTOPLASMATISCHE TUNNEL	65
5.6. DISKUSSION DES FLAGELLENMOTORS VON <i>THERMOTOGA MARITIMA</i>	68
<u>6. DIE TERMINAL PLUGS VON <i>METHANOSPIRILLUM HUNGATEI</i></u>	<u>73</u>
6.1. <i>METHANOSPIRILLUM HUNGATEI</i>	73
6.2. ERGEBNISSE	73
6.2.1. DIE DREIDIMENSIONALE KORRELATIONSMITTELUNG DER TERMINAL PLUGS	75
6.3. DISKUSSION ZUR STRUKTUR DER ZELHÜLLE	77
<u>7. DIE HAMI DES KALTWASSERARCHAEONS SM1</u>	<u>83</u>
7.1. DAS ARCHAEON SM1	83
7.2. DIE ZELLANHÄNGE VON SM1	83
7.3. ELEKTRONENTOMOGRAPHIE DER HAMI	88
7.4. DISKUSSION ZUR HAMUS-STRUKTUR	90
<u>8. PARASITISMUS BEI DEN ARCHAEA: <i>NANOARCHAEUM EQUITANS</i> UND <i>IGNICOCCUS SP. KIN4/1</i></u>	<u>92</u>
8.1. <i>IGNICOCCUS SP. KIN4/1</i> UND <i>NANOARCHAEUM EQUITANS</i>	92
8.2. ELEKTRONENTOMOGRAPHIE VON <i>IGNICOCCUS SP. KIN4/1</i> UND <i>NANOARCHAEUM EQUITANS</i>	95
8.2.1. <i>NANOARCHAEUM EQUITANS</i>	95
8.2.2. <i>IGNICOCCUS SP. KIN4/1</i>	96
8.2.3. TOMOGRAPHIE DER VERBINDUNGSSTRUKTUREN ZWISCHEN <i>NANOARCHAEUM EQUITANS</i> UND <i>IGNICOCCUS SP. KIN4/1</i>	97
8.3. DISKUSSION DER VERBINDUNGSSTRUKTUREN VON <i>IGNICOCCUS SP. KIN4/1 S</i> UND <i>NANOARCHAEUM EQUITANS</i>	100

9. DISKUSSION UND AUSBLICK.....	102
10. REFERENZEN.....	106
11. DANKSAGUNG	114

Zusammenfassung

Mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie können dünne biologische Zellen mit einer Auflösung zwischen 4 und 6nm dreidimensional abgebildet werden. Die Anwendung von Kryo-Techniken erlaubt zudem die Abbildung von quasi nativen Zellen, da die invasiven Präparationsschritte wie die Dehydratisierung, Kontrastierung und Einbettung der Präparate vollständig umgangen werden. Stattdessen werden die Zellen im Zellmedium vitrifiziert, was die Bildung von Präparationsartefakten drastisch reduziert und den zellulären Kontext erhält.

Es wurde ein Spektrum biologischer Strukturen aus Prokaryonten untersucht, um das Potential dieser Technik für die biologische Strukturforschung auszuloten. Dabei wurden Zellanhänge, die Hami des Archaeons SM1, Bestandteile der Zellwand, wie die deckelartigen *terminal plugs* des Archaeons *Methanospirillum hungatei*, membrangebundene Strukturen, wie der Flagellenapparat von *Thermotoga maritima* und die Chemorezeptoren der Prokaryonten untersucht. Auch Interaktionen zwischen unterschiedlichen Organismen wurden am Beispiel des parasitären Verhältnisses der Archaeen *Ignicoccus sp* KIN4/1 und *Nanoarchaeum equitans* bearbeitet.

Besonders durch die Untersuchung dieser unterschiedlichen prokaryontischen Strukturen werden die Vorteile dieser Methode deutlich. Es konnten Erkenntnisse über die dreidimensionale Information der untersuchten Strukturen gewonnen werden, die bisher durch keine andere präparative und abbildende Technik zugänglich war. Damit wurde die Schichtung und der Aufbau der *terminal plugs* von *Methanospirillum hungatei* ebenso aufgeklärt wie die Anzahl und Anordnung der Stacheln und der Ankerstruktur in den Hami.

Durch die Erhaltung der strukturellen Integrität aufgrund der nichtinvasiven Kryo-Präparationstechnik konnten fragile Strukturen untersucht werden, die anderen präparativen Techniken nicht standhalten. Im Laufe dieser Arbeit wurde erstmals die Existenz und der Verlauf eines zytoplasmatischen Tunnels von *Thermotoga maritima* nachgewiesen. Weiterhin gelang erstmals die dreidimensionale Darstellung der makromolekularen, membrangebundenen Komplexe der Chemorezeptor-Cluster an

Wildtyp-Zellen. Hier konnte die Anordnung der Rezeptoren an den Zellpolen der *Thermotoga*-Zellen in einem hexagonalen Gitter aufgeklärt werden. Auch die Untersuchung des Flagellenmotors von *Thermotoga maritima* lieferte neue strukturelle Informationen. Es wurde ein für diesen Organismus noch nicht bekanntes, zusätzliches Extra (E-) Rings entdeckt. Die parasitische Interaktion der beiden Archaeen-Arten *Ignicoccus* sp KIN4/1 und *Nanoarchaeum equitans* über fädige Verbindungsstrukturen konnten ebenfalls erstmals eindeutig nachgewiesen werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird deutlich, daß mit dieser Methode wichtige Beiträge zum Verständnis des Aufbaus und der Funktion zellulärer Systeme möglich werden. Keine andere Technik erlaubt zur Zeit die Erforschung quasi intakter, dreidimensionaler Systeme in diesem Auflösungsbereich. Durch die Weiterentwicklung der Technik der Kryo-Elektronentomographie wird die Auflösungsgrenze der Datensätze in naher Zukunft noch sinken. Damit werden weitere strukturelle Aussagen möglich sein, die bis jetzt noch nicht geklärt werden konnten.

1. Einleitung

Mit der ersten Abbildung einer Zelle im Elektronenmikroskop (1945 von K. R. Porter, A. Claude und E. F. Fullam) wurde ein wichtiger Grundstein für die Entstehung der modernen Zellbiologie gelegt. Zum ersten Mal gelang damit Biologen der tiefere Blick in die Zelle, bei dem eine Fülle von Strukturen sichtbar wurden, die im Lichtmikroskop nicht erkennbar waren. Zusammen mit den Erkenntnissen der Genetik und der Biochemie prägte die Elektronenmikroskopie entscheidend unser heutiges Bild vom Aufbau und der Funktion biologischer Zellen bei Eukaryonten und Prokaryonten.

Es mussten aufwändige Verfahren entwickelt werden, um die strahlenempfindlichen und kontrastarmen biologischen Objekte im Elektronenmikroskop untersuchen zu können. Im klassischen Präparationsverlauf werden Zellen fixiert, entwässert in polymerisierbares Material eingebettet, mit Schwermetallsalzen wie Osmiumtetroxyd oder Uranylacetat kontrastiert und als dünne Schnitte im Elektronenmikroskop abgebildet. So war die Untersuchung von Zellorganellen und die Detektion von Strukturen bis zur Größe von Ribosomen möglich.

Doch die Nachteile der chemischen Fixierung und Einbettung des Materials sind offensichtlich. Jeder dieser Präparationsschritte verändert oder zerstört die molekularen Strukturen der Präparate und limitiert die Interpretation kleinerer Zellstrukturen.

Ein erster Durchbruch zur Abbildung nativer Strukturen gelang Taylor und Glaeser (Taylor and Glaeser, 1974; Taylor and Glaeser, 1976) mit in Eis eingebetteten, unkontrastierten Katalasekristallen.

Fast ein Jahrzehnt später wurden die optimalen Bedingungen für den Strukturerehalt biologischer Proben entwickelt. Durch extrem schnelles Einfrieren dünner Flüssigkeitsschichten in flüssigem Ethan gelang es, die biologischen Strukturen in einem weitgehend nativen Zustand zu erhalten (Dubochet et al., 1988; Lepault et al., 1982).

Die Einbeziehung von Energiefiltern, leistungsfähiger Kameras, kohärenten Strahlquellen und Beschleunigungsspannungen von 300 keV in speziell ausgerüsteten Elektronenmikroskopen ermöglichte es letztlich, vitrifizierte, native Objekte bis zu einer Dicke von 0,5 bis 1 μm so abzubilden, dass sie für die weitere Bildanalyse geeignet waren.

Mit der Einführung der Automatisierung der Bildaufnahme, der Fokussierung und der Alignierbarkeit der Projektionen einer Kippserie waren endgültig die Voraussetzungen geschaffen, intakte biologische Objekte wie etwa geeignet große Prokaryonten so abzubilden, dass ihre 3D-Struktur rekonstruiert werden konnte (Dierksen and al, 1992; Dierksen and al, 1993; Koster et al., 1997). Das Verfahren der automatisierten Kryo-Elektronentomographie bietet somit die Möglichkeit, den dreidimensionalen Aufbau strahlenempfindlicher Zellen oder Zellausschnitten und die Struktur von biologischen Objekten in ihrer natürlichen Umgebung ohne präparative Eingriffe zu rekonstruieren. Die dabei erreichbare Auflösung liegt in der Größenordnung von wenigen Nanometern und damit in einem Bereich, in dem makromolekulare Komplexe, Filamente und die Substruktur größerer Zellbestandteile auflösbar werden. Die Idee der 3D-Elektronentomographie ist nicht neu, schon Ende der sechziger Jahre wurden die Grundlagen dafür beschrieben (DeRosier and Klug, 1968; Hart, 1968; Hoppe et al., 1968). Das Prinzip der Tomographie besteht darin, zweidimensionale Projektionen aus unterschiedlichen Blickwinkeln aufzunehmen und daraus anschließend das dreidimensionale Volumen im Computer zu rekonstruieren.

Da die Bildentstehung bei der Transmissionselektronenmikroskopie aufgrund der Durchstrahlung der Proben zustande kommt, sind die Auflösung, die Qualität und die Auswertbarkeit der Projektionen auch abhängig von der Dicke der zu untersuchenden Objekte. Bei biologischen Präparaten können Datensätze bis zu einer Objekt-Dicke von ca. 1 μm aufgenommen werden, idealerweise liegt die Dicke bei unter 500 nm.

Die Kryo-Elektronentomographie wurde bereits erfolgreich an biologischen Systemen durchgeführt. An den eukaryontischen Zellen der Gattung *Dictyostelium* konnte die dreidimensionale Struktur des Aktin-Zytoskeletts, die Anordnung der Filamente zueinander und ihre Anheftungsstellen an der Membran aufgeklärt werden (Medalia et al., 2002).

Zellen mit einem Durchmesser von 0,2 bis ca. 1 μm kommen vor allem bei Bakterien und Archaeen vor. Sie können direkt im Mikroskop untersucht werden, ohne dass aufwändige Kryoschnidetechniken angewendet werden müssen. Damit stellen sie ideale Untersuchungsobjekte für die Kryo-Elektronentomographie dar.

Um das Potential der Elektronentomographie für die Strukturanalyse an Prokaryonten auszuloten, wurden für diese Arbeit unterschiedliche Fragestellungen bearbeitet. Insbesondere sollte das Chemotaxis-System der Prokaryonten, der Flagellenmotor und komplexe Strukturen der Zellwand des Archaeums *Methanospirillum hungatei* untersucht werden. Zudem sollten mit Hilfe der Elektronentomographie der Aufbau ungewöhnlicher Zellanhänge von neu isolierten Archaeen aufgeklärt und die stabile Zell-Zell-Interaktion von Prokaryonten untereinander untersucht werden. Die untersuchten Systeme werden jeweils in einführenden Kapiteln vor der Beschreibung der Ergebnisse vorgestellt.

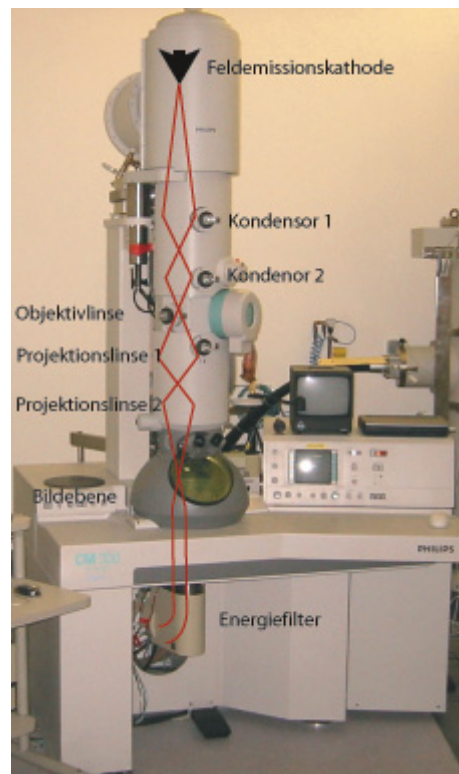
2. Grundlagen

2.1. Die Elektronenmikroskopie

2.1.1. Das Elektronenmikroskop

Das Elektronenmikroskop lässt sich im Aufbau mit einem Umkehr-Lichtmikroskop vergleichen. Als Strahlquelle dient im Elektronenmikroskop eine Kathode. Hier werden Elektronen emittiert und durch das Anlegen einer Hochspannung von 100-400 kV beschleunigt. Entweder werden hierfür thermische Kathoden, wie ein gebogener Wolframdraht, eine LaB6-Kristall, oder aber eine Feldemissionskathode verwendet. Die beschleunigten Elektronen werden mit Hilfe eines elektromagnetischen Linsensystems durch die evakuierte Mikroskopsäule gelenkt. Typischerweise wird der Elektronenstrahl durch zwei aufeinander folgende Kondensoren auf die Objektebene fokussiert. Hier durchdringt er die Probe und wird durch die Objektivlinse und die darauf folgenden Projektivlinsen aufgeweitet. Anschliessend passieren die Elektronen den Energiefilter und treffen auf die CCD-Kamera.

Abbildung 1: Strahlengang am CM300



2.1.2. Die Bildentstehung

Die Bildentstehung am Mikroskop beruht auf der Interaktion des Elektronenstrahls mit der zu untersuchenden Probe. Hierbei werden prinzipiell zwei Arten der Wechselwirkung unterschieden: Die elastische und die inelastische Streuung der Elektronen.

Bei der elastischen Streuung werden die Elektronen des Strahls vom Coulombpotential der in der Probe enthaltenden Atomkerne abgelenkt. Da ein Atomkern durch die im Vergleich zu den Elektronen wesentlich höhere Masse bei einer Streuung seine Position praktisch nicht verändert, überträgt das Elektron bei diesem Streuvorgang keine nennenswerte Energie. Es wird zwar in seiner Bahn abgelenkt, verliert dabei aber nicht an Geschwindigkeit. Die Stärke der Ablenkung ist hierbei sowohl von der Kernladungszahl des Atomkerns als auch von der Geschwindigkeit des Elektrons abhängig. Je niedriger die Geschwindigkeit und je höher die Kernladungszahl sind, desto größer fällt die Ablenkung des Elektrons aus.

Der Streuwinkel beeinflusst direkt die Auflösung des entstehenden Bildes. Sehr stark gestreute Elektronen werden von der Objektivblende abgefangen und tragen nicht direkt zur Abbildung des Objektes bei, wirken aber kontrastverstärkend. Durch den Brechungsindex von Materie wird eine Phasenverschiebung des Elektronenstrahls bewirkt. Dabei wird der Strahl gegenüber dem Nullstrahl verschoben. Wird der gebeugte Strahl um etwa $\pi/2$ verschoben, interferieren die Wellen des gebeugten und des ungebeugten Strahls mit einer wahrnehmbaren Amplitudenmodulation. Dieses Phänomen wird Phasenkontrast genannt und ist für die Bildentstehung verantwortlich.

Der Phasenkontrast im Elektronenmikroskop wird durch die sphärische Abberation der Objektivlinse und durch die Lage der Fokusebene beeinflusst. Im idealen Fall beträgt die Phasenverschiebung $\pi/2$. Dies ist jedoch nicht über den gesamten Beugungswinkel möglich — es entsteht eine Kontrastübertragungsfunktion. Sie beschreibt die Kontrastverhältnisse eines abgebildeten Objekts abhängig von dem eingestellten Defokus und dem Beugungswinkel des Elektronenstrahls. Sie kann beide Vorzeichen enthalten oder auch null betragen.

Mathematisch ist diese Funktion der Sinus der Phasenschiebung $\sin \gamma(\theta)$.

Näherungsweise läßt sich die Phasenschiebung wie folgt ausdrücken:

$$\gamma(\theta) = \frac{\pi}{2}(C_s \lambda^3 \theta^4 - 2\lambda \Delta z \theta^2)$$

θ = Streuwinkel (in rad)

λ = Wellenlänge der Elektronen

Δz = Fokus

C_s = Gerätekonstante

Eine weitere Art der Wechselwirkung des Strahls mit der Probe wird als inelastische Streuung bezeichnet. Hierbei interagieren die Strahlelektronen mit den Schalelektronen der Atome der Probe. Beim Zusammentreffen übertragen die eintreffenden Elektronen Energie, sie werden dabei abgebremst, abgelenkt und vergrößern ihre Wellenlänge. Diese chromatischen Elektronen haben für die Bildentstehung unerwünschte Folgen, da sie den Kontrast verschlechtern und Objektdetails ‚verwischen.‘ Dieser unerwünschte Effekt verstärkt sich mit zunehmender Dicke des Objektes.

Die Abbildung unkontrastierter, dicker biologischer Proben wie in Eis eingefrorene ganze Zellen wird durch die inelastische Streuung stark beeinträchtigt. Durch den Einsatz eines Energiefilters können diese gestreuten Elektronen herausgefiltert und die Qualität der entstehenden Bilder deutlich verbessert werden. Dieses Prinzip wird als ‚zero-loss imaging‘ bezeichnet.

Werden im Energiefilter jene Elektronen analysiert, die Energie verloren haben, so lassen sich Rückschlüsse auf die Art der Atome im Objekt ziehen. Die Elektronen-Energie-Verlust-Spektroskopie (EELS= electron energy loss spectroscopy) wird vor allem in den Materialwissenschaften verwendet.

2.1.3. Kryopräparation

Um biologische Objekte in einem quasi-nativen Zustand im Mikroskop betrachten zu können, müssen sie vitrifiziert werden (Dubochet et al., 1982). Diese Methode verhindert zum einen das Verdampfen des Wassers im Hochvakuum des Mikroskops und erhält zum anderen die Ultrastruktur der Proben.

Durch extrem rasches Einfrieren wird die Kristallisation des Wassers verhindert und es entsteht ein amorpher Eisfilm. Ist die Abkühlrate nicht ausreichend, bildet sich ein hexagonales Eisgitter aus, was eine Zerstörung der Ultrastruktur der Probe zur Folge haben kann.

Bei dünnen Proben mit einer Dicke von $< 1 \mu\text{m}$ ist dabei eine Abkühlrate von 10^6 K/s erforderlich. Dies wird durch Schockgefrieren in flüssigem Ethan erreicht. Dabei wird ein Tropfen der Probe auf ein Trägernetzchen (Grid) aufgebracht und mit einem Filterpapier solange überschüssige Flüssigkeit abgesaugt, bis ein gleichmäßig dünner Film entsteht („Blotten“). Mit einer guillotineartigen Einschussapparatur wird das Grid in flüssiges Ethan eingeschossen, das in flüssigem Stickstoff gekühlt wird, um die hohe Abkühlrate erreichen zu können. Stickstoff selber eignet sich nicht als Abkühlmedium für die Vitrifizierung, da die Wärmeleitfähigkeit durch das Stickstoffgas reduziert wird (Leidenfrost-Phänomen).

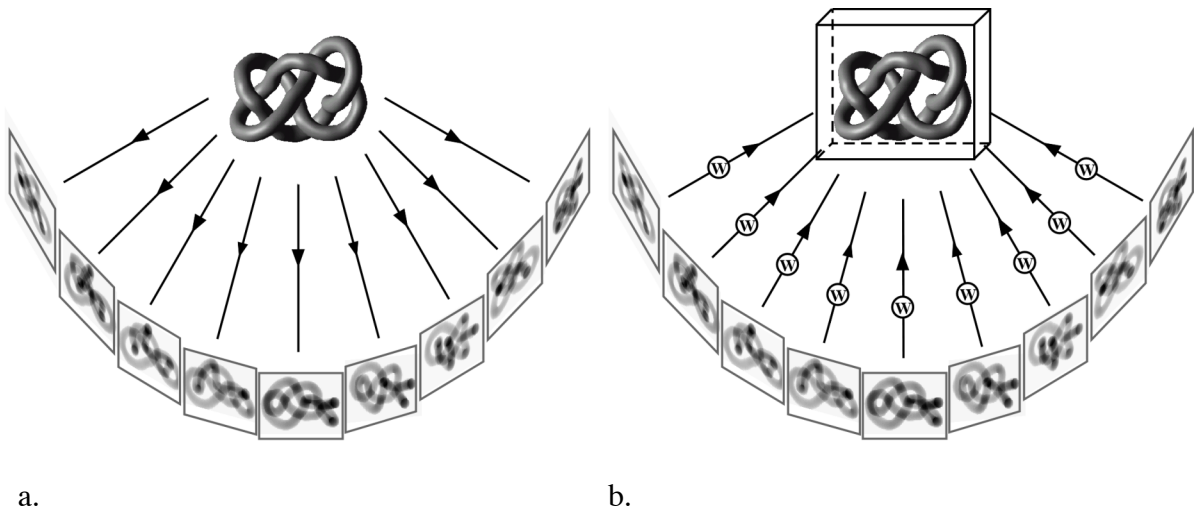
Wichtig ist bei dieser Methode, dass nach dem Blotten rasch eingeschossen wird, da das Wasser aus dem Flüssigkeitsfilm verdampft und damit die Salzkonzentration des Mediums schnell zunimmt. Dies kann unerwünschte osmotische Effekte im Präparat hervorrufen. Bei sehr empfindlichen Proben muss deshalb in einer Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit gearbeitet werden, um starke Schwankungen in der Salzkonzentration zu vermeiden.

2.1.4. Tomographie

Um die dreidimensionale Struktur eines Objektes mit Hilfe des Elektronenmikroskops zu untersuchen, müssen zunächst 2D-Projektionen des Präparats mit unterschiedlichem Kippwinkeln senkrecht zum einfallenden Elektronenstrahl aufgenommen werden (2a). Anschließend kann über eine gewichtete Rückprojektion das 3D-Volumen rekonstruiert werden (2b).

Abbildung 2 (Plitzko et al., 2002): Prinzip der Tomographie

- a. Es werde 2D-Projektionen eines Objekts aus verschiedenen Kippwinkeln aufgenommen
 b. Durch eine gewichtete Rückprojektion der 2D-Projektionen kann die dreidimensionale Struktur des Objektes Rekonstruiert werden.



Für die Rückprojektion muss zunächst ein einheitliches Koordinatensystem definiert werden. Um die Alignierung der Projektionen zu erleichtern, wird das Grid vor dem Auftragen der eigentlichen Probenlösung zunächst mit in Puffer gelösten kolloidalen Nano-Gold benetzt. Nach dem Verdampfen des Puffers sind die Goldpartikel gleichmäßig auf dem Trägernetzchen verteilt und können nach der Aufnahme der Daten als Alignierungsmarker verwendet werden.

Ist das Koordinatensystem festgelegt, werden die Bilder Fourier-transformiert und frequenzabhängig gewichtet. Die Gewichtung ist notwendig, da sich bei der Rücktransformation alle Bilder in der Mitte des Volumens überschneiden und sich damit von außen nach innen eine zunehmende Informationsaddition ergibt, die durch die

Gewichtung der Bilder korrigiert wird. Anschließend werden die Daten rücktransformiert und superpositioniert, so dass man einen dreidimensionalen Datensatz erhält. Die Auflösung eines Volumens wird durch die Anzahl der über den ganzen Winkelbereich verteilten Einzelaufnahmen bestimmt und kann für Einachsenkippen für sphärische Partikel und einem Winkelbereich von 360° wie folgt beschrieben werden (Crowther et al., 1970):

$$d = \frac{\pi D}{N}$$

d = Auflösung

D = Dicke des Objekts

N = Anzahl der Projektionen

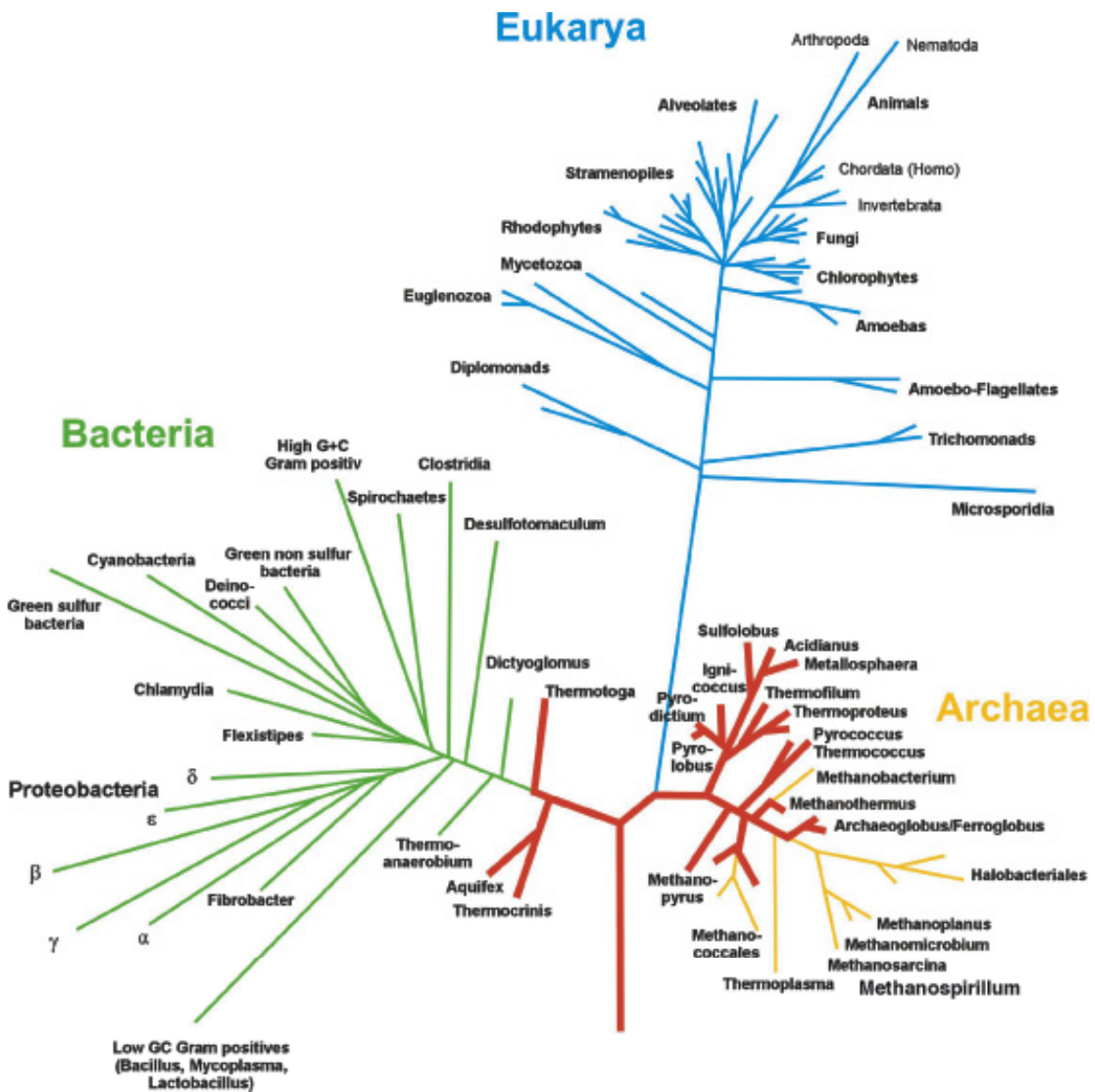
Die Auflösung im Volumen ist allerdings nicht in jeder Raumrichtung gleich. Der volle Winkelbereich von -90° bis +90° kann nicht vollständig genutzt werden, da ab einem Kippwinkel von etwa ±70° das Objekt durch den Probenhalter selber verdeckt wird. Im Fourier-Raum äußern sich die fehlenden Projektionen im Volumen als Doppelkeil ohne Bildinformationen, der als ‚missing wedge‘ bezeichnet wird. Im Realraum bewirkt die fehlende Information eine Elongation und eine geringere Auflösung des Objektes in Z-Richtung.

Da es sich bei biologischen Objekten um extrem strahlenempfindliche Präparate handelt, ist die Auflösung durch die Anzahl der Einzelprojektionen limitiert und dadurch die Auflösung eingeschränkt. Zudem kann die erlaubte Gesamtdosis nicht ausschließlich zur Bildaufnahme verwendet werden. Vor jeder Aufnahme muss erneut fokussiert und das Objekt in den Bildmittelpunkt geschoben werden, da durch die mechanische Kippung des Goniometers eine nanometergenaue Einstellung nicht möglich ist. Um hierbei nur die geringstmögliche Dosis zu verwenden, wurde die Tomographie weitgehend automatisiert. Dadurch kann die erlaubte Gesamtdosis optimal genutzt werden und eine maximale Anzahl an Projektionen aufgenommen werden. Dennoch wird die Auflösung durch die Niederdosisbedingungen und das daraus folgende schlechte Signal-zu-Rausch Verhältnis eingeschränkt.

2.2. Die Prokaryonten

Der Stammbaum des Lebens gliedert sich in drei Domänen: die Eukaryonten, die Bakterien und die Archaeen. Unter dem Begriff der Prokaryonten werden die beiden Domänen der Bakterien und der Archaeen zusammengefasst.

Abbildung 3 Tree of Life (von Harald Huber, Universität Regensburg)



Ein gemeinsames Merkmal dieser beiden Gruppen ist die Abwesenheit eines membranbegrenzten ‚echten‘ Zellkerns. Die DNA liegt als ringförmiges Chromosom im Zytoplasma. Teilweise sind mehrere Kopien der DNA vorhanden, wie zum Beispiel bei *Methanococcus janaschii* mit deutlich über 10 Kopien (Maladin et al., 1999). Zusätzlich können weitere, kleinere ringförmige DNA-Moleküle vorliegen. Diese Plasmide tragen jedoch meist keine für die Vermehrung wichtigen Informationen (Ausnahmen, zum Beispiel *Halobacterium* (Ng et al., 2000)). Die Zellen der Prokaryonten enthalten keine Organellen wie zum Beispiel Mitochondrien, den Golgi-Apparat oder ein Endoplasmatisches Retikulum. Sie kommen als Einzelzellen oder als Zellaggregate vor. Auch wenn die Prokaryonten morphologisch wenig differenziert erscheinen, ist ihre physiologische Vielfalt enorm. Ihr Stoffwechsel kann aerob oder anaerob als Atmung oder Gärung verlaufen. Manche Formen können Lichtenergie nutzen, andere gewinnen Energie durch die Reduktion und Oxidation anorganischer Verbindungen oder Elemente (hauptsächlich Schwefel und Wasserstoff). Ihre Zellsubstanz bauen sie aus organischen Verbindungen (Heterotrophie) oder aus CO₂ (Autotrophie) auf. Viele Arten sind auch dazu befähigt, molekularen Stickstoff zu fixieren (Schlegel, 1992).

Einige Grundmerkmale der drei Domänen sind in Tabelle 1 gegenübergestellt.

	Bakterien	Archaeen	Eukaryonten
DNA Chromosom	Ringförmig (normalerweise)		Linear
Genorganisation	Multi-Gen Operons, wenig Introns		Einzelne Gene, Viele Introns
Metabolismus	Denitrifikation, Stickstoff-Fixierung, Lithotrophie, Respiration und Fermentation		Respiration und Fermentation
Zellkern	Nicht vorhanden (Nucleoid)		Membran-umschlossener Zellkern
Vielzelligkeit	Einfach		Komplex
Monomolekulare Zellwand	Peptidoglycan (fast immer)	Abwesend bei den meisten Spezies (Methanogene besitzen Pseudopeptidoglycan)	
Sensitivität der Ribosomen gegen Cam, Kan und Str	Sensitiv	Resistent	
Translations-Start	Formyl-Methionin	Methionin (Ausnahme mitochondrielles Formyl-Methionin)	
RNA Polymerase	Bakteriell	Eukaryontisch	
Transkriptions-faktoren	Bakteriell	Eukaryontisch	
Methanogenese	Nein	Ja	Nein
Thermophiles Wachstum	> 80 °C	>100°C	>80°C
Photosynthese	Bei vielen Spezies, Bakterien-chlorophyll	Nur bei den Halobakterien; Bakterienrhodopsin	Bei vielen Spezies, Chlorophyll
Lichtabsorption des Chlorophylls	Rot und Blau	Grün	Rot und Blau
Membranlipide	Fettsäuren mit Esterverbindungen	Terpenoide mit Etherverbindungen	Fettsäuren mit Esterverbindungen
Pathogene von Pflanzen und Tieren	Viele Pathogene	Keine Pathogene	Viele Pathogene

Tabelle 1 (nach http://biology.keyon.edu/Microbial_Biorealm/domains.html/)
Vergleich einiger Grundmerkmale der drei Domänen Bakterien, Archaeen und Eukaryonten.

2.2.1. Die Bakterien

Die Domäne der Bakterien lässt sich strukturell in drei große Gruppen unterteilen:

1. Gram-negative Bakterien mit einer Zellwand
2. Gram-positive Bakterien mit einer Zellwand
3. Bakterien ohne Zellwand

Die Zellwand der Gram-negativen Bakterien besteht aus einer äußeren Membran, einer inneren Peptidoglycanschicht und weiteren variablen Bestandteilen zwischen und außerhalb der beiden Schichten. Die Zellwand der Gram-positiven Bakterien besitzt keine äußere Membran. Die Peptidoglycanschicht ist oftmals dicker als die der Gram-negativen Bakterien und enthält Teichonsäuren bzw. Teichuronsäuren und/oder Polysaccharide. Viele Arten weisen einen S-Layer als äußere Zellwandschicht auf. Bei der dritten Gruppe handelt es sich um zellwandlose Bakterien, die Mycoplasmen. Sie sind ausschließlich von einer Plasmamembran umgeben (Krieg, 2001).

In dieser Arbeit werden zwei Vertreter der Gram-negativen Bakterien untersucht. Zum einen das hyperthermophile Bakterium *Thermotoga maritima* (Kapitel 4 und 5) und zum anderen das Proteobakterium *Escherichia coli* (Kapitel 4).

2.2.2. Die Archaeen

Die Archaeen wurden erst Ende der siebziger Jahre anhand von DNA-Sequenzvergleichen von Carl Woese als eigene Domäne eingeführt (Woese and Fox, 1977). Ursprünglich wurden sie an extremen Standorten isoliert, wie an schwarzen Rauchern bei Temperaturen von über 100°C, in extrem salzreichen, alkalischen oder sauren Habitaten. Allerdings zeigen neuere Untersuchungen, dass sie auch in moderaten Biotopen zu finden sind. Sie gliedern sich in vier Reiche: Die Crenarchaeoten, die Euryarchaeoten, die ‚Korarchaeoten‘ und die Nanoarchaeoten. Die Crenarchaeoten bestehen nur aus einer einzigen Klasse, den *Thermoprotei*, die sich wiederum in drei Ordnungen untergliedern lässt: den *Thermoproteales*, den *Desulfurococcales* und den *Sulfolobales*. Die meisten Vertreter dieser Klasse sind obligat thermophil bis hyperthermophil mit optimalen Wachstumstemperaturen zwischen 70°C und 113°C. Der morphologisch sehr diverse Reich

der Euryarchaeoten besteht aus acht Ordnungen Methanopyrales, Methanococcales, Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Thermococcales, Archaeoglobales, Thermoplasmatales, Halobacteriales.

In dieser Arbeit werden folgende Vertreter dieses Reichs untersucht: Zum einen *Methanospirillum hungatei* (Methanomicrobiales) (Kapitel 6), zum anderen das noch nicht kultivierte Euryarchaeon SM1, das zwar zum Reich der Euryarchaeoten gehört, aber keine nähere Verwandtschaft zu einer der anderen acht bekannten Ordnungen aufweist (Rudolph et al., 2001) (Kapitel 7).

Ein weiteres Reich bilden die Nanoarchaeoten. Sie beinhalten nur eine Gattung mit einer bekannten Art *Nanoarchaeum equitans*. Aus Umweltproben konnten durch Amplifikation mit spezifischen 16S rDNA Primern Hinweise erhalten werden, dass es weitere Spezies gibt, die diesem Reich zugeordnet werden können (Hohn et al, 2003). In dieser Arbeit wird *Nanoarchaeum equitans* (Kapitel 8) untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Medien für die Zellzucht

3.1.1. Medium für *Thermotoga maritima*

Das Wachstumsmedium setzt sich nach Huber et al. (1986), wie folgt zusammen (leicht modifiziert).

Synthetisches Meerwasser (2x); für 1 l:

NaCl	55 g
Magnesiumsulfat	14 g
Magnesiumchlorid	11 g
Calciumchlorid	1,5 g
Kcl	1,3 g
NaBr	0,2 g
Borsäure	0,06 g
Strontiumchlorid	30 mg
KJ (1mg/ml Stammlösung)	100 μ l
Mit MillQ auf 1 l auffüllen und autoklavieren	

Mineralienextrakt (10x):

MgSO ₄ x7H ₂ O	30 g
MnSO ₄ x2H ₂ O	5 g
NaCl	10 g
FeSO ₄ x7H ₂ O	1 g
CoSO ₄ (CoCl ₂)	1 g
CaCl ₂ x2H ₂ O	1 g
ZnSO ₄	1 g
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,1 g
KAl(SO ₄)	0,1 g
H ₃ BO ₃	0,1 g
Na ₂ MgO ₄ x2H ₂ O	0,1 g
Ni(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	2 g
Mit MilliQ auf 1 l auffüllen und pH 1 mit H ₂ SO ₄ einstellen. In Aluminiumfolie bei 4°C aufbewahren	

Medium (1 l):

KH ₂ PO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
NaHCO ₃	0,2 g
Hefeextrakt (Difco)	0,5 g
Mit MilliQ auf ca. 400ml auffüllen und autoklavieren	
Stärke	5 g, in 150 ml MilliQ gelöst
Mineralienextrakt (10x)	1,5 ml
Meerwasser (2x)	250 ml
Mit MilliQ auf 1 l auffüllen	
Resazurin (0,1%)	1 ml

Die Mediumsflasche wird mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen und 20 min mit N₂ begast. Danach wird dem Medium 1 ml 50% Na₂S zugegeben und 10 min gerührt. Der pH-Wert wird mit 50% H₂SO₄ auf pH 7 eingestellt.

Nun kann das fertige Medium in der Sauerstoff-freien Atmosphäre eines Anaerobenzeltes (Kapitel 3.1.2) in Druckflaschen abgefüllt werden. Diese Flaschen werden anschließend mit N₂ an einer Gasstation (Kapitel 3.1.3.) unter Druck gesetzt (2 bar) und sind nach 20 min Autoklavieren gebrauchsfertig.

3.1.2. Das Anaerobenzelt

Um das Abfüllen des *Thermotoga maritima* Mediums unter Sauerstoff-freien Bedingungen zu bewerkstelligen, wurde dieser Präparationsschritt in einem Anaerobenzelt (Eigenbau der Abteilung) durchgeführt. Die Hülle dieses Anaerobenzeltes besteht aus 0,25 mm starkem induktionsgeschweißtem PE-Material und wird von einem Trägerrahmen aus 18 mm starken Siederohr gehalten. Eine zylindrische Druckschleuse mit einem Innendurchmesser von 25 cm und einer Länge von 35 cm ermöglicht das Ein- und Ausschleusen. Das Zelt ist mit einem Gasgemisch aus 95% N₂ und 5% H₂ gefüllt.

Die Zeltluft wird durch einen Palladiumgranulatfilter (Hersteller: Firma Coy) geblasen. Dabei wird der etwa durch kleine Lecks in der Zellhülle vorhandene Restsauerstoff durch die katalytische Verbrennung mit Wasserstoff reduziert. Das entstehende Wasser wird an einem weiteren Filter, der mit Kieselgel gefüllt ist, aufgenommen. Beide Filter müssen regelmäßig durch Ausheizen bei 100°C in einem Wärmeofen regeneriert werden.

Durch das Reduzieren des *Thermotoga*-Mediums mit Na₂S entstehen kleine Mengen an Schwefelwasserstoff, der ein Katalysatorgift für das Palladiumgranulat darstellt. Daher wird die Zeltluft zusätzlich durch eine Raseneisenerz-Säule geblasen, die den entstehenden Schwefelwasserstoff aufnimmt.

Um die Atmosphäre im Inneren des Zeltes kontrollieren zu können, ist ein Gasmonitor (Firma Coy) im Zeltinneren angebracht. Hier wird sowohl der Wasserstoff-, als auch der Sauerstoffgehalt angezeigt.

3.1.3. Die Gasstation

Die verwendete Gasstation wurde von der Werkstatt der Abteilung gebaut. Sie wird zum Be- und Entgasen der Gasdruckflaschen verwendet. Die gewünschten Gase werden

mittels Plastik-Schläuchen mit Luer-Lock Kupplungen, an die Injektionsnadeln angeschlossen sind, in und aus den Flaschen gepumpt. Zum Einstellen des gewünschten Gasdrucks dient ein Druckminderer. Zum Abpumpen wird eine Rotationspumpe verwendet.

3.1.4. Medien für *Escherichia coli* (B r/K)

Minimalmedium M9

MilliQ	750 ml
5* M9 Salze	200 ml
1M MgSO ₄	2 ml
20% Glucoselösung	20 ml
CaCl ₂	0,1 ml

5*M9 Salze (1l):

Na ₂ HPO ₄	64 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2,5 g
NH ₄ Cl	5 g
Mit MilliQ auf 1 l auffüllen	

LB-Medium (1l)

Hefe	5 g
Tryptene	10 g
NaCl	10 g
NaOH	1 ml
Mit MilliQ auf 1 l auffüllen	

3.2. Untersuchte Organismen

Neben *Thermotoga maritima* und *Escherichia coli* wurden in dieser Arbeit weitere Organismen untersucht, die in der folgenden Liste aufgeführt werden. Sie wurden freundlicherweise von Mitarbeitern des Archaeenzentrums Regensburg (Reinhard Rachel, Karl Stetter, Harald Huber, Robert Huber und Christine Moissl) gestellt.

<i>Nanoarchaeum equitans</i>
<i>Ignicoccus islandicus</i>
SM1
<i>Methanospirillum hungatei</i>

3.3. Die Probenpräparation

3.3.1. Die Vorbereitung der Objektträger ('Grids')

Zunächst werden die Objektträger, die so genannten ‚Grids‘ vorbereitet. Diese Grids sind Kupfernetzchen, die mit einem löchrigen Kohlefilm überzogen sind. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Grid-Typen verwendet. Bei den so genannten ‚Quantifoils‘ sind die Löcher des Kohlefilms gleich groß und regelmäßig angeordnet. Der Vorteil dieser Objektträger liegt in ihrer Stabilität. Bei den ‚Lacy-Carbon Grids‘ sind die Löcher unregelmäßig geformt und im Verhältnis ist weniger Kohlefilm vorhanden. Dadurch ist

die Wahrscheinlichkeit deutlich erhöht, dass sich die gewünschte Probenstelle nicht auf dem Kohlefilm befindet.

Zur Vorbereitung der Grids werden sie zunächst in einem Plasmacleaner für 20 Sekunden beglimmt, um sie hydrophil zu machen. Dadurch verteilt sich später die Probenflüssigkeit gleichmäßig und die Zellen bleiben eher an der Oberfläche des Grids haften.

Anschließend wird das Grid mit 3-4 μl einer kolloidalen Goldlösung mit einer Partikelgröße von 5-10 nm bedeckt. Das Gold wird für die Allignierung der Einzelprojektionen einer Kippserie benötigt. Nach dem Eintrocknen dieser Flüssigkeit sind die Grids für den Probenauftrag einsatzbereit.

3.3.2. Die Vorbereitung der Proben

Die Zellen sollten für die Tomographie in einem lebensnahen Zustand erhalten werden. Die Proben wurden deshalb so wenig wie möglich behandelt. Zur Aufkonzentration der Zellen wurden einige ml der Zellsuspension entnommen, zentrifugiert (üblicherweise 5 min bei 4°C und 14000 rpm) und anschließend in etwas Medium resuspendiert. Für besonders empfindliche Proben, wie zum Beispiel den Flagellenmotor von *Thermotoga maritima* (Kapitel 5) kommt allerdings eine Zentrifugation nicht in Frage, da hierbei die Flagellen abgeschert werden.

3.3.3. Die Kryo-Präparation

Für die Kryo-Präparation werden die vorbereiteten Grids (Kapitel 3.3.1) mittels einer geschlossenen Pinzette in eine Guillotine eingespannt. Anschließend werden etwa 5 μl Probenflüssigkeit auf das Grid aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit (je nach Probe unterschiedlich, etwa 10-20 Sekunden), wird die überschüssige Zellsuspension mit einem Filterpapier abgesaugt, so dass ein gleichmäßig dünner Flüssigkeitsfilm entsteht. Für wenig konzentrierte Proben, wie bei den empfindlichen *Thermotoga maritima* Zellen, die nicht zentrifugiert werden können, wird das Quantifoil-Grid als Sieb verwendet und die Flüssigkeit von der anderen Seite abgesaugt, so dass die in der aufgetragenen Suspension befindlichen Zellen auf dem Grid konzentriert werden.

Anschließend wird das Grid in mit flüssigem Stickstoff gekühltes Ethan ‚eingeschossen.‘ Die Zellen sind nun in amorphem Eis eingeschlossen, da durch die hohe Abkühlrate eine Eiskristallbildung verhindert wird. Dadurch sind die Zellen in einem quasi nativen Zustand erhalten. Die fertigen Grids werden in flüssigen Stickstoff überführt und in einem Gatan-Kryo-Halter in das Mikroskop transferiert.

3.3.4. Milchsäurebehandlung der äußeren Membran von *Escherichia coli*

Um die äußere Membran von *Escherichia coli* für mit Fluoreszenz- beziehungsweise mit Immunogold markierten Liganden durchlässig zu machen, wurden die Zellen mit Milchsäure behandelt (Alakomi et al., 2000). Hierfür wurden zunächst 6 ml Zellsuspension 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml 5 mM HEPES-Puffer (pH 7,2) resuspendiert und in einem mit Eis gefüllten Behälter transferiert. Nach Zugabe von 1 μ l Milchsäure fällt der pH auf einen Wert von 4,5. Die derart behandelten *Escherichia coli* Zellen weisen eine löchrige äußere Membran auf, die für Immunogold- oder Fluoreszenz-markierte Liganden durchlässig ist.

3.3.5. Fluoreszenzfärbung der Chemorezeptoren von *Escherichia coli*

Für diesen Versuch musste zunächst der Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin-Alexa 488 an einen Polyliganden gebunden werden. Dieser Ligand besteht im Wesentlichen aus einem langen Kohlenstoffgerüst, an dem in regelmäßigen Abständen 35 Galactose-Moleküle angehängt sind. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde wegen seiner starken Fluoreszenz und seiner Photo- und pH- Stabilität in einem Bereich zwischen pH 4-9 ausgewählt (Panchuk-Voloshina et al., 1999). Hierfür wurden 10 μ l Polymer (20 mg/ml) und 20 μ l Streptavidin-Alexa 488 (20 mg/ml) zusammengegeben und mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde konnte die Lösung für die Markierung der Chemorezeptoren verwendet werden.

Für die Fluoreszenzfärbung wurden jeweils 50 μ l Zellsuspension vor und nach der Milchsäurebehandlung entnommen und nach Zugabe von 2 μ l Polyligand-Streptavidin-Alexa 488 Lösung für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf

Objektträger aufgebracht und im Lichtmikroskop untersucht. Die Fluoreszenzversuche wurden mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm durchgeführt. Alexa 488 emittiert in einem Bereich um 520 nm (Panchuk-Voloshina et al., 1999).

3.3.6. Immunogold-Markierung der Chemorezeptoren von *Escherichia coli*

Um den Polyliganden mit 6 nm Immunogold zu markieren, wurde zunächst 1 μ l (20mg/ml) in 200 μ l H₂O gegeben. 1 μ l dieser verdünnten Lösung wurde nun mit 99 μ l Streptavidin-Gold Lösung (0,1 nM/ml) auf 100 μ l aufgefüllt und eine Stunde inkubiert. Zur Vorbereitung der Zellen wurden 4ml der Suspension bei 14000 rpm 5 Minuten zentrifugiert und in 2 ml 5 mM HEPES-Puffer (pH 7,2) und 0,25 mM L-Leucin resuspendiert. Nach Zugabe von 1 μ l Milchsäure auf Eis fällt der pH auf 4,5 ab. 100 ml der Suspension wurden nun mit 100 ml der Polyliganden-Streptavidin-Gold Lösung versetzt und über Nacht inkubiert. Nun konnten die Proben auf EM-Grids aufgebracht und in flüssiges Ethan eingeschossen werden. Durch das Vorhandensein des Immunogoldes in der Lösung konnte bei diesen Proben auf die Verwendung von Markergold für die spätere Alignierung verzichtet werden.

3.3.7. Polymyxin-Behandlung der *Thermotoga maritima* Zellen

Um die Membranen der *Thermotoga maritima*-Zellen durchlässig zu machen, wurden sie mit Polymyxin B behandelt. Dieses Antibiotikum stört die Membranen Gram-negativer Bakterien.

Es wurden 10 ml Zellsuspension bei 14000 rpm 5 min abzentrifugert, in 2 ml *Thermotoga*-Medium resuspendiert und auf Eis 2 mg Polymyxin B zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Stunden wurden die Zellen dann für das Elektronenmikroskop präpariert.

3.4. Das Mikroskop

Für alle elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Philips CM300 verwendet. Dieses Mikroskop ist mit einer FEG und einem Gatan Energiefilter GIF 2002 (Peasanton, Kalifornien) ausgestattet. Die automatisierte Tomographie wurde mit der Software Digital Micrograph 3.4.0. durchgeführt.

3.5. Die Rekonstruktion der Tomogramme

Für die Rekonstruktion und Auswertung der dreidimensionalen Strukturen der untersuchten Objekte wurde das EM-Programm (Hegerl, 1996) verwendet. Die Einzelprojektionen der Kippserien wurden mit Hilfe von mindestens drei Goldpartikeln aligniert. Anschließend wurde mittels einer gewichteten Rückprojektion der dreidimensionale Aufbau der Probe rekonstruiert. Der entstehende Datensatz kann beliebig gedreht, geschnitten und weiterbearbeitet werden. Die Volumendarstellungen der Rekonstruktionen wurden mit dem Programm AMIRA (Mercury Computer Systems, Düsseldorf) angefertigt.

3.6. Bildauswertung durch dreidimensionale Korrelationsmittelung

Pseudoperiodische Strukturen sind bei den Prokaryonten häufig zu finden. Da viele dieser Strukturen allerdings nicht planar sind, können sie nicht mit Hilfe der gewöhnlichen Korrelationsmittelung bearbeitet werden. Um die nicht-planaren, extrazellulären deckelartigen Strukturen, die sogenannten *terminal plugs* von *Methanospirillum hungatei* (Kapitel 6) zu untersuchen, wurde die allgemeine dreidimensionale Korrelationsmittelung entwickelt (Reiner Hegerl). Sie konnte anschließend auch auf andere, nicht-planare periodische Strukturen angewandt werden, wie z.B. die Chemorezeptor-Cluster von *Thermotoga maritima* (Kapitel 4).

Hierbei wird zunächst ein kleines, aus wenigen Untereinheiten bestehendes Volumen aus dem Tomogramm ausgeschnitten. Diese Referenz wird anschließend mit dem ganzen Tomogramm kreuzkorreliert. Die Maxima in dieser Funktion zeigen Positionen mit einer der Referenz ähnlichen Struktur an. Allerdings wird nur eine geringe Anzahl an Maxima

gefunden, da sich die Orientierung der Untereinheiten mit zunehmendem Abstand von der Referenzposition schnell ändert. Eine vorläufige Mittelung erhält man durch die Extraktion und Überlagerung der Volumina an den Maximapositionen. Diese Mittelung wird im nächsten Schritt als neue Referenz verwendet. Eine Serie an normalisierten Kreuzkorrelationen wird dabei mit jeweils unterschiedlicher Orientierung dieser Referenz gerechnet. Im dritten Schritt werden die Volumina an den Maximapositionen entnommen und bezüglich der Referenz räumlich angeordnet. Die Orientierungsparameter werden dabei bis zu einer Genauigkeit von 1° verfeinert. Die aus diesem Schritt hervorgehende Mittelungsstruktur wird anschließend dazu verwendet, ein Modell zu generieren. Dazu wird die Mittelungsstruktur an den Maximapositionen in Abhängigkeit der ermittelten Orientierungsparameter platziert.

Ergebnisse

4. Chemotaxis: Die Chemorezeptorcluster der Prokaryonten

Schon seit dem 19. Jahrhundert ist bekannt, dass Prokaryonten auf Lockstoffe reagieren. Pfeffer zeigte dies in einem Experiment, in dem er Bakterien zur Öffnung von Kapillaren lockte, die mit Stoffen wie Kohlenstoffquellen oder Aminosäuren gefüllt waren. Dagegen entfernten sich die Bakterien von Kapillaren, wenn Schreckstoffe wie etwa schwache organischen Säuren angeboten wurden. Dieses Verhalten wird als Chemotaxis bezeichnet (Lengeler et al., 1999). Erst in letzter Zeit werden die molekularbiologischen Grundlagen der Chemotaxis in ihren Einzelheiten untersucht und verstanden.

4.1. Grundlagen der Chemotaxis

Der Kontrollmechanismus des Zwei-Komponenten- Signaltransduktionssystems der Chemotaxis ist sowohl bei den Archaeen als auch bei den Bakterien konserviert. Einen Überblick über das System ist in Abbildung 4 dargestellt (Szurmant and Ordal, 2004). Die mit roter Farbe gekennzeichneten Bestandteile sind universell bei allen chemotaktischen Prokaryonten zu finden, orange kennzeichnet diejenigen Komponenten der Chemotaxis, die bei den meisten Archaeen und Bakterien vorkommen, und in gelb sind die Proteine dargestellt, die nur bei einzelnen Vertretern der Prokaryonten zu finden sind.

Das System besteht aus einer Histidin-Kinase (CheA), die durch Autophosphorylation und Übertragung dieser Phosphatgruppe auf den ‚Response-Regulator‘ CheY die Drehrichtung der Flagelle beeinflusst. Die Aktivität dieser Kinase CheA wird durch die MCPs (Methyl-Accepting-Proteins) gesteuert. Diese Transmembranrezeptoren können verschiedenste Lock- und Schreckstoffe im umgebenden Medium detektieren.

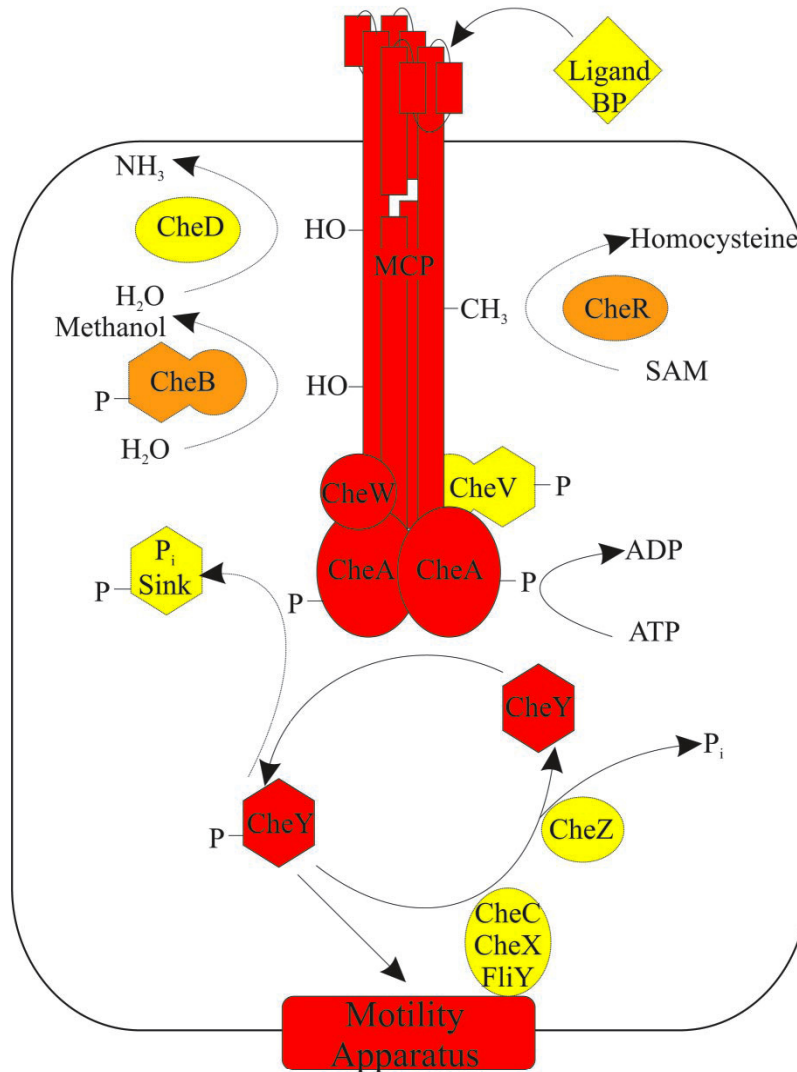


Abbildung 4:

(Szurmant and Ordal, 2004). Allgemeines, schematisches Modell der biochemischen Prozesse der Chemotaxis. Die Hexagone kennzeichnen die ‚Response-Regulator‘ – Domänen. Die universellen Bestandteile sind in rot dargestellt, die fast universellen in orange und optionale Komponenten sind in gelb gekennzeichnet.

4.1.1. Die MCPs

Eine zentrale Rolle bei der Chemotaxis spielen die MCPs (Methylated Chemotactic Proteins). Sie besitzen eine N-terminale periplasmatische Domäne, eine Transmembranregion und eine etwa 26 nm langen, ins Zytoplasma reichende *coiled-coil* Domäne (Kim et al. 1999; Levin et al. 2002). Die periplasmatische Seite dieser Proteine

enthalten die Bindestellen für unterschiedliche chemische Stoffe. Eine so genannte HAMP-Region überträgt die Information der Rezeptordomänen auf die Signalregion der Rezeptoren am zytoplasmatischen Ende. Es sind drei verschiedene Klassen Rezeptoren bekannt (Abbildung 5).

Sie unterscheiden sich durch die An- oder Abwesenheit von Insertions- bzw. Deletions-Regionen, den so genannten ‚Indels‘ bestehend aus 14 Aminosäuren (Abbildung 5). Die Rezeptorklasse III wird dabei als die ursprünglichste angesehen (Le Moual and Koshland, 1996; Szurmant and Ordal, 2004). Ein phylogenetischer Baum der chemotaktischen Bakterien und Archaeen mit der jeweiligen Anzahl der vorkommenden Rezeptoren und ihrer Klassenzugehörigkeit ist in Abbildung 6 dargestellt.

Die MCPs besitzen jeweils vier oder mehr spezielle Glutamyl-Reste an den langen, helikalen *coiled-coil* Fortsätzen. Durch die Methylierung und Demethylierung dieser Positionen wird die Aktivität von CheA gesteuert.

Diese reversible Methylierung wird bei *Escherichia coli* durch die Proteine CheR und CheB reguliert. CheR ist eine Methyltransferase und überträgt Methylgruppen auf die Rezeptoren, die Methylsterase CheB dagegen ist für die Demethylierung zuständig. CheB wird durch die Übertragung einer Phosphatgruppe von CheA aktiviert. Ist nur ein geringer Anteil der Rezeptoren methyliert, ist auch die Aktivität von CheA gering, ein hoher Anteil an Methylierung hat den entgegengesetzten Effekt auf CheA. Steigt die Konzentration der Lockstoffe im Medium, inhibiert dies die CheA-Aktivität. Die Konzentrationserhöhung hat zur Folge, dass durch dieselben Änderungen in der Rezeptorkonformation auch langsam der Methylierungszustand der MCPs durch CheR ansteigt, so dass trotz der erhöhten Lockstoffkonzentrationen die Aktivität von CheA wieder auf den ursprünglichen Wert absinkt. Da die Methylierung bzw. Demethylierung wesentlich langsamer abläuft als die Phosphorylierung von CheA und CheY, dient sie sozusagen als Erinnerungsmechanismus. Dies ermöglicht der Zelle, die gegenwärtige Situation mit der vergangenen zu vergleichen (Webre et al. 2003).

Im Unterschied zu dem Prototyp der Klasse I Rezeptoren aus *Escherichia coli* scheinen bei anderen Rezeptoren, wie für einen Vertreter der Klasse III Rezeptoren (McpB) aus *Bacillus subtilis* beschrieben, die Methylierungsstellen jeweils unterschiedliche Funktionen zu besitzen. Dabei spielt nur ein Teil dieser Methylierungspositionen eine

Rolle bei der Adaptation (Szurmant and Ordal, 2004). Bei einigen Bakterien ist CheV, ein Protein dass CheA and die Rezeptoren bindet, zusätzlich an der Adaptation beteiligt.

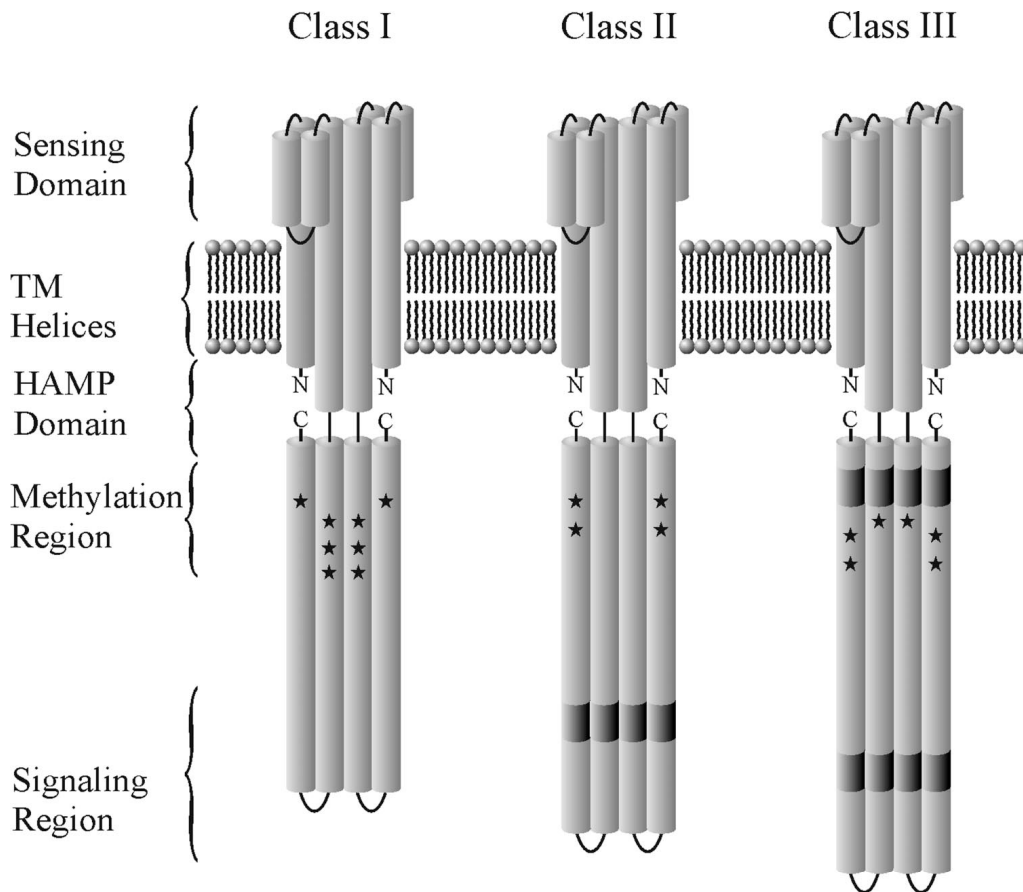


Abbildung 5 (Szurmant and Ordal, 2004)

Schemazeichnungen der drei Klassen der Chemorezeptoren. Gezeigt ist jeweils ein Dimer jeder Rezeptorklasse. Die Insertions-/Deletions-Regionen (Indels) sind in Dunkelgrau markiert. Die Sterne kennzeichnen die Methylierungs-Stellen für (von links nach rechts): *E. coli* Tar, *M. xanthus* FrzCD, und *B. subtilis* MepB.

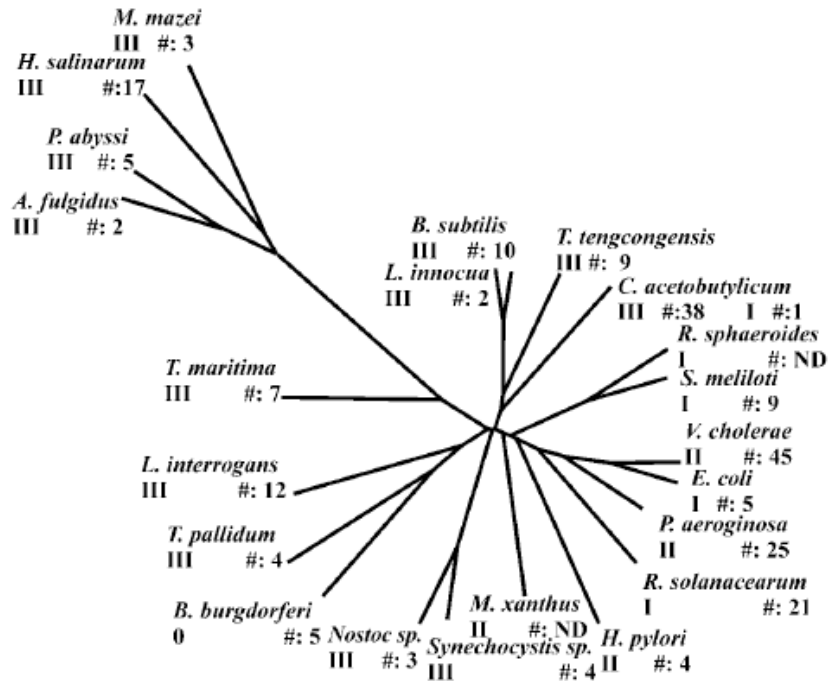


Abbildung 6 (Szurmant and Ordal, 2004):
 Schema der Anzahl und Art der Chemorezeptoren einiger Prokaryonten.

4.1.2. Die Clusterbildung der Chemorezeptoren an den Zellpolen

Obwohl die Struktur der einzelnen Komponenten der Chemotaxis aufgeklärt ist und ebenfalls bekannt ist, dass sie bei einigen Vertretern Cluster an den Zellpolen bilden, ist deren Aufbau noch weitgehend unbekannt. Eine mögliche Anordnung der Komponenten ist in Abbildung 7 und Abbildung 8 zu sehen. Die Untereinheit des Gitters besteht jeweils aus Trimeren der Rezeptorhomodimere (blau), drei CheA-Monomeren (gelb) und drei CheW-Monomeren (rot). Die CheA-Monomere, die dem benachbarten Cluster angehören, sind in grau dargestellt. Abbildung 7a zeigt die Untereinheit als Stereo-Seitenansicht und Abbildung 7b die Ansicht von oben. In Abbildung 8a wird ein Modell für die Anordnung im Gitter vorgeschlagen, in dem sechs dieser Untereinheiten angeordnet sind (Shimizu et al., 2000).

In Abbildung 8b ist dieses Gittermodell in Seitenansicht zu sehen. In grau ist hier ein so genanntes ‚Adaption Compartment‘ gekennzeichnet. Die Autoren nehmen an, dass durch die dichte Packung von CheA und CheW ein eigenes Kompartiment zwischen diesen

beiden Proteinen und der Plasmamembran gebildet wird. Demnach würden CheR und CheB, die die modifizierenden Reaktionen katalysieren, in diesen Raum mit eingeschlossen. Dadurch würde eine freie Diffusion dieser Proteine durch das Zytoplasma verhindert, was eine Effektivitätssteigerung dieser Enzyme zur Folge hätte.

Das Modell bietet eine Erklärung für die Übertragung der Konformationsänderungen von einem Rezeptor auf die benachbarten Rezeptoren. Durch den engen Kontakt zwischen den CheA-Monomeren kann eine Konformationsänderung eines Rezeptors auf drei benachbarte übertragen werden und sich so im Cluster verbreiten (Shimizu et al., 2000).

4. Chemotaxis: Die Chemorezeptorcluster der Prokaryonten

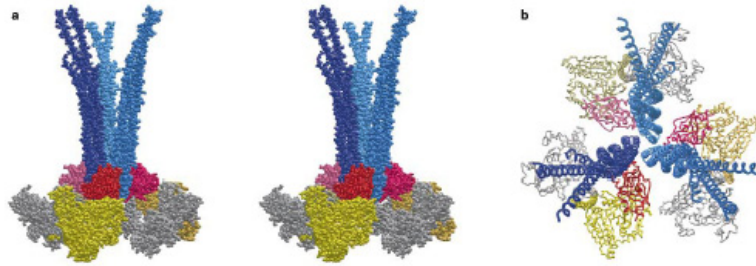


Abbildung 7 (Shimizu et al., 2000)

Strukturelle Untereinheit des Gitters. Die wiederkehrende Einheit des Rezeptorgitters besteht aus drei Rezeptordimeren, drei CheA Monomeren und drei CheW Monomeren. Die Einheit wird hier mit drei CheA Dimeren anstelle von CheA Monomeren dargestellt, um die Tatsache zu unterstreichen, dass die Untereinheit alleine nicht stabil ist. Die Rezeptoren sind in Blautönen dargestellt, CheW in Rottönen und CheA in gelb. CheA Monomere der benachbarten Untereinheiten sind in grau dargestellt. Stereo ‚Seitenansicht‘ der raumfüllenden Darstellung, mit der die Blickrichtung parallel zur Plasmamembran (a) Aufsicht auf die Darstellung in Abbildung (b) mit Blickrichtung auf die Plasmamembran

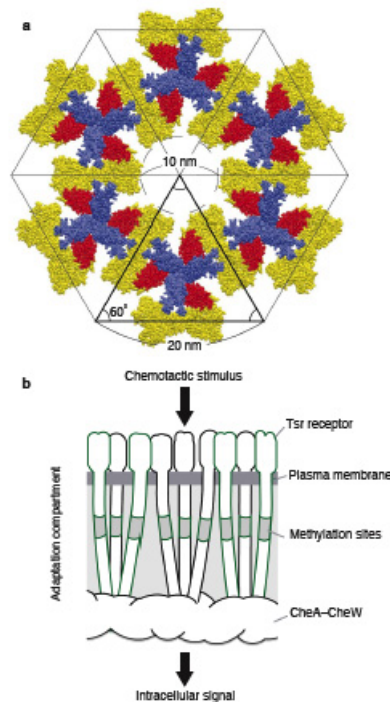


Abbildung 8 (Shimizu et al., 2000): Das hexagonale Netzwerk

(a) Aufsicht von der Plasmamembran in Richtung des Zellinneren. Rezeptoren sind in blauer Farbe dargestellt, CheW in Rot und CheA in Gelb. (b) Schematische Seitenansicht des Netzwerks, in dem das ‚Adaption Compartment‘ in grau dargestellt ist.

In *Escherichia coli* aggregieren vermutlich mehrere tausend der vier homologen Rezeptoren mit CheA und CheW an den Zellpolen und bilden Chemorezeptor-Cluster. Nachgewiesen werden konnte dies mit elektronenmikroskopischen Immunogold-Untersuchungen (Lybarger and Maddock, 2001; Maddock and Shapiro, 1993). Abbildung 9 zeigt eine Immunogoldfärbung der MCPs an den Zellpolen von *Escherichia coli*. Ein räumliches Modell über die Anordnung der einzelnen Komponenten in diesen Clustern ist in Abbildung 10 zu sehen. Dass die Cluster ein hexagonales Gitter mit einer Vektorlänge von 7,5 nm ausbilden, konnte anhand von Kryo-Schnitten an *Escherichia coli* Zellen, in denen der Rezeptor Tsr überexprimiert wurde, nachgewiesen werden (Zhang et al., 2004).



Abbildung 9 (Lybarger and Maddock, 2001):

Dünnschnitt einer *Escherichia coli* Zelle. Pfeile zeigen die Positionen der Immunogold-gefärbten Rezeptoren an den Zellpolen.

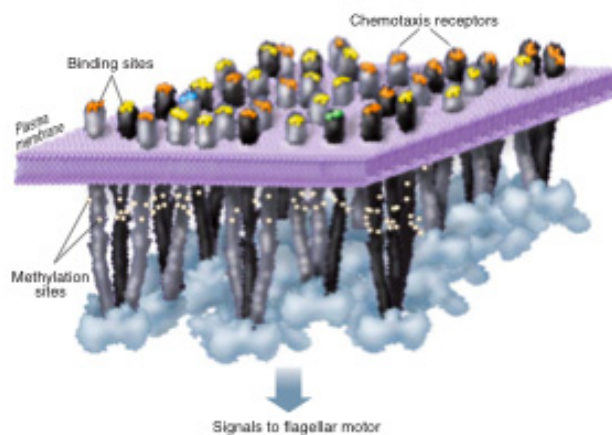


Abbildung 10 (Bray, 2003)

Mehrere tausend Transmembran-Chemotaxisrezeptoren von *Escherichia coli* aggregieren in der Plasmamembran durch das Binden von stromabwärtsgelegenen Signalproteinen. Jeder einzelne Rezeptor besitzt acht mögliche Methylierungsstellen (weiße Kreise) und kann mindestens zwei verschiedene Konformationen einnehmen (grau oder schwarz). Es gibt vier verschiedene homologe Rezeptortypen (durch verschiedene Farben an den Bindungsstellen gekennzeichnet), die zufällig angeordnet sind und in Dreiergruppen interagieren.

4.2. Ergebnisse

Für die elektronentomographischen Untersuchungen der Rezeptorcluster wurden zwei verschiedene Bakterienarten ausgewählt. Viele der atomaren Strukturen der an der Chemotaxis beteiligten Proteine wurden aus *Escherichia coli* aufgeklärt. Dieser Organismus besitzt Rezeptoren der Klasse I. Allerdings sind die Zellen dieses Organismus mit einem Durchmesser von über 1 μm eigentlich für die Tomographie ungeeignet. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein *Escherichia coli*- Stamm mit veränderter Zellmorphologie ausgewählt. Die Zellen des Stammes B/r K thy (Koppes et al., 1999; Woldringh and Zaritsky, 1994) haben aufgrund einer Deletion sowohl des Lon-Proteins als auch des Membranproteins OmpF eine veränderte Zellform. Die Zellen sind elongiert und ihr Durchmesser beträgt weniger als 1 μm . Sie sind daher für die Elektronentomographie gut geeignet.

Zum anderen wurde *Thermotoga maritima* für die Untersuchung an den Chemorezeptorclustern ausgesucht. Auch an diesem Organismus wurden bereits Untersuchungen der Chemotaxis durchgeführt (zum Beispiel bei Gluch et al., 1995; Swanson et al., 1996; Shimizu, 2000). Im Unterschied zu *Escherichia coli* besitzen die *Thermotoga maritima* Zellen die als ursprünglich angesehenen Rezeptoren der Klasse III.

4.2.1. Die Chemorezeptorcluster von *Escherichia coli*

4.2.1.1. Kryo-Elektronentomographie der Chemorezeptoren von
Escherichia coli (B/r K thy)

Um festzustellen, ob der *Escherichia coli* Stamm B/r K thy tatsächlich Chemorezeptoren besitzt, wurden Western Blots mit einem Antikörper gegen den häufig vorkommenden Rezeptor Tar (Abbildung 11) durchgeführt. In Spalte 3 ist das Ergebnis des für die Tomographie verwendeten Stammes zu sehen. Die Bande des 60kDa-Proteins ist deutlich zu erkennen.

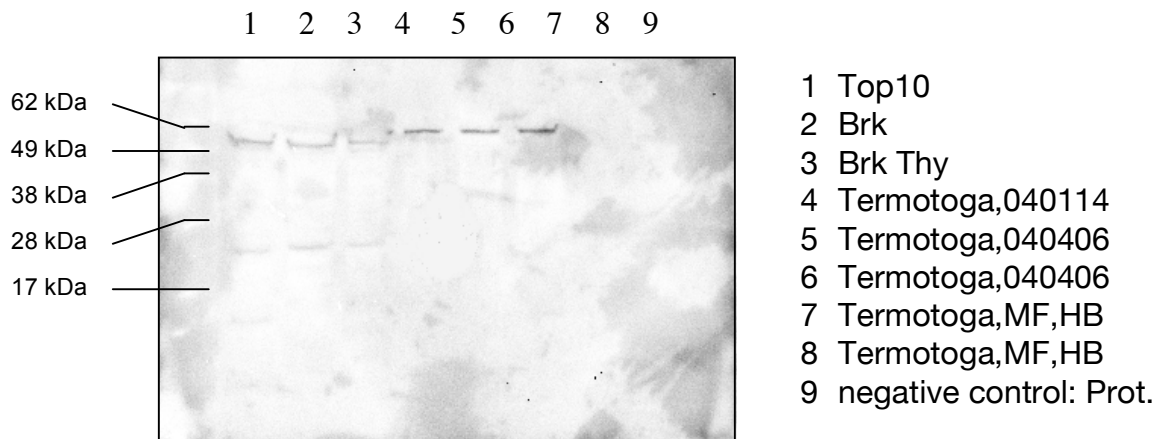


Abbildung 11:

Westernblot aus Zellextrakten der *E.coli* Stämme 1 Top10, 2 Brk, 3 Brk Thy und zwei verschiedene *Thermotoga maritima* MSB8 Kulturen (4,5,6). In Spalte 6 wurde die doppelte Menge an *Thermotoga* Zellextrakt aufgetragen. Spalte 8 und 9 sind Membranfraktionen von *Thermotoga*, in Spalte 10 ist als Negativkontrolle das aufgereinigte Proteasom von *Rhodococcus erythropolis*.

Der Westernblot wurde mit dem Antikörper gegen den Rezeptor Tar inkubiert.

Anschließend wurde Kryo-Elektronentomographie an *Escherichia coli* (B/r K thy) durchgeführt. Die im quasi nativen Zustand belassenen stäbchenförmigen Zellen besitzen ein dicht gepacktes Zytoplasma, das von der Gram-negativen Zellwand eingeschlossen ist. Hier ist die äußere Membran, eine dünne Peptidoglycanschicht und die innere Membran

deutlich zu erkennen (Siehe Abbildung 12b). An den Polen einiger Zellen ist eine weitere Struktur zu sehen, die einer Doppelmembran ähnelt. In den Rekonstruktionen der 3D-Datensätze kommt diese Struktur, bei der es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Chemorezeptor-Cluster handelt, deutlich zum Vorschein (Abbildung 12b).

Diese Cluster erstrecken sich von der inneren Membran (IM) etwa 36 nm in das Zytoplasma der Zellen. Etwa in der Mitte dieser Struktur, ca. 18 nm von der inneren Membran entfernt, ist ein elektronendichteres, dunkles Band zu erkennen (Abbildung 12b).

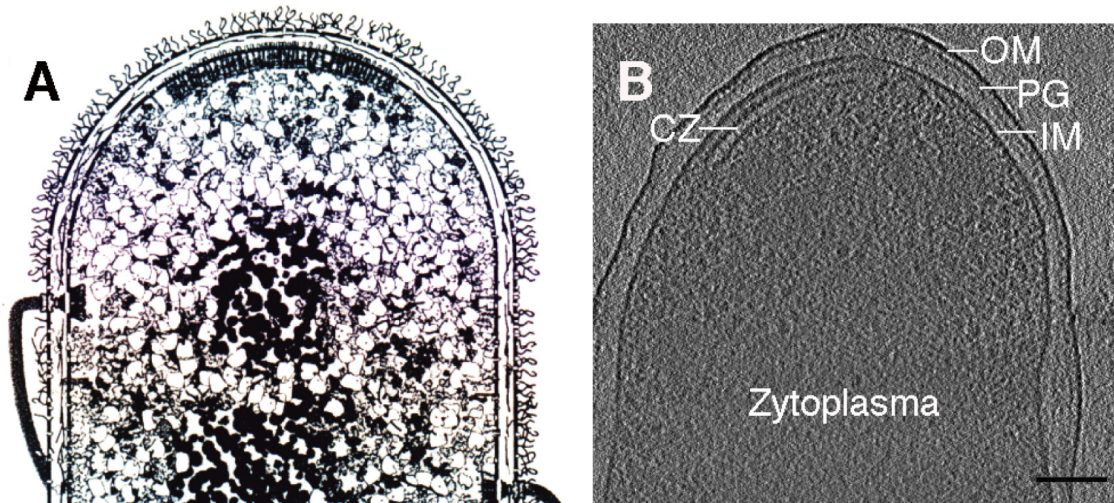


Abbildung 12:

A, Ein von Dr. Dennis Bray gezeichnetes Modell eines *Escherichia coli* Zellpols, die eine Vorstellung von der Erscheinungsform der Chemorezeptor-Cluster darstellt.

B, *Escherichia coli* (B/r K thy). Am Zellpol an der Innenseite der Zytoplasmamembran ist eine in Erscheinungsform, Größe und Position ähnliche Struktur zu erkennen. XY Schichtdicke: 4,9 nm, Defokus: 12 μm . Balken: 100 nm

In einem Teil der untersuchten *Escherichia coli* Zellen sind die Chemorezeptor-Cluster nicht als regelmäßiges Doppelband parallel zur inneren Membran angeordnet, sondern sie bilden Einstülpungen und Falten (Abbildung 13). Hier scheinen deutlich mehr Rezeptoren zu aggregieren als die eigentliche Zytoplasma-Membran aufnehmen kann. An diesen Tomogrammen ist auch eine Querstreifung der Cluster zu erkennen, die eine regelmäßige Anordnung von Chemorezeptor-Einheiten rückschließen lässt. Betrachtet man die XZ-

Schnitte an der Position (siehe Abbildung 13a), die mit einem roten Pfeil im XY-Schnitt gekennzeichnet ist, so erkennt man einzelne Reihen mit einem regelmäßigen Abstand von etwa 8 nm. Dies wird auch im Powerspektrum des XZ-Schnittes in Abbildung 13a deutlich.

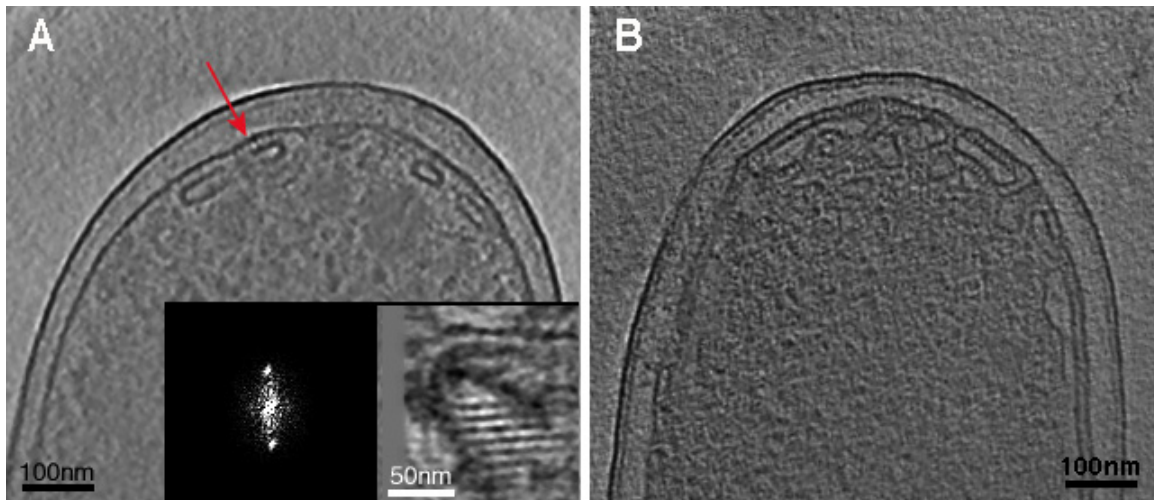


Abbildung 13:

Einfaltungen der Chemorezeptorcluster von *Escherichia coli*.

A, 55 nm dicker XY-Schnitt durch ein entraushtes Tomogramm eines *Escherichia coli* Zellpols. Die Einfaltungen der Chemorezeptorcluster sind deutlich zu sehen. Der rote Pfeil markiert die Position, die als XZ-Schnitt vergrößert dargestellt ist. Hier ist eine reihenförmige Anordnung der Chemorezeptoren mit einem Reihenabstand von etwa 8 nm zu sehen, was auch durch das Powerspektrum dieses Bildes verdeutlicht wird.

B, 5 nm dicker XY-Schnitt durch ein weiteres Tomogramm eines *Escherichia coli* Zellpols, in dem ebenfalls deutliche Invaginationen und Einfaltungen der Chemorezeptor-Cluster zu erkennen sind. Defokus beider Tomogramme $-12 \mu\text{m}$.

4.2.1.2. Elektronentomographie an Immunogold-markierten *Escherichia coli* B/r K thy Zellen

Um einen Nachweis zu erbringen, dass es sich bei diesen Zellpolstrukturen tatsächlich um Chemorezeptor-Cluster handelt, wurden Immunogold-Versuche durchgeführt. Die Schwierigkeit dieser Experimente liegt darin, dass es sich bei den Chemorezeptoren um intrazelluläre Strukturen handelt. Zum einen stellt sich dabei das Problem, Goldcluster von ausreichender Größe durch die äußere Membran zu schleusen, ohne dabei die Zelle an sich zu zerstören. Zum anderen ist der Nachweis einer spezifischen Bindung schwierig, da Gold, das im periplasmatischen Raum eingeschlossen ist, schwer von einem Goldpartikel zu unterscheiden ist, das spezifisch an einen Rezeptor gebunden ist.

Um zunächst die äußere Membran von *Escherichia coli* für das Immunogold mit einer Größe von 6 nm durchlässig zu machen, wurden die Zellen mit Milchsäure behandelt (Alakomi et al., 2000). Die in Kapitel 3.3.4. beschriebene Präparation verursacht in den Zellen eine Beschädigung der äußeren Membran. Es sind deutlich Löcher zu erkennen, die schon in 2D-Projektionen im Elektronenmikroskop auszumachen sind (Abbildung 14). Teilweise ist das Periplasma der *Escherichia coli* Zellen an den Zellpolen deutlich vergrößert (Abbildung 14).

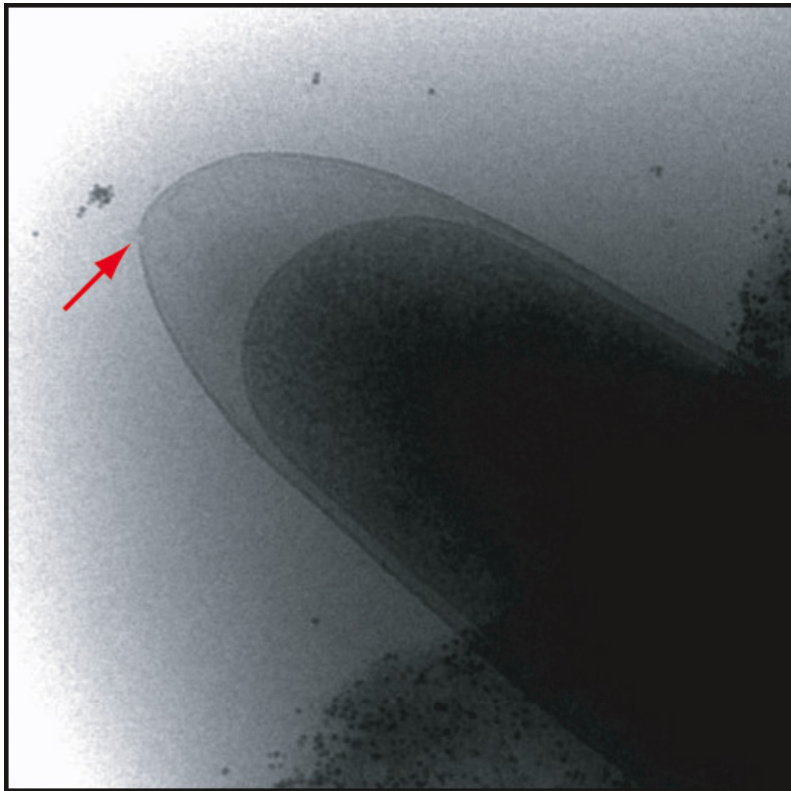


Abbildung 14:

Escherichia coli (B/rK thy) nach der Behandlung mit Milchsäure. Die äußere Membran ist geschädigt während die innere Membran und das Zytoplasma intakt erscheinen. Der Pfeil deutet auf ein großes Loch in der äußeren Membran.

Das Bild wurde am CM120 Biofilter Elektronenmikroskop (Philips) aufgenommen. Der Bilddurchmesser entspricht 1,34 μm .

Um die Chemorezeptoren zu markieren, wurde ein synthetisch hergestellter Polyligand verwendet. Er besteht im Wesentlichen aus einem langen Kohlenstoffgerüst, an dem in regelmäßigen Abständen 35 Galactose-Moleküle angehängt sind. Außerdem ist diesem Liganden ein Biotin angehängt, an das leicht über eine Bindung mit Streptavidin Immunogold- oder Fluoreszenzmarker angehängt werden können. Die Strukturformel dieses Liganden ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Vorteile der Verwendung dieses synthetisch hergestellten Liganden liegt vor allem darin, dass zusätzlich zur spezifischen Bindung an die Chemorezeptoren eine Verstärkung der Clusterbildung erreicht wird (Gestwicki et al., 2001; Gestwicki et al., 2000).

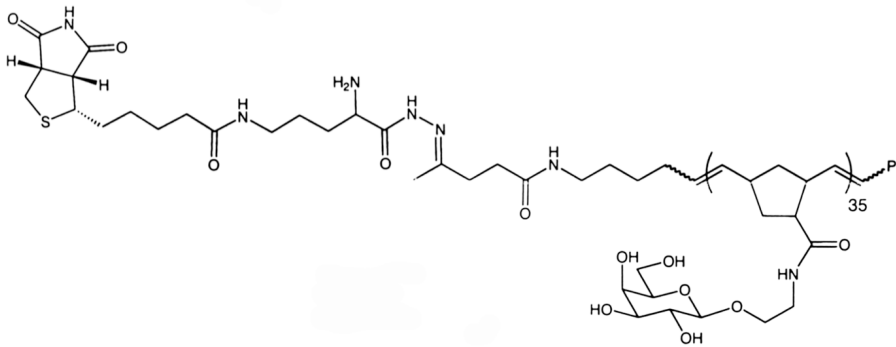


Abbildung 15:

Strukturformel des verwendeten Polyliganden. Die Kohlenstoff-Kette trägt 35 Galactosemolekül-Reste, die an die Chemorezeptoren binden. Dem Polymer ist zusätzlich ein Biotin-Molekül angehängt, an das leicht Immunogold oder Fluoreszenzfarbstoffe über eine Bindung mit Streptavidin angehängt werden kann.

Um zu testen, ob durch die Milchsäurebehandlung die äußere Membran der Zellen für den Liganden durchlässig geworden ist und dieser an die Chemorezeptoren bindet, wurde er mit einem an Streptavidin gebundenen Fluoreszenz-Farbstoff (Alexa 488) markiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff zeichnet sich durch hohe Photostabilität, starke Fluoreszenz und durch Stabilität bei pH-Werten zwischen 4-10 aus (Panchuk-Voloshina et al., 1999). Es wurden sowohl Zellsuspensionen nach der Milchsäurebehandlung als auch Zellen ohne vorherige Behandlung mit diesem Liganden versetzt und im Lichtmikroskop untersucht. Abbildung 16a und 16b zeigen das Ergebnis mit den unbehandelten *Escherichia coli* Zellen. 16a zeigt eine Hellfeldaufnahme der Probe, 16b das entsprechende Fluoreszenz-Bild. Bei diesem Versuch konnte keine Bindung an die Rezeptoren erreicht werden. Wurden die Zellen dagegen vorher mit Milchsäure behandelt, ist eine deutliche Markierung der im Hellfeld aufgenommenen Zellen (16c) im Fluoreszenz-Licht zu erkennen (16d).

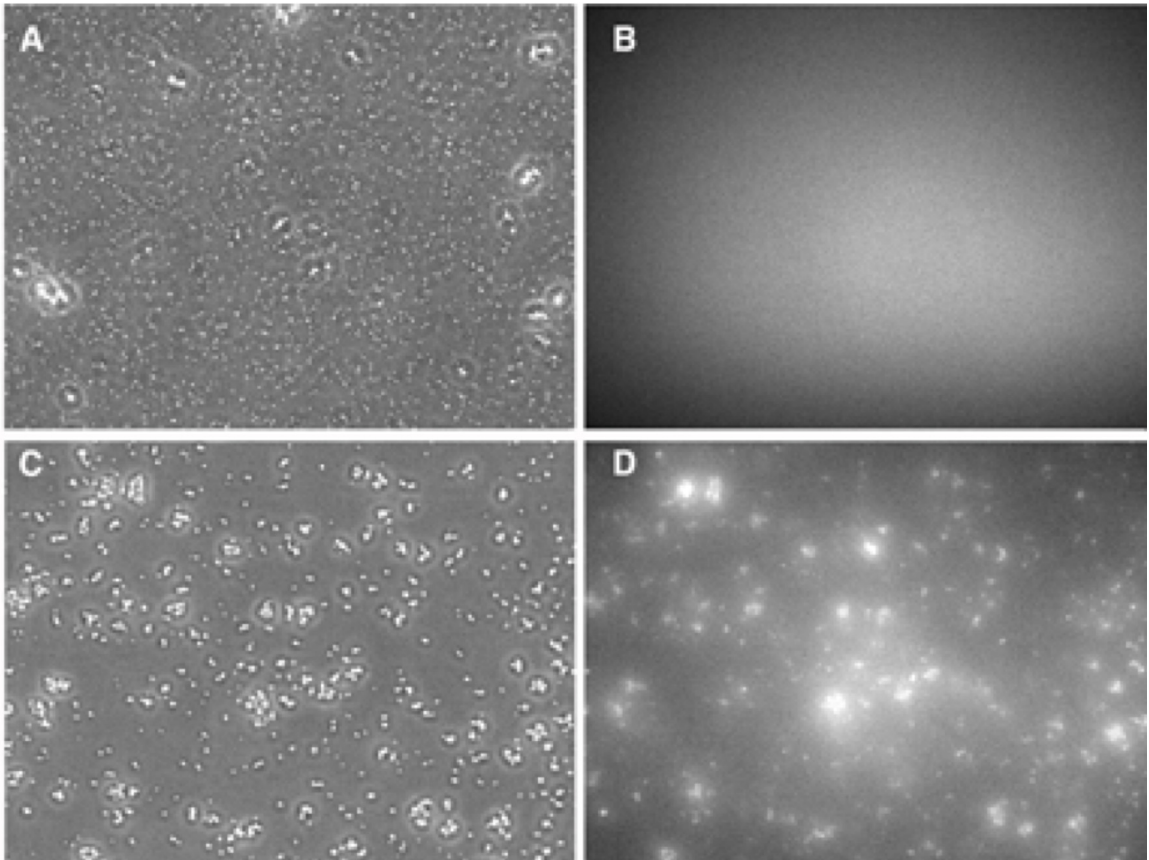


Abbildung 16:

Fluoreszenzfärbung der *Escherichia coli* Br/K thy Zellen

A, B vor der Behandlung mit Milchsäure

C, D nach der Behandlung mit Milchsäure

A: Hellfeldaufnahme der *Escherichia coli* Zellsuspension

B: Die der Abbildung A entsprechende Fluoreszenzaufnahme bei einer Wellenlänge von 520 nm. Die unbehandelten Zellen weisen keine Fluoreszenzfärbung auf.

C: Hellfeldaufnahme der *Escherichia coli* Zellsuspension nach der Behandlung mit Milchsäure

D: Die der Abbildung C entsprechende Fluoreszenzaufnahme bei einer Wellenlänge von 520 nm. Durch die Milchsäurebehandlung konnte die äußere Membran der Zellen für den mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Polyliganden durchlässig gemacht werden. Die Zellen zeigen eine deutliche Fluoreszenzfärbung.

Um die Bindung des Polyliganden auch im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen, wurde an Streptavidin gebundenes Gold mit einer Größe von etwa 6 nm an das Biotin des Polymers angehängt und mit den mit Milchsäure behandelten Zellen inkubiert. Eine Schwierigkeit bei diesem Versuch liegt darin, dass im Vergleich zur Markierung mit dem Fluoreszenz-Farbstoff die maximal einstellbare Konzentration des mit Gold markierten Polyliganden mit nur 0,1 nM/ml wesentlich geringer ausfiel. Eine Verwendung von

höheren Konzentrationen war nicht möglich, da im Gegensatz zum Fluoreszenzfarbstoff die Goldcluster Aggregate bilden würden.

Um dennoch die Chancen auf eine erfolgreiche Markierung zu erreichen, wurde bei diesem Versuch wesentlich länger (über Nacht) inkubiert. Gleichzeitig wurde die Clusterbildung der Chemorezeptoren in *Escherichia coli* durch die Zugabe einer geringen Menge (0,25 mM) L-Leucin gefördert. In dieser Konzentration beeinflusst die Aminosäure nachweislich die Clusterbildung in positiver Weise (Kahn et al., 2004).

In einem der aufgenommenen Datensätze sind auf der Höhe der Chemorezeptor-Cluster an der inneren Membran im periplasmatischen Raum elektronendichte Massen zu erkennen. In Abbildung 17 ist ein XY-Schnitt aus diesem Tomogramm gezeigt. Die in regelmäßigem Abstand sichtbaren Massen sind mit roten Pfeilen markiert. Sie entsprechen in Form und Größe dem verwendeten Markergold. Auch die Bindung an die Chemorezeptor-Cluster spricht für ein positives Ergebnis des Versuchs. Allerdings ist der Kontrastunterschied zwischen diesen Massen und dem Markergold außerhalb der Zelle so groß, dass nicht mit Sicherheit feststeht, ob es sich tatsächlich um die Goldmarker handelt.

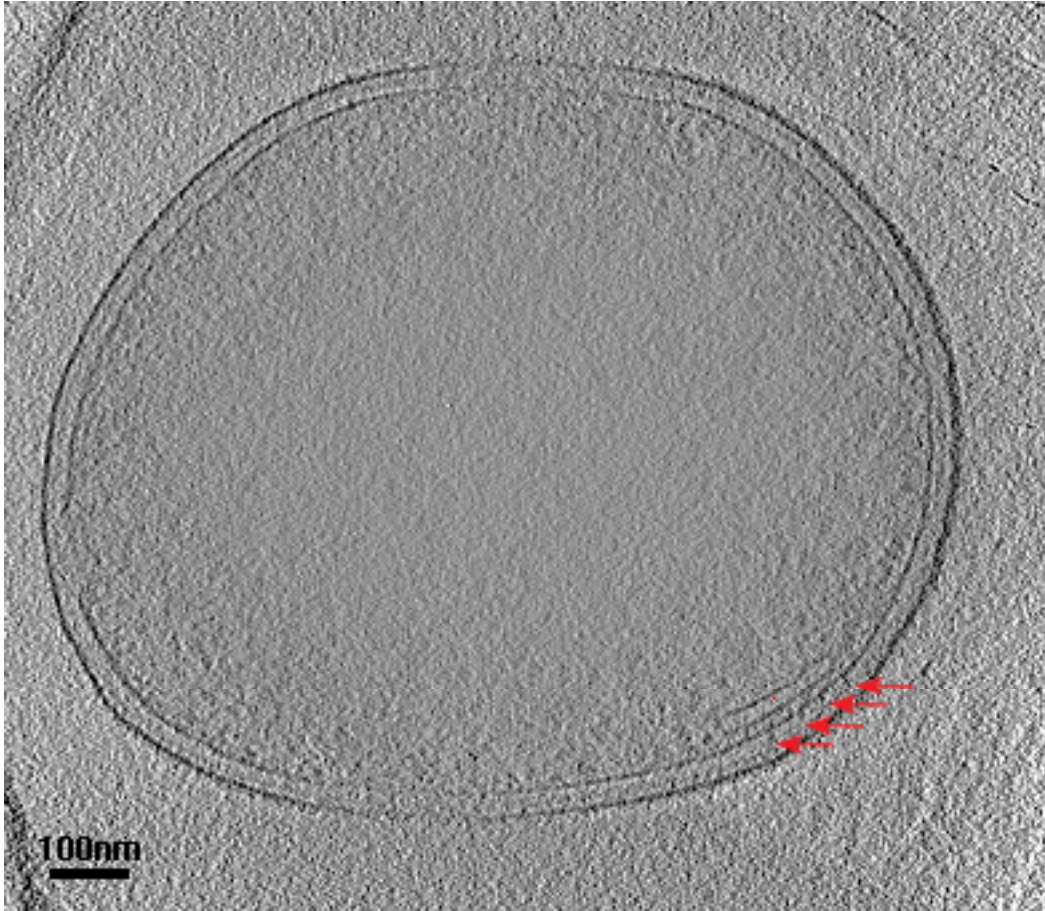


Abbildung 17: Immunogold-Markierung der Chemorezeptor-Cluster

3 nm dicker XY-Schnitt durch ein Tomogramm einer ganzen *Escherichia coli* Br/K thy Zelle. Die roten Pfeile markieren elektronendichte Massen auf der Außenseite der inneren Membran. In Form und Größe entsprechen sie dem verwendeten Markergold, ihre Position an den Bindestellen der Chemorezeptoren deutet ebenfalls auf eine erfolgreiche Markierung hin.

Defokus: $-10 \mu\text{m}$

4.2.2. Kryo-Elektronentomographie der Chemorezeptoren von *Thermotoga maritima*

In dieser Arbeit wurden neben den Chemorezeptor-Clustern von *Escherichia coli* auch Untersuchungen an diesen Strukturen von *Thermotoga maritima* durchgeführt.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Typ III Rezeptoren von *Thermotoga maritima* zu den Typ I Rezeptoren von *Escherichia coli* konnten positive Ergebnisse in Western-Blots erlangt werden, die mit einem gegen den Rezeptor Tar generierten Antikörper aus *Escherichia coli* durchgeführt wurden. Es sind deutliche Banden mit einer Proteingröße von etwa 60 kDa sichtbar (Abbildung 11, Spalten 4-6).

Betrachtet man die Tomogramme von intakten *Thermotoga* Zellen, so sind an den Polen einiger Zellen deutlich Chemorezeptor-Cluster zu erkennen (Abbildung 18a).

Auch bei *Thermotoga maritima* ähnelt diese Struktur einem Doppelband, allerdings ist hier die mittlere Schicht zum einen näher an der inneren Membran positioniert, zum anderen ist sie wesentlich schwächer zu erkennen als bei den Clustern von *Escherichia coli*. Die Cluster reichen von der inneren Membran 32 nm in das Zytoplasma hinein, das schwache Band dieser Strukturen befindet sich etwa 15 nm von der Membran entfernt.

In den Tomogrammen von *Thermotoga maritima* ist eine Querstreifung dieses Doppelbandes gut zu erkennen (Abbildung 18b).

In Abbildung 18c ist eine 3D-Darstellung der Zelle aus 18a gezeigt, in der die Position der Cluster (gelb) an der inneren Membran (rot) gut zu erkennen ist.

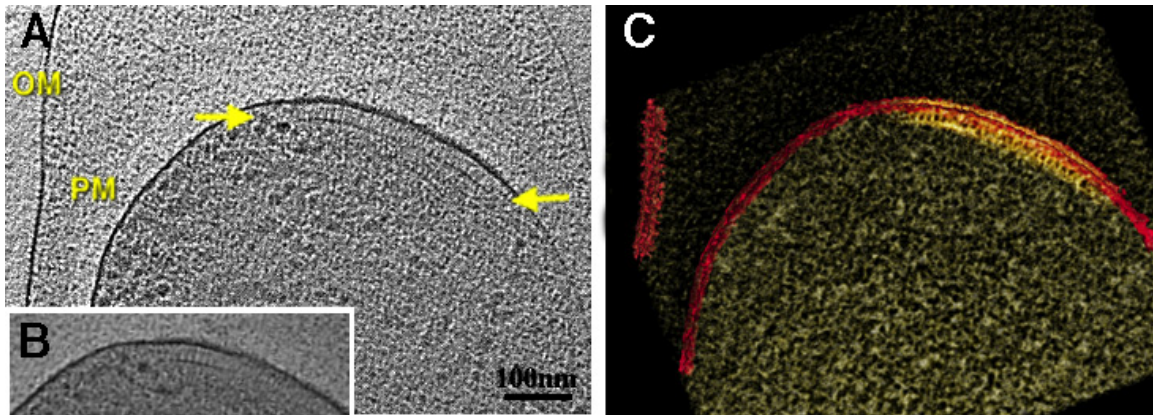


Abbildung 18: *Thermotoga maritima*.

A: 70 nm dicker XY-Schnitt einer *Thermotoga maritima*- Zelle. Am Zellpol an der inneren Membran ist eine Struktur zu erkennen, die in ihrer Dimension, ihrer Position in der Zelle und in ihrer Erscheinungsform ein Chemorezeptorcluster annehmen lässt.

Verwendeter Defokus: $-8 \mu\text{m}$

B: Vergrößerte Darstellung der Struktur aus A.

C: Volumengerechtere Darstellung der Struktur aus A. Die Membranen sind mit roter Farbe, das Chemorezeptorcluster in gelber Farbe markiert.

Doch wie auch bei den *Escherichia coli* Clustern konnte bei *Thermotoga maritima* an den intakten Zellen keine Anordnung der Rezeptoren in einem Gitter festgestellt werden, da die Dicke der Zellen und Dichte des Zytoplasmas die Auflösung der Datensätze zu sehr einschränkte.

Um dennoch genauere Aussagen über die Anordnung der Rezeptoren treffen zu können, wurden die Zellen mit Polymyxin B behandelt. Dieses Antibiotikum stört die Membranen Gram-negativer Zellen. Bei *Thermotoga maritima* konnte mit dieser Methode eine schonende Verringerung des zytoplasmatischen ‚Crowdings‘ durch das Austreten molekularer Komplexe aufgrund der entstandenen Fehlstellen in den Membranen erreicht werden, ohne dass die Zellen ihre native Form verloren. Abbildung 19a zeigt einen XY-Schnitt eines Tomogramms einer mit dieser Methode behandelten Zelle.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind die Chemorezeptor-Cluster des Zellpols wesentlich deutlicher zu erkennen, da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch die Polymyxin-Behandlung deutlich verbessert wurde.

Betrachtet man bei dieser Zelle Schnitte in XZ-Ausrichtung (Abbildung 19b), ist der gitterartige Aufbau des Clusters zu erkennen. Der in Abbildung B hervorgehobene Ausschnitt ist in Abbildung 19c vergrößert dargestellt. Das Powerspektrum dieses Bildes (19d) weist ebenfalls die Gitterstruktur der Chemorezeptor-Cluster nach.

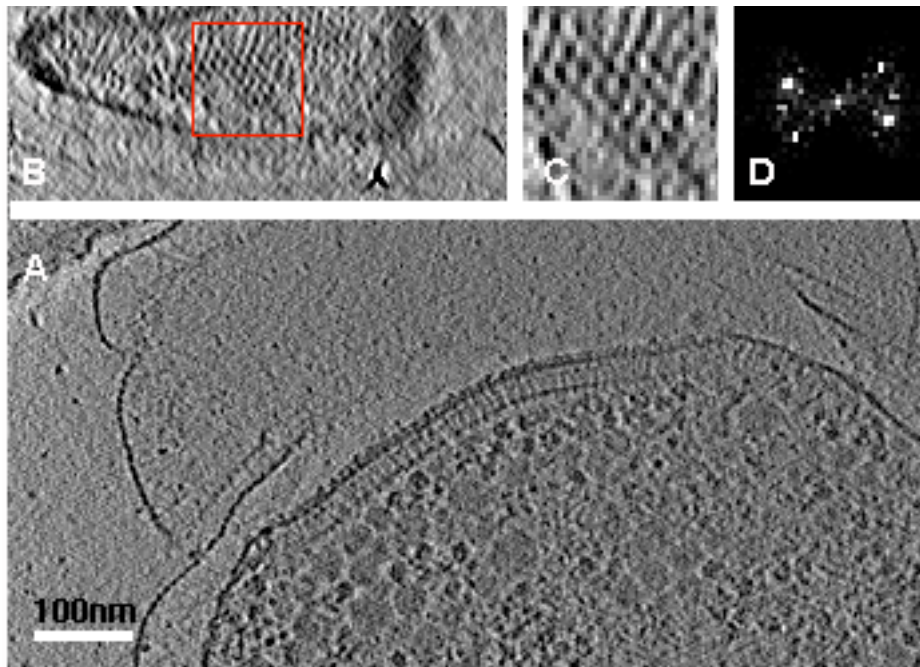


Abbildung 19: Polymyxin B behandelte *Thermotoga maritima* Zelle

A: 3 nm dicker XY-Schnitt durch ein Tomogramm einer mit Polymyxin B behandelten Zelle. Durch die Reduzierung des molekularen ‚Crowdings‘ sind einzelne Komplexe im Zytoplasma zu erkennen. Die Chemorezeptoren sind ebenfalls sehr deutlich sichtbar.

B: 8 nm dicker XZ-Schnitt demselben Tomogramms aus A. Die gitterartige Struktur der Cluster ist klar zu erkennen.

C: Vergrößerter Ausschnitt des in B, markierten Bereichs.

D: Powerspektrum von Abbildung C. Es sind eindeutig die Reflexe eines hexagonal erscheinenden Gitters zu erkennen.

Für die weiter Auswertung der Daten wurde die Methode der dreidimensionalen Korrelationsmittelung angewendet. Dabei wurde ein Ausschnitt aus dem Tomogramm aus dem Bereich der Chemorezeptor-Cluster entnommen und in mehreren Schritten mit dem Originaltomogramm gekreuzkorreliert. Die Höchstwerte der Kreuzkorrelationsfunktionen

indizieren die Positionen, die zu einer Mittelung verwendet wurden. Das Ergebnis dieser Prozedur ist in Abbildung 20 zu sehen.

Abbildung 20a zeigt aufeinander folgende Schnitte YZ-Schnitte durch die Mittelung. Das hexagonale Gitter mit einem charakteristischen Abstand von 12 nm ist deutlich zu erkennen.

Betrachtet man die XY-Schnitte durch die gemittelten Daten (Abbildung 20b), so sind die einzelnen Komponenten des Clusters besonders gut zu erkennen: die innere Membran, die beiden Schichten parallel zu dieser Membran und V-förmige Strukturen senkrecht dazu. Wird die Mittelung um 60° um die y-Achse gedreht, verschwindet die V-Form. Bei einer Drehung um weitere 60° (120° von der Ausgangsposition aus), tritt die V-Form wieder in Erscheinung.

Es wird deutlich, dass die regelmäßige Anordnung der senkrecht zur Membran stehenden Strukturen in der Nähe der Zytoplasma-Membran stark abnimmt, die Mittelung liefert hier kaum noch eine erkennbare Struktur. Abbildung 21a zeigt eine 3D-Darstellung der Clusterkomponenten, der das Clustermodell von Bray (Bray, 2003) in Abbildung 21b gegenübergestellt ist.

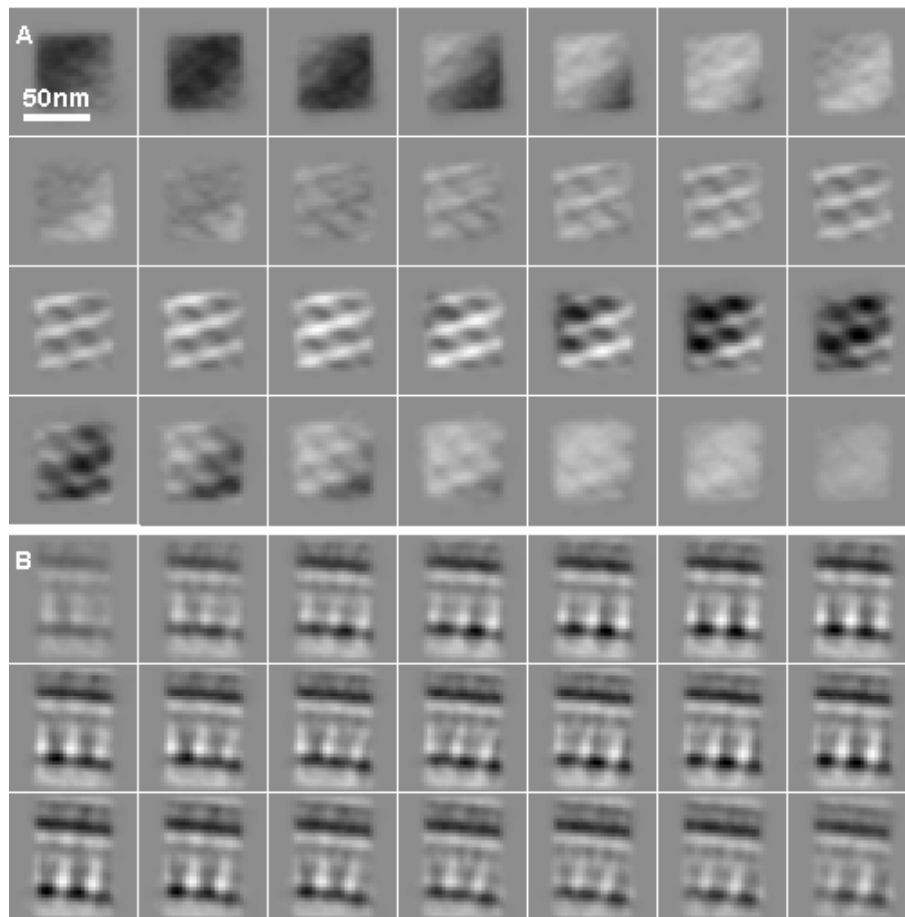


Abbildung 20:

Dreidimensionale Korrelationmittelung der Chemorezeptor-Cluster

A: Aufeinanderfolgende XZ-Schnitte durch die Mittelung. Das hexagonale Gitter mit einem Abstand der einzelnen Zentren von 12 nm ist deutlich zu erkennen.

B: Aufeinanderfolgende XY- Schnitte derselben Mittelung wie in A. Von oben nach unten ist in den einzelnen Bildern die Zytoplasma-Membran und die beiden parallel dazu liegenden Schichten des Chemorezeptor-Clusters zu erkennen. Senkrecht dazu sind V-förmige Strukturen zu erkennen, die schwächer zu erkennen sind, je näher sie der Zytoplasma-Membran sind, was für eine Abnehmende regelmäßigkeit der Anordnung spricht.

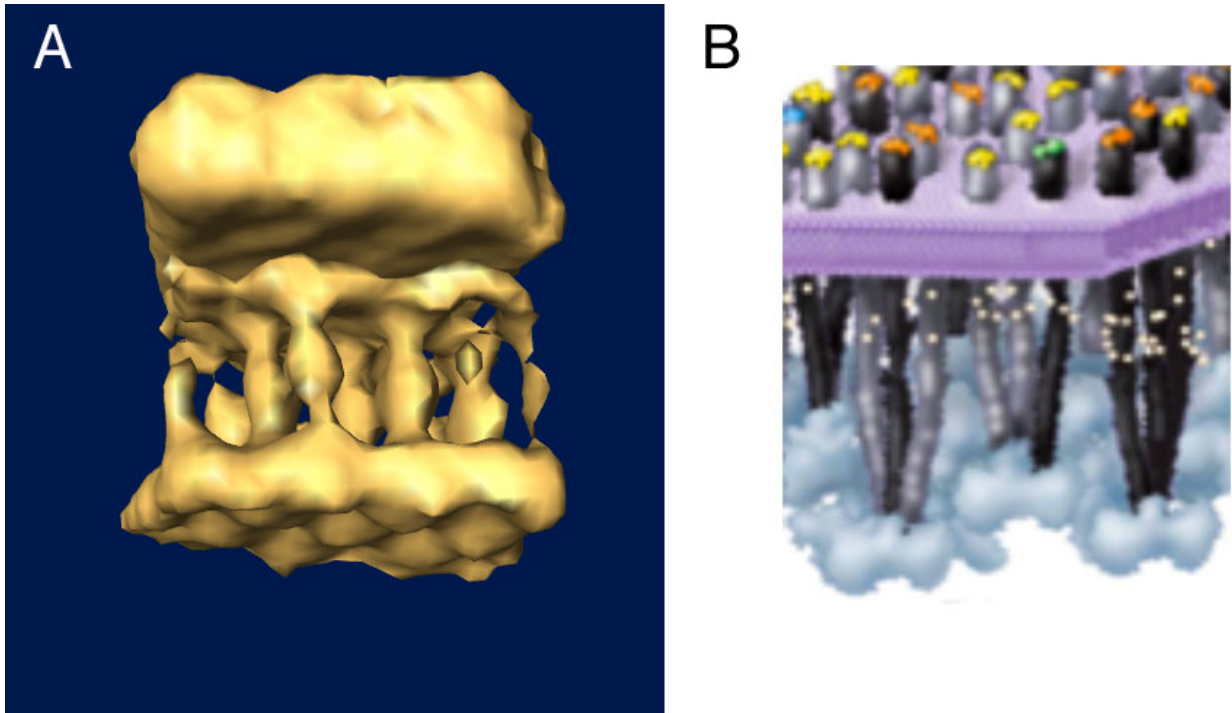


Abbildung 21:

A: 3D-Darstellung der Mittelung aus Abbildung 20. Bildgröße ca. 50 nm

B: Ausschnitt aus Abbildung 10 (Bray, 2003)

4.3. Diskussion zur Kryo-Elektronentomographie der Chemorezeptor-Cluster

4.3.1. Escherichia coli

Mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie konnten zum ersten Mal die dreidimensionale Struktur der Chemorezeptor-Cluster von quasi nativen *Escherichia coli*- Zellen untersucht werden. Da an diesem Organismus der Großteil der bisherigen Forschung an den Chemorezeptoren vorgenommen wurde, bietet sich *Escherichia coli* für die dreidimensionale Strukturaufklärung an. Das Vorhandensein dieser Cluster und ihre Position in der Zelle waren aufgrund von Immunogold-Versuchen an Ultradünnschnitten bereits bekannt (Lybarger and Maddock, 2001). Allerdings waren diese Zellen aufgrund ihrer Größe für die Tomographie ungeeignet. Selbst die Untersuchung des Stammes Br/K thy, der aufgrund von Mutationen zwar länger ist, aber einen geringeren Durchmesser als

ein Wildtyp-Stamm besitzt, stellte sich als schwierig heraus. Durch die nach wie vor relativ dicken Zellen war das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der resultierenden Tomogramme gering.

Die Anordnung der Rezeptoren im Cluster ist bei *Escherichia coli* kürzlich auch anhand von Kryoschnitten untersucht worden. Sie zeigen ein hexagonales Gitter mit einem Gitterabstand von 7,5 nm (Zhang et al., 2004), das mit den in Tomogrammen beobachteten Dimensionen von 8 nm gut übereinstimmt.

Da die Zellen in den Tomogrammen mit ihrer Längsachse immer senkrecht zum Elektronenstrahl liegen, kann die Aufsicht auf dieses Gitter nur in XZ-Schnitten untersucht werden. Da hier zusätzlich zum schlechten Signal-zu-Rausch Verhältnis auch noch der ‚missing wedge‘ die Auflösung verschlechtert, war dieses Gitter nicht zu erkennen. Es konnten nur eine Anordnung der Rezeptoren in einzelnen Reihen visualisiert werden, die jeweils einen Abstand von etwa 8 nm voneinander besaßen.

Die Seitenansicht der Cluster in den dreidimensionalen Datensätzen offenbarte neue Erkenntnisse in die Strukturen. Die Rezeptoren reichen etwa 33 nm ins Zellinnere hinein. An ihrem zytoplasmatischen Ende sind sie mit CheA und CheW verbunden. Diese beiden Proteine bilden eine dichte, durchgängige, membranartige Schicht. Es ist wahrscheinlich, dass dadurch tatsächlich das von Shimizu vorgeschlagene Adaptationskompartiment zwischen der inneren Membran und CheA und CheW gebildet wird (Shimizu et al., 2000).

In den Tomogrammen der Chemorezeptor-Cluster von *Escherichia coli* fällt eine weitere elektronendichte Schicht auf, die parallel zur inneren Membran etwa auf der Hälfte des zytoplasmatischen Teils der Rezeptoren zu sehen ist. Sie wurde auch in Kryo-Schnitten dieser Zellen beobachtet (Zhang et al., 2004). Die Position dieser Schicht entspricht dem Hauptteil der Methylierungsstellen der Rezeptoren des Typs I (Tar). Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um die Methylierungs- und Demethylierungs-Proteine ChR und CheB handelt, die an die Chemorezeptoren gebunden sind.

In einigen Tomogrammen des *Escherichia coli* Stammes Br/K thy fällt auf, dass die Rezeptor-Cluster Einstülpungen und Invaginationen bilden. Dieses Phänomen wurde auch

an Zellen beobachtet, in denen der Rezeptor Tsr überexprimiert wurde (Lefman et al., 2004). Die Autoren nehmen an, dass diese Anordnung auch in Wildtypzellen vorhanden sein könnte, und dadurch die Interaktion der Rezeptorcluster an gegenüberliegenden Membranen unterstützen könnte. Die Ergebnisse der Tomographie an Br/K thy unterstützen die Annahme, dass diese Invaginationen tatsächlich auch in Wildtyp-Zellen vorkommen. Allerdings ist es durch die etwas veränderte Zellform dieses Stammes nicht auszuschließen, dass hier die Zellpolregion im Vergleich zum Wildtyp derart verkleinert ist, dass ähnliche Effekte wie bei einer Überexpression auftreten.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Versuch unternommen, eine intrazelluläre Immunogold-Markierung an ganzen Zellen durchzuführen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass dieser Versuch erfolgreich war, ein endgültiger Beweis bedarf aus statistischen Gründen weiterer Versuche. Dies wäre zum Beispiel durch die Aufnahme eines ‚high angle annular darkfield imaging‘ (HAADF) (Otten, 1991) am Zellpol möglich. Durch das gezielte Filtern von Elektronen bestimmter Streuung kann eindeutig bestimmt werden, ob es sich bei den elektronendichten Massen an der Außenseite der inneren Membran auf der Höhe der Chemorezeptor-Cluster tatsächlich um Gold handelt. Diese Filterung war im Verlauf dieser Arbeit allerdings noch nicht verfügbar.

4.3.2. *Thermotoga maritima*

Wie bei *Escherichia coli* konnte auch die dreidimensionale Struktur der Chemorezeptor-Cluster an *Thermotoga maritima* untersucht werden. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der Cluster, die zu unterschiedlichen Rezeptorklassen gehören. Die Form dieser Komplexe unterscheidet sich dabei in charakteristischer Weise. Die Schicht, die in *Escherichia coli* den Methylierungs-Positionen entspricht, ist auch bei *Thermotoga maritima* zu sehen. Ihre Position ist allerdings näher an der Zytoplasma-Membran gelegen. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit dem der Rezeptorklassen-Modelle. Der Hauptteil der Methylierungsstellen der Rezeptorklasse III ist relativ zur Gesamtlänge des zytoplasmatischen Teils auch näher an der Zytoplasma-Membran gelegen. Ein weiterer Unterschied liegt in der Dichte dieser Schicht. Während in

Escherichia coli dieses Band sehr dicht erscheint, ist es bei *Thermotoga* nur schwach zu erkennen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass die Adaptation bei *Escherichia coli* hauptsächlich über den Methylierungsprozess der Rezeptoren funktioniert. Bei *Bacillus subtilis*, der wie *Thermotoga* Rezeptoren der Klasse III besitzt, scheinen die Methylierungsstellen jeweils unterschiedliche Funktionen zu besitzen. Dabei spielt auch nur ein Teil dieser Methylierungspositionen eine Rolle bei der Adaptation (Szurmant and Ordal, 2004). Da die Methylierungsstellen demnach nicht die exakt gleiche Funktion besitzen, ist eine unterschiedliche Struktur denkbar.

Die Schicht, die den CheA/CheW Proteinen entspricht, ist in ihrer Erscheinungsform mit der von *Escherichia coli* vergleichbar. Auch hier handelt es sich um eine elektronendichte, membranähnliche Schicht. Allerdings scheint ihr Abstand zur Zytoplasma-Membran mit 32 nm etwas geringer zu sein als bei *Escherichia coli*.

Die Chemorezeptor-Cluster von *Thermotoga maritima* sind an intakten Zellen deutlicher zu erkennen als bei *Escherichia coli*. Dennoch ist auch hier in der Aufsicht auf den Zellpol ein Gitter nicht erkennbar. Die Polymyxin-Behandlung der Zellen ermöglicht allerdings eine derartige Steigerung der Auflösung und des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, dass die Anordnung der Rezeptoren in einem hexagonalen Gitter sichtbar gemacht werden konnte. Damit ist es zum ersten Mal gelungen, die Chemorezeptor-Cluster von *Thermotoga maritima* in ihrer dreidimensionalen Struktur darzustellen.

Sowohl in den Rohdaten als auch in der Mittelung erscheinen die senkrecht zur inneren Membran verlaufenden Strukturen als V-förmig. Da bei der Drehung der Mittelung um 120° dieses V ebenfalls gefunden werden kann, ist daraus zu schließen, dass die Rezeptordimere tatsächlich in Trimeren angeordnet sind. Die Tatsache, dass bei einer weiteren Drehung um 120° das V nicht zu erkennen ist, kann mit den fehlenden Daten aufgrund des ‚Missing Wedges‘ erklärt werden. Die Daten sprechen also sehr dafür, dass die Anordnung der Chemorezeptoren und die damit verbundenen Proteine CheA/CheW in *Thermotoga maritima* dem Modell von Shimizu (Shimizu et al., 2000) entspricht (Abbildung 7/8).

5. Der Flagellenmotor von *Thermotoga maritima*

Viele Bakterienarten bewegen sich mit Hilfe von Flagellen fort. Je nach Art besitzen Bakterienzellen eine oder mehrere Flagellen, die in der Zellhülle verankert sind. Diese Fortbewegungsstrukturen lassen sich in einen Flagellenmotor, den Haken (Hook) und ein langes Filament gliedern. Durch einen Protonengradienten (bzw. Na^+ Gradienten) wird ein Drehmoment im Flagellenmotor erzeugt und über den Haken auf das Filament übertragen. Ist die Drehrichtung gegen den Uhrzeigersinn gerichtet (in der Blickrichtung vom distalen Ende der Flagelle in Richtung des Zellkörpers), bilden die einzelnen Filamente bei Zellen mit mehreren Flagellen (wie zum Beispiel *Escherichia coli*) Bündel, mit dem die Bakterien gleichmäßig vorwärts schwimmen. Ändert sich die Drehrichtung kurzzeitig, löst sich das Flagellenbündel auf und die Zelle beginnt zu ‚taumeln,‘ wobei sich ihre Ausrichtung zufällig ändert, bis sich die Drehrichtung des Motors wieder gegen den Uhrzeigersinn läuft. Die Drehrichtung der Flagellen wird durch das chemotaktische Signalprotein CheY beeinflusst, das an den sogenannten ‚Switch-Komplex‘ bindet, welcher zu der Motorstruktur gehört.

5.1. Das Filament

Das 5-10 μm lange Filament ist aus 11 Protofilamenten zusammengesetzt, die jeweils aus nur einem einzigen Protein, dem Flagellin, aufgebaut sind. Durch die helikale Anordnung des Flagellins wird ein Kanal im Inneren des Filaments mit einem Durchmesser von 2 nm gebildet, durch den die einzelnen Flagellinmonomere bei der Verlängerung der Flagelle transportiert werden, um am distalen Ende angebaut zu werden (Yonekura et al., 2003). Das pentamere ‚Cap-Protein‘ HAP2 steuert die Assemblierung und verhindert die freie Diffusion der Flagellinmonomere in das umgebende Medium.

Die Protofilamente können zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen: die L- und R-Form. Liegen alle Protofilamente in der gleichen Konformation vor, ist das Filament eine gerade Röhre. Kommen sowohl die L- als auch die R-Konformation vor, bildet das Filament eine Helix. Je nach Konformation der einzelnen Protofilamente existieren somit nach diesem Model zwei gerade Formen (nur L- bzw. nur R-Konformationen), sowie 10

helikale Formen, die sowohl R- als auch L-Formen beinhalten (Samatey et al., 2001). Die beiden Konformationen unterscheiden sich in der Länge des Protofilaments, wobei die R-Form im Vergleich zur L-Form verkürzt ist. (siehe Abbildung 22)

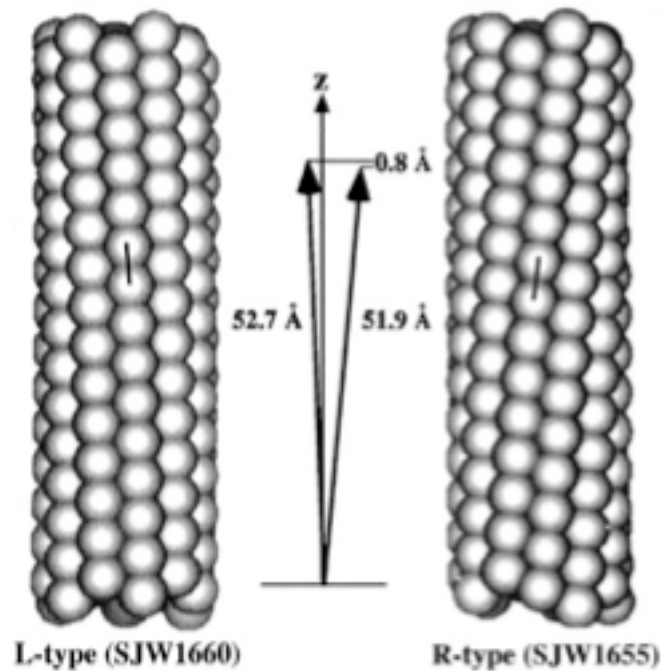


Abbildung 22: aus (Berg, 2003; Namba and Vonderviszt, 1997).

Das Oberflächengitter der geraden R- und L-Form des Filaments. Der Abstand der Flagellinuntereinheiten eines Protofilaments einer 11-start Helix der R-Form ist um 0,07 nm kürzer als bei den entsprechenden Untereinheiten der L-Form. L und R beziehen sich dabei auf die Händigkeit der Windung des Filaments.

5.2. Der Haken

Der gebogene Haken verbindet das Filament mit dem Flagellenmotor. Er ist etwa 50 nm lang und hat einen Durchmesser von 20 nm (DePamphilis and Adler, 1971). Etwa 120 Kopien des Proteins FlgE bilden die rechtsgängige Helix des Hakens (Jones and Aizawa, 1991). Durch den Haken kann sich das Filament relativ zum Zellkörper frei bewegen, somit erfüllt er die Funktion eines Gelenks (Wagenknecht and DeRosier, 1982).

5.3. Der Flagellenmotor

Im Flagellenmotor (Abbildung 23) wird ein Protonen- (bzw. Natriumionen-) gradient in mechanische Energie umgewandelt. Er ist in die Zellwand eingebettet und reicht bis ins Zytoplasma der Zelle. Der Basalkörper des Flagellenmotors eines Gram-negativen Bakteriums besteht aus einer zentralen Achse, die durch zwei Ringpaare verläuft. Diese Ringpaare sind nach ihrer Position bezüglich der Gram-negativen Zellwand benannt (DePamphilis and Adler, 1971). So ist das LP-Ringpaar (L für Lipopolysaccharid und P für Peptidoglycan) in der äußeren Membran, bzw. auf Höhe der Peptidoglycanschicht zu finden und hat die Funktion eines Lagers, das die Achse durch die äußere Membran führt. Der L-Ring wird aus FlgH aufgebaut, der P-Ring aus FlgI.

Der MS-Ring (M für Membran und S für Supramembran) liegt innerhalb und über der Zytoplasma-Membran und fungiert als eine Einheit. Sowohl der MS-Ring als auch der proximale Teil der Achse wird hauptsächlich aus FliF aufgebaut (Blair, 2003).

Der M-Ring wird vom Mot-Ring eingeschlossen, der aus MotA/MotB Komplexen zusammengesetzt ist (Abbildung 24a). Die Anzahl dieser Komplexe variiert bei den verschiedenen Bakterienarten zwischen 10 und 16 (Kahn et al., 1988). Es wird angenommen, dass jeweils zwei MotB und vier MotA Proteine einen Komplex mit jeweils zwei Protonenkanälen ausbilden (Berg, 2003). Dieser Ring bildet den Stator, der fest in der Zellwand verankert ist. Die Protonen interagieren mit einem Aspartatsäurerest Asp32 des MotB Proteins und bewirken eine Konformations- bzw. Ladungsänderung in MotA (Kojima and Blair, 2001). Dadurch wird die Interaktion zwischen MotA und FliG (einer Rotorkomponente) verändert und das Drehmoment erzeugt.

Der C-Ring liegt unterhalb des MS-Rings im Zytoplasma (Schuster and Baeuerlein, 1992). Er ist aus den Proteinen FliM und FliN aufgebaut (Zhao et al., 1996). Bindet das phosphorylierte Chemotaxisprotein CheY-P an FliM, bewirkt es dort eine Konformationsänderung, die sich wiederum auf FliG überträgt und die Rotationsrichtung der Flagelle beeinflusst. FliG, FliM und FliN werden zusammen auch als Schalterkomplex (switch-complex) bezeichnet, da sie zusammen für das Umschalten des

Drehsinns der Flagelle von Bedeutung sind. Es wird angenommen, dass C-Ring und MS-Ring zusammen den Rotor des Motors bilden und sich als eine Einheit drehen.

In der Mitte des C-Rings ist in Gefrierbruch-Abbildungen eine Struktur zu erkennen, bei der es sich wahrscheinlich um den Exportapparat handelt (Abbildung 24b).

5.4. Die Assemblierung

Bei der Synthese der Flagelle wird zunächst der MS-Ring aus FliF gebildet. Anschließend wird FliG und der C-Ring bestehend aus FliM und FliN angehängt. Im nächsten Schritt wird der Exportapparat aus den Proteinen FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ und FliR aufgebaut, der dazu dient, die Flagellinmoleküle zum Aufbau weiterer Axialstrukturen durch den Kanal in der Mitte des MS-Rings zu schleusen. Verschiedene zytoplasmatische Chaperone unterstützen den Transportprozess, indem sie die unkontrollierte Aggregation im Zytoplasma verhindern. Die nächsten Komponenten im Assemblierungsprozess der Flagelle sind die proximale Achse (FlgB, FlgC, FlgF) und die distale Achse (FlgG). FliE bildet vermutlich eine Verbindung zwischen dem MS-Ring und der proximalen Achse. Die Assemblierung des Hakens beginnt zwar, schreitet aber nicht weiter fort, solange der P- und L-Ring (FlgI und FlgH) nicht vollständig integriert sind. Der Haken wird mit Hilfe einer Kappenstruktur (FliD) am distalen Ende aufgebaut. Diese Kappe wird nach dem Erreichen der Gesamtlänge des Hakens entfernt. Der genaue Mechanismus der Längenkontrolle ist nicht bekannt, allerdings spielt FliK dabei eine entscheidende Rolle. Die Haken-assoziierten Proteine HAP1 (FlgK), HAP3 (FlgL) und HAP2 (FliD) werden in dieser Reihenfolge angebaut, so dass nun die Flagellinuntereinheiten (FliC) das Filament unter einer pentameren Kappe (FliD) am distalen Ende angelagert werden können (Berg, 2003).

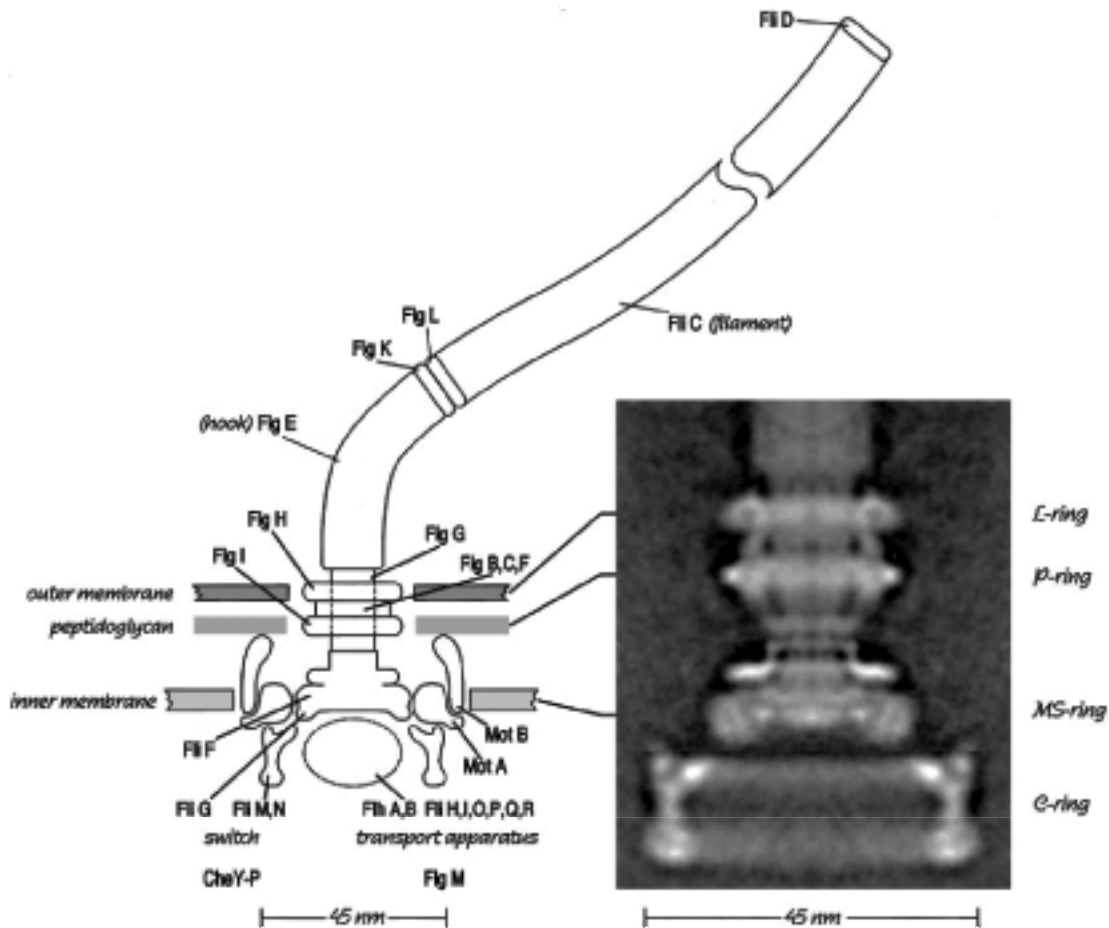


Abbildung 23 (aus (Berg, 2003))

Schema des Flagellenmotors im Vergleich zur rotationssymmetrisch gemittelten Rekonstruktion von etwa 100 in Eis eingebettete Hacken-Basalkörperkomplexen von *Salmonella* (SJW880) am Elektronenmikroskop. C-ring, MS-ring, P-ring, L-ring, Hacken und Hacken-assoziierte Proteine und das Filament sind die charakteristischen morphologischen Bestandteile der Flagelle. Da MotA, MotB und der Transportapparat die Extraktion nicht überstehen, fehlen sie in der rechten Abbildung. Die Verbindung zwischen dem C-Ring und dem Rest der Struktur erscheint relativ schwach zu sein.

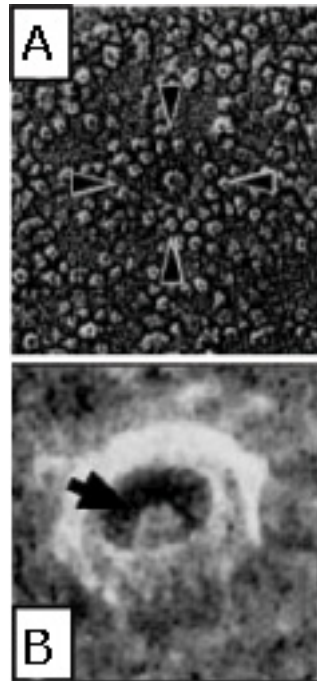


Abbildung 24 aus (Blair, 2003):

A, ringförmige Anordnung membrangebundener Proteine aus *Salmonella*, bei denen es sich wahrscheinlich um MotA/MotB Komplexe (Stator) handelt. In der Mitte befindet sich der proximale Teil der Achse des Basalkörpers. Der innere Durchmesser des Proteinrings beträgt etwa 30 nm.

B, der Pfeil deutet auf einen zentralen Teil des C-Rings, bei dem es sich wahrscheinlich um den Exportapparat handelt, der für die Assemblierung der äußeren Flagellenstrukturen von Bedeutung ist (Blickrichtung aus dem Zellinneren).

5.5. Ergebnisse

Mit Hilfe der Elektronentomographie wurde der dreidimensionale Aufbau des Flagellenmotors von *Thermotoga maritima* untersucht. Die Zellwand dieser Bakterien besteht aus einer äußeren Membran, die vorwiegend aus einem hexagonalen Gitter des Porins Omp β aufgebaut ist (Engel et al., 1993; Rachel et al., 1990). Das Protein Omp α verankert die äußere Membran an den Längsseiten der Zelle an das Peptidoglycan. Sie hat damit einen konstanten Abstand von etwa 50nm zur inneren Membran (Lupas et al., 1995). Das ungewöhnliche Murein dieser Zellen bildet keinen Sacculus und kommt höchstens stellenweise in der Zellwand vor (Huber et al., 1986). Etwa 5-10 % der Zellen einer Kultur sind monotrich begeißelt. Mit den Flagellen, die sich vorwiegend im Uhrzeigersinn drehen, erreichen die Zellen bei einer Temperatur von 85°C Maximalgeschwindigkeiten von etwa 60 $\mu\text{m/s}$ (Gluch et al., 1995).

Die Position, an der die Flagelle in *Thermotoga maritima* Zellen entspringt, ist bereits in zweidimensionalen Abbildungen gut zu erkennen. Sie liegt im Seitenbereich der Zelle in der Nähe des Zellpols (Abbildung 25).

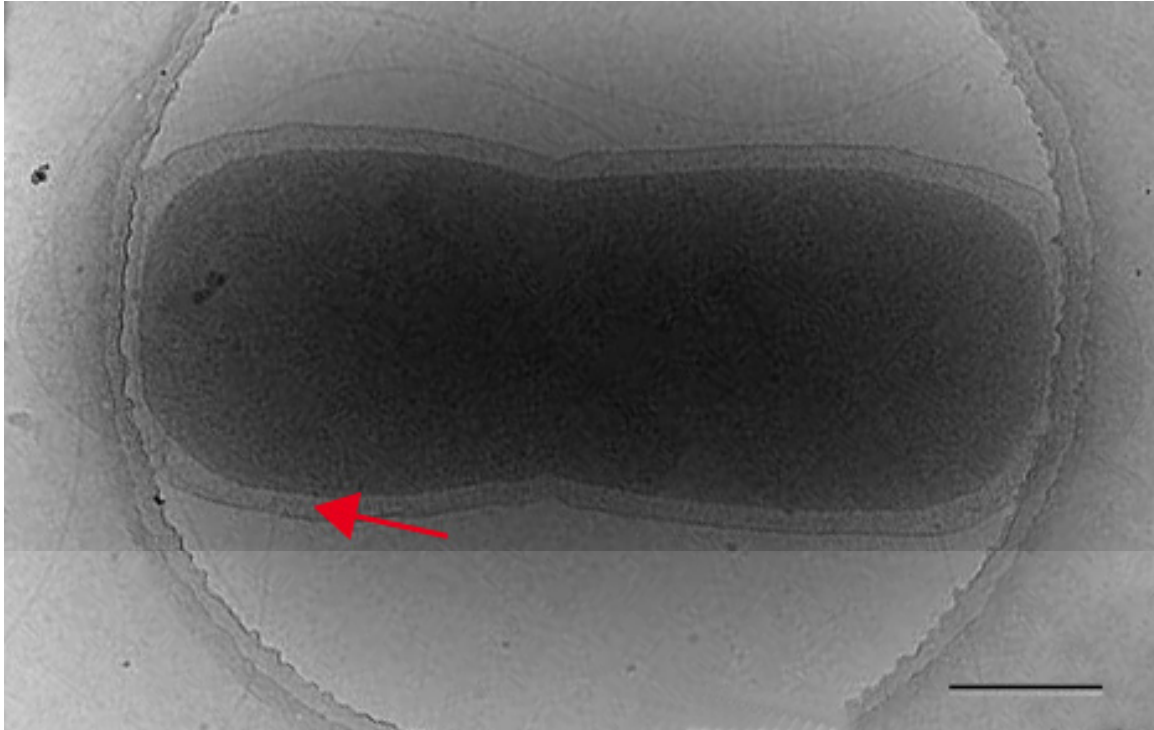


Abbildung 25

2D-Aufnahme von *Thermotoga maritima* bei einem Defokus von $-12 \mu\text{m}$ (Gruska, 2004). Der Pfeil deutet auf die Position, an der die Flagelle in die Zelle eindringt.

Balken: 200 nm

Im Folgenden werden die aus den Rekonstruktionen gewonnenen Ergebnisse vorgestellt. Die verwendeten Abbildungen entstammen aus einem Datensatz, der aus 75 Projektionen (Kippbereich von $-57,5^\circ$ bis 54° mit einem Inkrement von $1,5^\circ$) besteht und der bei einem Defokus von $-12 \mu\text{m}$ aufgenommen wurde (Gruska, 2004).

Abbildung 26 zeigt den generellen Aufbau der Flagelle, die sich aus dem Filament, dem Haken und dem in der Zellwand verankerten Flagellenmotor zusammensetzt. Das Filament dieser Zelle ist etwa $12 \mu\text{m}$ lang und hat einen Durchmesser von 12 nm. Der Haken hat eine Länge von 85 nm und besitzt einen Durchmesser von ca. 20 nm. Der in der Zellwand eingebettete Motor reicht bis ins Zytoplasma. Er hat eine Gesamtlänge von 70 nm und einen maximalen Durchmesser von 56 nm.

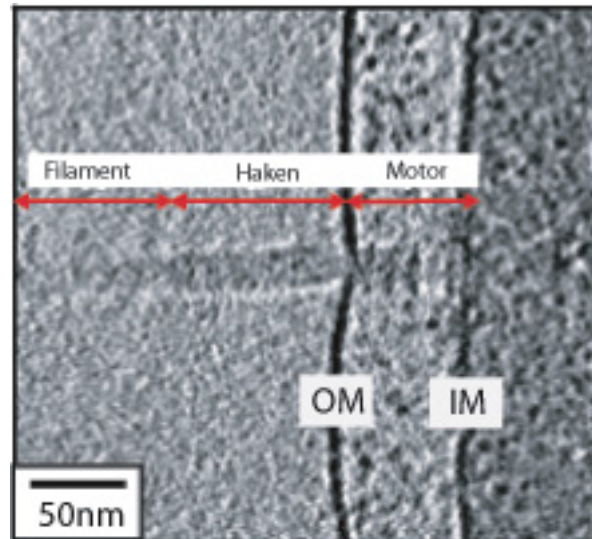


Abbildung 26 nach (Gruska, 2004), modifiziert

Übersicht über den Aufbau der Flagelle von *Thermotoga maritima*. 23 nm dicke XY-Projektion einer Rekonstruktion. Der Datensatz wurde an der Zelle aus Abbildung CC aufgenommen. Ein Teil des Filaments, der Haken und der in der Zellwand verankerte Motor sind deutlich zu erkennen.

Der Flagellenmotor zeigt einen ähnlichen Aufbau wie er für andere Gram-negative Bakterien beschrieben ist. In Abbildung 27 sind die Komponenten des Motorkomplexes farblich hervorgehoben. Von der äußeren Membran beginnend sind zunächst das L-P Ringpaar zu erkennen. Der nächste Ring ist eine zusätzliche Struktur, die vom Schema des Gram-negativen Flagellenmotors abweicht. In Anlehnung an den Basalkörper des Gram-negativen Bakteriums *Caulobacter crescentus*, der ebenfalls einen zusätzlichen Ring besitzt (Stallmeyer et al., 1989), wird dieser Ring als E (Extra)- Ring bezeichnet. Es folgt ein kontrastschwächeres Ringpaar, der MS-Ringkomplex. Der M-Ring ist in die innere Membran eingebettet und wird vom Mot-Ring umgeben. Im Zytoplasma findet sich der als C-Ring bezeichnete Proteinkomplex.

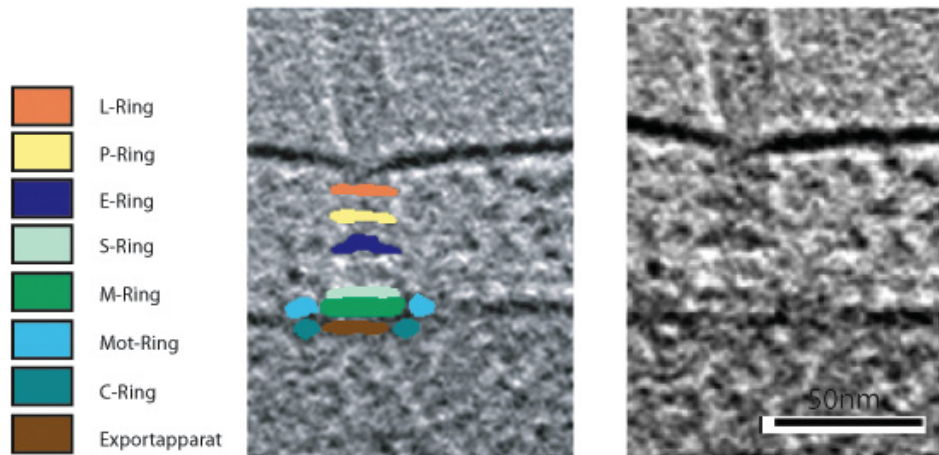


Abbildung 27 (Gruska, 2004)

Der Flagellenmotor von *Thermotoga maritima*. In der linken Abbildung sind die einzelnen Bestandteile des Motors gekennzeichnet, die aus der Rekonstruktion (linke Abbildung) erkennbar sind. Die linke Abbildung zeigt eine 23 nm dicke XY-Projektion des Flagellenmotors. Balken: 50 nm.

5.5.1. Die Ringe des Flagellenmotors

Die einzelnen Ringe des Flagellenmotors von *Thermotoga maritima* wurden in xy-Schnitten des Tomogramms vermessen (Tabelle 2). Wegen des starken Defokus des Datensatzes sind die angegebenen Werte begrenzt genau, sie geben die Größenverhältnisse aber annähernd wieder.

Der in die äußere Membran eingebettete L-Ring ist 21,9 nm im Durchmesser, er ist von der von der sehr kontrastreichen äußeren Membran umgeben. Der Durchmesser des P-Rings beträgt 24,9 nm, und der des E-Rings 23,2 nm und ist damit der Größe des L- und des P-Rings sehr ähnlich. Die Dicke der Ringe mit ca. 4 nm liegt an der Grenze der Auflösung des Datensatzes.

Der in der inneren Membran befindliche Ringkomplex besteht aus dem S-Ring (Durchmesser 24,6 nm, Dicke 4,2 nm) und dem M-Ring (Durchmesser 31,4 nm, Dicke 6,1 nm). Er ist vom Mot-Ring umgeben, der einen Durchmesser von 55,9 nm und eine Dicke von 9,6 nm besitzt. Die damit größte Komponente des Motors scheint aus 11 Proteinkomplexen zu bestehen (Abbildung 28).

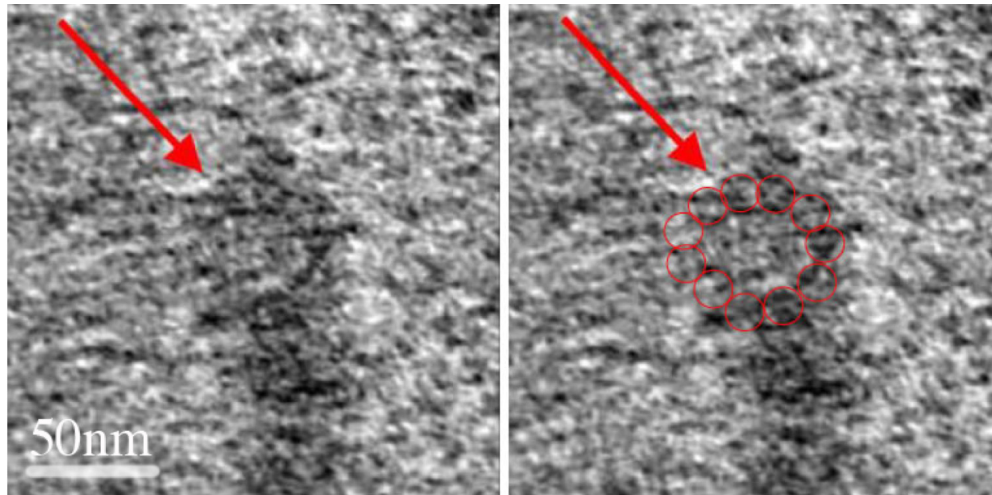


Abbildung 28: Der Mot-Ringkomplex (Gruska, 2004).

Auf der linken Seite ist ein yz-Schnitt durch den Mot-Ring (roter Pfeil) mit einer Dicke von 8 nm dargestellt. Auf der rechten Seite sind in demselben Schnitt die 11 Proteinkomplexe hervorgehoben, die den Mot-Ring von *Thermotoga maritima* bilden.

Der C-Ring-Komplex liegt direkt unterhalb der Zytoplasma-Membran und ist der zweitgrößte Ring des Flagellenmotors mit einem Durchmesser von 49,1 nm und einer Dicke von 9,6 nm. Er umschließt den Exportapparat, dessen Abmessungen allerdings nicht aus dem Tomogramm entnommen werden konnten.

In der Tabelle 2 sind die Maße der Ringe zusammengefasst.

Tabelle2: Komponenten und Maße des Flagellenmotors aus *Thermotoga maritima*

	Äußerer Durchmesser in nm	Dicke in nm
L-Ring	21,9	4,1
P-Ring	24,9	4,1
E-Ring	23,2	4,1
S-Ring	24,6	6,1
M-Ring	31,4	6,1
Mot-Ring	55,9	9,6
C-Ring	49,1	9,6

5.5.2. Visualisierung des Flagellenmotors

Nach Entrauschen des Datensatzes durch die nichtlineare, anisotrope Diffusionsfilterung (Frangakis and Hegerl, 2001) wurde der Flagellenmotor rotationssymmetrisch gemittelt und dreidimensional dargestellt (Abbildungen 29a-d). Die Dimensionen der Ringe nach der Rotationsmittelung sind vergleichbar mit den Werten, die aus dem Tomogramm ermittelt wurden.

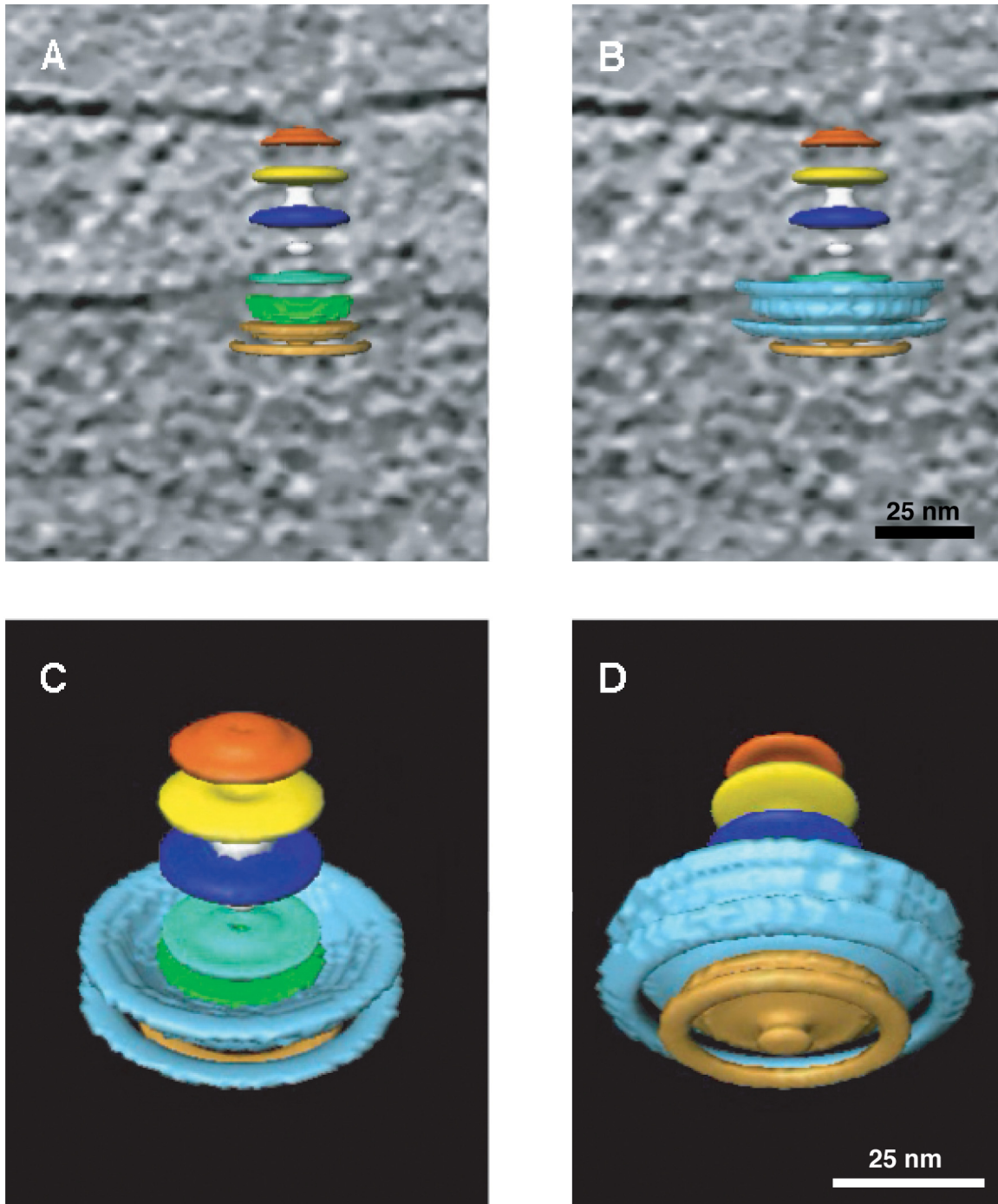


Abbildung 29:

A-D: Visualisierung des rotationssymmetrisch gemittelten Flagellenmotors von *Thermotoga maritima*. Die einzelnen Ringe sind farblich gekennzeichnet: rot: L-Ring, gelb: P-Ring, dunkelblau: E-Ring, hellgrün: S-Ring, dunkelgrün: M-Ring, braun: C-Ring mit Exportapparat, hellblau: Mot-Ring. Abbildungen A und B zeigen das gemittelte Modell im zellulären Kontext zwischen der inneren und der äußeren Membran eingebettet.

5.5.3. Der zytoplasmatische Tunnel

In der Rekonstruktion ist eine weitere Struktur zu finden, die mit der Flagelle von *Thermotoga maritima* in Verbindung steht. In horizontalen Schnitten erkennt man ein kontrastschwaches Band, das sich im Zytoplasma vom C-Ring des Flagellenmotors aus in Richtung des Zellpols erstreckt (Abbildung 30). Im Querschnitt (Abbildung 31) wird deutlich, dass es sich um eine Röhre mit einem Durchmesser von 23,3 nm handelt. Diese Struktur wird deshalb im Folgenden als ‚zytoplasmatischer Tunnel‘ bezeichnet.

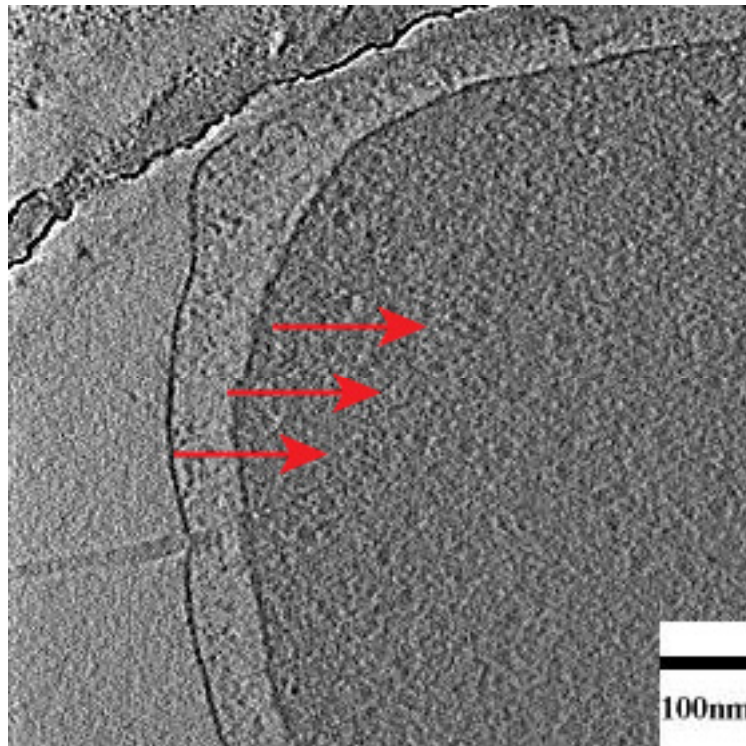


Abbildung 30: Zytoplasmatischer Tunnel (Gruska, 2004, modifiziert)

4 nm dicke XY-Projektion eines Tomogramms einer *Thermotoga maritima* Zelle. Der Verlauf des zytoplasmatischen Tunnels, der sich vom C-Ring des Flagellenmotors durch das Zytoplasma in Richtung des Zellpols erstreckt, ist mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

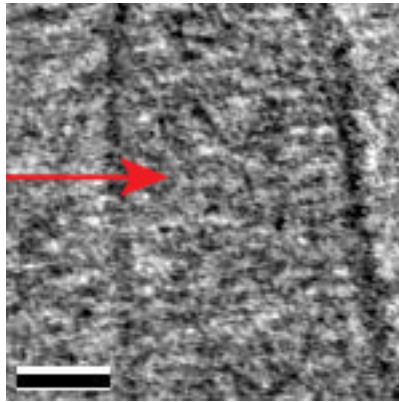


Abbildung 31 (Gruska, 2004):

Zytoplasmatischer Tunnel im Querschnitt. Die 5,5 nm dicke Projektion zeigt die röhrenförmige Struktur des Tunnels (Pfeil). Balken: 25 nm

Da der zytoplasmatische Tunnel aufgrund des ‚molecular crowdings‘ und der Dicke der Zelle nur sehr schwer zu erkennen ist, wurde eine Textur-statistische Analyse an den einzelnen Schichten des Tomogramms durchgeführt. Dabei konnten zwei Texturen unterschieden werden: Eine innerhalb und eine außerhalb der Tunnelstruktur. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 32 dargestellt. Die rote Markierung kennzeichnet den Bereich außerhalb des Tunnels. Die Textur innerhalb des Tunnels ist mit blauer Farbe markiert. Die Tunnelwand konnte anschließend an der Grenze zwischen den beiden Texturen identifiziert werden (gelb).

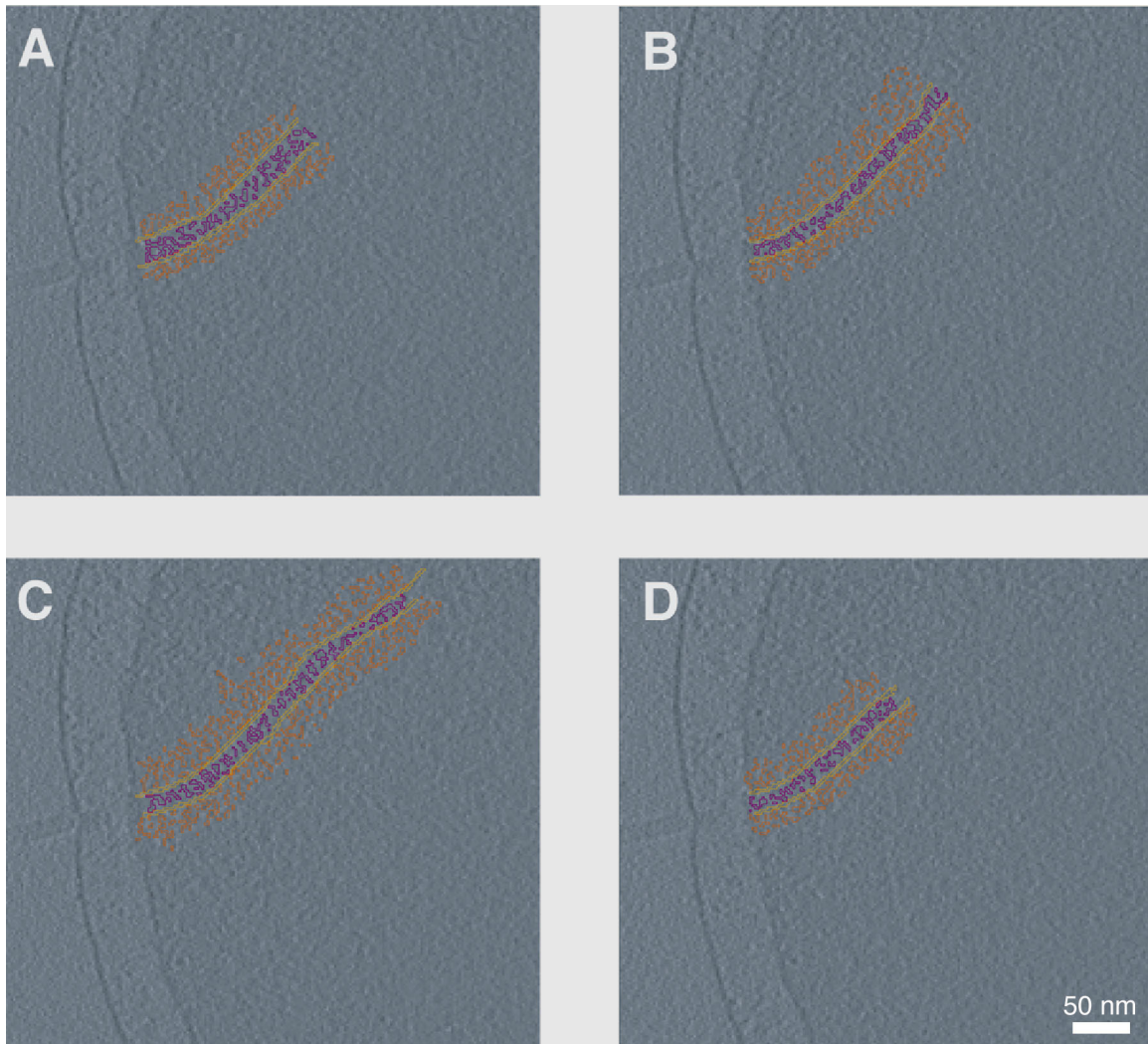


Abbildung 32:

Texturanalyse des zytoplasmatischen Tunnels. Mittels einer Textur-statistischen Analyse konnten zwei Texturen an vier aufeinander folgenden Schichten eines Tomogramms (A-D) unterschieden werden. Eine außerhalb des Tunnels (rot), die andere innerhalb des Tunnels (blau). Die Grenzen zwischen den beiden Texturen entsprechen der Tunnelwand und sind mit gelber Farbe eingezeichnet.

5.6. Diskussion des Flagellenmotors von *Thermotoga maritima*

Mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie konnte der Flagellenmotor von *Thermotoga maritima* zum ersten Mal an einer Zelle im nativen Zustand räumlich untersucht und dargestellt werden. Es konnten neue Erkenntnisse über seinen Aufbau, seine Position in der Zelle und einer bis jetzt unbekanntem Verbindungsstruktur in das Zytoplasma gewonnen werden.

Die Verankerungsposition der Flagelle seitlich an der Zelle in der Nähe des Zellpols konnte anhand der dreidimensionalen Rekonstruktionen eindeutig bestimmt werden. Anhand früherer Untersuchungen konnten zwar die Flagellen bis zum Zellkörper verfolgt werden, doch ihre Verankerung war bisher nicht darstellbar.

Vergleicht man den Flagellenmotor von *Thermotoga maritima* mit dem anderer Gram-negativer Bakterien, sind einige gemeinsame Merkmale zu verzeichnen. So stimmen die Grundstruktur des L-P-Rings und des M-S-Ringkomplexes mit dem allgemeinen Motormodell Gram-negativer Bakterien überein. Im Flagellenmotor von *Thermotoga maritima* liegt zwischen diesen beiden Ringpaaren ein zusätzlicher Ring, der in gleicher Position auch bei dem Bakterium *Caulobacter crescentus* beschrieben wurde (Stallmeyer et al., 1989). Die Extra (E-)-Ringstruktur hat eine bisher unbekannte Funktion. Auch ist unklar, mit welchen anderen im Periplasma angesiedelten Strukturen er in Wechselwirkung tritt.

In früheren Arbeiten an den Flagellen von *Thermotoga maritima* wurde dieser E-Ring nicht beobachtet (Gluch, 1993) (Abbildung 33). Es ist nicht auszuschließen, dass diese Struktur labil ist und durch die Isolation und Kontrastierung verlorengeht. So ist vorläufig unklar, ob die Flagellenmotoren anderer Bakterien ebenfalls einen zusätzlichen Ring besitzen, der zu instabil ist um isolierbar zu sein, oder der E-Ring nur auf wenige Arten, u.a. *Caulobacter crescentus* und *Thermotoga maritima* beschränkt ist.

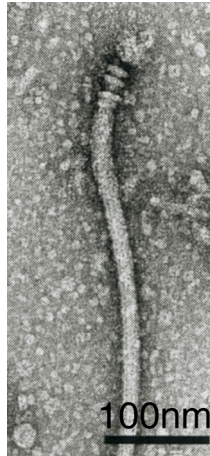


Abbildung 33 aus (Gluch, 1993)
Isolierte, kontrastierte Flagelle von *Thermotoga maritima*. Der E-Ring scheint während der Präparation verloren zu gehen.

In *Caulobacter crescentus* scheint der E-Ring eine Rolle im ungewöhnlichen Zellzyklus dieses Bakteriums zu spielen. Der Flagellenaufbau findet am Ende der Zellteilung bei einem Teil der Zellen statt. Später wird bei flagellentragenden Zellen der Komplex aus Achse, Haken und Filament abgestoßen und es entsteht eine Art Stiel an dieser Stelle (Jensen et al., 2002). Es wird angenommen, dass der E-Ring eine Rolle bei diesem Abstoßungsprozess spielt (Stallmeyer et al., 1989).

Für *Thermotoga maritima* ist ein Zellzyklus dieser Art nicht beschrieben. Demnach sollte der E-Ring eine andere Funktion besitzen. Da die Zellwand und der periplasmatische Raum von *Thermotoga maritima* mit etwa 50 nm wesentlich breiter ist als etwa die Zellwand von *Escherichia coli* mit ungefähr 30 nm, könnte der E-Ring daran beteiligt sein, diesen größeren Abstand zu überbrücken und damit den gesamten Motor stabilisieren.

Mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie konnte zum ersten Mal der Mot-Ring ohne zusätzliche Kontrastierungstechnik dreidimensional untersucht werden. Dieser Ring wird bei *Thermotoga maritima* aus 11 Komplexen gebildet. Untersuchungen an verschiedenen Bakterien ergab jeweils einen Aufbau aus zwischen 10 und 16 Komplexeinheiten (Kahn

et al., 1988). Somit liegt die Anzahl der Mot-Komplexe von *Thermotoga maritima* im für Gram-negative Bakterien erwarteten Bereich.

Sowohl der Mot-Ring als auch der Exportapparat dieses Flagellenmotors konnten erstmals in TEM-Aufnahmen im zellulären Kontext nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Gefrierbruchtechnik im Rasterelektronenmikroskop abgebildete Komplexe deuten zwar bereits die Grundstruktur des Mot-Rings an, boten aber noch keine 3D-Information (Blair, 2003; Kahn et al., 1991).

Die Abmessungen des Flagellenmotors von *Thermotoga maritima* sind in Tabelle 3 den bekannten Abmessungen der Flagellenmotoren von *Salmonella typhimurium* und *Caulobacter crescentus* gegenübergestellt. Da die Werte allerdings mit verschiedensten Präparationen gemessen wurden, liefern sie nur Richtwerte. In ihren Dimensionen sind die einzelnen Ringe der zum Vergleich herangezogenen Bakterien weitgehend ähnlich. Ein deutlicher Unterschied liegt im äußeren Durchmesser des Mot-Rings von *Thermotoga maritima*, der mit 55,9 nm deutlich größer ist als der von *Salmonella typhimurium* mit nur 34,4 nm (Tabelle 3). Ein weiterer, gravierender Unterschied liegt in der Länge der Achse, die bei *Thermotoga maritima* mit 68 nm etwa doppelt so lang ist wie bei *Salmonella typhimurium* und *Caulobacter crescentus* (Tabelle 3). Möglicherweise erklärt sich die Existenz eines zusätzlichen Ringkomplexes bei *Thermotoga maritima* im Zusammenhang mit der längeren Achse.

	<i>Thermotoga maritima</i>		<i>Salmonella thyphimurium</i>		<i>Caulobacter crescentus</i>	
	Äußerer Durchmesser in nm	Dicke in nm	Äußerer Durchmesser in nm	Dicke in nm	Äußerer Durchmesser in nm	Dicke in nm
L-Ring	21,9	4,1	26,0 ¹	5,2 ^{1*}	31 ²	7,9 ^{2*}
P-Ring	24,9	4,1	27,5 ¹	6,4 ^{1*}	25 ²	5,9 ^{2*}
L-/P-Ring	-	15,3	-	16 ¹	-	14,7 ^{2*}
E-Ring	23,2	4,1	-	-	20 ²	2,7 ^{2*}
S-Ring	24,6	4,1	26,5 ¹	5,0 ¹	24 ²	2,9 ^{2*}
M-Ring	31,4	6,1	27,5 ¹	6,5 ¹	31 ²	5,9 ^{2*}
S-/M-Ring	-	12,5	-	11,5 ¹	-	8,8 ^{2*}
C-Ring	49,1	9,6	41 ³	23 ³	-	-
Mot-Ring	55,9	9,6	34,4 ^{4*}	-	-	-
Achse	11,3	56,9	11,5 ¹	27 ^{1*}	-	23,5 ^{2*}
Basalkörper (Haken-Ende bis einschließlich M-Ring)	-	68,1	-	36,5 ^{1*}	-	33,8 ^{2*}

Tabelle 3:

1. (Sosinsky et al., 1992)
2. (Stallmeyer et al., 1989), nach der Präparationsmethode von Suzuki, 1978
3. (Katayama et al., 1996)
4. (Kahn et al., 1991)

Aufgrund der Möglichkeit, eine einzelne, intakte Zelle durch Elektronentomographie zu untersuchen, konnte die als zytoplasmatischer Tunnel bezeichnete Struktur identifiziert werden. Diese röhrenförmige Struktur, die am Flagellenmotor beginnt und sich ins Zytoplasma in Richtung des Zellpols fortsetzt, wurde bisher weder in *Thermotoga maritima* noch in anderen Prokaryonten beschrieben. Erst mit der Kryoelektronentomographie war es möglich, räumliche Untersuchungen an nahezu intakten zellulären Systemen durchzuführen und auch fragile Strukturen sichtbar zu machen. Die Funktion des Tunnels ist nicht geklärt. Es lässt sich darüber spekulieren, dass er eine Verbindung zwischen dem Flagellenmotor und den an den Zellpolen befindlichen Chemorezeptoren (siehe dazu Kapitel 5.2.) herstellen könnte. Über das phosphorylierte

Chemotaxisprotein CheY-P als Botenstoff einer internen Signalkette reagiert die Zelle auf veränderte Umweltbedingungen, die sie mit den Chemorezeptoren wahrnimmt. CheY-P lagert sich an den C-Ring des Flagellenmotors an und bewirkt eine Änderung in der Drehrichtung der Flagelle. Es ist vorstellbar, dass über diesen zytoplasmatischen Tunnel eine gerichtete Diffusion von CheY-P stattfinden könnte. Dies hätte im Vergleich zur freien Diffusion eine Effektivitätssteigerung der Signaltransduktion zur Folge, die sich in kürzeren Reaktionszeiten äußert.

Allerdings reicht die Öffnung der Tunnelstruktur nicht an beliebige Stellen des Clusters und könnte somit nur von bestimmten Regionen das chemische Signal aufnehmen. Zur weiteren Untersuchung dieser Hypothese müssten weitere Strukturdaten gewonnen und die biochemische Identität der Struktur aufgeklärt werden.

6. Die terminal plugs von *Methanospirillum hungatei*

6.1. *Methanospirillum hungatei*

Die zu den methanogenen Archaeen gehörende Art *Methanospirillum hungatei* (Ferry et al., 1974) zeichnet sich durch eine einzigartige, mehrschichtig parakristallin aufgebaute extrazelluläre Struktur aus. Seit ihrer Entdeckung geben diese *plugs* der Forschung Rätsel über deren Aufbau und Funktion auf (Beveridge et al., 1991; Firtel et al., 1994; Shaw et al., 1985; Southam et al., 1993; Zeikus and Bowen, 1975).

Die Zellen von *Methanospirillum hungatei* kommen als einzelne Zellen oder auch als Zellketten vor, die mehrere Hundert μm lang werden können. Jede Zelle besitzt an ihren Zellpolen so genannte *plugs*, die entweder die Zellen in einer Zellkette (*spacer plug*) voneinander trennen oder aber den Abschluss einer Zellkette bilden (*terminal plug*).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden mit fixierten, mit Schwermetallen kontrastierten und in Kunstharz eingebetteten Zellen durchgeführt (Beveridge et al., 1990; Firtel et al., 1993; Shaw et al., 1985; Southam et al., 1993; Zeikus and Bowen, 1975). Sie zeigten, dass mehrere, regelmäßig strukturierte S-Layer-ähnliche Schichten an dem Aufbau der *plugs* beteiligt sind.

Um den dreidimensionalen Aufbau dieser Strukturen aufzuklären, wurden die Ergebnisse von isolierten *plug*-schichten und längsgeschnittenen ganzen Zellen herangezogen. Allerdings konnten auf diese Weise nur ein möglicher Aufbau der *plugs* vorgeschlagen werden. Die verwendeten klassischen EM-Methoden erlaubten es nicht, die dreidimensionale Struktur aufzuklären. Mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie sollte die genaue Anzahl der Schichten, ihre regelmäßige Substruktur und ihre Anordnung im Verhältnis zueinander aufgeklärt werden.

6.2. Ergebnisse

Untersucht man die Zellen von *Methanospirillum hungatei* bei niedriger Vergrößerung im Mikroskop, erkennt man lange, mit der Längsachse parallel zum Grid angeordnete

Filamente. Der Durchmesser der Zellen liegt konstant bei etwa 440 nm, die Länge ist dagegen sehr variabel (Abbildung 34a).

Jede einzelne Zelle ist neben der Zellmembran von einer Zellwand mit einem S-Layer umgeben. Zusätzlich sind alle Zellen eines Filaments gemeinsam von einer dritten Hülle, der so genannten Scheide, umschlossen. Alle drei Hüllschichten haben zusammen eine Dicke von etwa 36nm. An den Zellpolen sind die charakteristischen *plugs* zu erkennen, die mit 47 nm deutlich dicker als die Zellwand sind.

Für die Kippserien wurden die *terminal plugs* ausgewählt, die entweder senkrecht zur Kippachse oder parallel dazu angeordnet waren. Bei paralleler Orientierung ergibt sich eine gute Auflösung in den senkrecht dazu liegenden Schichten des *plugs* und eine schwächere Auflösung in den parallel angeordneten Hüllschichten bzw. umgekehrt bei um 90° geänderter Orientierung. Ursache hierfür ist der ‚missing wedge‘, der durch den limitierten Kippwinkel hervorgerufen wird.

Abbildung 34a zeigt einen XY-Schnitt durch ein Tomogramm eines Zellterminus. Der Längsschnitt ist eine Projektion von 10 Einzelschnitten mit einer Gesamtdicke von 34 nm. Erkennbar sind die drei Hüllschichten, der extrazelluläre *plug* und neben kurzen, filamentösen Strukturen auch lange Flagellen, die den *plug* zu durchdringen scheinen (34b,c). Allerdings konnte bis jetzt die Verankerung der Flagellen nicht aufgelöst werden. Im dichtgepackten Zytoplasma findet man häufig *inclusion body* – ähnliche Partikel, die eine kugelige Gestalt haben und einem Durchmesser von ca. 100 nm aufweisen (34a).

Die Scheide von *Methanospirillum hungatei* hat die Form eines Zylinders mit einer glatten Außenseite und einer regelmäßig gestreiften Innenseite mit einem Streifenabstand von jeweils 11,5 nm (34d). Der regelmäßige Abstand dieser Streifen lässt sich auch im Powerspektrum nachweisen (34d). Von außen nach innen folgt nach der Scheide der hexagonal symmetrische S-Layer. Der Ordnungszustand des Gitters scheint in der Nähe des Plugs schlechter zu sein als an den Seiten des Zylinders. Dies ist die Zone des Übergangs, bei der die ursprüngliche Periodizität nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Die Zylinderwand kann von einem in sich geschlossenen 2D-Kristall gebildet werden und somit wie andere S-Layer eine hohe Ordnung bewahren (Paul et al., 1992; Wildhaber and Baumeister, 1987) Die darauf folgende Zellmembran ist strukturell amorph und weist keine Periodizität auf.

Der *plug* besteht aus fünf einzelnen Schichten mit einem regelmäßigen Abstand der Schichten von jeweils 12 nm. Die gesamte Struktur ist etwa 47 nm dick und beginnt etwa 16 nm entfernt vom polar liegenden Teil des S-Layers.

Durch die Möglichkeit, die Tomogramme in jeder beliebigen Richtung virtuell zu schneiden, können die parakristallinen Schichten in geeigneter Orientierung dargestellt und untersucht werden (34e). Das hexagonale Gitter der Schichten ist auch im Powerspektrum nachweisbar (34e). Aufgrund der Krümmung des Gitters im *plug* ist im Schnitt nur ein Teil der hexagonalen Anordnung sichtbar. es ist ersichtlich, dass der *plug* aus fünf aufeinander folgenden, gekrümmten parakristallinen Schichten besteht.

6.2.1. Die Dreidimensionale Korrelationsmittelung der terminal plugs

Mit Hilfe der dreidimensionalen Korrelationsmittelung konnte die Struktur des *plugs* genauer untersucht werden. Dieses von Dr. Reiner Hergerl entwickelte Verfahren ist in Kapitel 3.6. genauer beschrieben.

Als erste Referenz wurde ein kleines Volumen aus der Mitte der zweiten und dritten *plug*-Schicht entnommen. Mit Hilfe der Korrelationsmittelung konnte diese Referenz durch Addition gut alignierter Untereinheiten sowohl in der Auflösung als auch im Signal-zu-Rausch Verhältnis verbessert werden. Die Referenz folgt dabei der Krümmung der Schichten. Die Abbildungen 34f und 34g zeigen orthogonale Schnitte durch die dreidimensionale Kreuzkorrelationsfunktion. Diese Funktion enthält die einzelnen Kreuzkorrelationsmaxima, die sich durch die Variation der Orientierung der Referenz ergeben. Die Korrelationsmaxima sind auf der Oberfläche einer imaginären Kugel angeordnet. Bei Anwendung eines Radius von 499 Pixeln liegen 261 Maxima mit einer Standardabweichung von nur 0.5941 Pixeln auf dieser Kugeloberfläche. Diese Analyse zeigt bereits, dass die *plug*-Strukturen nicht planar sind, sondern eine gekrümmte Struktur aufweisen.

Die gemittelte Struktur wurde anschließend dazu verwendet, ein rauschfreies Modell der Schichten zu generieren. Sie wurde als Baustein an jeder Maximumsposition mit der entsprechenden Orientierung eingesetzt. Das Ergebnis sind glatte Schichten (35e), die sich

dreidimensional darstellen lassen (Abb. 35c, 35d). Der Schwellwert hierfür wurde willkürlich gewählt, da die Zusammensetzung der Schichten nicht bekannt ist.

Alle *plug*-Schichten weisen dieselbe Krümmung auf und bestehen aus einem hexagonalen Gitter mit einer Gittervektorenlänge von 18,1 nm. Sie sind so angeordnet, dass jeweils die Löcher der Gitter genau übereinander liegen. Die äußerste Schicht (blau) ist ein einfaches, glattes Gitter. Die Struktur der beiden folgenden Schichten (grün) scheint identisch zu sein. Die Gitterstreben der zweiten und dritten Schicht wölben sich in Richtung der Löcher der ersten Schicht. Die Gitter dieser beiden Schichten sind nahezu störungsfrei, soweit dies aus den Korrelationsfunktionen abgeleitet werden kann.

Die nächsten beiden Schichten (rot) stehen in enger Beziehung zueinander. Die innerste Schicht (Nummer fünf) ist den Schichten zwei und drei ähnlich und ist mit der Zwischenschicht (Nummer vier) mit hakenähnlichen Strukturen verbunden. Diese vierte Schicht ist schwierig zu erkennen, da sie neben ihrer komplexen Struktur zudem weniger dicht erscheint. Die Form der einzelnen Schichten ist allerdings durch den ‚missing-wedge‘ Effekt beeinflusst. Hierbei können mögliche Symmetrieachsen des quasi-hexagonalen Gitter verzerrt sein.

Die filamentösen Strukturen außerhalb des *plugs* sind nicht periodisch angeordnet und verschwinden deshalb in der dreidimensionalen Mittelung.

In einer zweiten Analyse wurden die Schichten des *plugs* individuell untersucht, um eine möglicherweise aufgezwungene Periodizität durch die allgemeine Korrelationsmittelung ausschließen zu können. Hierfür wurden die einzelnen Schichten durch Masken, die unter Berücksichtigung der bekannten Krümmung der Schichten erstellt wurden, einzeln aus dem Originaltomogramm herausgeschnitten. Anschließend wurde jeweils ein kleiner Bereich aus der isolierten Schicht herausgeschnitten und das Powerspektrum generiert. Alle Spektren zeigten dabei dasselbe Gitter und bestätigten die vorherige Analyse. Die Gitter waren allerdings unterschiedlich gut erhalten.

Das Verfahren der allgemeinen Korrelationsmittelung wurde auch auf den S-Layer im zylindrischen Teil der Zellwand angewendet. Abbildung 36a zeigt einen Ausschnitt aus der Zellhülle von *Methanospirillum hungatei*. Die Anordnung der Komponenten ist so, dass von links nach rechts die Zytoplasma-Membran, der S-Layer und die Scheide zu erkennen sind. In Abbildung 36b ist der entsprechende Ausschnitt der

Korrelationsmittelung zu sehen. Dieser Average ist aus zwei Einzelmittelungen zusammengesetzt, da der S-Layer und die Scheide unterschiedliche Periodizitäten besitzen, die eine gemeinsame Mittelung nicht reproduziert hätte. Der Ausschnitt aus 36a wurde zwischen S-Layer und Scheide geteilt, separat gemittelt und anschließend wieder zusammengesetzt. Abbildung 36c zeigt aufeinander folgende XZ-Schichten dieses Modells. Hierbei ist die hexagonale Anordnung mit einem Gitterabstand von 15,1 nm des S-Layers und die gestreifte Struktur der Innenseite der Scheide mit einem periodischen Abstand von 11,5 nm gut zu erkennen. Abbildung 36d zeigt eine Oberflächendarstellung der zusammengesetzten Korrelationsmittelung.

6.3. Diskussion zur Struktur der Zellhülle

Durch die allgemeine Korrelationsmittelung konnten neben der dreidimensionalen Anordnung der unterschiedlichen Schichten im Plug von *Methanospirillum hungatei* auch die Feinstruktur der Schichten selbst untersucht werden.

Die Zellwand von *Methanospirillum hungatei* besteht aus einem hexagonalen Gitter mit einem Gitterabstand von 15,1 nm und bestätigt damit die Ergebnisse früherer Untersuchungen (Firtel et al., 1993). Der S-Layer weist in der Nähe der *terminalen plugs* so viele Störungen auf, dass die parakristalline Struktur fast nicht mehr zu erkennen ist. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Wachstumszone des S-Layers an den Polen liegt. Für die Scheide wurde die Wachstumszone ebenfalls dort lokalisiert (Southam and Beveridge, 1992). Der Einbau neuer Proteinuntereinheiten in den S-Layer kann nur an Gitterstörungs-Stellen von statten gehen (Harris and Scriven, 1970).

Die Verankerung der Flagellen in der Zellwand könnte ebenfalls das Gitter des S-Layers stören (Firtel et al., 1993). Dass die Flagellen den *plug* durchdringen, wurde bereits früher beschrieben (Southam et al., 1990). Die Gitter des *plugs*, der Durchmesser der Löcher in den Gittern wie auch ihre Anordnung im Verhältnis zueinander unterstützen diese Theorie, jedoch konnte die Position der Verankerung bis jetzt nicht bestimmt werden.

Die Innenwand der Scheide weist Streifen mit einem regelmäßigen Abstand von etwa 12 nm auf. Frühere Veröffentlichungen über die Scheide beschreiben sie als einen Stapel aus ‚Reifen‘. Die Breite dieser Reifen wurde mit 2,5 bis 3 nm angegeben, sie sind

vermutlich aus 2,8 mal 5,6-5,7 nm Untereinheiten aufgebaut (Beveridge et al., 1990; Blackford et al., 1994; Shaw et al., 1985). Die in den Tomogrammen nachweisbaren Streifen würden demnach jeweils vier dieser Reifen mit einer Breite von drei Nanometern enthalten. Die Auflösung der Tomogramme reicht allerdings nicht aus, um die Untereinheiten selbst aufzulösen.

Ebenfalls wurde beobachtet, dass die Breite der Reifen zwischen vier und siebenmal dem Durchmesser der Untereinheiten entspricht (Beveridge et al., 1990; Blackford et al., 1994). Blackford und Koautoren schlagen als Erklärung das Wachstum und die Reifung der einzelnen Reifen vor (Blackford et al., 1994). In den Tomogrammen erscheinen die Abstände der Streifen als konstant. Allerdings wurden die Tomogramme alle an den Zellpolen aufgenommen und die Scheide konnte so nur vom *plug* bis etwa 500 nm weit zur Zellmitte hin untersucht werden. Über die periodische Struktur der Scheide weiter von der Wachstumsregion entfernt kann deshalb keine Aussage gemacht werden.

Es wurde weiterhin die Theorie aufgestellt, dass die Scheide aus zwei Schichten besteht und dass die Steifung durch die teilweise Zerstörung der inneren Schicht hervorgerufen wird (Stewart et al., 1985). Da die Kryo-Präparation die Ultrastruktur nicht zerstört, kann die Streifung nicht als Präparationsartefakt erklärt werden. Ob die Scheide unabhängig davon tatsächlich aus zwei dünneren Schichten besteht, kann zumindest bis zum Auflösungslevel der Rekonstruktion ausgeschlossen werden.

Firtel und Koautoren haben bereits ein dreidimensionales Modell des *plugs* vorgeschlagen (Firtel et al., 1994), das mit Hilfe von Längsschnitten durch die Zelle und anhand von isolierten *plug*-Schichten generiert worden ist. Die grünen Schichten in den Abbildungen 35b-c in diesem Modell sind die beiden mittleren Schichten, es fehlen aber die beiden in Abbildung 35b-c rot markierten Schichten und die äußerste Schicht (blau) erscheint als Doppelschicht, was nicht mit der Anordnung der *plug*-Komponenten übereinstimmt. Auch konnte die Anordnung der Schichten im Verhältnis zueinander nicht aufgeklärt werden, was nur in ungestörten 3D-Strukturen gelingen kann. Somit ergibt sich aus den tomographischen Untersuchungen ein neues Bild der *plug*-Struktur.

Die Funktion des *plugs* ist immer noch Gegenstand von Spekulationen. Firtel schlug eine Rolle des *plugs* während der Methanogenese vor (Firtel et al., 1994), allerdings konnte kein direkter Beweis dafür erbracht werden. Für die Zusammensetzung der Schichten

wurden die Enzyme Methylreduktase und Hydrogenase vorgeschlagen. Betrachtet man ihre Funktion während der Methanogenese, so sind sie in den energiebildenden letzten Schritten dieses Prozesses involviert. Doch ist eine Bildung von H^+ -Gradienten bzw. ein Elektronentransport außerhalb von Membranen bzw. außerhalb der Zelle sehr unwahrscheinlich.

Einen Hinweis auf die tatsächliche Bedeutung dieser einmaligen Struktur liefern Überlegungen von Xu und Koautoren zur Funktion der Scheide von *Methanospirillum* (Xu et al., 1995). Die Scheide wurde als Druckausgleichsregulator vorgeschlagen, da die Zellen einen Innendruck von 300 bis 400 atm aushalten müssen und sich bei steigendem Druck ausdehnen. Da die Scheide nur an der Längswand der Zellfäden zu finden ist, und der osmotische Druck auch an den Zylinderenden kompensiert werden muss, ist es gut vorstellbar, dass die *terminal plugs* mit ihrer komplexen Schichtstruktur genau diese Aufgabe erfüllen. Dafür spräche auch die einer Kugeloberfläche entsprechende Krümmung der Schichten, die sich zwangsläufig ausbildet, wenn ein gleichmäßiger Druck von innen wirkt.

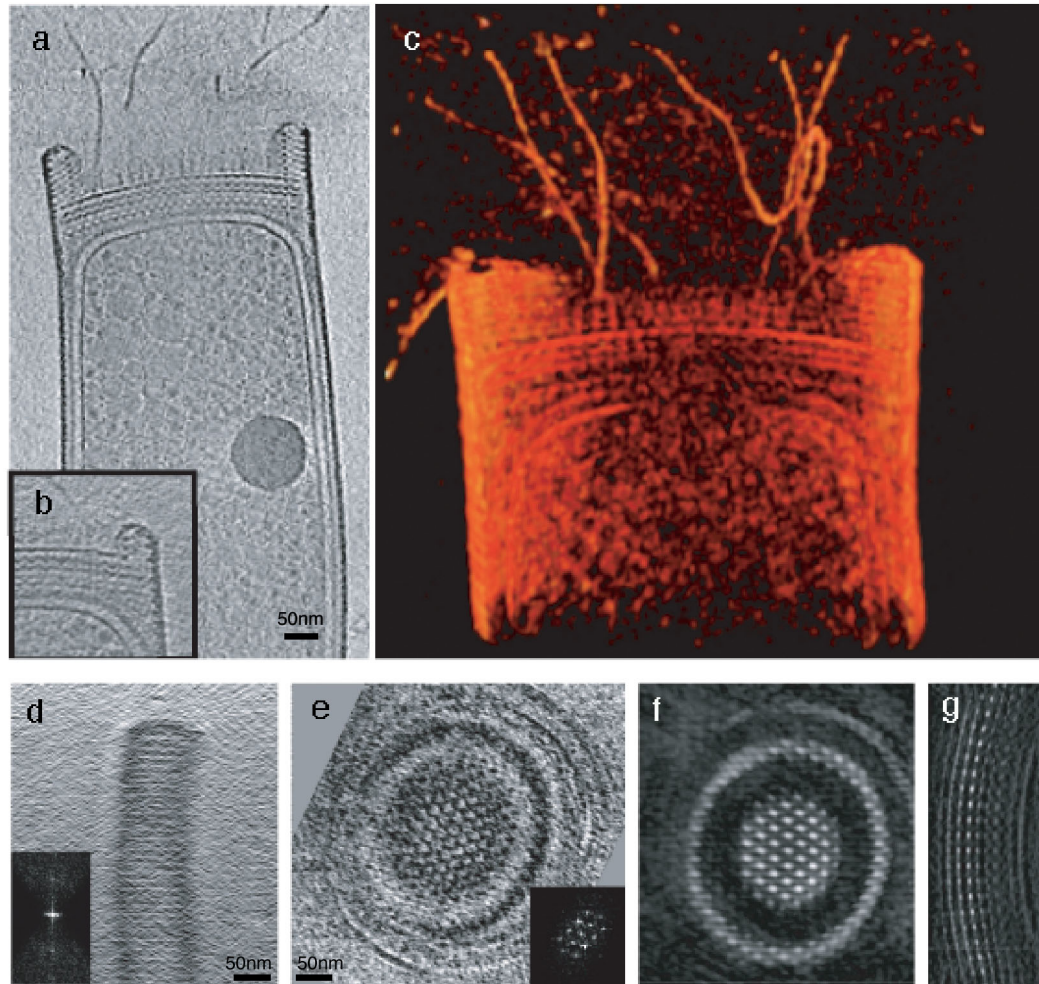


Abbildung 34:

- a. Übersicht eines *Methanospirillum hungatei* Zellpols. Zu sehen sind die drei Zellhüllschichten: Zellmembran, Zellwand und die Scheide. Am Zellpol sind die extrazellulären *plug*-Schichten und die Flagellen zu erkennen. Das dicht gepackte Cytoplasma enthält ein sogenanntes 'Inclusion body', ein kugelartiger Einschluß mit einem Durchmesser von etwa 150 nm. Schichtdicke der XY-Projektion: 34 nm
- b. Ausschnitt einer Einzelschicht (Dicke 2,3 nm) des Zellpols. Die gezeigte Flagelle durchdringt die *plug*-Schichten. Eine Verankerung ist nicht genau zu erkennen.
- c. volumengerenderte Darstellung der in a, abgebildeten Zelle.
- d. 8 nm dicker YZ-Schnitt durch die Scheide von *Methanospirillum hungatei*. Der regelmäßige Aufbau aus einzelnen Reifen wird im Powerspektrum (im Bild links unten) besonders deutlich.
- e. 2,3 nm dicker XZ-Schnitt durch eine der *plug*-Schichten. Der hexagonale Aufbau ist gut zu erkennen und wird auch im Powerspektrum (im Bild rechts unten) erkennbar.
- f. XZ- Schnitt durch die dreidimensionale Kreuzkorrelationsfunktion.
- g. XY- Schnitt durch die dreidimensionale Kreuzkorrelationsfunktion.

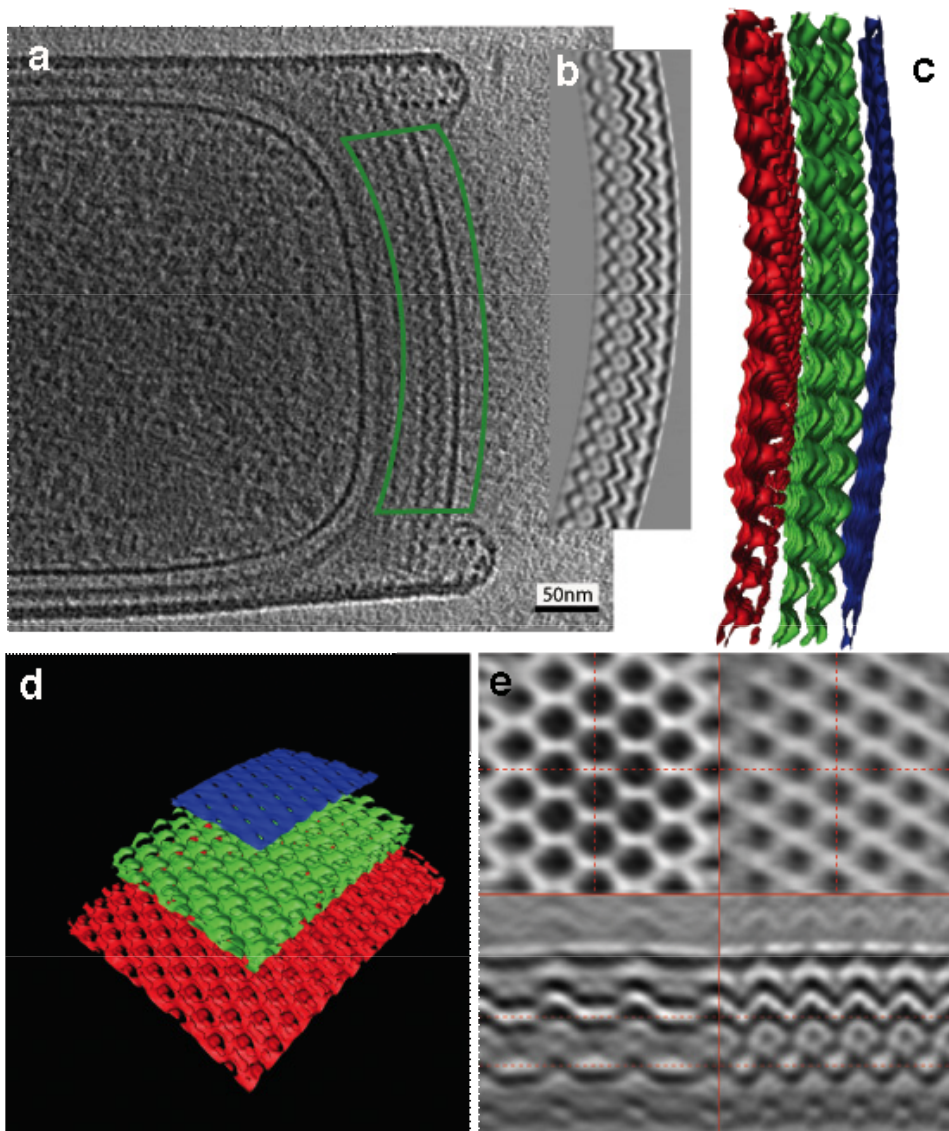


Abbildung 35:

a. 2,3 nm dicker XY-Schnitt durch den Zellpol von *Methanospirillum hungatei*. Die extrazellulären *plug*-Schichten sind in grün umrandet.

b. die in Abbildung 35a, umrandeten Schichten nach der dreidimensionalen Korrelationsmittelung. Die einzelnen, periodischen *plug*-Strukturen sind nun viel deutlicher zu erkennen.

c, d. Oberflächengerenderte Darstellung der einzelnen *plug*-Schichten nach der dreidimensionalen Korrelationsmittelung.

e. Ausschnitte aus dem Modell des *terminal plugs*. Zwei XZ-Schnitte (die beiden oberen Abbildungen), ein YZ-Schnitt (links unten) und ein XY-Schnitt (rechts unten) sind zu sehen. Die gepunktete rote Linie deutet die Position der Schnitte zueinander an. Der Schnitt rechts oben entspricht dabei der oberen gepunkteten Linie in den beiden unteren Abbildungen, der Schnitt rechts oben entspricht jeweils der unteren Linie in den beiden unteren Abbildungen.

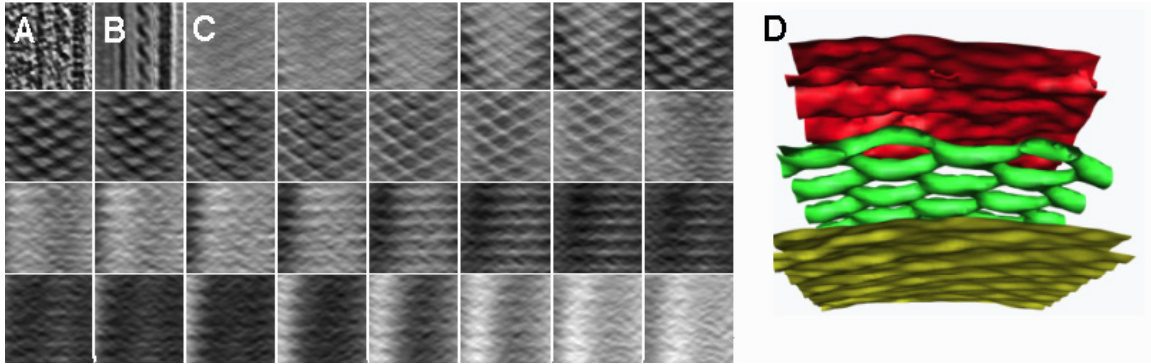


Abbildung 36: Die Zellhülle von *Methanospirillum hungatei*

(a) ein Ausschnitt aus der Zellhülle von *Methanospirillum hungatei*. Von links nach rechts sind die Zytoplasmamembran, der S-Layer und die Scheide zu sehen.

(b) Zusammengesetztes Modell aus zwei Korrelationsmittelungen: Da die Periodizitäten von S-Layer und Scheide unterschiedlich sind, mussten beide getrennt gemittelt und anschließend wieder zusammengesetzt werden.

(c) XZ-Schichten der zusammengesetzten Mittelung. Das hexagonale Gitter des S-Layers mit einem Gitterabstand von 15,1 nm und die Streifung der Innenseite der Scheide mit einem Streifenabstand von 11,5 nm sind gut zu erkennen.

Bildgröße: (a)-(c) 75 nm x 75 nm

(d) Oberflächengerenderte Darstellung der Mittelung. Zu sehen sind die Scheide (rot) mit der charakteristischen Streifung auf der Innenseite, der hexagonalen S-Layer (grün) und die Zytoplasmamembran (gelb).

7. Die Hami des Kaltwasserarchaeons SM1

7.1. Das Archaeon SM1

In den letzten Jahren werden immer mehr Archaeenarten gefunden, die nicht auf extreme Lebensbedingungen spezialisiert sind, sondern sich an moderate Habitate angepasst haben. Eine dieser neu gefundenen Arten ist das vorläufig unbenannte Archaeon SM1, die in einem schwefelhaltigen Moor südlich von Regensburg entdeckt wurde (Rudolph et al., 2001). Das schwefelhaltige Wasser in den Bächen dieses Moores hat über das ganze Jahr eine konstante Temperatur von etwa 10°C. Zusammen mit dem Bakterium *Thiotrix* bilden SM1-Zellen eine perlenkettenartige Lebensgemeinschaft aus (Rudolph et al., 2001). Abbildung 37a zeigt diese makroskopisch sichtbaren, weißlichen Fäden in ihrem Habitat (Rudolph et al., 2001). Jede dieser Perlen besitzt einen Durchmesser von 0.5 bis 3mm (Moissl et al., 2003). Die äußere Hülle dieser Perlen, sowie die Verbindung der Perlen untereinander werden vorwiegend von dem fadenbildenden Bakterium ausgebildet. Im Inneren jeder Perle befinden sich etwa 10^7 coccoide Archaeenzellen (Rudolph et al., 2001) des Typs SM1.

Im auf 16S-rDNA-Sequenzen basierenden phylogenetischen Stammbaum werden diese Archaeen einem tiefen phylogenetischen Zweig ohne nähere Verwandtschaft zu kultivierten oder unkultivierten bekannten Arten zugeordnet (Rudolph et al., 2001). Sie stellen demnach einen neuen phylogenetischen Zweig der Archaeen dar.

SM1 konnte bisher nicht unter Laborbedingungen gezogen werden, jedoch gelang es mit Hilfe von Polyethylen-Netzen größere Mengen dieser perlenkettenartigen Lebensgemeinschaft zu ernten und durch sanfte physikalische Trennmethode spezifisch anzureichern (Moissl et al., 2003). Abbildung 37b zeigt eine rastermikroskopische Aufnahme aus dem Inneren einer dieser Perlen, auf der die einzelnen Archaeen mit ihren Zellanhängen zu sehen sind.

7.2. Die Zellanhänge von SM1

Eine einzelne, platinumbedampfte SM1-Zelle ist in Abbildung 37c dargestellt. Die

coccoliden Archaeen haben einen Durchmesser von etwa $0,6 \mu\text{m}$ und zählen damit nach *Nanoarchaeum equitans* zu den kleinsten Zellen der Archaeen. Etwa 100 der $1\text{-}3 \mu\text{m}$ langen Zellanhänge umgeben den Zellkörper strahlenförmig. Sie besitzen einen äußerst komplexen Aufbau und repräsentieren eine neue Art der Zellanhangstrukturen für die der Name Hamus (Dorn, Krallen, Haken; Plural: Hami) vorgeschlagen wird (Moissl et al., in press). Biochemische Untersuchungen dieser Strukturen wurden an isolierten Hami durchgeführt (Moissl et al., in press). Mit mechanischen Methoden wie Ultratrax, Ultraschall oder Glasperlen konnten pro Präparation etwa $40 \mu\text{g}$ Hami gewonnen werden. Diese Zellanhänge erwiesen sich als äußerst resistent sowohl gegenüber hohen Temperaturen als auch gegenüber pH-Veränderungen. In einem Temperaturbereich von 0° bis 70° und einem pH-Bereich von $0,5$ bis $11,5$ konnten nach Inkubation über mindestens eine Stunde keine Strukturveränderungen beobachtet werden.

Hauptbestandteil ist ein Protein mit einer Masse von 120 kDa . Um die Funktion dieser außergewöhnlichen Strukturen herauszufinden, wurden Zelladhäsionsexperimente mit einer „Optischen Pinzette“ durchgeführt (Moissl et al., 2003). Hierbei wurde die Adhäsion der Zellen an verschiedene Oberflächen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften (Polylysin, Polyglutamat, Gelatine, Rinderserum-Albumin, Laminin, Fibronectin, Bindsilan) gemessen. Selbst bei maximaler Einstellung der Laserleistung ($2,5\text{W}$) konnten die Zellen nicht mehr von der Oberfläche abgelöst werden.

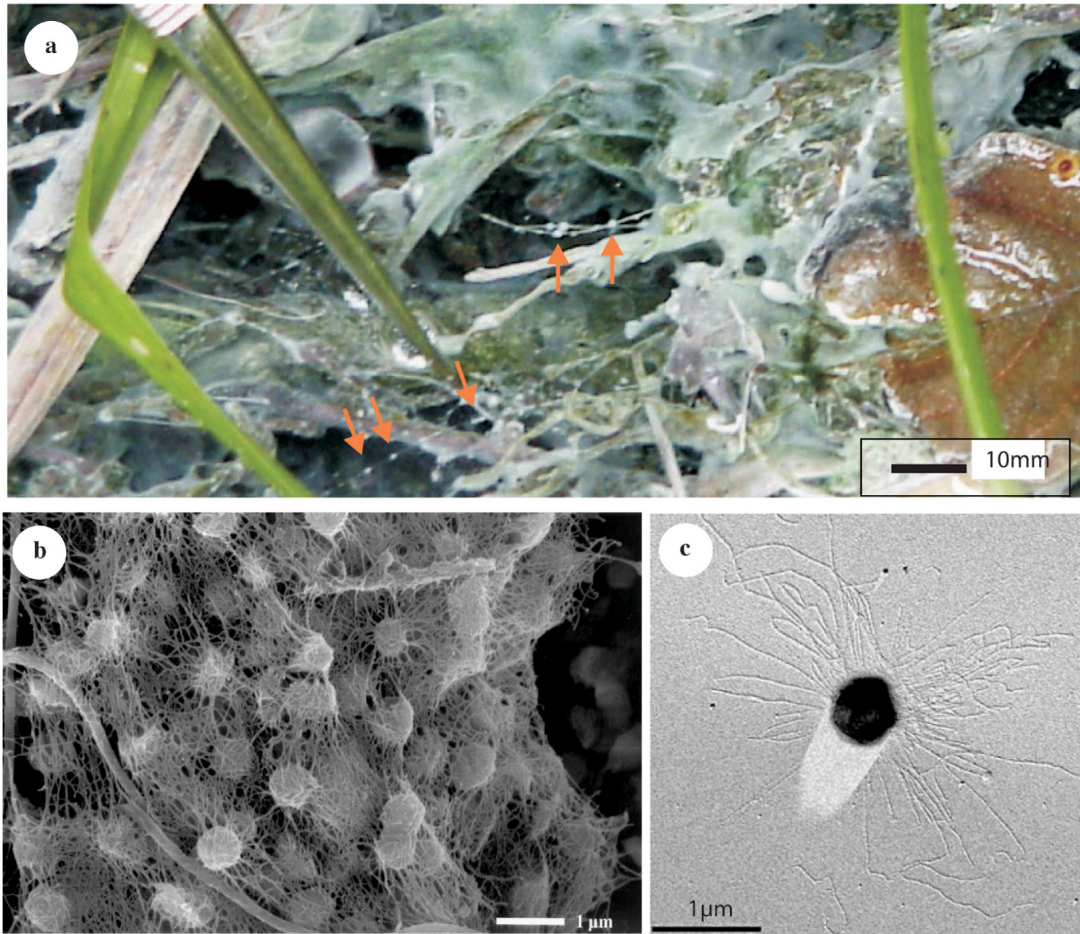


Abbildung 37:

a, b aus (Rudolph et al., 2001), c aus (Moissl et al., 2003)

(a) Photographische Aufnahme der Lebensgemeinschaft zwischen Archaeen und Bakterien in einer morphologisch charakteristischen Anordnung ('perlenkettenartige' Struktur) im schwefelhaltigen Wasser des Sippenauer Moores. Die orangenen Pfeile deuten auf einzelne Perlen.

(b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme aus dem Inneren einer dieser Perlen. Einzelne Kokken umgeben von fädigen Strukturen sind zu erkennen.

(c) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer einzelnen, Platin-bedampften SM1-Zelle. Der Kokkus ist kranzförmig von zahlreichen 1-3 µm langen Zellanhängen (Hami) umgeben.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Hami-Strukturen mit negativ kontrastierten Präparaten zeigten einen hochkomplexen Aufbau mit einer gut definierten Organisation von der Basis zur Spitze (Abbildung 38a). Sie haben einen Durchmesser von etwa 7 nm und eine Länge von 1-3 μm . Im zentralen Bereich besitzen sie kleine, stachelähnliche Fortsätze, die etwa alle 46 nm am zentralen Filament ansitzen. Sie haben mit etwa 4 nm einen geringeren Durchmesser als das Zentralfilament und sind etwa 30 nm lang. Von der Zelloberfläche gemessen setzt sich ein Hamus aus bis zu 60 dieser Stachelregionen zusammen. Am Ende jedes Zellanhangs befindet sich eine ca. 150 nm lange Haken- oder Ankerregion. Diese besteht aus einem glatten Filament, das am distalen Ende eine ankerähnliche Struktur besitzt.

Fourierfilterungen der negativkontrastierten Hamibilder zeigen den helikalen Aufbau der Hami (Abbildung 38). Der Abstand der Stachelregionen entspricht dabei der Periodizität der Helix. Starke Reflexe im Fourierspektrum (Abbildung 38e) befinden sich zwischen den Raum-Frequenzen $1/46 \text{ nm}^{-1}$ und $1/4.6 \text{ nm}^{-1}$ (Abbildung 38e). Sie entsprechen zum einen dem Abstand der Stachelregionen voneinander (46 nm), und zum anderen den kleinsten Untereinheiten der Hami mit 4.6 nm, die in den Aufnahmen aufgelöst werden können (Abbildung 38b,c).

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte bereits vermutet werden, dass jeweils 10 dieser Untereinheiten ein Segment zwischen den Stachelansatzstellen bilden und dass das zentrale Filament aus drei Protofilamenten aufgebaut ist.

Die Stacheln besitzen mit 3.5 bis 4.5 nm einen geringeren Durchmesser als das Filament mit 7 bis 8.5 nm. Demnach scheinen die Stacheln aus 5 bis 7 aneinander gereihten 4,6 nm Untereinheiten aufgebaut zu sein und könnten eine strukturelle Verwandtschaft mit den Protofilamenten der Hami besitzen. Es war jedoch unklar, ob jeweils 2 oder 3 stachelartige Fortsätze an das Filament gebunden waren.

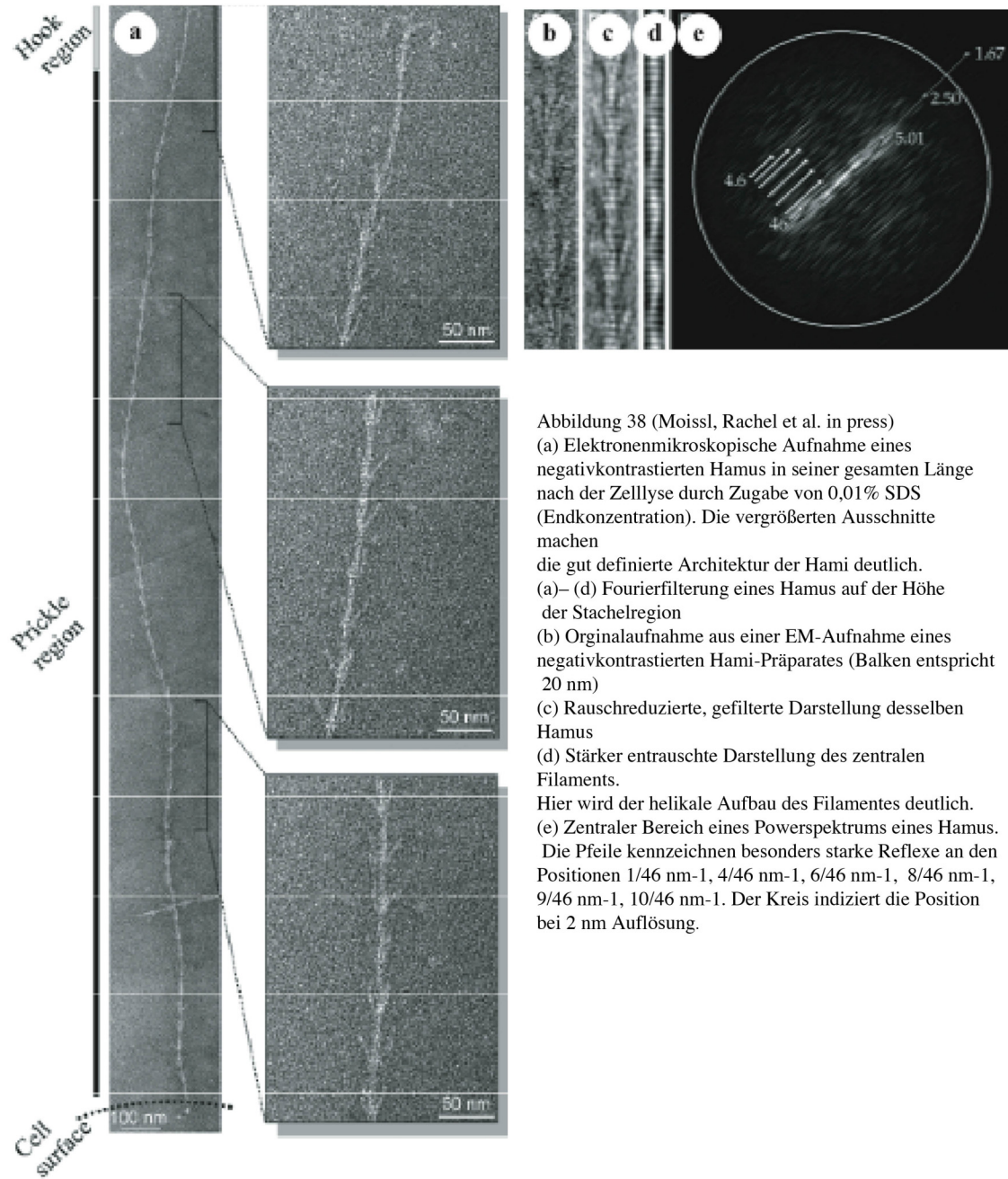


Abbildung 38 (Moissl, Rachel et al. in press)

(a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines negativkontrastierten Hamus in seiner gesamten Länge nach der Zellyse durch Zugabe von 0,01% SDS (Endkonzentration). Die vergrößerten Ausschnitte machen die gut definierte Architektur der Hami deutlich.

(a)–(d) Fourierfilterung eines Hamus auf der Höhe der Stachelregion

(b) Originalaufnahme aus einer EM-Aufnahme eines negativkontrastierten Hami-Präparates (Balken entspricht 20 nm)

(c) Rauschreduzierte, gefilterte Darstellung desselben Hamus

(d) Stärker entrauschte Darstellung des zentralen Filaments.

Hier wird der helikale Aufbau des Filamentes deutlich.

(e) Zentraler Bereich eines Powerspektrums eines Hamus.

Die Pfeile kennzeichnen besonders starke Reflexe an den Positionen $1/46 \text{ nm}^{-1}$, $4/46 \text{ nm}^{-1}$, $6/46 \text{ nm}^{-1}$, $8/46 \text{ nm}^{-1}$, $9/46 \text{ nm}^{-1}$, $10/46 \text{ nm}^{-1}$. Der Kreis indiziert die Position bei 2 nm Auflösung.

7.3. Elektronentomographie der Hami

Die dreidimensionale Struktur der Hami sollte mit Hilfe elektronentomographischer Untersuchungen näher bestimmt werden.

Die Positionen für die Aufnahme von Tomogrammen wurde allein durch den Abstand von einer SM1 Zelle bestimmt. Das schlechte Signal zu Rausch-Verhältnis und der geringe Kontrast bei Niederdosisbedingungen machen ein Erkennen der ‚Anker‘ so gut wie unmöglich. Es wurden zunächst Zellen bei niedriger Vergrößerung gesucht und anschließend in etwa 2 μm Abstand davon Datenserien aufgenommen. Erst nach der Rekonstruktion am Computer wurden die Hami mit der Ankerstruktur sichtbar. Abbildung 39a zeigt aufeinanderfolgende XY-Schnitte durch einen Hamus.

Aus diesen Schnitten und dem 3D-Modell ist ersichtlich, dass jeweils 3 Stacheln pro Ansatzstelle gebildet werden. Deutlich wird dies auch in vertikalen Schnitten der dreidimensionalen Rekonstruktion des Hamus (Abbildung 39e). Dabei scheinen die drei Stacheln nicht genau auf derselben Höhe anzusetzen, sondern sie weichen um 2 bis 5 nm voneinander ab. Erkennbar wird dies aus aufeinanderfolgenden Querschnitten des Filaments (Abbildung 39e) und dem Längsschnitt des Hamus (Abbildung 39f). Die einzelnen Stacheln sind etwa 120° voneinander entfernt. Sie schließen mit der Filamentachse einen Winkel von 45° - 60° ein und weisen in Richtung des Ankers.

Der Anker, der das Ende des Hamus bildet, besteht ebenfalls aus drei ‚Armen‘ (Abbildung 39d), die jeweils etwa 120° voneinander entfernt sind. Die einzelnen Arme sind rückwärts gebogen, so dass ihre Spitzen parallel zum Filament in Richtung des Zellkörpers weisen.

Der Aufbau der Hami wird besonders in dem 3D-Modell deutlich (Abbildung 39). Hierfür wurde der Datensatz mit Hilfe der nichtlinearen, anisotropen Difussion entrauscht (Frangakis and Hegerl, 2001). In Abbildung 39e sind aufeinander folgende, 1.36 nm dicke XY-Schnitte durch diesen aufbereiteten Datensatz gezeigt. Ein direkter Vergleich der Originaldaten und der entrauschten Daten ist in Abbildung 39f und 39g gegenübergestellt. Aus der Kombination aller bekannten Daten konnte eine erste Vorstellung von der einmaligen Struktur der Hami entwickelt werden (Abbildung 39i).

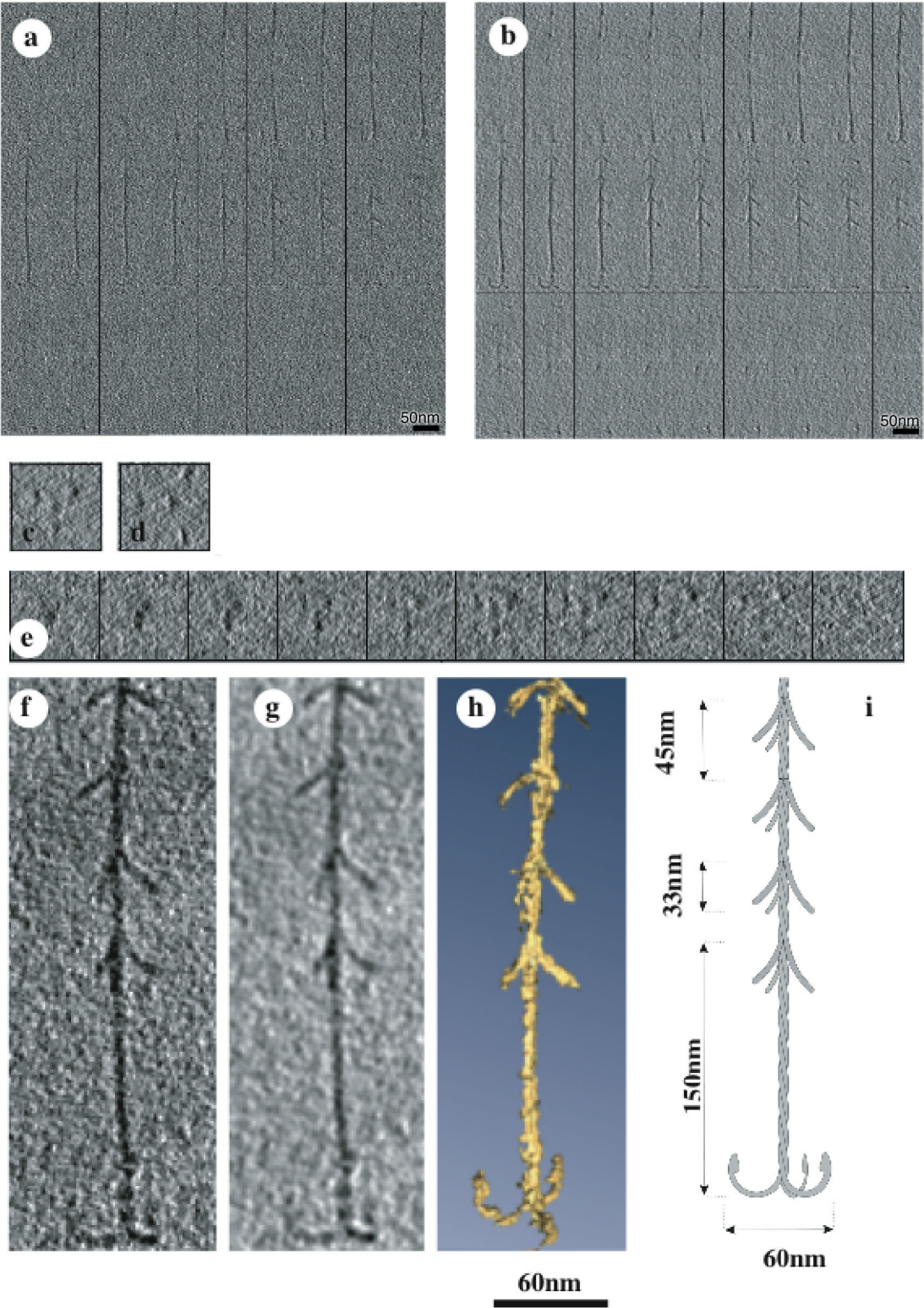


Abbildung 39: Kryo-Elektronentomographie eines Hamus

- (a) XY-Schnitte durch das rekonstruierte Volumen eines Hamus
- (b) XY-Schnitte durch das entrauschte Volumen aus (a) des Hamus
- (c) Eine XZ-Projektion mit einer Dicke von 4,1 nm durch den Hamus auf der Höhe einer Stachelregion. Die Anordnung der drei Stacheln im 120° Winkel und das zentrale Filament sind zu erkennen (Bild Durchmesser 67 nm)
- (d) Eine XZ-Projektion mit einer Dicke von 5,4 nm durch die Ankerregion zeigt dieselbe Anordnung wie die Stachelregion aus Abbildung (c) (Bild Durchmesser 67 nm)
- (e) XZ-Schnitte durch eine Stachelregion (Bild Durchmesser jeweils 67 nm, Dicke der einzelnen Schnitte 1,36 nm)
- (f) XY-Schnitt mit einer Dicke von 1,34 nm durch einen Hamus, vergrößert dargestellt
- (g) XY-Schnitt mit einer Dicke von 1,34 nm durch den entrauschten Hamus, vergrößert dargestellt
- (h) Oberflächenrendering-Darstellung des Hamus

7.4. Diskussion zur Hamus-Struktur

Aufgrund des überraschend komplexen Aufbaus der Zellanhänge des Euryarchaeons SM1 und der Verschiedenheit gegenüber den bekannten Anhangstrukturen der Prokaryonten wurde der Terminus ‚Hamus‘ (Plural: Hami) eingeführt.

Die Hami erinnern in ihrer dreidimensionalen Struktur an menschengefertigte Fischerhaken oder Schiffsanker. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten liegt die Annahme nahe, dass sie auch in ihrer Funktion zur ‚Verankerung‘ oder Anheftung übereinstimmen. Unterstützt wird diese Theorie durch die Ergebnisse der Adhäsionsexperimente (Moissl et al., 2003). Es ist anzunehmen, dass sie eine entscheidende Rolle bei der Bildung der perlenketterartigen Lebensgemeinschaft mit dem Bakterium *Thiotrix* spielen.

Vergleicht man die Hami mit anderen Zellanhängen der Prokaryonten, so wird ihr komplexer Aufbau deutlich. Sowohl Flagellen als auch Pili bilden Röhren oder helikale Filamente ohne weitere morphologische Differenzierung (Fernandez and Berenguer, 2000; Hahn et al., 2002; Jarell et al., 2001). Im Durchmesser sind die Hami deutlich dünner als bakterielle Flagellen (Yonekura et al., 2003). Sie gleichen damit eher bakteriellen Pili (5-6 nm) oder den Pilus-ähnlichen Filamenten (3-5 nm) (Doddema et al., 1979; Fernandez and Berenguer, 2000; Leadbetter and Breznak, 1996; Miroshnichenko et al., 1998).

Die Hami besitzen offenbar keinen zentralen Kanal. Sie ähneln darin den Flagellen der Archaea und den bakteriellen Pili (Cohen-Krausz and Trachtenberg, 2002). Somit ist ein

Aufbau der Hami durch das Hinzufügen der Untereinheiten an der Basis wahrscheinlich, vergleichbar mit den bakteriellen Pili und wie für die Flagellen der Archaea angenommen (Bardy et al., 2003; Jarell et al., 2001; Li and Mobley, 2001). Wie allerdings die ‚Stacheln‘ und die ‚Ankerstruktur‘ entstehen bzw. an das Filament angebaut werden bleibt ungeklärt. Ein entscheidender Umstand ist dabei die Substruktur der ‚Stacheln‘, die aus einem oder auch aus zwei Protofilamenten bestehen könnten. Die komplexe Architektur deutet dabei auf ein Mehrkomponentensystem bei der Assemblierung der Hami hin. Diese Frage kann aber erst bearbeitet werden, wenn die Substruktur der Hami weitergehend untersucht worden ist.

Auch die Verankerung dieser Strukturen in der Zytoplasma-Membran ist noch ungeklärt. Mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie, der Identifizierung der beteiligten Gene und der Isolierung der entscheidenden Proteine könnte diese Frage geklärt werden.

8. Parasitismus bei den Archaea: *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sp. KIN4/1

8.1. *Ignicoccus* sp. KIN4/1 und *Nanoarchaeum equitans*

Ignicoccus sp. KIN4/1 wurde erstmals aus Proben isoliert, die nördlich von Island in einer Tiefe von ca. 100 m aus sandigem Sediment entnommen wurden (Fricke et al., 1989). Dieser Organismus wurde der Gattung der Desulfurococcaceae (Crenarchaeoten) zugeordnet (Huber et al., 2000).

Die Zellen dieser Art bestehen aus unregelmäßigen Kokken mit einem Durchmesser von 1,2-3 μm und besitzen monopolare, polytriche Flagellen. Sie wachsen obligat anaerob in einem Temperaturbereich zwischen 70° und 98°C. Die chemolithoautotrophen Organismen gewinnen Energie über die Reduzierung von elementarem Schwefel, wobei ihnen molekularer Wasserstoff als einzige Elektronenquelle dient (Huber et al., 2000). *Ignicoccus* sp. KIN4/1 besitzt mit einer äußerem (zytoplasmatischen) Membran eine unter den Archaea sonst unbekannte Zellhülle (Rachel et al., 2001). Es existiert kein für die Archaea typischer S-Layer, sondern sie bilden eine lipidhaltige äußere Membran aus. Durch die Zytoplasma-Membran und die äußere Membran wird ein periplasmatischer Bereich mit einer Breite von 20 bis 400 nm begrenzt, dessen Bedeutung für die Kompartimentierung der Zelle noch unklar ist (Rachel et al., 2001).

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung eines *Ignicoccus* sp. KIN4/1 -Stammes wurden Zellen mit kleinen, kugelförmigen Anhängen beobachtet. Es handelte sich dabei um Zellen eines neuen Phylums der Nanoarchaeota (Huber et al., 2002). Die bisher einzige Art *Nanoarchaeum equitans* ist mit einem Durchmesser von nur 400 nm die kleinste bekannte Archaeen-Art. Auch mit einer Genomgröße von etwa 490kb bewegen sich diese Zellen am unteren theoretischen Limit für zelluläre Mikroorganismen (Huber et al., 2003). In Abbildung 40 sind mikroskopische Aufnahmen von *Ignicocccen*-Zellen zusammen mit *Nanoarchaeum equitans* gezeigt.

Die Zellen von *Nanoarchaeum equitans* werden von einer Zytoplasma-Membran und einem S-Layer mit einer Gitterkonstante von 15 nm begrenzt. Sie besitzen teilweise einen einzelnen, extrazellulären Anhang bei dem es sich möglicherweise um eine archaeelle Flagelle oder einen Pilus handelt (Huber et al., 2003).

Nanoarchaeum equitans wächst in Kultur nur zusammen mit *Ignicoccus* sp. KIN4/1. Versuche, *Nanoarchaeum equitans* auf Zellhomogenaten von *Ignicoccus* sp. KIN4/1 oder durch eine semipermeable Membran getrennt von *Ignicoccus* sp. KIN4/1 zu ziehen sind fehlgeschlagen. *Ignicoccus* sp. KIN4/1 dagegen ist nicht auf die Gemeinschaft mit *Nanoarchaeum equitans* angewiesen (Huber et al., 2003).

Das Genom von *Nanoarchaeum equitans* besteht aus einem einzelnen, ringförmigen Chromosom. Etwa 95% davon kodieren Proteine oder stabile RNA, es ist damit das kompakteste bekannte Genom überhaupt. Alle nötigen Komponenten für die Replikation, die Transkription, die Translation und die Vollendung des Zellzykluses sind vorhanden. Dagegen sind nahezu keine Gene zu identifizieren, die für die Biosynthese von Aminosäuren, Nucleotiden, Kofaktoren und Lipiden benötigt werden. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass die Beziehung zwischen *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sp. KIN4/1 parasitischer Natur ist (Waters et al., 2003). Allerdings besitzt *Nanoarchaeum equitans* einen voll funktionstüchtigen DNA-Reparatur-Mechanismus, was für parasitische Organismen sehr ungewöhnlich ist.

Die Zellen bzw. die Assoziation der beiden Archaeen-Arten sollte mit Hilfe der Elektronentomographie untersucht werden.

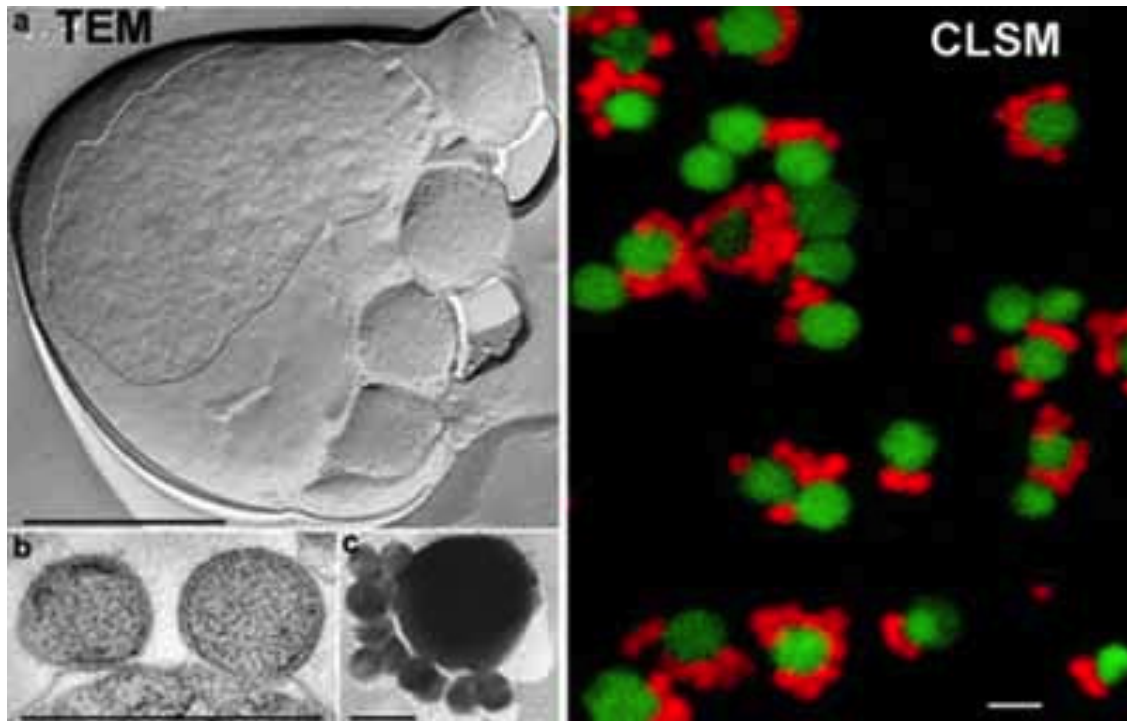


Abbildung 40 (Huber et al., 2002): Mikroskopische Aufnahmen von *Ignicoccus* sp. KIN4/1 und *Nanoarchaeum equitans*.

- (a) Gefrierbruch-TEM Aufnahme einer *Ignicoccus*-Zelle mit vier *Nanoarchaeen*-Zellen
- (b) Ultradünnschnitt zweier *Nanoarchaeen*-Zellen, die an der äußeren Membran von *Ignicoccus* hängen
- (c) Platinumbedampfte *Ignicoccus*-Zelle mit mehreren angehängten *Nanoarchaeen*-Zellen.

Rechte Seite Laserscanning-Mikroskopie *Nanoarchaeum* (CY3 markiert, rot) und *Ignicoccus* (Rhodamine-green markiert, grün).

8.2. Elektronentomographie von *Ignicoccus* sp. KIN4/1 und *Nanoarchaeum equitans*

8.2.1. *Nanoarchaeum equitans*

Untersucht man eine Co-Kultur von *Ignicoccus* sp. KIN4/1 und *Nanoarchaeum equitans*, so finden sich neben den an den *Ignicocce*-Zellen hängenden *Nanoarchaeen* auch freie Zellen im Medium. Diese vereinzelt Zellen stellen ideale Objekte für die Tomographie dar, da sie mit einem Durchmesser von nur 400 nm sehr klein sind. Ein XY-Querschnitt durch ein Tomogramm einer freien *Nanoarchaeum equitans* Zelle ist in Abbildung 41a abgebildet. Das Zytoplasma des kugelförmigen Organismus ist dicht gepackt mit Makromolekülen und wird von der Zellwand mit einem S-Layer eingeschlossen. Abbildung 41b zeigt einen an der Zelloberfläche verlaufenden Schnitt aus demselben Tomogramm. Hier ist der hexagonale S-Layer mit einem Gitterabstand von 15 nm zu erkennen. Bei keiner der untersuchten freien *Nanoarchaeen* konnten Flagellen oder andere Zellanhangstrukturen gefunden werden.

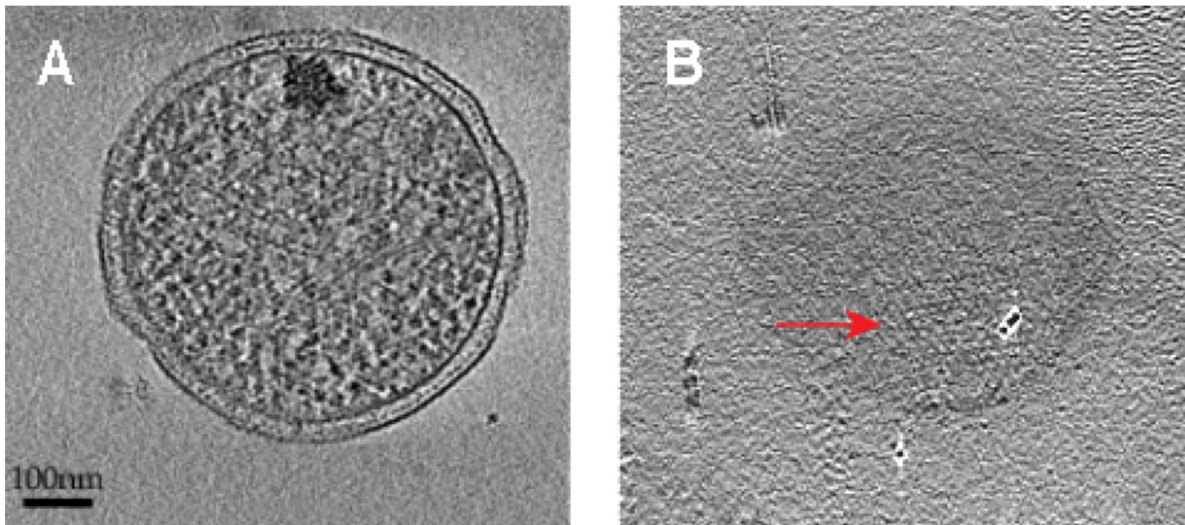


Abbildung 41:

Elektronentomographie von *Nanoarchaeum equitans*

(a) XY-Schnitt eines Tomogramms einer freien *Nanoarchaeum equitans* Zelle

(b) XY-Schnitt desselben Tomogramms aus (a) auf der Höhe des S-Layers (roter Pfeil)

8.2.2. *Ignicoccus* sp. KIN4/1

Betrachtet man 2D-Projektionen von in Eis eingebetteten *Ignicoccus*-Zellen im Elektronenmikroskop, fällt sofort der ungewöhnliche Aufbau dieses Organismus auf. Ein sehr großer periplasmatischer Raum wird zwischen einer äußeren Membran und einer Zytoplasma-Membran eingeschlossen (Abbildung 42b). Ein S-Layer ist nicht vorhanden. Die kokkenförmigen Zellen besitzen mehrere Flagellen (Abbildung 42b, rote Pfeile).

Im Gegensatz zu *Nanoarchaeum equitans* stellt *Ignicoccus* sp. KIN4/1 ein denkbar ungeeignetes Objekt für die Elektronentomographie dar. Mit über 1 μm Durchmesser sind diese Zellen zu dick, um mit dieser Methode ohne Schneidetechniken untersucht zu werden. Ein Tomogramm eines Zellausschnitts ist in Abbildung 42a gezeigt. Aufgrund der Größe des Organismus ist das Signal-zu-Rausch Verhältnis allerdings so gering, dass hier keine Details zu erkennen sind.

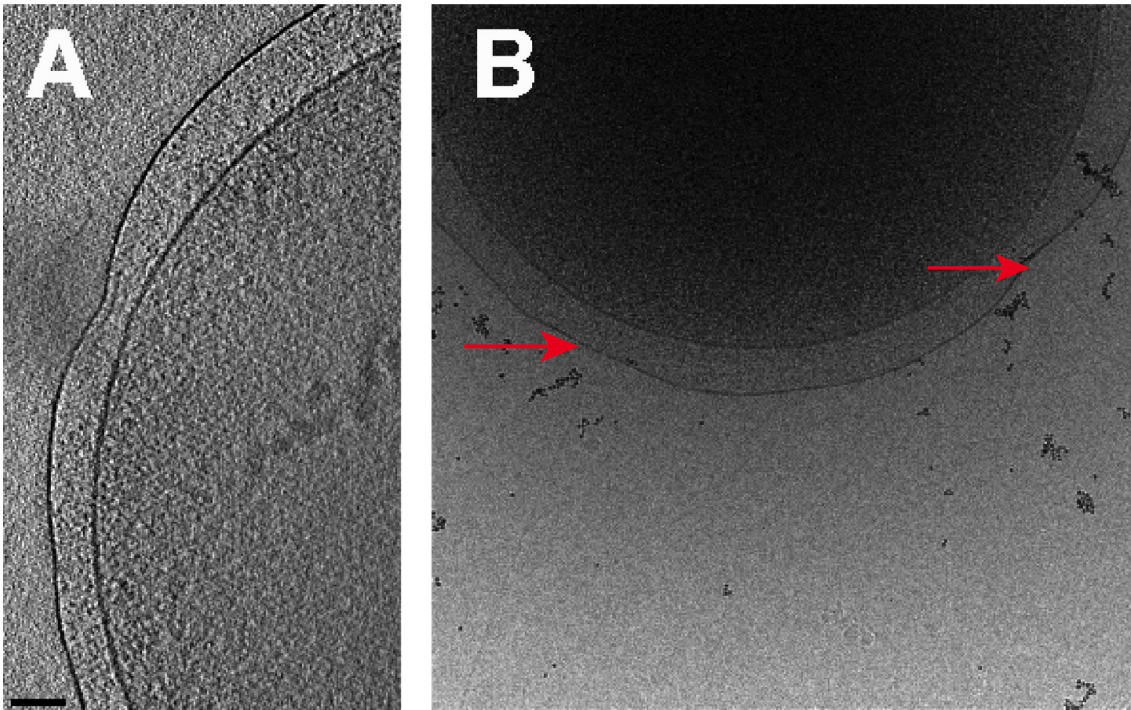


Abbildung 42: *Ignicoccus* sp. KIN4/1

(a) XY-Projektion aus einem Tomogramm eines Zellausschnitts von *Ignicoccus islandicus*: Aufgrund der Größe der Zelle ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis so schlecht, dass so gut wie keine Details zu erkennen sind.

(b) 2D-Aufnahme eines Zellausschnitts. Die Zytoplasma-Membran und die äußere Membran schließen einen sehr großen periplasmatischen Raum ein. Die roten Pfeile markieren die Austrittsstellen von Flagellen.

Balken: 100 nm

8.2.3. Tomographie der Verbindungsstrukturen zwischen *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sp. KIN4/1

Um die Interaktion zwischen *Nanoarchaeum* und *Ignicoccus* verstehen zu können, muss zunächst die Natur dieser Verbindung geklärt werden. Dieses Problem ist mit herkömmlichen Methoden bisher nicht lösbar gewesen. Allerdings geben 2D-Aufnahmen von Ultradünnschnitten dieser Co-Kulturen Hinweise darauf, dass fädige Verbindungen eine Rolle spielen könnten (Abbildung 43a). Um genauere Aussagen treffen zu können, wurden in Eis eingebettete, an *Ignicoccen* gebundene *Nanoarchaeen* im Elektronenmikroskop untersucht.

Der im Folgenden ausgewertete Datensatz wurde von -50° bis $+60^\circ$ mit einem Inkrement von 2° und einem Defokus von $-10\ \mu\text{m}$ aufgenommen. Abbildung 43b zeigt einen 138 nm dicken Ausschnitt einer Projektion aus diesem Tomogramm. Zu sehen ist eine *Nanoarchaeen*-Zelle, die an eine *Ignicoccen*-Zelle angeheftet ist. Tatsächlich lässt sich eine gerade noch erkennbare, fädige Struktur ausmachen, die beiden Zellen zu verbinden scheint.

Obwohl *Nanoarchaeum* ein ideales Objekt für die Tomographie darstellt, ist aufgrund der Dicke der Wirtszellen die Datenauswertung äußerst schwierig. Um die etwaigen Verbindungen zwischen den Zellen zweifelsfrei detektieren zu können, wurde der Datensatz mittels eines Korrelationsverfahrens nach Strukturen abgesucht, die senkrecht zur Zellmembran orientiert waren. Mit Hilfe eines speziellen Algorithmus wurde der weitere Verlauf dieser fädigen Strukturen berechnet. Mit dieser Methode konnten die Verbindungsstrukturen beider Zellen innerhalb und außerhalb der Membranen segmentiert werden.

8. Parasitismus bei den Archaea: *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sp. KIN4/1

Das Ergebnis der Analyse ist als dreidimensionale Darstellung in Abbildung 44 dargestellt. Es sind 6 nm dicke fädige Strukturen nachweisbar, die vom Inneren der *Ignicoccus*-Zelle in das Zytoplasma des *Nanoarchaeums* reichen. Offenbar kommen mehrere dieser Strukturen vor. Das Tomogramm erlaubte es nicht, die Substruktur der Fäden aufzulösen, so dass unklar bleibt, ob die Filamente hohl oder massiv sind.

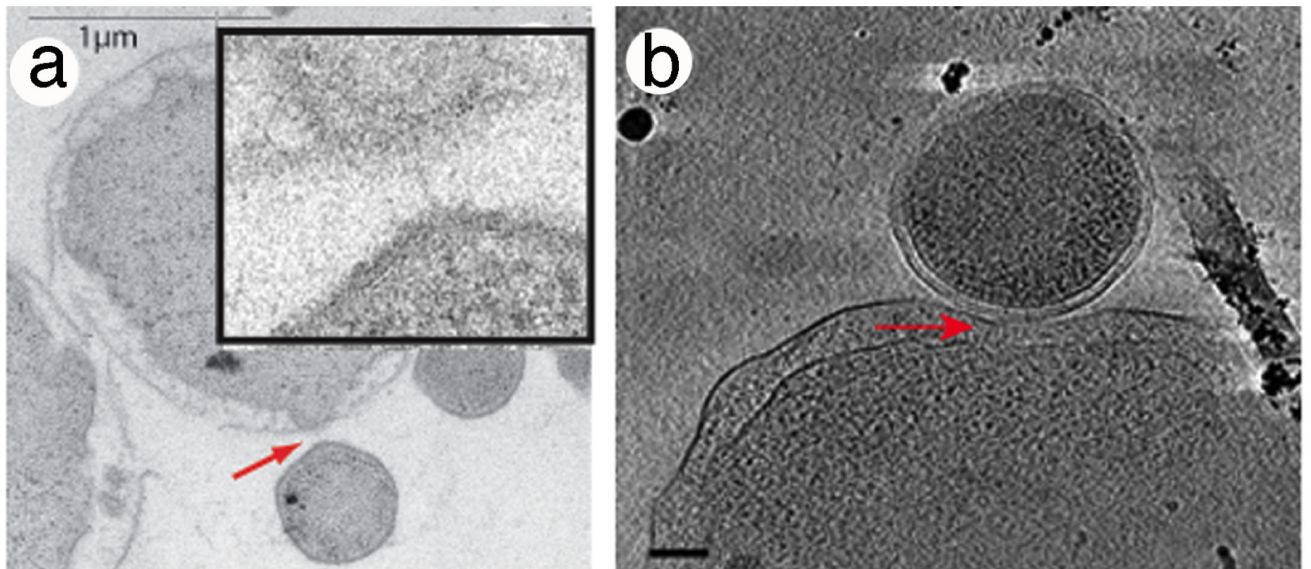


Abbildung 43:

- (a) Negativ kontrastierter Ultradünnschnitt (Reinhard Rachel, Regensburg). Der rote Pfeil kennzeichnet die Position, die vergrößert dargestellt ist. Die beiden Zellen scheinen durch eine fädige Struktur verbunden zu sein.
- (b) XY-Schnitt eines Tomogramms. Der rote Pfeil deutet auf schwach erkennbare, fädige Strukturen zwischen *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sp. KIN4/1

Balken: 100 nm

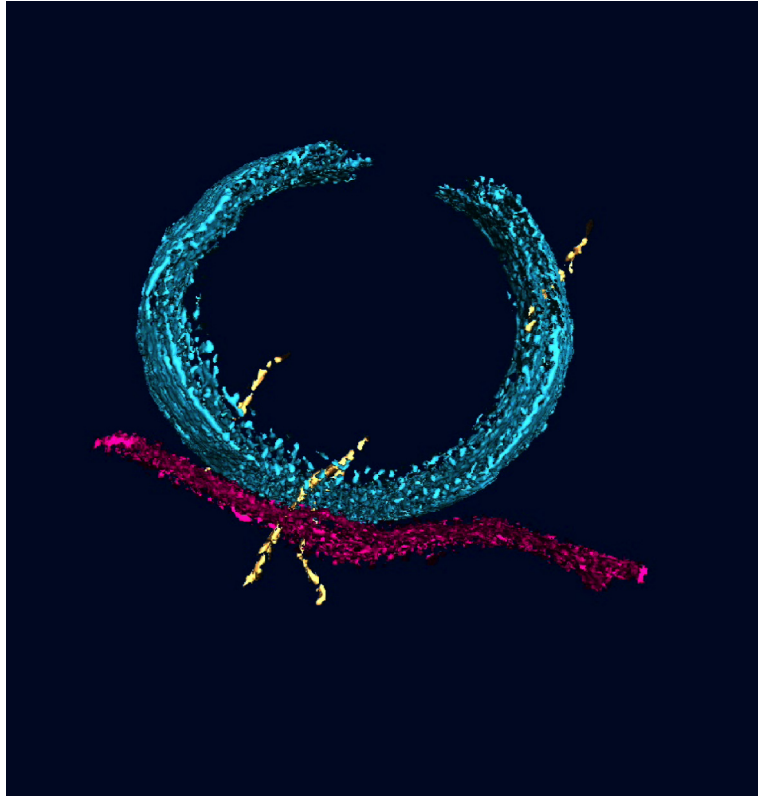


Abbildung 44:

Dreidimensionale Darstellung des Tomogrammauschnitts aus Abbildung 42b. Die Zellwand von *Nanoarchaeum* ist in blauer Farbe, die äußere Membran von *Ignicoccus* in lila Farbe und die mittels Korrelation gefundene Verbindungsstrukturen in gelb dargestellt. Diese flexibel erscheinende Fäden reichen in die Zytoplasmata beider Zellen.

Bildgröße: ca. 750 nm

8.3. Diskussion der Verbindungsstrukturen von *Ignicoccus* sp. KIN4/1 s und *Nanoarchaeum equitans*

Mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie konnten erstmalig Verbindungsstrukturen zwischen dem prokaryontischen Parasiten *Nanoarchaeum equitans* und seiner Wirtszelle, *Ignicoccus* sp. KIN4/1, identifiziert werden.

Diese 6 nm dicken, flexibel erscheinenden Fäden verbinden die Zytoplasmata beider Zellen. Es ist bisher allerdings nicht geklärt, ob diese Strukturen lediglich dazu dienen, den Kontakt aufrecht zu erhalten, oder ob sie tatsächlich auch zum Stofftransport verwendet werden. Bei einer Dicke von 6 nm könnten die Fäden einen maximalen Innendurchmesser von etwa 2 nm besitzen, also gerade ausreichend, um für Transportzwecke verwendet werden zu können. Da diese Verbindungsstrukturen zudem sowohl in das Zytoplasma des Parasiten, als auch in das Zytoplasma der Wirtszelle reichen, ist eine Transportfunktion denkbar.

Auf der anderen Seite scheinen diese Fäden strukturell flexibel zu sein, sie stellen keine geradlinige Verbindung zwischen den Zellen her, was eher für eine reine Kontakterhaltungsfunktion spricht. Demnach müssten weitere Verbindungen zwischen diesen Zellen zu finden sein. Einen genaueren Aufschluss über diese Fragen kann man erst erwarten, wenn geklärt ist, wie diese Fäden biochemisch aufgebaut sind.

Aus der Genomanalyse konnten bei *Nanoarchaeum equitans* bisher mögliche Transporter identifiziert werden, die für den Stofftransport zwischen der Wirtszelle und zelleigenem Zytoplasma in Frage kommen. Dazu zählen unter anderem drei Typen des ABC-Transportsystems (ATP-binding cassette). Zusätzlich sind Teile einer Protein-Translokase nachgewiesen worden, allerdings hat man bislang die Protein- und RNA-Komponenten für die Signalerkennung noch nicht entdecken können. Auch zwei Bestandteile des Typ II / Typ IV Proteinexport-Systems konnten identifiziert werden, die für die Biosynthese der Pili oder archaeellen Flagellen verantwortlich sind (Waters et al., 2003). Inwieweit diese bei der Bildung der zellverbindenden Filamente beteiligt sind, bleibt noch zu untersuchen. Einen weiteren Aufschluss über die Zahl, Anordnung und zelluläre Organisation der Filamente sollte man durch die Tomographie an Kryo-Schnitten gewinnen können. Mit

dieser Technik ist prinzipiell auch das für die zelluläre Tomographie ungeeignet große System aus zwei oder mehr Zellen handhabbar. Besonders interessant wären Untersuchungen an *Nanoarchaeen*-Zellen, denen nur noch Reste der äußeren Membran von *Ignicoccus*-Zellen anhaften. Hier wären spezifische Strukturen der Kontaktflächen besonders gut zugänglich und auflösbar.

In einigen Publikationen wird angenommen, dass *Nanoarchaeum equitans* im Besitz einer Geißel sein könnte. Gestützt wird dies durch eine Aufnahme einer platinumbedampften freien *Nanoarchaeen*-Zelle, die eine einzelne geißelähnliche Struktur aufweist (Abbildung 45). In den hier untersuchten, vitrifizierten Proben wurden bislang keine Hinweise auf das Vorhandensein einer Flagelle gefunden. Um diese Frage abschließend beantworten zu können, sind weitere Ergebnisse aus tomographischen Untersuchungen und der Genomanalyse abzuwarten.

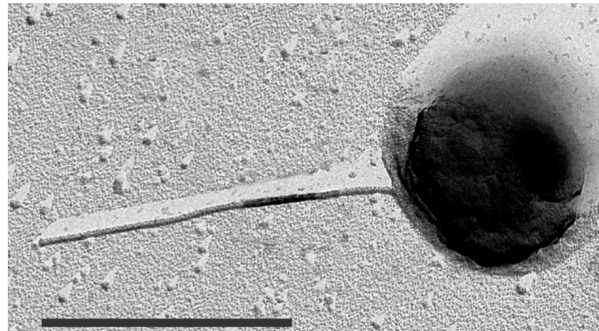


Abbildung 45 (Huber et al., 2003)

Platinumbedampfte *Nanoarchaeum equitans* Zelle mit einer Zellanhang-Struktur, wahrscheinlich eine Flagelle

Balken: 0,5 μm

9. Diskussion und Ausblick

Das grundlegende Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, was die Kryo-Elektronentomographie zur Aufklärung biologischer Strukturen in intakten Zellen beitragen kann.

Anhand aktueller wissenschaftlicher Fragestellungen wurde ein breites Spektrum mikrobiologischer Strukturen ausgewählt, um das Potential dieser Technik auszuloten. Objekte meiner Untersuchungen waren extra- und intrazelluläre filamentöse Strukturen, wie die Hami oder die zellverbindenden Filamente der *Ignicoccus-Nanoarchaeum*-Lebensgemeinschaft, komplexe membranassoziierte Strukturen wie der Flagellenapparat und die Chemorezeptoren von Bakterien, der vielschichtige Aufbau von archaeellen Zellwandstrukturen wie der *terminal plugs* und super-makromolekulare Gebilde im Zytoplasma wie der zytoplasmatische Tunnel. In allen Fällen zeigten sich die Vorteile der zellulären Elektronentomographie, insbesondere aufgrund der Möglichkeit, an der weitgehend intakten Zelle arbeiten zu können, und führten zu Erkenntnissen, die durch andere präparative Techniken und abbildende Verfahren nicht gewonnen werden konnten. Zum einen liefert die Kryo-Elektronentomographie Ergebnisse über den dreidimensionalen Aufbau der untersuchten Systeme in einem der Lichtmikroskopie weit überlegenen Auflösungsbereich. Insbesondere konnte die Schichtung der *terminalen plugs* von *Methanospirillum hungatei* eindeutig bestimmt werden. Auch der Aufbau der extrazellulären Anhangstrukturen des Archaeons SM1 wurde aufgeklärt. Die Anzahl und Position der einzelnen Stacheln und die Struktur des terminalen Ankers konnten eindeutig bestimmt werden.

Zum anderen wird die strukturelle Integrität der Zellen und Makromoleküle durch die Kryo-Präparationstechniken erhalten. Durch die Vermeidung jeglicher Fixierung, Färbung oder Einbettung der Zellen konnten sie in einem quasi-nativen Zustand erhalten werden. Auf diese Weise wurden fragile Strukturen den Untersuchungen zugänglich gemacht werden, die bisher keiner anderen Präparationstechnik standhalten. Dies ermöglichte die Entdeckung von unbekanntem Strukturen, wie etwa dem zytoplasmatischen Tunnel von *Thermotoga maritima*, dessen Existenz und Verlauf erstmals nachgewiesen werden

konnte. Am Flagellenmotor dieses Bakteriums wurde ein zusätzlicher Extra (E-) Ring entdeckt, der in isolierten Flagellen nicht gefunden wurde (Gluch, 1993).

Die Kryo-Elektronentomographie erlaubte ebenfalls die Untersuchung der Chemorezeptor-Cluster von Wildtyp-Zellen und lieferte neue Erkenntnisse über deren Aufbau in einem hexagonalen Gitter und der unterschiedlichen Erscheinungsform der Cluster unterschiedlicher Rezeptorkassen. Ebenso konnte die Anordnung der einzelnen Schichten des *terminal plugs* von *Methanospirillum hungatei* im Verhältnis zueinander eindeutig bestimmt werden. Bei der Analyse der Assoziation zwischen den beiden Zellen der parasitischen Lebensgemeinschaft von *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sp. KIN4/1 konnten erstmals strukturelle Details des Zell-Zell-Kontakts dargestellt werden. Die Rekonstruktion des natürlichen Verlaufs von fädigen Verbindungsstrukturen zwischen den Zytoplasmata der Zellen ermöglicht neue Überlegungen zum Mechanismus der Interaktion zwischen diesen beiden Archaeen.

Derzeit existieren noch technische Limitationen, die die Anwendung der Tomographie bzw. die Auswertbarkeit der Tomogramme einschränken. Dazu zählt die Tatsache, dass bestmöglich eine Auflösung von etwa 4 bis 6 nm erreicht wird. Dies ist vor allem bedingt durch die Niederdosisbedingungen aufgrund der extrem strahlungsempfindlichen Zellen und durch die fehlende Information aufgrund des limitierten Kipp-Bereichs.

Dadurch wurde die Darstellung von Substrukturen wie etwa der Chemorezeptor-Cluster der *Escherichia coli* Zellen derart beschränkt, dass die Anordnung der Rezeptormoleküle nicht genügend aufgelöst werden konnte.

Auch das reduzierte Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Daten aufgrund des geringen Kontrastunterschiedes der Zellen zum umgebenden Mediums und des hohen *molecular crowdings* des Zytoplasmas erschwert die Auswertung erheblich. Dadurch konnten Strukturen wie etwa der zytoplasmatische Tunnel im Zellinneren von *Thermotoga maritima* trotz seiner Größe nur mit aufwändigen Bildverarbeitungs-Verfahren zweifelsfrei nachgewiesen werden. Der vollständige Verlauf dieser Struktur war bisher aber noch nicht verlässlich erkennbar.

Die Minimierung dieser limitierenden Faktoren steht in näherer Zukunft im Mittelpunkt der technischen Bemühungen, die Kryo-Tomographie biologischer Objekte zu verbessern. Es wurden bereits einige Methoden entwickelt, diese Probleme zu reduzieren. Hier sei das

Doppelkippen der Proben erwähnt (Mastronarde et al., 1997; Penczek et al., 1995). Dabei werden zwei um 90° zueinander gedrehte Kipp-Serien ein und derselben Probenstelle aufgenommen. Bei der Rekonstruktion dieser Daten reduziert sich der missing wedge zu einem missing cone; gegenüber der Einachsenkippen ist deutlich mehr Information über die abgebildete Struktur vorhanden (Nickell et al., 2003). Diese Methode ist mit speziellen Kryo-Haltern bereits möglich und wird in zunehmenden Maße für die Aufklärung biologischer Fragestellungen eingesetzt. Die Verwendung dieser Kryo-Halter könnte den Nachweis über die Anordnung der Chemorezeptoren in den Clustern von *Escherichia coli*-Wildtyp-Zellen in einem hexagonalen Gitter erbringen.

Zur weiteren Verbesserung der Auflösung der Datensätze werden weitere Verfahren entwickelt, deren Nutzen für die Tomographie biologischer Zellen allerdings noch nicht geklärt ist. Es sei hier die Reduzierung der Bestrahlung der Proben für Kalibrierungszwecke genannt. Zurzeit werden Programme entwickelt, die sowohl das Fokussieren, als auch das ‚Tracking‘ während der Datenaufzeichnung aufgrund einer Präkalibrierung überflüssig machen (Ziese et al., 2001). Wie sich diese Programme in der Praxis bewähren, bleibt abzuwarten. Ein weiterer Ansatz ist die Tomographie ganzer Zellen, die auf die Temperatur flüssigen Heliums (etwa 4 Kelvin) gekühlt werden. Diese Methode wird erfolgreich bei Einzelmolekül-Analysen angewendet (Van Heel et al., 2000). Durch die tiefere Temperatur wird eine deutliche Reduktion der Strahlschädigung erreicht und die Proben können etwa der doppelten Elektronendosis ausgesetzt werden, ohne dass eine Zerstörung der Proben erkennbar wird. Allerdings scheinen diese positiven Effekte nicht auf dicke Präparate mit ganzen Zellen zuzutreffen. Erste Versuche ergaben bis jetzt keine erkennbare Verringerung der resultierenden Schäden an der Probe (Grant Jensen, persönliche Mitteilung).

Ein möglicher Weg für spezielle Fragestellungen ist die Anwendung gezielter, schonender präparativer Eingriffe in die Zellen um dadurch eine Verbesserung des Kontrastes zu erzielen. Als Beispiel sei hier die Polymyxin-Behandlung der *Thermotoga maritima* Zellen genannt. Durch die limitierte Lyse der Zellen konnten die störenden Effekte des molekularen ‚Crowdings‘ der Zellen deutlich reduziert werden. Die resultierenden Datensätze haben im Vergleich zu unbehandelten Zellen ein deutlich besseres Signal-zu-

Rausch-Verhältnis, und eine höhere Auflösung, was die Interpretation der Rekonstruktion der Chemorezeptor-Cluster erleichterte. Durch die Anpassung und Verfeinerung dieser schonenden Lyse der Zellen könnten auch Aussagen über die vollständige Struktur des zytoplasmatischen Tunnels im Zellinneren von *Thermotoga maritima* möglich werden.

Es ist zu erwarten, dass die Kryo-Elektronentomographie ganzer Zellen in Zukunft die Auflösung von 2 nm erreichen wird (Plitzko et al., 2002). Dies wird Aussagen über die Identität der untersuchten Strukturen auf molekularer Ebene erleichtern und fördern. Um kleinere Moleküle anhand ihres dreidimensionalen Erscheinungsbildes zu identifizieren, sind weitere Ausführungen nötig. So wäre es von großer Bedeutung, neue Methoden zur Markierung von Molekülen zu entwickeln, die einerseits im Elektronenmikroskop detektierbar sind und zum anderen an möglichst intakten Zellen durchgeführt werden können. Die Weiterentwicklung der Immunogold-Markierung intrazellulärer Strukturen an ganzen Zellen, wie sie in dieser Arbeit an den Chemorezeptor-Clustern von *Escherichia coli* erstmals durchgeführt wurde, könnte einen wichtigen Beitrag zur eindeutigen Identifizierung zellulärer Strukturen liefern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die zelluläre Elektronentomographie mit dem gegenwärtigen Stand der Technik bereits in der Lage ist, Einblicke in die strukturelle Organisation von intakten Mikroorganismen zu liefern und es dadurch ermöglicht, zu völlig neuen Erkenntnissen zu gelangen. Durch die Weiterentwicklung dieser Technik wird die Kryo-Elektronentomographie in Zukunft eine noch wichtigere Rolle bei der Strukturaufklärung biologischer Objekte spielen.

10. Referenzen

- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., and Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2001-2005.
- Bardy, S. L., Ng, S. Y. M., and Jarell, K. F. (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology* 149, 295-304.
- Berg, H. C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* 72, 19-54.
- Beveridge, T. J., Southam, G., Jericho, M. H., and Blackford, B. L. (1990). High-Resolution Topography of the S-Layer Sheath of the Archaeobacterium *Methanospirillum-Hungatei* Provided by Scanning Tunneling Microscopy. *Journal of Bacteriology* 172, 6589-6595.
- Beveridge, T. J., Sprott, G. D., and Whippey, P. (1991). Ultrastructure, Inferred Porosity, and Gram-Staining Character of *Methanospirillum-Hungatei* Filament Termini Describe a Unique Cell-Permeability for This Archaeobacterium. *Journal of Bacteriology* 173, 130-140.
- Blackford, B. L., Xu, W., Jericho, M. H., Mulhern, P. J., Firtel, M., and Beveridge, T. J. (1994). Direct observation by scanning tunneling microscopy of the two-dimensional lattice structure of the s-layer sheath of the archaeobacterium *methanospirillum hungatei* gp1. *Scanning Microscopy* 8, 507-512.
- Blair, D. F. (2003). Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett* 545, 86-95.
- Bray, D. (2003). Molecular Prodigality. *Science* 299, 1189-1190.
- Cohen-Krausz, S., and Trachtenberg, S. (2002). The structure of the archaebacterial 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.
- Crowther, R. A., DeRosier, D. J., and Klug, A. (1970). The reconstruction of a three-dimensional structure from its projections and its applications to electron microscopy. *Proceedings of the Royal Society, London* 317, 317-340.
- DePamphilis, M. L., and Adler, J. (1971). Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 105, 384-395.
- DeRosier, D. J., and Klug, A. (1968). Reconstruction of three-dimensional structures from electron micrographs. *Nature* 217, 130-134.
- Dierksen, K., and al, e. (1992). Towards atomic electron tomography. *Ultramicroscopy* 40, 71-87.

-
- Dierksen, K., and al, e. (1993). Towards automatic electron tomography II. *Ultramicroscopy* 49, 109-120.
- Doddema, M. H., Derksen, J. W. M., and Vogels, G. D. (1979). Fimbriae and flagella of methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 5, 135-138.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J., Homo, J.-C., Lepault, J., McDowell, A. W., and Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Reviews in Biophysics* 21, 129-228.
- Dubochet, J., Lepault, J., Freeman, R., Berriman, J. A., and Homo, J.-C. (1982). Electron Microscopy of Frozen Water and Aqueous Solutions. *Journal of Microscopy* 128, 219-237.
- Engel, A. M., Brunen, M., and Baumeister, W. (1993). The functional properties of Omp β , the regular arrayed porin of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiology Letters* 109, 231-236.
- Fernandez, L. A., and Berenguer, J. (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 24, 21-44.
- Ferry, J. G., Smith, P. H., and Wolfe, R. S. (1974). *Methanospirillum*, a New Genus of Methanogenic Bacteria, and Characterization of *Methanospirillum-Hungatei* Sp-Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24, 465-469.
- Firtel, M., Southam, G., Harauz, G., and Beveridge, T. J. (1993). Characterization of the Cell-Wall of the Sheathed Methanogen *Methanospirillum-Hungatei* Gp1 as an S-Layer. *Journal of Bacteriology* 175, 7550-7560.
- Firtel, M., Southam, G., Harauz, G., and Beveridge, T. J. (1994). The Organization of the Paracrystalline Multilayered Spacer- Plugs of *Methanospirillum-Hungatei*. *Journal of Structural Biology* 112, 160-171.
- Frangakis, A. S., and Hegerl, R. (2001). Noise reduction in electron tomographic reconstructions using nonlinear anisotropic diffusion. *Journal of Structural Biology* 135, 239-250.
- Fricke, H., Giere, O., Stetter, K. O., Alfredsson, G. A., Kristjansson, J. K., Stoffers, P., and Svavarsson, J. (1989). Hydrothermal vent communities at the shallow subpolar Mid-atlantic ridge. *Mar Biol* 102, 425-429.
- Gestwicki, J. E., Strong, L. E., Borchardt, S. L., Cairo, C. W., Schnoes, A. M., and Kiessling, L. L. (2001). Designed potent multivalent chemoattractants for *Escherichia coli*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9, 2387-2393.
- Gestwicki, J. E., Strong, L. E., and Kiessling, L. L. (2000). Tuning chemotactic responses with synthetic multivalent ligands. *Chemistry & Biology* 7, 583-591.
- Gluch, M. F. (1993) Untersuchungen des thermosensorischen Verhaltens von *Thermotoga maritima* durch computergestützte Bewegungsanalyse, Technische Universität, München.

Gluch, M. F., Typke, D., and Baumeister, W. (1995). Motility and thermotactic responses of *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology* 177, 5473-5479.

Gruska, M. (2004) Kryo-Elektronentomographie an *Thermotoga maritima*, Martinsried.

Hahn, E., Wild, P., Hermanns, U., Sebbel, P., Glockshuber, R., Häner, M., Taschner, N., Burkhard, P., Aebi, U., and Müller, S. A. (2002). Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Mol Biol* 323, 845-857.

Harris, W. F., and Scriven, L. E. (1970). Function of Dislocations in Cell Walls and Membranes. *Nature* 228, 827-829.

Hart, R. G. (1968). Electron microscopy of unstained biological material: The polytropic montage. *Science* 159, 1464-1467.

Hegerl, R. (1996). The EM program package: a platform for image processing in biological electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 116, 30-34.

Hoppe, W., Langer, R., Knesch, G., and Poppe, C. (1968). Protein-Kristallstrukturanalyse mit Elektronenstrahlen. *Naturwissenschaften* 55, 333-336.

Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyschkony, I., Rachel, R., and Stetter, K. O. (2000). *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2093-2100.

Huber, H., Hohn, M., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., and Stetter, K. O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417, 63-67.

Huber, H., Hohn, M., Stetter, K. O., and Rachel, R. (2003). The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Research in Microbiology* 154, 165-171.

Huber, R., Langworthy, T. A., König, H., Thomm, M., Woese, C. R., Sleytr, U. B., and Stetter, K. O. (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria, growing up to 90°C. *Arch Microbiol* 144, 324-333.

Jarell, K. F., Bayley, D. P., Correia, J. D., and Thomas, D. R. (2001). Archaeal Flagella. In *Nature Encyclopedia of life sciences* (London, Nature Publishing Group).

Jensen, R. B., Wang, S. C., and Shapiro, L. (2002). Dynamic localisation of proteins and DNA during a bacterial cell cycle. *Nature Reviews* 3, 167-176.

Jones, C., and Aizawa, S. (1991). The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and motor. *Advances in Microbial Physiology* 32.

Kahn, S., Dapice, M., and Reese, t. S. (1988). Effects of mot gene expression on the structure of the flagellar motor. *J Mol Biol* 202, 575-584.

-
- Kahn, S., Jain, S., Reid, G. P., and Trentham, D. R. (2004). The Fast Tumble Signal in Bacterial Chemotaxis. *Biophysical Journal* 86, 4049-4058.
- Kahn, S., Kahn, I. H., and Reese, T. S. (1991). New structural features of the flagellar base in *Salmonella typhimurium* revealed by rapid-freeze electron microscopy. *Journal of Bacteriology* 173, 2888-2896.
- Katayama, E., Shiraishi, T., Oosawa, K., Baba, N., and Aizawa, S. (1996). Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images. *J Mol Biol* 225, 458-475.
- Kojima, S., and Blair, D. F. (2001). Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry* 40, 13041-13050.
- Koppes, L. J. H., Woldringh, C. L., and Nanninga, N. (1999). *Escherichia coli* contains a DNA replication compartment in the cell center. *Biochimie* 81, 803-810.
- Koster, A. J., Grimm, R., Typke, D., Hegerl, R., Stoschek, A., Walz, J., and Baumeister, W. (1997). Perspectives of molecular and cellular electron tomography. *Journal of Structural Biology* 120, 276-308.
- Krieg, N. R. (2001). Prokaryotic domains, Vol 1, Second edition edn (New York, Berlin, Heidelberg, Springer).
- Le Moual, H., and Koshland, D. E. J. (1996). Molecular Evolution of the C-terminal cytoplasmic domain of a superfamily of bacterial receptors involved in taxis. *J Mol Biol* 261, 568-585.
- Leadbetter, J. R., and Breznak, J. A. (1996). Physical ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3620-3631.
- Lefman, J., Zhang, P., Hirai, T., Weis, R. M., Juliani, J., Bliss, D., Kessel, M., Bos, E., Peters, P. J., and Subramaniam, S. (2004). Three-Dimensional Electron Microscopic Imaging of Membrane Invaginations in *Escherichia coli* Overproducing the Chemotaxis Receptor Tsr. *Journal of Bacteriology*, 5052-5061.
- Lengeler, J. W., Drews, G., and Schlegel, H. G. (1999). *Biology of the Prokaryotes* (Stuttgart New York, Georg Thieme Verlag).
- Lepault, J., Booy, F. P., and Dubochet, J. (1982). Electron microscopy of frozen biological suspensions. *J Microsc* 129, 89-102.
- Li, X., and Mobley, H. L. T. (2001). *Bacterial pili and fimbriae* (London, Nature Publishing group).

-
- Lupas, A., Müller, S., Goldie, K., Engel, A. M., and Baumeister, W. (1995). Model structure of the Omp α rod, a parallel four-stranded coiled coil from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Journal of Molecular Biology* 248, 180-189.
- Lybarger, S. R., and Maddock, J. (2001). Polarity in Action: Asymmetric Protein Lokalization in Bacteria. *Journal of Bacteriology* 183, 3261-3267.
- Maddock, J. R., and Shapiro, L. (1993). Polar Location of the Chemoreceptor Complex in the Escherichia-Coli Cell. *Science* 259, 1717-1723.
- Maladin, L., Huber, H., and Bernander, R. (1999). Nucleoid Structure and Partition in *Methanococcus janaschii*: An Archaeon with Multiple Copies of the Chromosome. *Genetics* 152, 1315-1323.
- Mastrorade, D. A., and al., e. (1997). Dual-axis tomography: An Approach with Alignment Methods that Preserve Resolution. *Journal of Structural Biology* 120, 343-352.
- Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A. S., Nicastro, D., Gerisch, G., and Baumeister, W. (2002). Macromolecular Architecture in Eucaryotic Cells Visualized by Cryoelectron Tomography. *Science* 298, 1209-1213.
- Miroshnichenko, M. L., Gongadze, G. M., Rainey, F. A., Kostyukova, A. S., Lysenko, A. M., Chernyh, N. A., and Bonch-Osmolovskaya, E. A. (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., Rachel, R., Briegel, A., Engelhardt, H., and Huber, R. (in press). The Unique Structure of Archaeal "Hami", Highly Complex Cell Appendages with Nano-Grappling Hooks. *Molecular Microbiology*.
- Moissl, C., Rudolph, C., Rachel, R., Koch, M., and Huber, R. (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.
- Namba, K., and Vonderviszt, F. (1997). *Q Rev Biophys* 30, 1-65.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., *et al.* (2000). Genome Sequence of Halobacterium Species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12176-12181.
- Nickell, S., Hegerl, R., Baumeister, W., and Rachel, R. (2003). Pyrodictium cannulae enter the periplasmic space but do not enter the cytoplasm, as revealed by cryo-electron tomography. *Journal of Structural Biology* 141, 34-42.
- Otten, M. (1991). High-angle Annular Darkfield Imaging on a TEM/STEM system. *J Electron Microscop Tech* 17, 221-230.

-
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P., Bishop-Steward, J., Bhalgat, M. K., Millard, P. J., Mao, F., Leung, W., and Haugland, R. P. (1999). Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 47, 1179-1188.
- Paul, A., Engelhardt, H., Jakubowski, U., and Baumeister, W. (1992). Two-dimensional crystallization of a bacterial surface protein on lipid vesicles under controlled conditions. *Biophysical Journal* 61, 172-188.
- Penczek, P., and al., e. (1995). Double-tilt Electron Tomography. *Ultramicroscopy* 60, 393-410.
- Plitzko, J. M., Frangakis, A. S., Nickell, S., Förster, F., Gross, A., and Baumeister, W. (2002). In vivo veritas: electron cryotomography of cells. *Trends in Biotechnology* 20, 540-544.
- Rachel, R., Engel, A. M., Huber, R., Stetter, K. O., and Baumeister, W. (1990). A porin-type protein is the main constituent of the cell envelope of the ancestral eubacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS* 262, 64-68.
- Rachel, R., Wyschkony, I., Riehl, S., and Huber, H. (2001). The ultrastructure of *Ignicoccus*: Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea* 1.
- Rudolph, C., Wanner, G., and Huber, R. (2001). Natural communities of novel archaea and bacteria growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2336-2344.
- Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., and Namba, K. (2001). Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* 410, 331-337.
- Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*, 7 edn (Stuttgart, New York, Thieme).
- Schuster, S. C., and Baeuerlein, E. (1992). Location of the basal disc and ringlike cytoplasmic structure, two additional structures of the flagellar apparatus of *Wolinella succinogines*. *Journal of Bacteriology* 174, 263-268.
- Shaw, P. J., Hills, G. J., Henwood, J. A., Harris, J. E., and Archer, D. B. (1985). 3-Dimensional Architecture of the Cell Sheath and Septa of *Methanospirillum-Hungatei*. *Journal of Bacteriology* 161, 750-757.
- Shimizu, T. S., Le Novere, N., Levin, M. D., Beavil, A. J., Sutton, B. J., and Bray, D. (2000). Molecular model of a lattice of signalling proteins involved in bacterial chemotaxis. *Nature Cell Biology* 2, 792-796.
- Sosinsky, G. E., Francis, N. R., Stallmeyer, M. J. B., and DeRosier, D. J. (1992). Substructure of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 223, 171-184.

-
- Southam, G., and Beveridge, T. J. (1992). Detection of Growth Sites in and Protomer Pools for the Sheath of Methanospirillum-Hungatei Gp1 by Use of Constituent Organosulfur and Immunogold Labeling. *Journal of Bacteriology* 174, 6460-6470.
- Southam, G., Firtel, M., Blackford, B. L., Jericho, M. H., Xu, W., Mulhern, P. J., and Beveridge, T. J. (1993). Transmission Electron-Microscopy, Scanning Tunneling Microscopy, and Atomic Force Microscopy of the Cell-Envelope Layers of the Archaeobacterium Methanospirillum-Hungatei Gp1. *Journal of Bacteriology* 175, 1946-1955.
- Southam, G., Kalmokoff, M. L., Jarrell, K. F., Koval, S. F., and Beveridge, T. J. (1990). Isolation, Characterization, and Cellular Insertion of the Flagella from 2 Strains of the Archaeobacterium Methanospirillum-Hungatei. *Journal of Bacteriology* 172, 3221-3228.
- Stallmeyer, M. J. B., Hahnenberger, K. M., Sosinsky, G. E., Shapiro, L., and DeRosier, D. J. (1989). Image reconstruction of the flagellar basal body of *Caulobacter crescentus*. *J Mol Biol* 205, 511-518.
- Stewart, M., Beveridge, T. J., and Sprott, G. D. (1985). Crystalline Order to High-Resolution in the Sheath of Methanospirillum-Hungatei - a Cross-Beta Structure. *Journal of Molecular Biology* 183, 509-515.
- Swanson, R. V., Sanna, M. G., and Simon, M. I. (1996). Thermostable chemotaxis proteins from the hyperthermophilic bacterium *thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology* 178, 484-489.
- Szurmant, H., and Ordal, G. W. (2004). Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 301-319.
- Taylor, K. A., and Glaeser, R. M. (1974). Electron diffraction of frozen-hydrated biological material. *Science* 186, 1036-1037.
- Taylor, K. A., and Glaeser, R. M. (1976). Electron microscopy of frozen hydrated biological specimens. *J Ultrastruct Res* 55, 448-456.
- Van Heel, M., Gowen, b., Matadeen, R., Orlova, E. V., Finn, R., Pape, T., Cohen, D., Stark, H., Schmidt, R., Schatz, M., and Patwardhan, A. (2000). Single-Particle Electron Cryo-Microscopy: Towards Atomic Resolution. *Quarterly Reviews in Biophysics* 33, 307-369.
- Wagenknecht, T., and DeRosier, D. J. (1982). Flagellar hook structures of *Caulobacter* and *Salmonella* and their relationship to the filament structure. *J Mol Biol* 162, 69-87.
- Waters, E., Hohn, M., Ahel, I., Graham, D. E., Adams, M. D., Barnstead, M., Beeson, K. Y., Bibbs, L., Bolanos, R., Keller, M., *et al.* (2003). The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *PNAS* 100, 12984-12988.

-
- Wildhaber, I., and Baumeister, W. (1987). The cell envelope of *Thermoproteus tenax*: Three-dimensional structure of the surface layer and its role in shape maintenance. *EMBO Journal* 6, 1475-1480.
- Woese, C. R., and Fox, G. E. (1977). Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5088-5090.
- Woldringh, C. L., and Zaritsky, A. (1994). Nucleotid partitioning and the division plane in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 176, 6030-6038.
- Xu, W., Blackford, B. L., Mulhern, P. J., Jericho, M. H., Firtel, M., and Beveridge, T. J. (1995). Stm Imaging of Metal-Coated Cell Plugs of the Archaeobacterium *Methanospirillum-Hungatei* Gp1. *Journal of Microscopy-Oxford* 178, 42-47.
- Yonekura, K., Maci-Yonekura, S., and Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 424, 643-650.
- Zeikus, J. G., and Bowen, V. G. (1975). Fine-Structure of *Methanospirillum-Hungatii*. *Journal of Bacteriology* 121, 373-380.
- Zhang, P., Boos, W., Heymann, J., Gnaegi, H., Kessel, M., and Subramaniam, S. (2004). Receptor Arrays in Frozen-Hydrated *E. coli* Direct visualization of receptor arrays in frozen-hydrated sections and plunge-frozen specimens of *E. coli* engineered to overproduce the chemotaxis receptor Tsr. *Journal of Microscopy* 216, 76-83.
- Zhao, R., Pathak, N., Jaffe, H., Reese, T. S., and Kahn, S. (1996). FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J Mol Biol* 261, 195-208.
- Ziese, U., Janssen, A. H., Murk, J.-L., Geerts, W. J. C., Van der Krift, T., Verkleij, A. J., and Koster, A. J. (2001). Automated High-Throughput Electron Tomography by Pre-Calibration of Image Shifts. *J Microsc* 205, 187-200.

11. Danksagung

Im folgenden möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht haben. Mein ganz besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. W. Baumeister für seine Unterstützung, seine Betreuung und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Dr. Harald Engelhardt für sein immer offenes Ohr, seine unschätzbaren Ratschläge, den zahllosen Diskussionen und der Durchsicht dieser Arbeit

Dr. Jürgen Plitzko für die Unterstützung rund um das Mikroskop - auch außerhalb gewöhnlicher Arbeitszeiten war immer Verlass auf schnelle Hilfe!

Dr. Reiner Hegerl für seine Hilfe und Geduld in allen Fragen rund um physikalische Fragen und das EM-Programm.

Dr. Marek Cyrklaff für die Einführung in die Kryo-Techniken und die Bedienung der Mikroskope.

Dr. Daniela Nicastrò für die Einführung in die Tomographie, ihre Hilfe im Umgang mit dem EM-Programm und die unzähligen Diskussionen.

Dr. Susanne Witt für ihre kompetente Hilfe, Geduld Unterstützung in allen Fragen rund um die Biochemie, den unzähligen Diskussionen und für die Durchführung der Western Blots.

Alexandros Linaroudis für die Bildverarbeitung und Hilfe bei Fragen rund um den Computer.

Alexandra Gerega für das Anfertigen von Western Blots.

Meinem ‚Diplomandenkind‘ Manuela Gruska für die gute Zusammenarbeit.

Meinen ‚Mit-Doktoranden‘ Christine Kofler, Julia Kürner, Friedrich Förster, Alexandros Linaroudis und Lars Andrees für das gute Arbeitsklima.

Oana Michalache, Brigitte Kühlmorgen und Günther Pfeiffer für ihre Hilfsbereitschaft.

Birgit Book und Sabina von Polenz für die freundliche Hilfe in allen Bürokratiefragen.

Den ‚Regensburgern‘ Reinhard Rachel für die schöne Zusammenarbeit, seine Unterstützung und Hilfe in allen Fragen rund um die Prokaryonten und die kritische Durchsicht dieser Arbeit;

Christine Moissl für die schöne und erfolgreiche Zusammenarbeit, für die Durchsicht von Teilen dieser Arbeit und viele schöne Diskussionen;
Robert Huber und Harald Huber für die gute Zusammenarbeit.

Dr. Dennis Bray und Erin McElroy für die Zusammenarbeit im Chemotaxisprojekt.

Meinem Mann, für seine Geduld, seine Aufmunterung, sein Verständnis und seine Unterstützung in jeder Hinsicht.

Meinen Eltern für all die uneingeschränkte Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Meiner Schwiegermutter für die unschätzbare Hilfe, ohne die diese Arbeit nie fertig geworden wäre.

Aurelia, Sebastian, Armin und Sabine für das Verständnis, Unterstützung und Hilfe.

Meinem Sohn Kai, der mich immer zum Lachen gebracht hat und mich damit an die wichtigsten Dinge im Leben erinnert hat.