

Charakterisierung von S-Layer-Proteinen bei Prokaryoten

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Erol Akça

geboren am 28. Juli 1973 in Kirn

Mainz, 2004

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2000 bis Dezember 2003 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. H. König durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise veröffentlicht:

Publikationen und Posterpräsentationen

1. Claus H., Akça E., Schultz N., Karbach G., Schlott B., Debaerdemaeker T., Declercq J.-P., König H. (2001): Surface (glyco-)proteins: primary structure and crystallization under microgravity conditions. In: Proc. First European Workshop on Exo-/Astrology: 313-320
2. Akça E., Claus H., Schultz N., Karbach G., Schlott B., Debaerdemaeker T., Declercq J.-P., König H. (2002): Genes and derived amino acid sequences of S-layer proteins from mesophilic, thermophilic and extremely thermophilic *methanococci*. *Extremophiles* 6: 351-358
3. Claus H., Akça E., Evrard C., Debaerdemaeker T., Declercq J.-P., König H. (2002): Primary structure of selected archaeal mesophilic and extremely thermophilic outer surface layer proteins. *System Appl. Microbiol.* 25: 3-12
4. Debaerdemaeker T., Evrard C., Declercq J.-P., Claus H., Akça E., König H. (2002): The first crystallization of the outer surface (S-layer) glycoprotein of the mesophilic bacterium *Bacillus sphaericus* and the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*. In: Proc. Second European Workshop on Exo-/Astrology: 411-442
5. Schultz N., Claus H., Akça E., Karbach G., König H. (2000): Comparative studies of the cell envelope proteins from mesophilic, thermophilic and extreme thermophilic methanococci. Posterpräsentation auf der The 3rd International Congress on Extremophiles, vom Sept. 2000 in Hamburg
6. Claus H., Akça E., Schultz N., Karbach G., König H. (2001): Comparative studies of cell envelope proteins from mesophilic, thermophilic and extreme thermophilic *methanococci*. Posterpräsentation auf der VAAM-Jahrestagung, März 2001 in Oldenburg
7. Debaerdemaeker T., Evrard C., Declercq J.-P., Claus H., Akça E., König H. (2002): Crystallization of the outer surface (S-layer) glycoprotein of the mesophilic bacterium *Bacillus sphaericus* and hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*. Posterpräsentation auf der Astrobiology Science Conference, USA, Ames, San Francisco, April 2002
8. Claus H., Akça E., Debaerdemaeker T., Evrard C., Declercq J.-P., König H. (2002): Primary structure of selected archaeal mesophilic and extremely thermophilic outer surface layer proteins. Posterpräsentation auf der Astrobiology Science Conference, USA, Ames, San Francisco, 2002

9. Akça E., Claus H., König H. (2002): S-layer proteins and genes of mesophilic, thermophilic, and extremely thermophilic *methanococci*. Posterpräsentation auf der VAAM-Jahrestagung, vom März 2002 in Göttingen
10. Akça E., Claus H., König H. (2002): Comparison of surface layer proteins from *Methanococcales* living under different thermoconditions. Posterpräsentation auf der The 4th International Congress on Extremophiles, September 2002 in Neapel
11. König H., Akça E., Claus H., Schlott B., Debaerdemaeker T., Declercq J.-P. (2003): Primary structure of the S-layer proteins from mesophilic, thermophilic, and hyperthermophilic *Methanococcales*. Posterpräsentation auf der 1st FEMS Congress of European Microbiologists, Slovenia, Ljubljana vom July 2003

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. H. Paulsen

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

27. Februar 2004

Diese Arbeit widme ich meinen verstorbenen Eltern.

Verwendete Abkürzungen

aa	amino acid (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATTC	American Type Culture Collection
BRE-Box	B Recognition Element-Box
bp	Basenpaar
B&W-Puffer	Binding & Wash-Puffer
Ca	Calcium
CBS	Center for Biological Sequence Analysis
CIP	Calp Intestinal Alkaline Phosphatase (Alkaline Phosphatase)
c-Region	Charged-Region
Da	Dalton
DABCO	1,1-Diazobicyclo-[2,2,2]Oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ExPaSy	Expert Protein Analysis System
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
h-Region	Hydrophobic-Region
IEF	Isoelektrische Fofussierung
IgG	Immunoglobulin G
iProClass	An Integrated Protein Classification Database
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (mol/l)
mM	Millimolar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonic acid 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Min	Minuten
Mn	Mangan
MPC	Magnetic Particle Concentrator
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (messenger Ribonucleinsäure)
mU	Milliunit
MW	Molecular Weight
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
n-Region	Nonhydrophobic-Region
OD	optische Dichte
PAS	Periodic Acid Schiff Reaction (Periodsäure-Schiff-Reaktion)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Negativer Dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PVDF-Membran	Polyvinylidid-Fluorid
RBS	Ribosomen Bindungsstelle
rpm	Revolutions Per Minute
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonucleinsäure)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium Docecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium Docecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S-Layer	Surface-Layer (Hüllprotein-Layer)
SLH	Surface Layer Homology
16S rRNA	16S ribosomale Ribonucleinsäure
SRS	Sequence Retrieval System
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetic Acid Glacial-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline Tween 20
TEMED	N,N,N,N,'-Tetramethylethylendiamin
TFB	Transcription Faktor B
TIGR	The Institute for Genomic Research
T _m	Melting Temperatur

T _{Opt.}	Temperaturoptimum
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
ÜN	Über Nacht
UP	Upstream Promoter
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolet
V	Volt
v/v	Volumen per Volume (Volumen pro Volumen)
W	Watt
w/v	Weight per Volume (Gewicht pro Volumen)
w/w	Weight per Weight (Gewicht pro Gewicht)

Symbole für Aminosäuren

Aminosäuren	IUPAC-IUI-Code	Kurz-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Asparagin oder -säure	Asx ¹⁾	B
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin oder -säure	Glx ¹⁾	Z
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

¹⁾ verwendet, wenn zwischen Asn/Asp bzw. Gln/Glu nicht unterschieden werden kann

Symbole für Nukleotide

A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin

Abkürzung der verwendeten Organismen

<i>A. salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>B. fusiformis</i>	<i>Bacillus fusiformis</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>B. pseudofirmus</i>	<i>Bacillus pseudofirmus</i>
<i>B. sphaericus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>C. fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>Cb. glaucum</i>	<i>Corynebacterium glaucum</i>
<i>Cl. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Cl. thermosaccharolyticum</i>	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Gb. stearothermophilus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>M. vannielii</i>	<i>Methanococcus vannielii</i>
<i>M. voltae</i>	<i>Methanococcus voltae</i>
<i>Mcc. jannaschii</i>	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
<i>Mt. igneus</i>	<i>Methanotorris igneus</i>
<i>Mth. thermolithotrophicus</i>	<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>
<i>Mts. fervidus</i>	<i>Methanothermus fervidus</i>
<i>Mts. sociabilis</i>	<i>Methanothermus sociabilis</i>
<i>R. prowazekii</i>	<i>Rickettsia prowazekii</i>
<i>R. typhi</i>	<i>Rickettsia typhi</i>

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 EINLEITUNG	1
1.1 Historie der S-Layer Forschung	1
1.2 Zellwandstrukturen bei S-Layer-tragenden Prokaryoten	3
1.3 Molekularer Aufbau der S-Layer	7
1.4 Funktion der S-Layerschicht	10
1.5 Gensequenzen der S-Layer-Proteine	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Organismen	17
2.2 Kultivierung der Organismen	17
2.2.1 Kultivierung der methanogenen Archaeobakterien	17
2.2.2 Basalsalz	21
2.2.3 Kultivierung der Bacillaceae	21
2.3 Mikroskopie	22
2.4 Elektrophorese	22
2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
2.4.2 Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.4.3 Proteinfärbung	24
2.5 Proteinbestimmung	24
2.6 Isolierung der S-Layer-Proteine der Methanococcales	25
2.6.1 Anzucht und Ernte der Zellen	25
2.6.2 Herstellung von S-Layer-Proteinextrakt	26
2.6.3 Isolierung der S-Layer-Proteine aus dem Kulturmedium	27
2.7 Reinigung der S-Layer-Proteine	27
2.7.1 Reinigung der S-Layer-Proteine durch präparative isoelektrische Fokussierung	27
2.7.2 Isolierung der S-Layer	28

2.8 Isolierung der S-Layer-Proteine der Bacillaceae	28
2.9 Proteolytischer Verdau der S-Layer-Proteine	28
2.10 Isoelektrischer Punkt der S-Layer-Proteine	29
2.10.1 Analytische Isoelektrische Fokussierung	29
2.10.2 Proteinfärbung	30
2.11 Nachweismethoden zur Glykolysierung bei Proteinen	30
2.11.1 Glykoprotein-Färbung (PAS-Test)	30
2.11.2 Enzym-Immunoassay Nachweismethodik zur Glykosilierung (Roche)	31
2.11.3 Chemische Deglykolisierung	31
2.12 Untersuchung zur Stabilität der S-Layer-Proteine	31
2.12.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Protein-Konformation	31
2.12.2 Einfluss der Temperatur auf die Protein-Konformation	32
2.12.3 Wechselwirkung der S-Layer-Proteine mit zweiwertigen Kationen	32
2.13 Immunologischer Nachweis des S-Layer-Proteins von <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> (slmj1)	32
2.13.1 Dot-Blot	33
2.13.2 Western-Blot	33
2.13.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie	34
2.14 Sequenzierung der N-Termini	35
2.14.1 Proteintransfer auf PVDF-Membranen	35
2.14.2 Sequenzierung der N-Termini der S-Layer-Proteine	36
2.15 PCR-Strategien und PCR-Produkte	36
2.15.1 DNA-Präparation	38
2.15.2 Amplifikation vom S-Layer-Gen durch Zwei-Schritt-PCR	39
2.15.3 Aufreinigung der Biotin-markierten PCR-Fragmente mit Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna)	43
2.15.4 Amplifikation vom S-Layer-Gen durch die Drei-Schritt-PCR	45
2.16 Amplifikation vom S-Layer-Gen aus mit Datenbankvergleich resultierenden Oligonukleotiden	46

2.16.1 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	46
2.16.2 Aufreinigung der PCR-Produkte	47
2.16.3 TA Klonierung der PCR-Amplifikate	47
2.16.4 Aufreinigung der Plasmide	49
2.16.5 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmidkonstrukten	49
2.17 Heterologe Expression des S-Layer-Proteins slmj1 im <i>E.coli</i> -System	49
2.17.1 Amplifikation des S-Layer-Gens slmj1	49
2.17.2 Restriktion des Fusionsplasmids pCR2.1-slmj1 und pET28a	51
2.17.3 Ligation des S-Layer-Gens slmj1 mit Expressionsvektor pET28a	52
2.17.4 Transformation des Expressionsplasmids pET28a-slmj1 in <i>E. coli</i> JM 105	53
2.17.5 Transformation des Expressionsplasmids pET28a-slmj1 in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	54
2.17.6 Expression und Reinigung des heterologen S-Layer-Proteins slmj1	55
2.18 Datenbanken zur Sequenzauswertung	56
3 ERGEBNISSE	57
 PROTEINCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN	
3.1 Löslichkeitsverhalten der S-Layer-Proteine in verschiedenen Agenzien	57
3.2 Reinigungen der S-Layer-Proteine der Ordnung Methanococcales	58
3.3 Glykosilierung der S-Layer-Proteine	60
3.4 Konformationsänderung des S-Layer-Proteins slmj1	63
3.5. Isoelektrische Punkt der hyperthermophilen S-Layer-Proteine	66
3.6 Aminosäuresequenzen der S-Layer-Proteine von <i>Bacillaceae</i>	67
 MOLEKULARGENETISCHE EIGENSCHAFTEN	
3.7 Identifizierung der S-Layer-Gene bei Prokaryoten	69
3.7.1 Nachweis der S-Layer-Gene der Ordnung Methanococcales	69
3.7.2 S-Layer Aminosäuresequenzen der Methanococcales	73
3.7.3 Nachweis der S-Layer-Gene aus der Familie der <i>Bacillaceae</i>	75
3.7.3.1 S-Layer-Gensequenz von <i>Bacillus sphaericus</i> DSM 396	75

3.7.3.2 S-Layer-Gensequenzen von <i>Bacillus fusiformis</i> DSM 2898T und B3	81
3.7.3.3 S-Layer-Gensequenz von <i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 2358	86
3.8 Sequenzanalysen mit der 16S rRNA von Bacillaceae	89
3.9 Vergleiche der Gen- und Proteinsequenzen der S-Layer von Bacillaceae	89
KLONIERUNGS- UND EXPRESSIONSDATEN	
3.10 Expression und Reinigung des S-Layer-Proteins slmj1	94
3.11 Eigenschaften des heterolog expremierten S-Layer-Proteins slmj1	97
IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VOM S-LAYER-PROTEIN (SLMJ1)	
3.12 Dot-Blot Analyse	99
3.13 Western-Blot Analyse	99
4 DISKUSSION	101
4.1 Isolierung und Charakterisierung der S-Layer-Proteine aus der Ordnung Methanococcales	101
4.2 Klonierung und Charakterisierung des heterolog expremierten S-Layer-Proteins slmj1	110
4.3 Isolierung und Charakterisierung der S-Layer-Proteine aus der Familie der Bacillaceae	112
4.4 Vergleich der S-Layer-Proteine aus der Familie der <i>Bacillaceae</i>	118
5 ZUSAMMENFASSUNG	123
6 LITERATURVERZEICHNIS	126
7 ANHANG	138

1 Einleitung

Seit den neunziger Jahren werden die Lebensformen auf unserem Planeten in drei phylogenetische Domänen *Bacteria*, *Archaea* und *Eucarya* unterteilt (WOESE *et al.*, 1990; KANDLER, 1998). Zu den Prokaryoten zählen die Bakterien (früher: Eubakterien) und die *Archaea* (früher: Archaeobakterien), die die kleinsten einzelligen Lebensformen darstellen. Die meisten *Bacteria* und *Archaea* besitzen Zellwandstrukturen die auf der Cytoplasmamembran verankert vorliegen. Die prokaryotische Zellhülle, bestehend aus Cytoplasmamembran und assoziierten Oberflächenproteinen, reguliert den molekularen Stoff-Austausch zwischen der Zelle und Umgebung. Außerdem muss die Zellhülle stabil genug sein, um dem Innendruck des Protoplasten standzuhalten und gleichzeitig an der Formgebung des Organismus beteiligt zu sein. Die meisten archaeobakteriellen und bakteriellen Organismen leben in spezialisierten biologischen Nischen, die eine spezifische Anpassung der äußeren Grenzschicht an die Umgebung erfordern. Dies spiegelt sich in der molekularen Architektur der Zellwände, die eine Vielfalt an spezifischen Zellwandstrukturen zeigt (BEVERIDGE & GRAHAM, 1991).

Von den vielen Oberflächenproteinen zählt das S-Layer-Protein bei *Archaea* und *Bacteria* zu den häufigsten. Nach morphologischen, chemischen, genetischen und morphogenetischen Untersuchungen stellt das S-Layer-Oberflächenprotein, die ursprünglichste und älteste Form einer Biomembran dar (MURRAY, 1993; SLEYTR *et al.*, 1993; SLEYTR 1997). Die S-Layerschicht wird aus ein oder zwei (Glyko-)Proteinmolekülen aufgebaut. Die kristalline Proteinoberfläche bildet sich, während der Zellteilung und des Zellwachstums, durch Selbstorganisation aus.

1.1 Historie der S-Layer Forschung

Die erstmalige Beschreibung von parakristallinen Zellwandschichten erfolgte durch HOUWINK (1953) nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen an *Aquaspirillum sp.* In den folgenden drei Jahren wurden elektronenmikroskopisch nach Negativ-Kontrastierung weitere vier Gattungen mit hochgeordneten Gitterstrukturen in den Zellwänden nachgewiesen: grampositiven Bakterium *Bacillus megaterium* (SALTON & WIALLIAMS, 1954), anaeroben phototrophen Purpurbakterium *Rhodospirillum rubrum* (SALTON & WIALLIAMS, 1954), gramnegativen anaeroben Bakterium *Selenomonas palpitans* (VAN ITERSON, 1956) und Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* (HOUWINK, 1956).

Im Verlauf der nächsten zehn Jahre wurde offensichtlich, dass S-Layerschichten bei vielen prokaryotischen Spezies vorkommen. Diese sind: *Azomonas insigne* (GLAUERT, 1962), *Lampropedia hyalina* (CHAPMAN *et al.*, 1963), *Halobacterium salinarium* (MOHR & LARSON, 1963), *Treponema microdentium* (LISTGARTEN & SOCRANSKY, 1964), *Bacillus subtilis* (HOWATSON & RUSSEL, 1964), *Caulobacter sp.* (DE BOER & SPIT, 1964), *Halobacterium cutirubrum* (KUSHNER *et al.*, 1964), *Clostridium botulinum* (TAKAGI *et al.*, 1965), *Clostridium tetani* (TAKAGI *et al.*, 1965) und *Bacillus alvei* (YOSHII, 1966).

Die erste bedeutende Veröffentlichung über S-Layer-Eigenschaften erfolgte über die Spezies *Geobacillus stearothermophilus* (SLEYTR *et al.*, 1967). Später folgten weitere Veröffentlichungen über *Clostridium thermohydrosulphuricum*, *Cl. thermosaccharolyticum* und *Desulfotomaculum nigrificans* (SLEYTR *et al.*, 1968, 1969).

Mit der Entwicklung der Gefrierätztechnik (Gefrierbruchtechnik) wurde im Zeitraum von 1966-1972 eine zunehmende Zahl an bakteriellen und archaebakteriellen S-Layerschichten elektronenmikroskopisch entdeckt und beschrieben.

Im Zeitraum von 1984 bis 1996 wurden vier internationale Tagungen über bakterielle S-Layer organisiert. Die letzte internationale S-Layer-Tagung wurde durch H. König und P. Messner 1996, in Rothenburg o. d. Tauber (Deutschland), organisiert. Alle Beiträge zu den Tagungen wurden in speziellen Tagungsbänden veröffentlicht.

Die meisten heutigen S-Layer-Forschungen widmen sich der Erforschung des biochemischen Aufbaus der Proteinuntereinheiten, ihrer Biosynthese, dem Zusammenspiel und der Bindung mit anderen Zellwandkomponenten, der Regulation und Kontrolle der Expression und ihrer funktionellen Aufgabe bei den verschiedenen prokaryontischen Spezies. Diese Untersuchungen sollen unter anderem zu einer Anwendung dieser einzigartigen biologischen Moleküle in der Nanotechnologie führen (siehe Tab. 1).

Tab. 1 Anwendungsgebiete von S-Layerschichten in Nano-, Biotechnologie und Biomimetik

- Anwendung in der Biotechnologie und Biomimetik
 - Ultrafiltrationsmembran mit einheitlicher Porengröße (SUM)
 - Matrix zur Immobilisierung von funktionellen Makromolekülen
 - Vakzinentwicklung
 - Trägerschicht für funktionelle Lipidmembranen
 - Biomineralisation
- Anwendung in der Nanotechnologie (Matrizenvorlage zur Herstellung regelmäßig angeordneter Nanopartikel)
 - Rekristallisation auf festen Trägern
 1. Edelmetalle zur Entwicklung ultradünner Arbeitselektroden für amperometrische Biosensoren
 2. S-Layer belegten Glas zur Entwicklung von optischen und elektrooptischen Sensorsystemen führen
 3. Wafer für die Mikroelektronik und bei miniaturisierten integrierten Biosensoren

1.2 Zellwandstrukturen bei S-Layer-tragenden Prokaryoten

Die Zellwandprofile der meisten S-Layer tragenden Prokaryoten lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen, die die phylogenetische Herkunft der einzelnen Organismen widerspiegelt (siehe Abb. 1). Für Gram-negative Archaeen sind zwei Zellwandstrukturen beschrieben (siehe Abb. 1a-b).

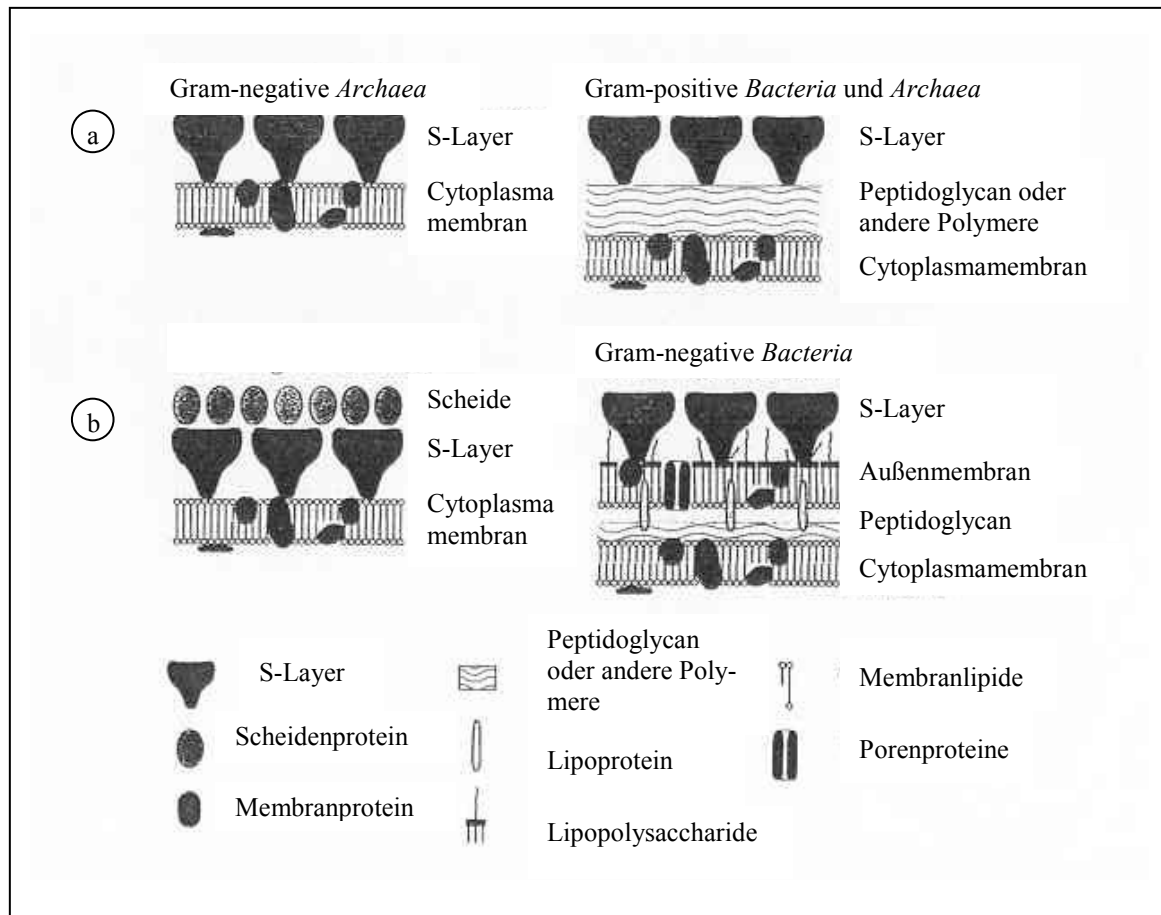


Abb. 1 Schematische Darstellung der Zellwandstrukturen der Hauptgruppen von *Archaea* und *Bacteria* mit S-Layerschichten (SLEYTR *et al.*, 1999)

In vielen Prokaryoten wurden S-Layerschichten nachgewiesen, die direkt der Cytoplasmamembran, Außenmembran oder dem Peptidoglycan aufliegen können (SLEYTR *et al.*, 1993). Ein typisches Merkmal fast aller archaebakteriellen Zellhüllen ist der Besitz von S-Layer. Die Zelloberflächenstrukturen von Prokaryoten können durch Gefrierbruchtechnik und Negativ-Kontrastierung elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Insbesondere die Gefrierätztechnik eignet sich für den eindeutigen Nachweis einer Oberflächenstruktur mit S-Layerschichten (siehe Abb. 2).

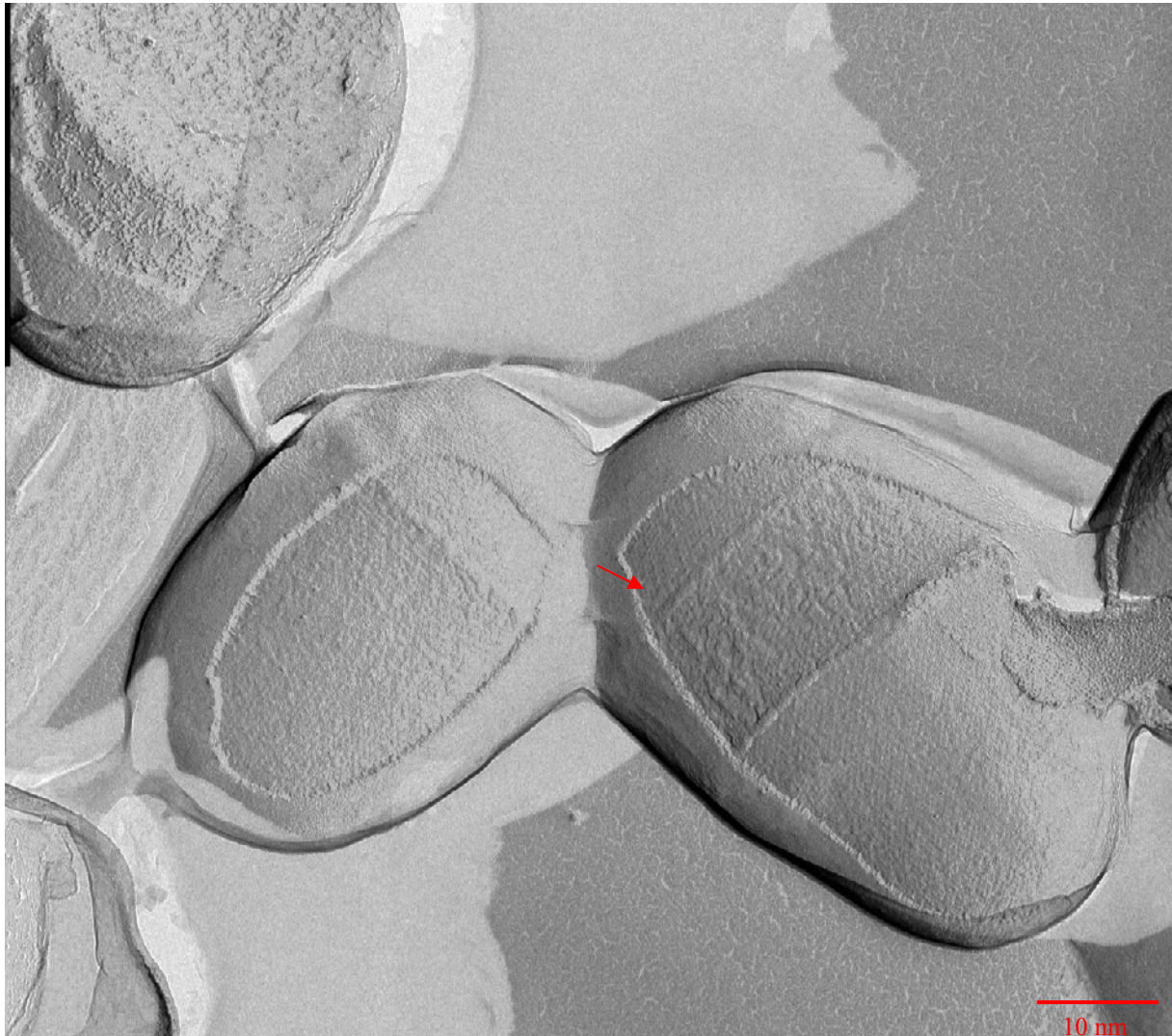


Abb. 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gefrierätz-Präparation von *Corynebacterium glaucum* mit hexagonalem (p6) S-Layerschicht-Gitter.

Pfeil weist auf die Bruchstelle mit S-Layerschicht auf der Zelloberfläche hin. (Die Länge des Balkens entspricht 10 nm.) (Aufnahme R. Rachel, Universität Regensburg)

Der S-Layer setzt sich aus identischen Monomeren zusammen, die theoretisch verschiedene Symmetrien annehmen können. Die Gitter weisen eine trikline (p1), monokline (p2), trigonale (p3), tetragonale (p4) und hexagonale (p6) Anordnung auf, die eine Grundeinheit bilden (SLEYTR, 1997; SLEYTR *et al.*, 1999; SÁRA & SLEYTR, 2000; siehe Abb. 3). Die S-Layerschichten besitzen häufig eine tetragonale oder hexagonale, selten eine monokline Gittersymmetrie. Die trikline und trigonale Gittersymmetrie wurde bislang noch nicht eindeutig nachgewiesen (BAUMEISTER *et al.*, 1989; Messner & Sleytr, 1992). Bei Archaeen liegen die

S-Layer vorwiegend in hexagonaler Gittersymmetrie vor (KÖNIG, 1988; MESSNER & SLEYTR, 1992; SLEYTR *et al.*, 1996). Die Grundeinheiten der S-Layerschichten weisen einen Zentrum-zu-Zentrum-Abstand von etwa 2,5- 35 nm auf. Unter geeigneten Bedingungen neigen die *in vivo* vorliegenden S-Layer-Proteine zur spontanen Ausbildung einer zwei-dimensionalen Gitterstruktur (PUM *et al.*, 1993; PUM & SLEYTR, 1994).

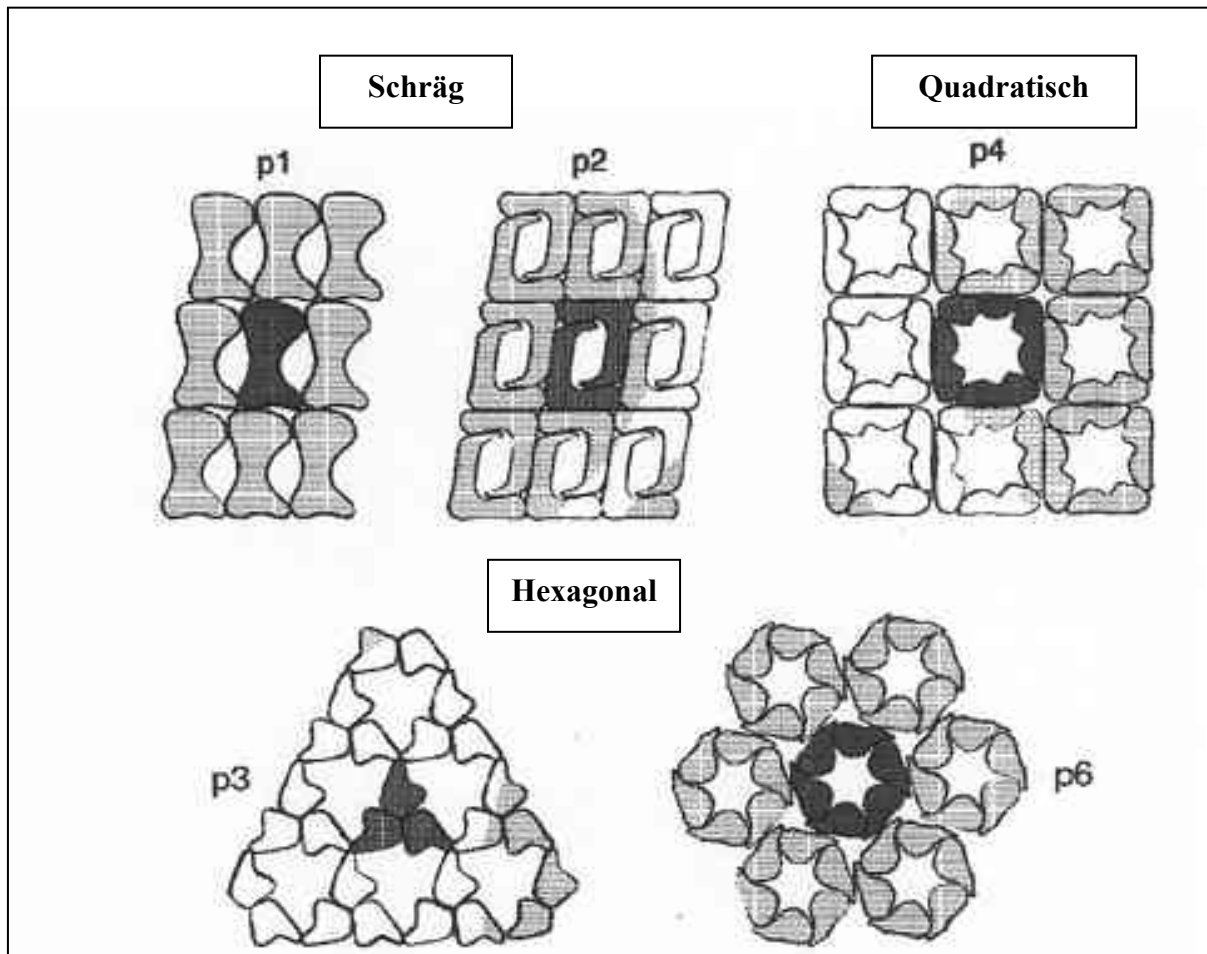


Abb. 3 Schematische Darstellung der verschiedenen vorkommenden S-Layer-Gittersymmetrien.

Die Gitter weisen eine schräge (p1, p2), quadratische (p4) und hexagonale Symmetrie (p3, p6) auf. Die morphologischen Grundeinheiten setzen sich aus ein, zwei, drei, vier oder sechs identischen Untereinheiten zusammen (SLEYTR *et al.*, 1999).

1.3 Molekularer Aufbau der S-Layer

Die biochemische Charakterisierung der S-Layer-Proteine ergab in der Aminosäure-Zusammensetzung von *Archaea* und *Bakteria* typische Gemeinsamkeiten. Die S-Layer-Proteine zeichnen sich durch einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren (ca. 40-60 %) aus (SLEYTR, 1997; SLEYTR *et al.*, 1999; SÁRA & SLEYTR, 2000). Schwefelhaltige Aminosäuren wie z.B. Cystein sind überhaupt nicht oder in einem geringen Anteil nur bei den hyperthermophilen S-Layern der Archaeen vorhanden. Die meisten S-Layer-Proteine sind überwiegend schwach sauer (pI etwa 4-6), wobei *Methanothermus fervidus*, *Methanothermus sociabilis*, *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Nanoarchaeum equitans* und *Lactobacilli* die Ausnahmen mit einem pI von 8 bis 10 darstellen (siehe Tab. 2). Die S-Layer-Proteine besitzen eine relative Molekularmasse von etwa 26 bis 210 kDa (siehe Tab. 3).

Tab. 2 Eigenschaften der S-Layerschichten (Modifiziert nach SLEYTR *et al.*, 1999)

- S-Layer-Gitter weisen eine schräge (p1, p2), quadratische (p4) oder hexagonale Symmetrie (p3, p6) auf
- Zentrum-zu-Zentrum Abstände der morphologischen Einheiten betragen zwischen 2,5 und 35 nm
- Schichtdicke zwischen 5 bis 25 nm (*Archaea* bis ca. 70 nm)
- Äußere Oberfläche ist vielfach rauer als die innere Oberfläche
- S-Layerschicht-Gitter weisen Poren von identischer Größe und Aufbau auf
- Viele S-Layerschichten zeigen zwei oder mehrere Typen von Poren
- Porengröße variiert zwischen 2 bis 8 nm
- Poren können 30 bis 70% der Oberfläche ausmachen
- Relative Molmasse der Untereinheiten liegt etwa zwischen 26000 bis 210000 Dalton
- Schwach saure Proteine (pI \approx 4-6) außer bei *Methanothermus fervidus*, *Methanothermus sociabilis*, *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Nanoarchaeum equitans* und *Lactobacilli* (pI \approx 8-10)
- Hoher Gehalt an Glutamin- und Asparaginsäuren (ca. 15 Mol-%)
- Hoher Gehalt an Lysin (ca. 10 Mol-%)
- Geringer Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren, wobei Cystein nur bei hyperthermophilen *Archaea* vorliegt

- Hoher Anteil an hydrophoben Aminosäuren (ca. 40-60 %)
- Hydrophile und hydrophobe Aminosäuren bilden keine ausgedehnten Cluster
- Die meisten S-Layer-Proteine sind in der Sekundärstruktur etwa zu 20 % als α -Helix und zu 40 % in β -Faltblattstruktur geordnet
- Ungleichmäßige Faltungen und der Gehalt an β -Turns variieren zwischen 5 bis 45 %
- Posttranslationale Modifikationen von S-Layer-Proteinen bestehen in Abspaltungen von N- und C-terminalen Fragmenten, Glykosylierung, Phosphorylierung und Sulphurylierung von Aminosäuren

Für die Ausschleusung von Proteinen sind bei den Prokaryoten mehrere Mechanismen bekannt. Die erstmalige Beschreibung eines spezifischen Ausschleusungsmechanismus für S-Layer-Proteine erfolgte für die Spezies *Aeromonas salmonicida* (NOONAN & TRUST, 1995). Bei der Sekretion wird das Protein durch Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids modifiziert. Ebenfalls können posttranslationale Modifikationen der S-Layer-Proteine durch Abspaltung von C-terminalen Fragmenten, Phosphorylierung und Glykosylierung von Aminosäuren verursacht werden (siehe Tab. 2). Bei *Aeromonas hydrophila* wurde eine Modifikation des S-Layer-Proteins durch Vergleich, der mittels SDS-PAGE und anhand der Gensequenz ermittelten Molekülmasse, festgestellt. Das modifizierte S-Layer Monomer wies eine um 7000 Da höhere Masse auf. Die chemische Modifikation wurde nach Western-Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper als Phosphotyrosinrest nachgewiesen (THOMAS & TRUST, 1995).

Eine weit verbreitete Modifikation der Proteine ist die Glykosylierung. Bei Eukaryoten sind zurzeit fünf verschiedene Bindungstypen von Glucanen an Proteine bekannt: N-glykosidisch, O-glykosidisch, S-glykosidisch, C-glykosidisch und Phosphat-gekoppelte glykosidische Bindung. Bei den prokaryotischen Proteinen liegen soweit bekannt nur N- und O-glykosidische Kohlenhydratbindungen vor. Das erste detailliert beschriebene glykosilierte prokaryotische Protein war das S-Layerhüllprotein von *Halobacterium salinarum* (MESCHER & STROMINGER 1976; LECHNER & SUMPER, 1987). Insgesamt sind zurzeit ungefähr 70 kohlenhydrathaltige Proteine bei Prokaryoten beschrieben (MESSNER & SLEYTR, 1991; MESSNER, 1997; MOENS & VANDERLEYDEN, 1997; SCHÄFFER *et al.*, 2001). Der Großteil der bekannten zuckerhaltigen Proteine liegt in der Domäne der *Archaeobacteria* vor.

Von den bakteriellen S-Layer-Hüllproteinen wurden nur bei den Gram-positiven *Bacilli* eindeutig Glykosylierungen nachgewiesen (MESSNER, 1996; MESSNER, 1997; MOENS & VANDERLEYDEN, 1997; UPRETI *et al.*, 2003). Diese bilden entweder O- oder N-glykosidische Bindungen aus, wobei hauptsächlich O-glykosidische Bindungen überwiegen. Der Kohlenhydrat-

anteil wurde zwischen 2 und 20 % (w/w) geschätzt (UPRETI *et al.*, 2003). Anhand der bekannten Glykanstrukturen der bakteriellen S-Layer-Glykoproteine können auf das Bauprinzip Rückschlüsse gezogen werden. Die S-Layer-Glykanketten von Bakterien sind aus 20 bis 50 identischen Wiederholungseinheiten aufgebaut, bestehend aus neutralen Hexosen, seltener Pentosen, 6-Desoxyhexosen und Aminozuckern (SLEYTR *et al.*, 1999). Pro S-Layer-Glykoprotein liegen zwischen 2 und 6 Glykosilierungsstellen vor (BOCK *et al.*, 1994; MESSNER *et al.*, 1992), wobei die O-glykosidischen über Bindungen wie β -D-Galactose \rightarrow Tyrosin (SLEYTR *et al.*, 1999) und β -D-Glucose \rightarrow Tyrosin (MESSNER *et al.*, 1992) erfolgen.

Die archaebakteriellen S-Layer-Glykoproteine bilden N- und O-glykosidische Bindungen einzeln oder gleichzeitig aus, wobei hauptsächlich die O-glykosidischen Bindungen vorliegen. Die S-Layer-Glykanketten bauen sich aus kurzen Heterosacchariden mit bis zu 10 Zuckerresten mit Wiederholungseinheiten auf (KÄRCHER *et al.*, 1993; SUMPER & WIELAND, 1995; MESSNER, 1996). Pro S-Layermonomer liegen zwischen 3 und 25 Glykosilierungsstellen vor (UPRETI *et al.*, 2003). Zurzeit sind die am besten untersuchten glykosilierten archaebakteriellen S-Layer, die Hüllproteine aus der Ordnung *Halobacteriales* mit den Spezies *Halobacterium salinarium* (Lechner & Sumper, 1987), *Haloferax volcanii* (SUMPER *et al.*, 1990) und *Haloarcula japonica* (WAKAI *et al.*, 1997). Bei Halobakterien können bis zu 25 Glykosilierungsstellen pro S-Layermonomer vorhanden sein (SUMPER & WIELAND, 1995), die N- und O-glykosidisch gebunden vorliegen können. Die N-glykosidischen Bindungstypen wie Glucose \rightarrow Asparagin (SUMPER & WIELAND, 1995) oder N-Acetyl-Galactosamin \rightarrow Asparagin (SUMPER & WIELAND, 1995; KÄRCHER *et al.*, 1993) treten über die Gesamtlänge des Proteins auf. Die O-glykosidischen Bindungen treten in Clustern threoninreicher Bereiche des Proteins auf.

Die S-Layer-Proteine von einigen Spezies weisen homologe Domänen auf, die gemeinsame Funktionen für das Protein vermitteln. Einer dieser Funktionen ist die Verankerung in die darunter liegende Zellgrenzfläche. Bei den meisten halobakteriellen S-Layermonomeren erfolgt die Verankerung in die Cytoplasmamembran über eine Transmembran-Domäne am C-Terminus. Die Gram-positiven Bakterien verankern ihre S-Layer-Proteine über die N-terminale Proteindomäne an das darunter liegende Peptidoglykan oder ein sekundäres Zellwandpolymer. Die N-terminale Bindung wird durch die sogenannten SLH (Surface Layer Homology)-Domänen unterstützt. Diese strukturelle Bindungsdomäne wurde in einigen *Bacillaceae*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermotoga maritima* und zwei Gram-negativen Bakterien *Synechocystis* PCC6803 und *Thermus thermophilus* gefunden (ARCHIBALD *et al.*, 1993). Die S-Layerschichten aus der Gattung *Geobacillus* und *Lactobacillus* verankern nicht über

die SLH-Domäne, sondern über ein anderes konserviertes N-terminales Strukturelement (EGELSEER *et al.*, 1998; JAROSCH *et al.*, 2000).

1.4 Funktion der S-Layerschicht

Nach dem momentanen Forschungsstand können für die S-Layerschichten verschiedene hypothetische Funktionen angenommen werden:

Unterstützung der Formgebung und Schutzschicht

Die S-Layerschichten aus der Ordnung Methanococcales bilden den einfachsten Zellwandtyp. Die S-Layerschicht bildet den einzigen Bestandteil der Zellhülle, die direkt auf der Cytoplasmamembran aufliegt. Sie dienen einerseits zur Formgebung und schützen andererseits den Organismus vor extremen äußeren Umwelteinflüssen.

Molekularsieb (Molekül- und Ionenfalle)

Die S-Layer Poren mit identischer Morphologie und Größe im Bereich von 2 bis 8 nm dienen als Molekularsieb für den Stoffaus- und -eintritt. Die kleinste bekannte Porengröße von 2 nm wurde für die scheidenartige S-Layerschicht von *Methanospirillum hungatei* (FIRTEL *et al.*, 1994, 1995) und die größten im Bereich von 5 bis 8 nm für die S-Layerschichten anderer Archaeen beschrieben. Für die S-Layerschichten der Gram-positiven Bakterien aus der Familie der *Bacillaceae* mit einem Porendurchmesser von 4 bis 5 nm wird vermutet, dass sie die Abgabe von Exoenzymen in den extrazellulären Raum beeinflussen. Aufgrund ihrer spezifischen molekularen Trenngrenze von 30000 und 40000 Dalton werden Exoenzyme wie Proteasen oder Amylasen in ihrem Durchtritt kontrolliert (BREITWIESER *et al.*, 1992; SÁRA *et al.*, 1992). Bei den Gram-negativen *Archaea* bilden die S-Layer-Monomer-Untereinheiten mit der Cytoplasmamembran eine Art periplasmatischen Raum, in dem Makromoleküle zurückgehalten werden können (LECHNER & SUMPER, 1987; PHIPPS *et al.*, 1991; PHIPPS *et al.*, 1992; MAYR *et al.*, 1996).

Beeinflussung der Zelladhäsion und Oberflächenerkennung

Die S-Layerschichten der Gram-negativen Bakterien *Aeromonas salmonicida*, *Campylobacter fetus*, *Aeromonas serpens* und *Caulobacter crescentus* wirken als Schutzhülle gegen den bakteriellen Befall durch *Bdellovibrio bacteriovorus* (KAVAL & HYNES, 1991; KOVAL, 1993). Bei den S-Layer tragenden Stämmen von *Lactobacillus acidophilus* und *L. crispatus* wurde eine

S-Layer-assoziierte Anheftung an die Epithelzellen des Darms festgestellt (SCHNEITZ *et al.*, 1993; TOBA *et al.*, 1995). Außer als Schutzschichtfunktion können S-Layerschichten auch als Virulenzfaktor bei pathogenen Organismen wirken. Detaillierte Untersuchungen wurden für die Organismen *A. salmonicida*, *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *C. fetus*, *Rickettsia prowazekii*, *R. typhi* und *Clostridium difficile* durchgeführt. Die Pathogenität der verschiedenen Spezies beruht auf unterschiedlichen Faktoren.

Bei *A. salmonicida* und *C. fetus* vermitteln die S-Layerschichten Resistenz gegenüber der bakteriziden Aktivität des Komplementsystems. Eine ähnliche Resistenzeigenschaft hat die S-Layerschicht von *B. cereus*, die an verschiedene Matrixproteine bindet und somit die humorale und zelluläre Immunantwort durch Maskierung verhindern kann (KOTIRANTA *et al.*, 1997). Bei *R. prowazekii* und *R. typhi* ist das S-Layer-Protein an der humoralen und zellulären Immunreaktion beteiligt (CARL & DASCH, 1989). Für *B. anthracis* wurden zwei S-Layer-Proteine Sap und EA1 als Virulenzfaktoren erkannt, wobei EA1 das Hauptantigen ist (ETIENNE-TOUMELIN *et al.*, 1995; MESNAGE *et al.*, 1997). Bei dem Diarrhöe auslösenden *Cl. difficile* werden die S-Layerschicht-Proteine zur Differenzierung und Typisierung der Stammspezifität verwendet (MC COUBREY *et al.*, 2003).

1.5 Gensequenzen der S-Layer-Proteine

Zurzeit sind weit über 400 Arten aus allen bedeutenden Phyla der *Bacteria* und *Archaea* bekannt, die S-Layer-Proteine bilden (SMIT *et al.*, 2002). Vollständige Gen- bzw. Protein- oder Teilsequenzdaten sind derzeit von 138 S-Layern von 105 Spezies verfügbar (siehe Tab. 3).

Die S-Layer-Proteine weisen bei manchen Spezies homologe Domänen auf, die ein konserviertes Strukturelement darstellen. Diese Strukturelemente vermitteln für die Hüllproteine gemeinsamen Funktionen, wie z.B. die Verankerung über SLH-Domänen in die darunter liegende Zellgrenzfläche.

Tab. 3 Prokaryoten mit bekannten S-Layer-Proteinsequenzen und S-Layer homologen Proteinen

Stamm	Abstammung	Primärsequenz (AS)	Molmasse (Dalton)	Gen	Accession Nummer
<i>Aeromonas hydrophila</i>	γ -Proteobakterien	409	47288	ahsA	PIR S53810 ^{a)}
<i>Aeromonas hydrophila</i> TF7	γ -Proteobakterien	472	47646	AEOSLP	L37348 ^{b)}
<i>Aeromonas hydrophila</i> A450	γ -Proteobakterien	502	52869	vapA	M64655 ^{b)}
<i>Serratia marcescens</i> Sr41 Isolat 176	γ -Proteobakterien	1002	101184	slaA	AB007124 ^{b)}
<i>Serratia marcescens</i> Sr41 Isolat 8000	γ -Proteobakterien	1004	102406	slaA	AB007125 ^{b)}
<i>Bacillus anthracis</i> Ames	Bazillen	862	91362	eag	X99724 ^{b)}
<i>Bacillus anthracis</i> Ames	Bazillen	814	86620	sap	Z36946 ^{b)}
<i>Bacillus licheniformis</i> NM 105	Bazillen	874	92735	olpA	U38842 ^{b)}
<i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4	Bazillen	931	96855	slpA	AF242295 ^{b)}
<i>Bacillus sphaericus</i> P-1	Bazillen	1252	129935	Sequenz 8	A45814 ^{b)}
<i>Bacillus sphaericus</i> WHO 2362	Bazillen	1176	125226	125	M28361 ^{b)}
<i>Bacillus sphaericus</i> WHO 2362	Bazillen	745	80113	80	B33856 ^{b)}
<i>Bacillus sphaericus</i> CCM 2177	Bazillen	1268	132047	sbpA	AF211170 ^{b)}
<i>Bacillus sphaericus</i> JG-A12	Bazillen	184*	19687	S-Layer	AJ292965 ^{b)}
<i>Bacillus sphaericus</i> DSM 396	Bazillen	810	85509		Diese Arbeit
<i>Bacillus cereus</i> DSM 31	Bazillen	577	64599	BC0991	AAP07978 ^{e)}
<i>Bacillus cereus</i> DSM 31	Bazillen	530	58834	BC0902	AAP07889 ^{e)}
<i>Bacillus cereus</i> DSM 31	Bazillen	410	45571	BC3524	AAP10458 ^{e)}
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i> NRRL 4045	Bazillen	821	87123	slpA	AJ249446 ^{b)}
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> 4Q2	Bazillen	393	45437	slp	X62090 ^{b)}
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Finitimus</i> CTC	Bazillen	816	87293	ctc	AJ012290 ^{b)}
<i>Bacillus fusiformis</i> DSM 2898T	Bazillen	576	62007		Diese Arbeit
<i>Bacillus fusiformis</i> B3	Bazillen	575	61874		Diese Arbeit
<i>Brevibacillus brevis</i> HDP31	Bazillen	1116	123397	HWP	D90050 ^{b)}
<i>Brevibacillus brevis</i> 47	Bazillen	1084	120768	mwp	M19115 ^{b)}
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	Bazillen	1099	115395	sbsC	AF055578 ^{b)}
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980/G ⁺	Bazillen	903	96200	sbsD	AF228338 ^{b)}
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> NRS 2004/3a	Bazillen	903	96640	sgsE	AAL46630 ^{e)}
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 2358	Bazillen	439*	47082		Diese Arbeit
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> PV 72/p6	Bazillen	1228	131075	sbsA	X71092 ^{b)}
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> PV 72/p2	Bazillen	920	97916	sbsB	X98095 ^{b)}
<i>Clostridium difficile</i> C253	Clostridien	719	76133	slpA	AJ291709 ^{b)}
<i>Clostridium difficile</i> R8366	Clostridien	756	79923	slpA	AJ300676 ^{b)}
<i>Clostridium difficile</i> R7404	Clostridien	714	75560	slpA	AJ300677 ^{b)}

Spezies	Abstammung	Primärsequenz (AS)	Molmasse (Dalton)	Gen	Accession Nummer
<i>Clostridium difficile</i> EX560	Clostridien	353	38193	slpA	AAM75943 ^{c)}
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 43598	Clostridien	354	37738	slpA	AAM75925 ^{c)}
<i>Clostridium difficile</i> 9354	Clostridien	351	37966	slpA	AAM75920 ^{c)}
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 43597	Clostridien	389	41788	slpA	AAM75944 ^{c)}
<i>Clostridium difficile</i> 56026	Clostridien	339	36205	slpA	AAM75939 ^{c)}
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 43594	Clostridien	394	42489	slpA	AAM75941 ^{c)}
<i>Clostridium difficile</i> 167	Clostridien	610	64729	slpA	AAM46789 ^{c)}
<i>Clostridium difficile</i> Y	Clostridien	767	81461	slpA	AAM46790 ^{c)}
<i>Clostridium thermocellum</i> NCIB 10682	Clostridien	1664	178194	cipA	X67506 ^{b)}
<i>Clostridium thermocellum</i> NCIB 10682	Clostridien	1036	113330	slpA	ACC33404 ^{c)}
<i>Clostridium thermocellum</i> NCIB 10682	Clostridien	688	74970	-	X67506 ^{b)}
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792	Clostridien	439	48116	CAC3558	AAK81482 ^{c)}
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792	Clostridien	1939	210335	CAC3389	AAK81319 ^{c)}
<i>Clostridium tetani</i> E88	Clostridien	354	37516	-	AAO35145 ^{c)}
<i>Clostridium tetani</i> E88	Clostridien	642	72100	-	AAO35101 ^{c)}
<i>Clostridium tetani</i> E88	Clostridien	708	77200	-	AAO36592 ^{c)}
<i>Clostridium tetani</i> E88	Clostridien	1334	145565	-	AAO35096 ^{c)}
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> JCM 11007	Clostridien	381	41380	TTE1862	AAM25051 ^{c)}
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> JCM 11007	Clostridien	474	53073	TTE2087	AEO13156 ^{c)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i>	ε-Proteobakterien	939	95508	sapA	J05577 ^{b)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> 23B	ε-Proteobakterien	922	95109	sapA1	L15800 ^{b)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> 82-40LP3	ε-Proteobakterien	1109	111805	sapA2	S76860 ^{b)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> 23D	ε-Proteobakterien	811	88153	sapAp8	AAO64214 ^{c)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> 23D	ε-Proteobakterien	1167	117324	sapA3	AAO64231 ^{c)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> 23D	ε-Proteobakterien	1106	111525	sapA5	AAO64211 ^{c)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> 23D	ε-Proteobakterien	1257	129306	sapA6	AAO64213 ^{c)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> 23D	ε-Proteobakterien	1292	130736	sapA7	AAO64215 ^{c)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i>	ε-Proteobakterien	893	92427	-	A37284 ^{b)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> 84-91	ε-Proteobakterien	1112	112504	sapB	U25133 ^{b)}
<i>Camplobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> CIP 5396T	ε-Proteobakterien	1112	112504	sapB2	AF048699 ^{b)}
<i>Camplobacter rectus</i> 314	ε-Proteobakterien	1361	144386	Crs	AF010143 ^{b)}
<i>Camplobacter rectus</i> ATCC 33238	ε-Proteobakterien	1361	144904	-	AB001876 ^{b)}
<i>Camplobacter rectus</i> ATCC 33238	ε-Proteobakterien	1123	118954	csxA	AF035193 ^{b)}
<i>Camplobacter rectus</i> ATCC 33238	ε-Proteobakterien	1238	130821	csxB	AF035192 ^{b)}
<i>Caulobacter crescentus</i> CB 15	α-Proteobakterien	1026	98132	rsaA	AE005779 ^{b)}

Spezies	Abstammung	Primärsequenz (AS)	Molmasse (Dalton)	Gen	Accession Nummer
<i>Caulobacter crescentus</i> CB 15	α - Proteobakterien	1073	103613	rsaA	AAK22991 ^{c)}
<i>Caulobacter crescentus</i> JS3001 (vibriodes)	α - Proteobakterien	1026	98132	rsaA	AF193063 ^{b)}
<i>Caulobacter crescentus</i> JS4000	α - Proteobakterien	658	76133	rsaA	AF193064 ^{b)}
<i>Caulobacter vibriodes</i>	α - Proteobakterien	658	68471	sapA	AAL47190 ^{c)}
<i>Rickettsia japonica</i> YH	α - Proteobakterien	1656	168098	rOmp B	AB003681 ^{b)}
<i>Rickettsia prowazekii</i> Breinl	α - Proteobakterien	1643	169854	spaP	M37647 ^{b)}
<i>Rickettsia rickettsii</i> R	α - Proteobakterien	1300	132802	pI20	X16353 ^{b)}
<i>Rickettsia typhi</i> Wiimington	α - Proteobakterien	1645	169698	slpT	L04661 ^{b)}
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Lactobazillen	444	46570	slpA	X89375 ^{b)}
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Lactobazillen	456	47773	slpB	X89376 ^{b)}
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 8287	Lactobazillen	465	48159	slpA	Z14250 ^{b)}
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	Lactobazillen	483	50924	slpB	AAK84948 ^{c)}
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	Lactobazillen	461	48856	slpC	AAK84949 ^{c)}
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	Lactobazillen	413	44572	slpD	AAK84950 ^{c)}
<i>Lactobacillus crispatus</i> JCM 5810	Lactobazillen	440	46771	cbsA	AF001313 ^{b)}
<i>Lactobacillus crispatus</i> JCM 5810	Lactobazillen	452	47602	cbsB	AF079365 ^{b)}
<i>Lactobacillus crispatus</i> M247	Lactobazillen	451	47012	S-Layer	AJ007839 ^{b)}
<i>Lactobacillus crispatus</i> LMG 12003	Lactobazillen	458	48750	slpNA	AF253043 ^{b)}
<i>Lactobacillus crispatus</i> LMG 12003	Lactobazillen	439	46796	slpNB	AF253044 ^{b)}
<i>Lactobacillus fermentum</i> BR11	Lactobazillen	264	28627	bspA	U97348 ^{b)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1007	Lactobazillen	388	40899	S-Layer	BAB72067 ^{c)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1008	Lactobazillen	391	41199	S-Layer	BAB72068 ^{c)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 12046	Lactobazillen	439	46702	S-Layer	AJ388558 ^{b)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009	Lactobazillen	439	46716	S-Layer	AJ388559 ^{b)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 303	Lactobazillen	439	46688	S-Layer	AJ388560 ^{b)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 35	Lactobazillen	437	46485	S-Layer	AJ388561 ^{b)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> IMPC i60	Lactobazillen	439	46704	S-Layer	AJ388562 ^{b)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> IMPC M696	Lactobazillen	439	46602	S-Layer	AJ388563 ^{b)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> IMPC HLMI	Lactobazillen	438	46622	S-Layer	AJ388564 ^{b)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 892	Lactobazillen	439	46688	slpH1	X91199 ^{b)}
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 1269	Lactobazillen	439	46657	slpH2	X92752 ^{b)}
<i>Deinococcus radiodurans</i> SARK	Deinococci	1036	108028	hpi2	M17895 ^{b)}
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Deinococci	1167	123729	DR2508	AE002080 ^{b)}
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	Deinococci	948	99356	HPI	P56867 ^{b)}
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Actinobakterien	492	52381	-	NP_600770 ^{d)}

Spezies	Abstammung	Primärsequenz (AS)	Molmasse (Dalton)	Gen	Accession Nummer
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 17965	Actinobakterien	526	57412	csp2	X69103 ^{b)}
<i>Cytophaga sp.</i> Jeang 1995	Cytophaga	1047	108718	-	AF068060 ^{b)}
<i>Pirellula sp.</i> 1	Planktomyceten	524	55241	-	CAD72961 ^{c)}
<i>Pirellula sp.</i> 1	Planktomyceten	818	90680	butB	CAD76355 ^{c)}
<i>Synechococcus lividus</i> PCC7942	Cyanobakterien	521	57139	somA	D64077 ^{b)}
<i>Synechococcus sp.</i> PCC 6301	Cyanobakterien	525	56213	somB	AAC33402 ^{c)}
<i>Synechococcus sp.</i> PCC 6301	Cyanobakterien	532	57386	somA	AAC33403 ^{c)}
<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	Cyanobakterien	630	67600	slr1841	D90906 ^{b)}
<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	Cyanobakterien	321	34543	slr2000	D90910 ^{b)}
<i>Gleobacter violaceus</i> PCC 7421	Cyanobakterien	697	72111	GII 4200	AP006582 ^{b)}
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	Fusobakterien	643	71502	FN0694	AAL94890 ^{c)}
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256	Fusobakterien	643	71874	FNV1357	EAA24374 ^{c)}
<i>Halobacterium halobium</i>	Halobakterien	852	89814	csg	J02767 ^{b)}
<i>Halobacterium sp.</i> NRC-1	Halobakterien	836	88071	csg	AE005139 ^{b)}
<i>Haloarcula japonica</i> TR-1	Halobakterien	862	89814	csg	D87290 ^{b)}
<i>Haloferax volcanii</i>	Halobakterien	827	85189	csg	M62816 ^{b)}
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Delta H	Methanogene/Archaea	1797	196807	MTH	F69195 ^{b)}
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Delta H	Methanogene/Archaea	1755	191961	MTH716	AAB85221 ^{c)}
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Delta H	Methanogene/Archaea	1408	152736	MTH1513	H69068 ^{b)}
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Delta H	Methanogene/Archaea	574	61922	MTH719	A69196 ^{b)}
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> DSM 2661	Methanogene/Archaea	558	60547	slmj1	AJ311636 ^{b)}
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> DSM 2661	Methanogene/Archaea	440	50745	MJ0954	U67539 ^{b)}
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> DSM 2095	Methanogene/Archaea	559	59225	slmt1	AJ308554 ^{b) #}
<i>Methanococcus vannielii</i> DSM 1224	Methanogene/Archaea	566	59064	slmv1	AJ308553 ^{b) #}
<i>Methanococcus voltae</i> DSM 1537	Methanogene/Archaea	565	59707	sla	M59200 ^{b)}
<i>Methanotorris igneus</i> DSM 5666	Methanogene/Archaea	519	55669	slmi1	AJ564995 ^{b) #}
<i>Methanosarcinan mazei</i> S-6	Methanogene/Archaea	652	68878	slgB	X77929 ^{b)}
<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	Methanogene/Archaea	557	62086	slg	AAM04705 ^{c)}
<i>Methanothermus fervidus</i> DSM 2088	Methanogene/Archaea	593	65481	slgA	X58297 ^{b)}
<i>Methanothermus sociabilis</i> DSM 3496	Methanogene/Archaea	593	65503	slgA	X58296 ^{b)}
<i>Pyrococcus abyssi</i> Orsay	Thermokokken/Archaea	604	65985	-	CAB49670 ^{c)}
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	Thermokokken/Archaea	236	26128	PH1395	BAA30501 ^{c)}
<i>Nanoarchaeum equitans</i> Kin4-M	Nanoarchaeum/Archaea	401	46681	NEK233	NP_941609 ^{d)}
<i>Euryarchaeta</i> 37F11	unkultivierte marine Gruppe II	564	61747	-	AAF97179 ^{c)}

diese Arbeit; * unvollständige Proteinsequenz; ^{a)} PIR NREF- ^{b)} Embl- ^{c)} GenBank- ^{d)} NCBI-Datenbank

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das primäre Ziel dieser Arbeit war durch Vergleiche von mesophilen und (hyper)thermophilen S-Layer-Proteinen nach Unterschieden zu suchen und ob sich hieraus Anhaltspunkte für thermostabilisierenden Faktoren ableiten lassen. Die Arbeit umfasst drei verschiedene Teilaspekte. Als erstes sollte aus der Ordnung Methanococcales eine Isolierungsmethode für die S-Layer-Proteine etabliert werden. Außerdem sollte parallel die Gensequenz der mesophilen, thermophilen und hyperthermophilen S-Layer-Gene, mit den transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen, ermittelt werden. Mit den Primärsequenzen sollten über Datenbankrecherche und -analyse Vergleiche innerhalb der Ordnung Methanococcales und mit anderen bekannten archaebakteriellen S-Layer-Proteinen durchgeführt werden. Mittels dieser Vergleiche sollte untersucht werden, welche Unterschiede in den mesophilen und hyperthermophilen S-Layer-Proteinen vorliegen und ob sich hieraus Hinweise für thermostabilisierende Faktoren ableiten lassen.

Zweitens sollte das hyperthermophile S-Layer-Gen (*slmj1*) von *Methanocaldococcus jannaschii* durch Klonierung und Überproduktion in *Escherichia coli* expremiert werden. Mittels der heterologen Proteinexpression sollte eine ausreichende Menge vom Protein für Kristallisationsexperimente gewonnen werden. Mit dem nativem und heterolog expremiertem S-Layer-Protein sollten Vergleiche im Hinblick auf posttranslationelle Modifikationen und auf thermostabilisierende Eigenschaften durchgeführt werden.

Drittens sollten die Nukleotidsequenzen der S-Layer-Gene aus der Familie der *Bacillaceae* durch molekulargenetischen Arbeitstechniken aufgeklärt und anhand dessen die Proteinsequenz ermittelt werden. Die Identifizierung des S-Layer-Proteins sollte über seine N-terminale Sequenz erfolgen. Zudem sollten die mutmaßlichen Promotorregionen für die Proteinexpression nachgewiesen und Vergleiche mit der bekannten Expressionsapparatur aus der Familie der *Bacillaceae* durchgeführt werden. Ebenfalls sollten mesophile und thermophile S-Layer-Proteinen auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede hin analysiert werden. Mittels dieser Vergleiche sollte gezeigt werden, ob sich Hinweise auf thermostabilisierende Faktoren oder konservierte Strukturelemente ableiten lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

Methanocaldococcus jannaschii (DSM 2661), *Methanotorris igneus* (DSM 5666), *Methanothermococcus thermolithotrophicus* (DSM 2095), *Methanococcus vannielii* (DSM 1224), *Geobacillus stearothermophilus* (DSM 2358), *Bacillus sphaericus* (DSM 396) und *Bacillus fusiformis* (DSM 2898T) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig (DSMZ) bezogen, *Bacillus fusiformis* B3 aus der Stammhaltung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (AG König). Für die Konstruktion des heterolog exprimierten S-Layer-Proteins wurden von *Escherichia coli* die Stämme JM 105 und BL 21 (DE3) aus der Stammhaltung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (AG Uden) verwendet.

2.2 Kultivierung der Organismen

2.2.1 Kultivierung der methanogenen Archaeobakterien

Für die Kultivierung der Organismen der Ordnung Methanococcales wurde die von BALCH *et al.* (1979) beschriebene Technik angewandt. Die Organismen *Mcc. jannaschii*, *Mt. igneus* wurden bei 85 °C, *Mth. thermolithotrophicus* bei 65 °C und *M. vannielii* bei 37 °C in “Methanogenium-Medium“ (Gasphase mit H₂ : CO₂ [80:20%], 1 bar) kultiviert.

Tab. 4 DSM Medium 282 (modifiziert):

Methanogene Medium für *Mcc. jannaschii* und *Mt. igneus*

Bestandteil	Menge
KCl	0,33 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	4,2 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	3,4 g
NH ₄ Cl	0,25 g

CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,14 g
K ₂ HPO ₄	0,14 g
NiCl ₂ x 6H ₂ O	0,50 mg
Na ₂ SeO x 5H ₂ O	0,50 mg
NaCl	30,0 g
Spurenelementlösung (Tab. 3)	20,0 ml
Vitaminlösung (Tab. 4)	20,0 ml
Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ x 7H ₂ O	10,0 mg
Natriumacetat	1,0 g
NaHCO ₃	1,0 g
Resazurin	1,0 mg
Cysteinhydrochlorid*	0,5 g
Na ₂ S x 9 H ₂ O*	0,5 g
Deionisiertes Wasser	ad 1000 ml

*separat zugegeben

Das Medium wurde nach Fertigstellung für 20 min in einem Ultraschallbad entgast und anaerobisiert. Dabei konnte ein Farbumschlag von rot nach hellgrün beobachtet werden. Anschließend wurde es für fünf min mit Stickstoff begast. Die Verteilung des Mediums auf die Kulturgefäße wurde in einer Anaerobenkammer (Toepffer lab Systems) unter 95% N₂ und 5% H₂ vorgenommen. Der pH-Wert des Mediums wurde mit konzentrierter H₂SO₄ zunächst auf pH 5,5 für *Mcc. jannaschii* und pH 6,0 für *Mt. igneus* eingestellt. Dieser stieg nach dem Autoklavieren auf pH 6,0 bzw. 6,5. Vor dem Autoklavieren wurden die Kulturflaschen mit H₂ und CO₂ (80:20%) mit 1 bar Überdruck begast.

Tab. 5 DSM Medium 141 (modifiziert):Methanogene Medium für *Mth. thermolithotrophicus* und *M. vannielii*

Bestandteil	Menge
KCl	0,335 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	4,0 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	3,45 g
NH ₄ Cl	0,25 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,14 g
K ₂ HPO ₄	0,14 g
NaCl	18,0 g
Spurenelementlösung (Tab. 3)	10,0 ml
Vitaminlösung (Tab. 4)	10,0 ml
Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ x 7H ₂ O	2,0 mg
NaHCO ₃	5,0 g
Resazurin	1,0 mg
Cysteinhydrochlorid*	0,5 g
Na ₂ S x 9 H ₂ O*	0,5 g
Reinstwasser	ad 1000 ml

*separat zugegeben

Das DSM Medium 141 (siehe Tab. 5) wurde nach Fertigstellung entsprechend den Angaben des Mediums 282 (siehe Tab. 4) entgast und anaerobisiert. Die Verteilung des Mediums auf die Kulturgefäße wurde in einer Anaerobenkammer unter 95% N₂ und 5% H₂ als Gasphase vorgenommen. Der pH-Wert des Mediums wurde mit konz. H₂SO₄ zunächst auf pH 6,3 für *Mth. thermolithotrophicus* und pH 6,5 für *M. vannielii* eingestellt. Dieser stieg nach dem Autoklavieren auf pH 6,8 bzw. 7,0. Vor dem Autoklavieren wurde mit H₂:CO₂ = 80:20 bei 1 bar Überdruck begast.

Tab. 6 Spurenelement Stammlösung

Bestandteil*	Menge
Nitrilotriessigsäure	1,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,0 g
MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 g
NaCl	1,0 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,10 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	10 mg
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	20 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	25 mg
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,3 mg
Deionisiertes Wasser	ad 1000 ml

*Alle Bestandteile wurden separat gelöst und hinzugefügt

Zunächst wurde die Nitrilotriessigsäure gelöst und der pH mit Kaliumhydroxid auf pH 6,5 eingestellt, dann wurden die restlichen Bestandteile hinzugegeben. Mit Kaliumhydroxid wurde später der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Tab. 7 Stammlösung Vitamine

Bestandteil*	Menge
Biotin (Sigma)	2,0 mg
Folsäure (Sigma)	2,0 mg
Pyridoxin-HCl (Merck)	10,0 mg
Thiamin-HCl (Sigma)	5,0 mg
Riboflavin (Merck)	5,0 mg
Nicotinsäure (Merck)	5,0 mg
DL-Calcium-Pantothenat (Fluka)	5,0 mg
Vitamin B12 (Merck)	0,1 mg
p-Aminobenzoesäure (Merck)	5,0 mg
Liponsäure (Merck)	5,0 mg
Deionisiertes Wasser	Ad 1000 ml

*Alle Bestandteile wurden separat gelöst und hinzugefügt

2.2.2 Basalsalz

Mit Basalsalz wurde das "Methanogene Medium" ohne Resazurin, Natriumsulfit und Cystein-HCl bezeichnet. Der pH-Wert entsprach dem DSM-Medium 282 bzw. 141 (siehe Tab. 4 und 5).

2.2.3 Kultivierung der Bacillaceae

Für die Kultivierung der *Bacillus*-Stämme wurde LB-Medium (5g/l Hefeextrakt, 5g/l Trypton, 5g/l NaCl; pH 7,5) und Standard-I-Medium (Merck) verwendet. Die Anzucht der Stämme *B. sphaericus* DSM 396, *B. fusiformis* DSM 2898T und *B. fusiformis* B3 erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 30 °C (180 rpm). *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 wurde unter aeroben Bedingungen bei 55 °C im Schüttelinkubator (Innova 4340; 180 rpm) kultiviert.

2.3 Mikroskopie

Die Vitalität von Zellen der Ordnung Methanococcales wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss, Axiophot2) unter blauem Fluoreszenzlicht (Filtersatz 5: Anregung 395-440 nm; Farbfilter 460 nm und Emission 470 nm) nachgewiesen (grüne Fluoreszenz). Die oxidierte Form des Cofaktors F₄₂₀ ist für die grüne Fluoreszenz bei Methanbakterien verantwortlich und fungiert als 2-Elektronen-Überträger.

2.4 Elektrophorese

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte nach der Vorschrift von LAEMMLI (1970).

Lösungen zur Herstellung der Gele

- Trenngelpuffer (1 M Tris/HCl pH 8,8)
- Sammelgelpuffer (1 M Tris/HCl pH 6,8)
- 40% Acrylamidlösung (37,5:1 entspricht 39,96 g Acrylamid, 1,04 g Bisacrylamid ad. 100 ml deionisiertes Wasser, filtriert)
- 10% SDS
- 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- TEMED (Serva)

	<u>Trenngel (10% PAA)</u>	<u>Trenngel (15% PAA)</u>	<u>Sammelgel (5% PAA)</u>
Wasser:	1,95 ml	1,20 ml	3,70 ml
Trenngelpuffer:	2,26 ml	2,26 ml	625 µl
Acrylamid:	1,50 ml	2,25 ml	625 µl
SDS (10%):	60 µl	60 µl	50 µl
TEMED:	5 µl	5 µl	5 µl
APS:	48 µl	48 µl	50 µl

Kammerpuffer

3 g Tris; 14,4 g Glycin; 10 ml SDS (10%); deionisiertes Wasser ad 1000ml

Auftragspuffer (4x):

- a) Roti-Load 1 (reduzierend, Roth)
- b) Roti-Load 2 (nicht reduzierend, Roth)

2.4.2 Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde entweder in Trennkammern von BioRad (Mini PII, Nr.: 165-2950) oder in Trennkammern von Sigma (Modell Z 37, 302-8) durchgeführt (10 min, 50 V, dann 150 V, RT). Zur Bestimmung der apparenten Proteingrößen wurden die folgenden Protein-Standardmischungen verwendet:

Proteinmischung Merck VIII (Merck, Nr.: 11536)

Ovalbumin MW 42700 Da, Glutamatdehydrogenase MW 56000 Da, Ovotransferrin MW 78000 Da, Phosphorylase b MW 97400 Da, β -Galaktosidase MW 116300 Da, Myosin MW 200000 Da.

Protein-Marker Roti-Mark 10-150 (Roth, T850.1)

Der Proteinmarker setzte sich aus einem Gemisch gentechnisch exprimierter Proteine mit einem Molekulargewichts-Bereich von 150-10 kDa zusammen. Folgende apparente Molekulargewichte lagen vor: 150; 100; 80; 60; 40; 30; 20; 10 kDa.

Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad; Nr.: 161-0318)

Myosin MW 203000 Da, β -Galaktosidase MW 118000 Da, Rinderserum-Albumin MW 82000 Da, Ovalbumin MW 50400 Da, Kohlenhydrat-Anhydrase MW 33400 Da, Trypsin-Inhibitor (Sojabohne) MW 26700 Da, Lysozym MW 19600 Da, Aprotinin MW 7400 Da

2.4.3 Proteinfärbung

Coomassie-Färbung

- Färbelösung (500 mg Coomassieblau R250; 500 ml Ethanol; 100 ml Eisessig; 400 ml deionisiertes Wasser)
- Entfärbelösung (100 ml Ethanol; 70 ml Eisessig; 830 ml deionisiertes Wasser)
- Fixierlösung (70 ml Eisessig; 930 ml deionisiertes Wasser)

Die Gele wurden für 20 min gefärbt. Anschließend wurden sie 60 min mit der Entfärbelösung behandelt und dann über Nacht fixiert. Durch die Fixierlösung wurden sie zusätzlich entfärbt.

CuCl₂-Färbung

Die CuCl₂-Färbung mit dem Copper Stain and Destain Kit (BioRad, Nr.: 161-0470) wurde nach der SDS-PAGE und vor dem Blotting der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran durchgeführt. Sie diente der Visualisierung der Proteinbanden und zur Steigerung der Transfereffizienz.

2.5 Proteinbestimmung

Lösungen:

1. 0.1 % CuSO₄ x 10 H₂O
0.2% K⁺ Na⁺Tartrat x 4 H₂O
10% Na₂CO₃

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Vorschrift von PETERSON (1977). Zuerst wurde Na_2CO_3 gelöst, dann wurde $\text{K}^+ \text{Na}^+$ Tartrat und anschließend gelöstes CuSO_4 unter Rühren zugegeben.

2. 10% SDS
3. 0.8 N NaOH
4. Folin-Ciocalteu's Lösung (Phenolreagenz, Sigma, Nr.: F-9252)

Reagenz A:

Lösungen 1,2,3 und deionisiertes Wasser wurden zu gleichen Volumina zusammengemischt. Reagenz A wurde stets erst kurz vor dem Gebrauch angesetzt.

Reagenz B:

1 Teil Lösung 4 + 5 Teile Wasser

Für die Proteinbestimmung wurden 20 μl Probe (Blind-Probe: Wasser) + 480 μl Wasser + 500 μl Reagenz A für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde 250 μl Reagenz B dazugeben und gemischt. Die Extinktion wurde nach 30 min (RT) bei 750 nm gegen die Blind-Probe gemessen. Die Kalibrierungsgerade wurde mit Rinderserumalbumin (Serva, Nr.: 11920.02) in den Konzentrationen 50 - 2000 $\mu\text{g/ml}$ erstellt.

2.6 Isolierung der S-Layer-Proteine der Methanococcales

2.6.1 Anzucht und Ernte der Zellen

Die Anzucht für die Isolierung der S-Layer-Hüllproteine von *Mth. thermolithotrophicus* und *M. vannielii* erfolgte mit 20 ml Medium in 100 ml Serum Flaschen (Bormioli-Glas) und 200 ml Medium in 1 Liter (Müller-Krempf, Schweiz) Flaschen. Die Zellkultur wurde in der späten exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation (Beckmann J2-MC Kühlzentrifuge, Rotor JA-10, 8000 Upm, 20 min, 4 °C) geerntet. Die Anzucht bei den hyperthermophilen

Stämmen *Mcc. jannaschii* und *Mt. igneus* erfolgte in einem 75 Liter-Laborfermenter (Arbeitsvolumen 50 Liter, Bioengineering Laborfermenter LP351). Zur Vorkulturanzucht für den Fermenter wurden die beiden Stämme in 100 ml Serum Flaschen und 1 l Flaschen kultiviert. 1 l aus dieser Vorkultur wurde in den Laborfermenter, der maximal zu zweidrittel mit Kulturmedium gefüllt vorlag, angeimpft. Die Zellen wurden in der späten logarithmischen Phase mit der Durchfluß-Zentrifuge (Heraeus Sepatech Contifuge 17 RS, Rotor 8575, 15000 Upm, 3 Stunden, 4 °C) bei einem Durchfluß von 300 ml/min geerntet. Das Zellpellet wurde zweimal mit Basalsalz gewaschen und bei -20°C aufbewahrt.

Löslichkeit des S-Layer-Proteins

Die gewaschenen Zellen wurden in deionisiertem Wasser resuspendiert und dabei aufgebrochen. Das resultierende Zellhomogenat wurde durch Zentrifugation (Eppendorf, Centrifuge 5415 D, 13000 Upm, 3 min, RT) in lösliche und unlösliche Zellbestandteile getrennt. Das Zellpräzipitat wurde mit Triton X-100 behandelt (Endkonzentration 0,5%, 30 min, 58 °C), um Membranproteine zu extrahieren und anschließend durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf, Centrifuge 5415 D, 13000 Upm, 3 min, RT). Das Pellet wurde jeweils mit 6 M LiCl, 5 M Guanidiniumchlorid (in 50 mM Tris/HCl; pH 7,2), 6 M Harnstoff und 1 M Tris/HCl bei Raumtemperatur (Eppendorf, Thermomixer comfort, 1400 Upm, 30 min) inkubiert. Die Suspension wurde durch Zentrifugation (Eppendorf, Centrifuge 5415 D, 13000 Upm, 5 min, RT) von festen Bestandteilen befreit und anschließend gegen deionisiertes Wasser dialysiert (Dialyserschlauch, Roth). Das Dialysat der einzelnen Agenzien wurde durch SDS-PAGE überprüft.

2.6.2 Herstellung von S-Layer-Proteinextrakt

Alternativ zur vorherigen Methode wurden die Zellen direkt in 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) im Verhältnis 1:3 (w/v) resuspendiert. Das Zellhomogenat wurde bei 42 °C (Eppendorf, Thermomixer comfort, 850 Upm, 30 min) inkubiert und durch zweimalige Zentrifugation (Eppendorf, Centrifuge 5415 D, 13000 Upm, 5 min, RT) von unlöslichen Zellbestandteilen befreit. Die lösliche Fraktion wurde in der Speed-Vac (Eppendorf, Concentrator 5301, 45 °C) eingengt. In der löslichen Fraktion war das S-Layer-Protein einer der dominierenden Proteine.

Deshalb wurde das Proteinextrakt-Konzentrat für die weitere Isolierung des S-Layer-Hüllproteins verwendet.

2.6.3 Isolierung der S-Layer Proteine aus dem Kulturmedium

Die Kulturen wurden während ihres logarithmischen Wachstums durch Zentrifugation geerntet (Sorvall, Rotor GS3, 8000 Upm, 20 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde aufgereinigt wie oben beschrieben. Der Kulturüberstand wurde zunächst gegen Wasser oder Tris-HCl (25 mM, pH 8,0) dialysiert (Dialysierschlauch, Roth). Das Dialysat wurde gefriergetrocknet (Leybold Heraeus), oder direkt mit dem doppelten Volumen Aceton gefällt (über Nacht, -20 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet enthielt die aufkonzentrierten S-Layer Proteine.

2.7 Reinigung der S-Layer-Proteine

2.7.1 Reinigung der S-Layer-Proteine durch präparative isoelektrische Fokussierung

Lösungen

Anodenpuffer 0,5 M Essigsäure (pH 2,5)

Kathodenpuffer 0,25 M HEPES (pH 5,0)

Laufpuffer A 24 ml 200 mM MES

Laufpuffer B 6 ml 200 mM Glycyl-Glycin

Die angereicherten S-Layer-Proteine aus dem Kulturmedium und den Zellen wurden durch präparative isoelektrische Fokussierung weiter aufgereinigt. Dazu wurden die lyophilisierten S-Layer Proteine in Laufpuffer A+B aufgenommen. Nach der Zugabe von deionisiertem Wasser bis zum Endvolumen von 50 ml erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (Rotofor, BioRad, 3,5-4 Stunden, 15 W, Anfangsspannung 320 V). Es wurden zwanzig Fraktionen aufgetrennt und nach pH-Messung durch SDS-PAGE überprüft.

2.7.2 Isolierung der S-Layer

Aus den zwanzig aufgefangenen Fraktionen, wurden diejenigen zusammengefasst, die im pH-Bereich zwischen 3,0-4,0 vorlagen und ein reines S-Layer-Protein aufwiesen. Das Gemisch wurde mit 5 M NaCl (1 M Endkonzentration) versetzt und geschüttelt (Edmund Bühler, KS-12 Control, 250 Upm, 2-3 h, RT), um Puffersubstanzen und anderen niedermolekularen Faktoren vom Hüllprotein zu lösen. Die behandelte Hochsalz-Protein-Mischung wurde über Nacht bei 4 °C gegen deionisiertes Wasser dialysiert (Dialysierschlauch, Roth). Aus dem Dialysat wurde durch Zentrifugation (Heraeus Sepatech Contifuge 17 RS, Rotor PTI F21 B, 15000 Upm, 20 min, 4 °C) Schwebstoffe entfernt und der Überstand durch Gefriertrocknung eingengt (Leybold Heraeus). Nach der Gefriertrocknung wurde das Dialysat-Konzentrat nochmals zentrifugiert (13000 Upm, 5 min, RT), um mögliche neu entstandene Schwebstoffe zu entfernen. Die Reinheit der Aufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft. Für alle folgenden Experimente wurde das so isolierte S-Layer-Protein verwendet.

2.8 Isolierung der S-Layer-Proteine der Bacillaceae

Die Isolierung der S-Layer-Proteine aus der Familie der *Bacillaceae* erfolgte auf zwei verschiedene Methoden. Beim Stamm *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 wurde das Hüllprotein nach der Vorschrift von RIES *et al.* (1997) aufgereinigt. Bei den Stämmen *B. sphaericus* DSM 396, *B. fusiformis* DSM 2898T und B3 wurden die S-Layer-Proteine nach der Aufreinigungsvorschrift von LEWIS *et al.* (1987) isoliert.

2.9 Proteolytischer Verdau der S-Layer-Proteine

Elutionspuffer (pH 8,25)

NH₄HCO₃ 3,95 g (50 mM)

SDS 1 g (0,1%)

Reinstwasser ad 1000 ml

Die gereinigten S-Layer-Proteine wurden in Elutionspuffer proteolytisch verdaut. Jeweils 40 µl Probe wurden für den Verdau eingesetzt und mit jeweils 2 µl Enzym (Endoproteinase Glu-

C, Endoproteinase Lys-C, Trypsin; Peptide Mapping Set, Roche, Nr.: 1520423) inkubiert (Endkonzentration für jedes Enzym 50 µg/ml). Die Verdauung mit Trypsin und Lys-C wurden für 17 Stunden bei 37 °C, der Ansatz mit Glu-C für 17 Stunden bei 25 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden je 40 µl Probe ohne Enzymzugabe sowie je 40 µl Elutionspuffer mit Enzym, aber ohne Probe, mitgeführt.

2.10 Isoelektrischer Punkt der S-Layer-Proteine

2.10.1 Analytische Isoelektrische Fokussierung

Lösungen

Elektrodenlösungen Anodenflüssigkeit 3 (Serva, Kat. Nr. 42984)

Kathodenflüssigkeit 10 (Serva, Kat. Nr. 42986)

Die analytische isoelektrische Fokussierung wurde mit einer Horizontalkammer (LKB Bromma, 2117 Multiphor II, Elektrophoresis Unit) durchgeführt. Die Auftrennung der S-Layer-Proteine erfolgte mit einem gebrauchsfertigen dünnen Polyacrylamid-Gel (Serva, Servalyt PreNets). Das Polyacrylamid-Gel wurde auf die 5 °C vorgekühlte horizontale Platte luftblasenfrei aufgerollt und die zugeschnittenen gleichmäßig getränkten Elektrodendochte (Serva, Kat. Nr. 42987) mit Anoden- bzw. Kathodenflüssigkeit auf das Gel aufgelegt. Der Applikatorstreifen wurde parallel zu den Elektrodendochten und quer über die gesamte Gelfläche mit leichtem Druck aufgerollt. Die gereinigten S-Layer-Proteine wurden dann in die Schlitze des Applikationsstreifens pipettiert. Die Elektroden der Horizontalkammer wurden mit leichtem Druck aufgesetzt und die Elektrophorese gestartet. Die horizontale Elektrophorese erfolgte mit einer Anfangsspannung von 200 V bei konstanter Leistung (10W) und einer Endspannung von 2000 V. Die Elektrophorese war nach 2,5-3,5 Stunden beendet.

IEF Marker 3-10, Serva Liquid Mix (Serva, Kat. Nr. 42967)

Cytochrome C pI (isoelektrischer Punkt) 10.7; Ribonuclease A pI 9.5; Lectin pI 8.3, 8.0, 7.8; Myoglobin pI 7.4, 6.9; Carbonic anhydrase pI 6.0; β-Lactoglobulin pI 5.3, 5.2; Trypsin inhibitor pI 4.5; Glucose oxidase pI 4.2; Amyloglucosidase pI 3.5

2.10.2 Proteinfärbung

Fixierlösung: 20% Trichloressigsäure (w/v)

Stammlösung I: 1 g SERVA Violet 17 (Kat. Nr. 35072) ad 500 ml deionisiertem Wasser

Stammlösung II: 233 ml Phosphorsäure (86%) ad 1000 ml Wasser

Entfärbelösung: 35 ml Phosphorsäure (86%) ad 1000 ml Wasser

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das IEF-Gel unter leichtem Schütteln in 20%iger Trichloressigsäure (1h) fixiert. Alle weiteren Färbungen und Entfärbungen wurden ebenfalls bei mäßiger Schüttelfrequenz durchgeführt. Nach Beendigung der Fixierung wurde das Gel in 200 ml deionisiertem Wasser (1 min) überführt. Das Acrylamidgel wurde für 10 min in der SERVA Violet- Färbelösung gefärbt. Die Färbelösung wurde direkt vor dem Gebrauch aus den Stammlösungen I und II im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt. Anschließend wurde es dreimal 10 min mit der Entfärbelösung behandelt und dann jeweils zweimal 2 min mit deionisiertem Wasser neutralisiert. Nach der Neutralisierung wurde das IEF-Gel über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.11 Nachweismethoden zur Glykosilierung bei Proteinen

2.11.1 Glykoprotein-Färbung (PAS-Test)

Die Glykoprotein-Färbung erfolgte mit dem Fuchsia Glycoprotein Gel Stain Kit (MoBiTec, P-21850). Die Glykoproteine erscheinen nach der Färbung mit Pro-Q Fuchsia bei einer Anregung mit UV-Licht ($\lambda=302$ nm) durch Fluoreszenz ($\lambda=590$) als dunkle Proteinbanden. Die nicht glykolisierten Proteine erscheinen als helle Banden.

Glykoprotein-Standard Candy Cane (MoBiTec, C-21852)

α_2 -Makroglobulin MW (Molecular Weight, Da) 180000, Phosphorylase b MW 97000, Glukose Oxidase MW 82000, Rinderserum Albumin MW 66000, Saure α_1 -Glykoprotein MW 42000, Kohlenhydrat-Anhydrase MW 29000, Avidin MW 18000, Lysozym MW 14000

2.11.2 Enzym-Immunoassay Nachweismethodik zur Glykolisierung (Roche)

Der Nachweis von Glykoproteinen erfolgte mit dem DIG Glycan Detection Kit (Roche, Best. Nr. 1142372).

2.11.3 Chemische Deglykolisierung

Lösungen: 100% Methanol

70 % Fluorsäure (w/v) in Pyridin (Aldrich) gelöst

0,1 M NaCl

Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift von VAN HOLST & VARNER (1984). Die chemische Deglykosilierung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

2.12 Untersuchung zur Stabilität der S-Layer-Proteine

Die S-Layer-Proteine wurden bei verschiedenen Temperaturen, pH-Werten und mit zweiwertigen Kationen inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Einfluss dieser Faktoren auf die Proteine durch SDS-PAGE überprüft.

2.12.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Protein-Konformation

Lösungen: Universalpuffer pH 2-10 (Stammlösung)

Tris/HCl 11,00 g/l

Maleinsäure 11,60 g/l

Citrat 14,00 g/l

Borsäure 6,28 g/l

2 N NaOH

20 ml der Stammlösung wurden mit 2 N NaOH auf die gewünschten pH-Bereiche zwischen 2 und 10 eingestellt und mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Die S-Layer-Proteine wurden 30 min bei RT bei den jeweiligen pH-Werten inkubiert.

2.12.2 Einfluss der Temperatur auf die Protein-Konformation

Die S-Layer-Hüllproteine wurden bei 55, 65, 75, 85, 99 °C (Eppendorf, Thermomixer comfort, 850 Upm, 2 min) und RT inkubiert.

2.12.3 Wechselwirkung der S-Layer-Proteine mit zweiwertigen Kationen

Die S-Layer-Proteine wurden 20 min bei RT mit folgenden zweiwertigen Kationen inkubiert: Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} und Mg^{2+} . Für alle verwendeten Kationenlösungen wurde eine Konzentration von 10 mM verwendet.

2.13 Immunologischer Nachweis des S-Layer-Proteins slmj1 von *Methanocaldococcus jannaschii*

Antikörper gegen das S-Layer-Protein slmj1 aus *Mcc. jannaschii* wurden im Kaninchen generiert. Die immunologische Analyse der Primärantikörper-Bindung an das S-Layer-Hüllprotein-Antigen slmj1 erfolgte im Dot- und Western-Blot mit dem BM Chromogenic Western Blotting Kit (Roche, Best. Nr. 1647644).

Lösungen: Tris buffered saline (TBS), pH 7,5	Tris (50 mM)	6,05 g/l
	NaCl (150 mM)	8,76 g/l
	10% HCl	

Mit 10%iger HCl-Lösung wurde der TBS-Puffer auf pH 7,5 eingestellt.

TBS-Tween 20 (TBST)	0,1% Tween 20 (v/v) in TBS
---------------------	----------------------------

Maleinsäure-Puffer, pH 7,5	Maleinsäure (100 mM)	5,8 g
	NaCl (150 mM)	4,4 g
	10% NaOH	
	ad 500 ml	

Mit 10%iger NaOH wurde der Maleinsäure-Puffer auf pH 7,5 eingestellt.

Transfermembran: Nitrocellulose Transfer Membran (Schleicher & Schüll)

2.13.1 Dot-Blot

Die Arbeitslösungen wurden aus den Kit-Komponenten entsprechend der Vorschrift vorbereitet. Die Detektion der Immunreaktion erfolgte bei RT ohne Schütteln.

1. Auf die Oberfläche der Transfermembran wurde punktförmig 1 µl Probe aufgetragen und luftgetrocknet.
2. Nitrocellulose Membran wurde mit 30 ml 1%igem Blocking Reagenz (w/v) mindestens 30 min bei RT oder 4 °C über Nacht inkubiert.
3. Zugabe von Primärantikörper (Konzentration 1-4 µg pro ml) in 14 ml 1%igem Blockierungs-Reagenz (w/v) und Inkubation der Membran mindestens 30 min bei RT oder 4 °C über Nacht
4. Waschen mit TBST: 4x 30 ml à 10min
5. Zugabe von 50 µl Sekundärantikörper (anti-Rabbit (IgG); Konzentration 880 mU/ml) zu 12,5 ml 1%igem Blockierungs-Reagenz (w/v); die Transfermembran wurde mindestens 30 min bei RT oder 4 °C über Nacht mit Sekundär-Antikörper inkubiert
6. Waschen mit TBST: 4x 30 ml à 10min
7. Detektion der Immunreaktion mit 12,5 ml RT AP Substrat Lösung (NBT/X-Phosphat Lösung) im Dunkeln für höchstens 30 min
8. Abbruch der Färbung durch mehrmaliges Waschen der Nitrocellulose-Membran mit deionisiertem Wasser

2.13.2 Western-Blot

Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen (10%) elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schüll) geblottet. Der Proteintransfer erfolgte durch Elektro-Blotten nach der Vorschrift 1.14.1 ohne CuCl₂ Färbung. Die Detektion der Immunreaktion erfolgte entsprechend wie beim Dot-Blot (siehe oben) ab dem Arbeitsschritt 2. Die Transfermembran wurde im Arbeitsschritt 4 und 6 jeweils 4x 30 min gewaschen.

Protein Standard Precision Plus Protein (Bio-Rad; Kat. Nr.: 161-0374)

Der Proteinmarker setzt sich aus einem Gemisch gentechnisch exprimierter Proteine mit einem Molmassen-Bereich von 250-10 kDa zusammen. Folgende apparente molekulare Massen lagen vor: 250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15; 10 kDa.

2.13.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Lösung: PBS-Puffer: NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l
KH ₂ PO ₄	0,24 g/l

Für die Immunfluoreszenz-Analyse wurde 1 ml der Übernacht-Kultur (ca. 10⁹ Zellen/ml) verwendet und zweimal mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in 200 µl PBS-Puffer aufgenommen und davon je 10 µl Zellsuspension pro Ansatz verwendet. Folgende Ansätze wurden verwendet:

- a) 100 µl Primär-Antikörper (Konzentration ca. 30 µg pro ml in PBS-Puffer)
- b) 100 µl Präimmunserum (Kaninchenserum, gleiche Konzentration wie a)
- c) 100 µl PBS (Kontrolle)

Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 4 °C inkubiert und zweimal mit 200 µl PBS-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in 50 µl Fluorescein markierten Sekundär-Antikörper (Fluorescein, FITC, -conjugated affinity pure F(ab')₂ fragment goat anti-rabbit IgG (Heavy+Low) Absorption gegen Humanserum protein; Dianova, No. 111-096-045; 1:50 in PBS) aufgenommen und bei 4 °C für eine Stunde inkubiert. Die Zellen wurden nach der Behandlung mit dem Sekundär-Ak zweimal mit 100 µl PBS-Puffer gewaschen. Die Antikörper markierten Zellen wurden in 100 µl PBS-Puffer mit Formaldehyd (1% Endkonzentration) suspendiert und dunkel bei 4 °C gelagert. Von der Suspensionslösung wurden 5 µl auf einen Objektträger (Teflon-Beschichtung; Fenster ø 6mm) 10 min bei 85 °C hitzefixiert. Die Ansätze wurden durch Zugabe von 5 µl DABCO (1,1-Diazobicyclo-[2.2.2]Oktan, 208 mM) je Fenster beschickt. Die Antikörperbindung wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss, Axiophot2) unter blauem Fluoreszenzlicht (Filtersatz 5-Anregung 395-440 nm; Farbfilter 460 nm und Emission 470 nm) nachgewiesen (grüne Fluoreszenz). Mit DAPI wurde eine Gegenfärbung mit den fixierten Zellen durchgeführt.

Gegenfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)

Den fixierten Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Stammlösung 1 mg/ml; 1:100) angefärbt. Die fixierten Zellen wurden mit 5 µl DAPI beschickt und 10 min im Dunkeln inkubiert. Durch vorsichtiges Abspülen mit deionisiertem Wasser wurde überschüssige Färbelösung entfernt. Die Präparate wurden im Dunkeln luftgetrocknet. Durch Zugabe von DABCO wurden die gefärbten, fixierten Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet oder zunächst bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Färbung wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss, Axiophot2) unter blauen Fluoreszenzlicht (Filtersatz 1-Anregung 365 nm; Farbfilter 460 nm und Emission 397 nm) nachgewiesen (blaue Fluoreszenz).

2.14 Sequenzierung der N-Termini

2.14.1 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Blot-Puffer (pH 9,2)

Tris	48 mM	(5,82 g)
Glycin	39 mM	(2,93 g)
SDS	1,7 mM	(0,50 g)

Deionisiertes Wasser ad 1000 ml

Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen (10%) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit CuCl₂ gefärbt und entfärbt (Copper Stain and Destain Kit, BioRad). Nach Entfärbung wurde das Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) geblottet. Dazu wurde das Gel zunächst 15 min in Blot-Puffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde erst 30 min in Methanol gegeben, dann 30 min in Blot-Puffer equilibriert. Der Transfer erfolgte bei 4 °C, 30 mV über Nacht (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad). Die geblottete Membran konnte dann mit Coomassie-Proteinfärbelösung gefärbt (2 min) und anschließend mit Entfärbelösung behandelt werden.

2.14.2 Sequenzierung der N-Termini der S-Layer-Proteine

S-Layer-Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen (10%) elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) geblottet (siehe oben). Die Aminosäuresequenzen der N-Termini wurden im Labor von Dr. Schlott (Institut für Molekulare Biotechnologie, IMB, Jena) nach Edman bestimmt (EDMAN, 1967).

2.15 PCR-Strategien und PCR-Produkte

Die Isolierung des S-Layer-Gens erfolgte nach einer Zwei-Schritt-PCR Strategie (SØRENSEN *et al.*, 1999) und abgewandelten Formen dieser Methode. Das Prinzip beruht auf der Verwendung von einem biotinylierten spezifischen Primer, sowie unspezifischen Zufallsprimern in einer ersten PCR. Nach Aufreinigung der biotinylierten PCR-Fragmente mittels Streptavidin gekoppelten Magnetkügelchen (Dynabead M-280 Streptavidin), schloss sich eine zweite spezifische PCR an. Es wurden zwei Abwandlungen dieser Zwei-Schritt-PCR Strategie entwickelt:

Die erste Abwandlung der Zwei-Schritt-PCR basierte auf der Nichtverwendung der biotinylierten und degenerierten Oligonukleotide im ersten Schritt. Zunächst wurde im ersten PCR-Schritt nur mit einem spezifischen Primer eine PCR durchgeführt. Dieses Amplifikat wurde bei der nächsten PCR als DNA-Template verwendet. Beim zweiten PCR-Schritt wurde der gleiche Oligonukleotid aus der ersten PCR, sowie die unspezifischen Zufallsprimer verwendet.

Die zweite Abwandlung der Zwei-Schritt-PCR beruhte darauf, dass ein weiterer PCR-Schritt vor dem biotinylierten spezifischen PCR mit einem spezifischen Primer und den unspezifischen Zufallsprimern vorgeschaltet wurde. Nach der Aufreinigung der PCR-Fragmente schloss sich die Standard Zwei-Schritt-PCR Strategie an (siehe Abb. 4). Diese Abwandlung der Methodik wurde als Drei-Schritt-PCR bezeichnet.

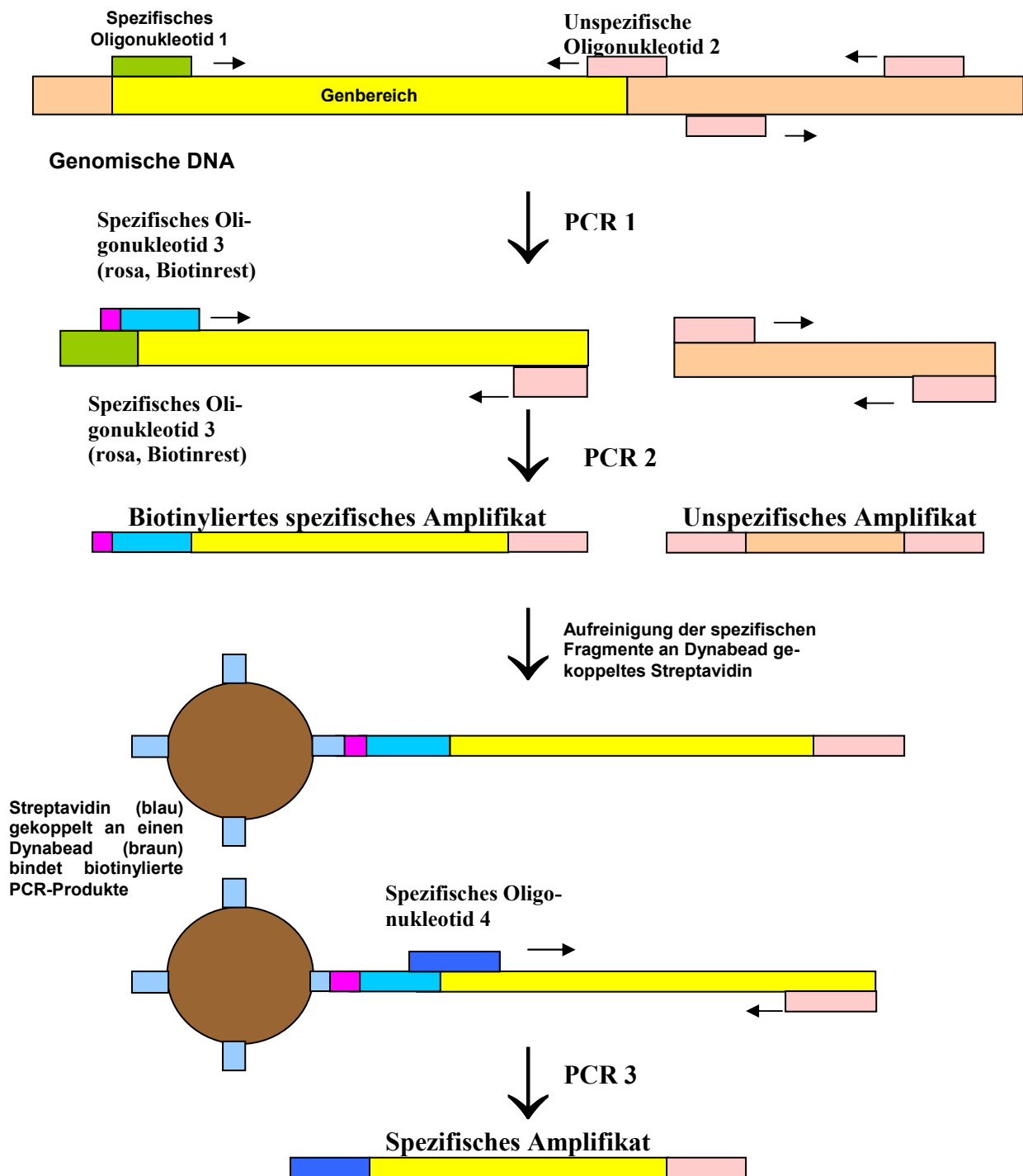


Abb. 4 Schema der abgewandelten Zwei-Schritt-PCR

Der Zwei-Schritt-PCR (SØRENSEN *et al.*, 1999) wurde eine PCR vor geschaltet. In einer ersten PCR mit genomischer DNA, wurden mit einem spezifischen Primer (Oligonukleotid 1) und einem unspezifischen Zufallsprimer (Oligonukleotid 2) sowohl spezifische, als auch unspezifische PCR-Fragmente erhalten. In der zweiten PCR wurden

die PCR-Fragmente mit einem spezifischen, biotinylierten Primer (Oligonukleotid 3) und einem unspezifischen Zufallsprimer (Oligonukleotid 2) behandelt. Es entstanden ebenfalls spezifische und unspezifische PCR-Fragmente. Die spezifischen Fragmente wurden aufgrund ihrer Biotinmarkierung durch Streptavidin gekoppelte Dynabeads aufgereinigt. In einem dritten PCR-Schritt wurden die aufgereinigten Fragmente durch einen spezifischen Nested-Primer (Oligonukleotid 4) und einem Zufallsprimer (Oligonukleotid 2) spezifische Amplifikate ergeben.

2.15.1 DNA-Präparation

DNA-Präparation mit InstaGene-Matrix (BioRad, Nr. 732-6030)

1 ml Bakterienkultur (ca. 10^8 Zellen/ml) wurde abzentrifugiert (Eppendorf, 3 min, 13000 rpm, RT) und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml sterilem Wasser suspendiert und erneut zentrifugiert (Eppendorf, 3 min, 13000 rpm, RT). Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Bakterienpellet in 200 μ l InstaGene-Matrix aufgenommen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die InstaGene-Matrix mit einer blauen Eppendorf-Spitze pipettiert wurde, nachdem das Pellet gut aufgeschüttelt wurde, damit kein Material in der Pipettenspitze hängen blieb. Das in InstaGene-Matrix suspendierte Bakterienpellet wurde dann in einem Thermomixer inkubiert (Eppendorf, 20 min, 56 °C), wobei der Ansatz zwischendurch alle 2-3 min aufgeschüttelt wurde. Dieser Schritt dient dazu, in Gram-positiven Bakterien Kationen aus der Zellwand zu lösen, wodurch diese labiler wird. Hier wurde dieser Schritt prophylaktisch beibehalten. Nachdem die Suspension dann 10 s geschüttelt wurde, kochte das Homogenat für 8 min bei 98 °C (Heizblock), was zum Aufbrechen der Organismen führte. Erneut wurde die Suspension 10 s geschüttelt, und anschließend wurde sie abzentrifugiert (Eppendorf, 3 min, 13000 rpm, RT). Überstand und Pellet verblieben im gleichen Gefäß und wurden auf Eis gestellt. Die aufgereinigte DNA befand sich im Überstand. Zur Lagerung wurde der Ansatz bei -20 °C eingefroren und für eine erneute Probennahme aufgetaut und abzentrifugiert.

DNA-Präparation mit Dynabeads DNA-Direct (DynaL, Nr. 630.02)

Alternativ wurde die DNA mit dem Kit Dynabeads DNA-Direct von Dynal aufgereinigt. Dazu wurde 1 ml Bakterienkultur (10^8 Zellen/ml) abzentrifugiert (13200 Upm, 3 min, RT) und

der Kulturüberstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde zweimal in 1 ml sterilem Phosphatpuffer (KH_2PO_4 12,25g/l; Na_2HPO_4 1,58 g/l; pH 5,9) suspendiert und erneut zentrifugiert (13200 Upm, 3 min, RT). Die gewaschenen Zellen wurden in 200 μl Phosphatpuffer aufgenommen und mit einem kräftigen Pipettierdruck 200 μl Dynabeads DNA DirektTM (10 mg/ml M-280 Streptavidin) hinzugefügt. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und danach 1-2 min in Dynal MPC (Magnetständer) platziert. Die frei vorliegende DNA aus der Zelllyse wurde von Magnetbeads gebunden die an der Gefäßwand am Magnetständer einen dunkelbraunen DNA DirektTM-Komplex bildeten. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Der Komplex wurde mit 200 μl Waschpuffer (RT) mit einem kräftigen Pipettierzug von der Gefäßwand gespült und nochmals in den Magnetständer gestellt, um den klaren Überstand zu entfernen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Der DNA-Komplex wurde mit 30 μl Resuspensionspuffer (raumtemperiert) resuspendiert. Dieser DNA-Komplex wurde direkt als Templat für die PCR eingesetzt.

2.15.2 Amplifikation vom S-Layer-Gen durch Zwei-Schritt-PCR

1. PCR-Ansatz der Zwei-Schritt-PCR

PCR-Ansatz

Spezifische Primer (Tab. 8), (100 pmol/ μl)	1,0 μl
Zufallsprimer (Tab. 8), (100 pmol/ μl)	1,0 μl
10 x PCR-Puffer	10,0 μl
MgCl_2 -Lösung (50 mmol/l)	5,0 μl
dNTP-Mix (je 2,5 mmol/l)	6,0 μl
Taq DNA-Polymerase (5 U/ μl)	0,4 μl
Genomische DNA	2,0 μl
Reinstwasser	74,6 μl

Der PCR-Ansatz wurde für jeden der vier Zufallsprimer separat angesetzt.

Tab. 8 Verwendete Oligonukleotide

Primer	Spezifität	Sequenz (5'→3')	T _m (°C)	Orientierung
FP1-MB ^{a)}	Zufallsprimer 1	CAGTTCAAGCTTGTCCAGGAATTCNNNNNNNGGCCT	67,1	↔
FP2-MB ^{a)}	Zufallsprimer 2	CAGTTCAAGCTTGTCCAGGAATTCNNNNNNNGCGCT	67,1	↔
FP3-MB ^{a)}	Zufallsprimer 3	CAGTTCAAGCTTGTCCAGGAATTCNNNNNNNCCGGT	67,1	↔
FP4-MB ^{a)}	Zufallsprimer 4	CAGTTCAAGCTTGTCCAGGAATTCNNNNNNNCGCGT	67,1	↔
MJ3SL	Methanokokken	GACGTTGTTTCAGCTGC	52,8	→
MJ4SL	Methanokokken	CTCTGTCKCCACCAG	55,6	←
MC-Leader	Methanokokken	TGGCAATGAGCTTAAANAAAATCG	58,9	→
MCT1-VIS	Mth. thermo.	TAAAAATCGGCGTCGTTACATCTT	59,7	←
MCT2-HISbio ^{d)}	Mth. thermo.	TGCATTAATAACGTTGGAGACAAG	58,1	→
MCT1-HIS	Mth. thermo.	GGAGACAAGAAGAAGATTAGGA	61,3	→
MCT-N2bio ^{d)}	Mth. thermo.	GCCATTACACCACTTGCTAATGCG	64,6	←
MCT-N1	Mth. thermo.	ACCACTTGCTAATGCGGAAGCTACC	64,6	←
MCV1-VIS	M.vannielii	GATAACTAAGTCATCATCGGTATCA	58,1	←
MCV2-VIS	M.vannielii	GTCACTTACTGCAGCTAATGTTTGT	59,7	←
MCV-N3 ^{d)}	M.vannielii	CGTCTTTTGCAGCAGCGTTTGAACC	64,6	←
MCV-N4	M.vannielii	GCAGCAGCGTTTGAACCTACTACAA	63,0	←
MCV-N1	M.vannielii	CACCAGTTGCTAAAGCGGATGCAAC	64,6	←
MCV-TT1	M.vannielii	ACCAAAGCAGGAATCGGCGATAAGG	64,6	→
MCV3-HIS	M.vannielii	CAACGCTTCCCCTGCAACCTTAGCT	66,3	→
MCV4-HISbio ^{d)}	M.vannielii	GCAATTGACAACGCTTCCCCTGCAA	64,6	→
MCIG1CR	Mt. igneus	GAAGTCTTGCTGCGCATC	58,8	←
MIG-Seq	Mt. igneus	GTATCCATAGTATTCTTCTGGC	56,5	←
MIGC1 bio ^{d)}	Mt. igneus	GCAGATGCGCAGCAAGCAGTTC	64,0	→
MIGC1 nes	Mt. igneus	GCAGCAAGCAGTTCCAGTAACAGC	64,4	→
MIGN3	Mt. igneus	GTGGTTGCTGCCATTACACCGCTTG	66,3	←
MIGN2 bio ^{d)}	Mt. igneus	GCTGATGCAACCATTGCCCTCC	66,0	←
MIGN2 nes	Mt. igneus	CCATTGCCCTCCAAGTCAATAG	64,4	←
MTIGF	Mt. igneus	CCCAGAAGTTAGAATAGGCGCAG	62,4	→

MIGCS1	Mt. igneus	GGAGGTCCAGTTGCAAAC	56,0	→
B3 Leader	B. fusiformis	ATGGCAAAGCAAAACAAAGGCCGTA	61,3	→
B3N-Leader	B. fusiformis	CTTACTAGAATGGTATTCTACTACT	56,4	→
B3 Cseq	B. fusiformis	CTACTAAAGATTGAACTGCTTCTTT	56,4	←
B3 LH	B. fusiformis	TTTCTACAGTTGCTGCGATAGCATC	61,3	←
BSLV1B	B. fusiformis	CGCAAAGCAAAACAAAGGCCGTAA	61,0	→
BSLV2	B. fusiformis	TTTACGWGCTTCAGAACGAGTTAAW	58,1	←
B3 CN1	B. fusiformis	TGTAAGTGCTACTGAATTCGCACCA	61,3	→
B3 CC1	B. fusiformis	TCACATTGATTTCTTTATCGCCAGC	59,7	←
B3 CN2	B. fusiformis	CGACGGTAAAGTTGATCCAGCTACA	63,0	→
B3 CC3	B. fusiformis	TCTTACTTCTGGACGAGTTTGGTCG	63,0	←
B3 CC1T	Stamm B3	CTGAGCCAGTTGAACAAGTATTTGC	61,3	→
B3-fCC1bio ^{d)}	Stamm B3	GGATGCAAGGTGGATCTAAAAAGCAAG	63,4	→
B3-fCC1nes	Stamm B3	GGTGGATCTAAAAAGCAAGCTGCATC	63,2	→
Bf HIS1	DSM 2898T	CATTCGTAGGTGACAATAAACTGGTT	60,1	→
Bf HIS1bio	DSM 2898T	CGTAAAAGACTTCTCTGGCAACGTA	61,3	→
Bf HIS1nes	DSM 2898T	GACTTCTCTGGCAACGTAATTGATAA	60,1	→
2358 CN1	Gb. stearoth.	CAAAGCCGGCAACTTGGACAAAGCG	66,3	→
2358 Leader	Gb. stearoth.	ATGGACAAAAAGAAAGCAGTCAAAC	58,1	→
2358 LH	Gb. stearoth.	GCTTTGAATACATACGTTTCGTATG	58,1	←
BSSLV1	Gb. stearoth.	GGCGCGAAAAAAGACGCKTAYTTRG	63,8	→
BSSLV2	Gb. stearoth.	CGCGCTTTCATKGCAACGGTRATRT	63,8	←
2358 N1bio ^{d)}	DSM 2358	CGCCAGATCTTGACGCAGACCGTCA	67,9	→
2358 N2nes	DSM 2358	GACGCAGACCGTCAAGCTTGAAGTGC	67,9	→
2358 sl1bio ^{d)}	DSM 2358	CGCGCACGGTCATTCTCGACCGCGT	71,2	→
2358 sl2	DSM 2358	GTCATTCTCGACCGCGTCTACGGCC	69,5	→
2358 CN2bio ^{d)}	DSM 2358	GCAGCACAAGACGCCAAGGCG	65,7	→
2358 CN2nes	DSM 2358	GACGCCAAGGCGGCGTATGAAG	65,8	→
2358 CN3nes	DSM 2358	CAGCACTTGCAACGTTGGATGGCTC	66,3	→
2358 CN4	DSM 2358	GATACAGTGGCGCCGACATTGAAAG	64,6	→

2358 HIS1	DSM 2358	GAAAGATACAGTGGCGCCGACAT	62,4	→
2358 HIS1 ^{bio^d}	DSM 2358	GCTACTGCGAAATCTACAACGAC	60,6	→
2358 HIS1 ^{nes}	DSM 2358	TCTACAACGACAAGAGTGACGCTTG	63,0	→
396 CN2 ^{nes}	DSM 396	CCACTTGACCGCGGTTAATTGTTTG	63,0	←
396 ISF1	DSM 396	CATCTGCTATCGTACCAGTGGCT	62,4	→
396 ISF2	DSM 396	CTGCTAATGGTGTGAAATCTCCAG	61,0	→
396 ISR1	DSM 396	GCAACACCGTTTTTCATCTGTTACAG	61,3	←
396 ISR2	DSM 396	GTGGAGCGATTTCAACATCGCC	62,1	←
396 CC1 ^{nes}	DSM 396	GACTTAGTAGCTGAGTACAAAAAGCG	61,9	→
396 CC2 ^{nes}	DSM 396	CTGCTAATGGTGTGAAATCTCCAGT	61,3	→
396 HIS1	DSM 396	CGTACACTGTTTACAACACTGGTGC	63,0	→
396HIS1B- ^{bio^d}	DSM 396	AGTTGGCGATGTTGAAATCGCTCC	62,7	→
396 HIS1B- ^{nes}	DSM 396	CCGCGTGCATACATTAGTTGCCG	64,2	→
396 HIS2	DSM 396	CGAAGGACGGAAACAAAGAATTCGC	63,0	→
396 HIS2 ^{bio^d}	DSM 396	CGATAGGGATCGTGTCTCCCATCA	64,4	→
396 HIS2 ^{nes}	DSM 396	GTGTCTCCCATCAGTTTATCGGCAG	64,6	→
396 C-Ed	DSM 396	TAYTTDATNGCNCNGTRTANGG	59,5	←
Narch1100R ^b	Archaeobakterien	GGGTCTCGCTCGTTRCC	57±1	←
Narch5A ^b	Archaeobakterien	TCCGGTTGATCCCGCCGG	62	→
NEubak5 ^c	Eubakterien	AGAGTTTGATCMTGGCTC	53±1	→
NEubak3 ^c	Eubakterien	AGAAAGGAGGTGATCC	48	←
Eub338F	Eubakterien	ACTCCTACGGGAGGCAG	56	→
Eub781F	Eubakterien	AACAGGATTAGATACCC	48	→
Eub1070F	Eubakterien	ATGGCTGTCGTCAGCT	50	→
KP-MJF-NdeI	Klonprimer mjsI	GGTGATAACATATGGCAATGAGCTTAAAG	62,4	→
KP-MJR-SALI	Klonprimer mjsI	CATAATGTCGACAATTAATTTAAATTTATGAATT	57,4	←

Abkürzungen (IUPAC Code): N=(A,T,G,C); D=(G,A,T); K=(G,T) R=(A,G); W=(A,T); Y=(C,T)

^anach SØRENSEN *et al.* (1999), ^bnach FRÖHLICH (1999), ^cnach BROSIUS *et al.* (1981),

^dbiotinylierte Oligonukleotide; Mth. therm.= *Mth. thermolithotrophicus*; Gb. stearoth= *Gb. stearothermophilus*

PCR-Programm (Thermocycler, Mastercycler gradient, Eppendorf)

Als Standard-PCR-Programm wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 1.) 5 min 95 °C 1 Zyklus
- 2.) 2 min 94 °C Denaturierung - 2 min 67°C Annealing - 2 min 72 °C Synthese 35 Zyklen
- 3.) 10 min 72 °C 1 Zyklus
- 4.) ∞ 8 °C

2.15.3 Aufreinigung der Biotin-markierten PCR-Fragmente mit Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna)

Lösung: 2 x Binding & Wash-Puffer (2 x B&W-Puffer)

20 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 2 M NaCl

Waschen der Dynabeads M-280 Streptavidin

Pro aufzureinigendes PCR-Fragment wurden 20 µl Dynabeads M-280 Streptavidin (10 mg/ml) in 1 ml 2 x B&W Puffer in einem Eppendorf-Gefäß aufgenommen. Das Eppendorf-Gefäß wurde dann in einen Magnetständer (Dyna, MPC) gestellt. Dabei wurden die Dynabeads durch den Magneten an den Rand des Eppendorf-Gefäßes gezogen, so dass man den Überstand leicht abziehen konnte. Die verbliebenen Dynabeads wurden dann auf gleiche Weise in 1 ml 2 x B&W-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Dynabeads wurden in 40 µl 2 x B&W-Puffer suspendiert (= 200 µg gewaschene Dynabeads /40 µl).

Aufreinigung der PCR-Fragmente

40 µl des biotinylierten PCR-Produktes wurden zu 40 µl gewaschenen Dynabeads M-280 Streptavidin gegeben und mindestens 35 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die biotinylierten (d.h. die spezifischen) PCR-Produkte von den Dynabeads M-280 Streptavidin gebunden und somit herausgezogen wurden. Dabei wurde alle 2-3 min geschüttelt, um ein Sedimentieren der Dynabeads zu verhindern. Der Ansatz wurde dann in einen Magnetic Particle

Concentrator (MPC) gestellt und der Überstand abgezogen. Dadurch wurden alle nicht-biotinylierten PCR-Produkte abgetrennt. Die gebundenen PCR-Fragmente wurden dann mit 1 ml 1 x B&W-Puffer gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die gebundenen PCR-Fragmente in 8 µl 0,1 M NaOH denaturiert (15 min, RT). Dabei brechen die doppelsträngigen, an Dynabeads M-280 Streptavidin gebundenen PCR-Fragmente zu Einzelsträngen auf. Der Ansatz wurde erneut in einen MPC gegeben, der Überstand abgezogen und weiterverwendet. Dadurch erhielt man spezifische, einzelsträngige, unmarkierte PCR-Amplifikate. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 4 µl 0,2 M HCl neutralisiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0 gepuffert und mit Reinstwasser auf 30 µl aufgefüllt. Dadurch erhielt man spezifische, einzelsträngige, unmarkierte, aufgereinigte DNA.

2. Zwei-Schritt-PCR

Die 2. PCR wurde als Semi-Nested-PCR durchgeführt. Dies bedeutet, dass einer der beiden PCR-Primer gegenüber der ersten PCR nach innen versetzt konstruiert wurde. Der zweite PCR-Primer war nun im Gegensatz zur ersten PCR spezifisch gegen eine konstante Region des ersten Zufallsprimers. Somit lieferte die zweite PCR ein spezifisches PCR-Produkt.

PCR-Ansatz

PCR-Primer Vorwärtsprimer (Tab. 8), (100 pmol/µl)	1,0 µl
PCR-Primer Rückwärtsprimer (Tab. 8), (100 pmol/µl)	1,0 µl
10 x PCR-Puffer	10,0 µl
MgCl ₂ -Lösung (50 mmol/l)	5,0 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mmol/l)	6,0 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
DNA (aus Aufreinigung der ersten PCR)	2,0 µl
Reinstwasser	74,6 µl

PCR-Programm (Thermocycler: Mastercycler gradient, Eppendorf)

Es wurde das Standard-PCR-Programm durchgeführt (2.14) mit einer Annealingtemperatur von 67 °C.

2.15.4 Amplifikation vom S-Layer-Gen durch die Drei-Schritt-PCR

Die Drei-Schritt-PCR beruht darauf, dass vor der Zwei-Schritt-PCR ein weiterer PCR-Schritt mit einem spezifischen Oligonukleotid und den unspezifischen Zufallsprimern, vorgeschaltet wurde. Nach der Aufreinigung der PCR-Fragmente schloss sich die Standard Zwei-Schritt-PCR Strategie an (siehe 2.14.2). Die Isolierung des S-Layer-Gens erfolgte in den ersten beiden PCR-Schritten mit einer Touch-Down-PCR. In der Touch-Down-PCR wurde die optimale Annealingtemperatur vom Oligonukleotid um 15 °C erniedrigt und in den folgenden ersten zehn Zyklen pro Zyklus um jeweils 0,5 °C erniedrigt. Bei der Touch-Down-PCR mit dem Primer Bf HIS1 (siehe Tab. 8) lag die Annealingtemperatur bei 60 °C vor. Im dritten PCR-Schritt wurde eine Standard PCR mit 30 Zyklen durchgeführt.

Touch-Down-PCR Programm (Thermocycler: Mastercycles gradient, Eppendorf)

Beispiel für Primer Bf HIS1:

Erster Zyklus

5 min 95 °C

10 Zyklen

2 min 94 °C

2 min 45 °C (Abnahme der Annealingtemperatur um 0,5 °C pro Zyklus)

2 min 72 °C

25 Zyklen

2 min 94 °C

2 min 60 °C

2 min 72 °C

Letzter Zyklus

10 min 72 °C

unendlich 8 °C

2.16 Amplifikation vom S-Layer-Gen mit aus Datenbankvergleich resultierenden Oligonukleotiden

Aus Datenbankvergleichen wurden für die S-Layer-Gene aus der Familie der *Bacillaceae* konservierte Nukleotidfolgen gefunden, die als Vorlage zur Konstruktion von Primern dienten.

Bei der Gattung *Geobacillus* wurden die S-Layer-Gene von *Gb. stearothermophilus* Stamm DSM 22 (=ATCC 12980, MESSNER *et al.*, 1984; JAROSCH *et al.*, 2000) und PV 72 (MESSNER *et al.*, 1984; KUEN *et al.*, 1994) miteinander verglichen (Programm CLUSTAL W 1.7). Dabei wurden konservierte Genbereiche als Vorlage für Primer verwendet, mit denen eine PCR mit genomischer DNA von *Gb. stearothermophilus* Stamm DSM 2358 erfolgte.

Bei der Gattung *Bacillus* wurden die S-Layer-Gene von *B. sphaericus* Stamm P-1 (LEWIS *et al.*, 1987) und WHO 2362 (LEWIS *et al.*, 1987; BOWDITCH *et al.*, 1989) verglichen (Programm CLUSTAL W 1.7). Dabei wurden konservierte Nukleotidfolgen gefunden, die als Vorlage zur Konstruktion von PCR-Primern dienten, mit denen eine PCR mit genomischer DNA von *B. fusiformis* Stamm B3 und DSM 2898T erfolgte.

2.16.1 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

DNA-Standard Marker 3 (MBI Fermentas, Nr.: SM0191)

Lambda DNA // *EcoRI*+*HindIII* (Basenpaare (bp): 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564)

DNA-Standard, 100 bp DNA-Leiter Plus (Peglabor, Nr.: 25-2010)

Basenpaare (bp): 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

50 x TAE-Puffer

242 g Tris, 57 ml konz. Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, ad 1000 ml bidest. Wasser

Agarosegele (1,5-2%)

GTG-Agarose Rotaphor-Grade (Biometra, Göttingen) 1,5-2g/100ml 0,5 x TAE-Puffer

Die PCR-Amplifikate wurden in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (SEALY & SOUTHERN, 1982). Nach Färbung der Gele mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml, 30 min), konnte die DNA der PCR-Fragmente bei Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) durch Fluoreszenz ($\lambda = 590$ nm) nachgewiesen werden (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.16.2 Aufreinigung von PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QUIAGEN) oder Gel Extraction Kit (QUIAGEN).

2.16.3 TA Klonierung der PCR-Amplifikate

Die PCR-Produkte wurden mittels TA Klonierung (TA Cloning Kit, Invitrogen Cat. No. K2000-01) ins Vektor pCR 2.1 integriert. Das frisch eluierte PCR-Amplifikat (Insert) wurde mit dem Vektor pCR 2.1 (siehe Tab. 9; Abb. 5) ligiert. Der Ligationsansatz (10 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

Steriles Wasser	4 µl
10 x Ligationspuffer	1 µl
pCR Vektor (25 ng/µl)	2 µl
Frisches PCR Amplifikat (~10 ng)	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

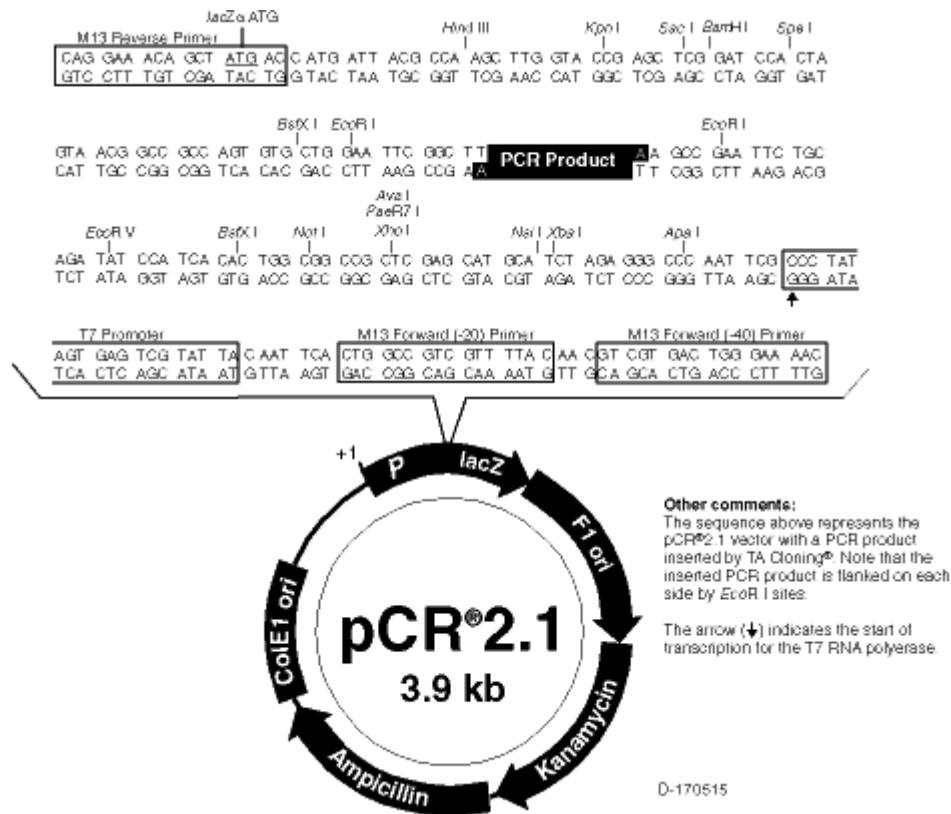


Abb. 5 Die Abbildung und Eigenschaft vom Vektor pCR 2.1 (www.invitro.com).

Zeigt einen Teilausschnitt der Sequenz mit den Restriktionsschnittstellen und ein integriertes PCR-Amplifikat durch TA Klonierung. Das Insert wird von zwei Restriktionsschnittstellen EcoRI flankiert. Über die überhängenden Adenin-Reste am 3'Ende vom Amplifikat wird es in den Vektor pCR 2.1 ligiert. Pfeil markiert Transkriptionsstartpunkt vom T7 Promotor.

Die Inkubation der Ligation erfolgte bei 14 °C über Nacht. 2 µl vom inkubierten Ligationsansatz wurden zu den aufgetauten kompetenten Zellen von *E. coli* (INFαF', 10⁸ Zellen/ml, siehe Tab. 9) zugegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt. Die Transformanten wurden 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Hitzeschock-Behandlung für exakt 30 s bei 42 °C im Wasserbad (GFL, Wasserbad 1003 mit Temperatur-Regelung) und auf Eis zurück platziert. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium (RT) wurde bei 37 °C (Eppendorf, Thermomixer comfort, 300 Upm, 60 min) inkubiert.

Für die Analyse der inkubierten Transformanten wurden 75 µl auf LB-Kanamycin-Agarplatten (jeweils 5 g/l Hefeextrakt, Trypton, NaCl, 12 g/l Agar-Agar-pH 7,5, 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Von jeweils 12 Transformanten wurde in LB-

Kanamycin-Flüssigmedium (50 µg/ml) bei 30 °C eine Übernachtskultur angelegt. Das Fusionsplasmid wurde mit QIAprep Miniprep Kit (siehe 2.16.4) isoliert.

2.16.4 Aufreinigung der Plasmide

Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit dem QIAprep Miniprep Kit (QUIAGEN).

2.16.5 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmidkonstrukten

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde mit dem Sequenzer ABI PRISM 377 von der Firma GENterprise GmbH, Mainz mit den spezifischen Oligonukleotiden (Tab. 8) durchgeführt. Die Plasmidkonstrukte mit dem Vektor pCR 2.1 wurden mit den Primern M13 forward und reverse Primer sequenziert.

2.17 Heterologe Expression des S-Layer-Proteins *slmj1* im *E. coli*-System

2.17.1 Amplifikation des S-Layer-Gens *slmj1*

Das komplette Gen von *slmj1* wurde mit den Primern KP-MJF-NdeI und -SalI (Tab. 8) amplifiziert, welche die Restriktionsschnittstellen NdeI und SalI aufwiesen.

PCR-Ansatz

Klon-Primer KP-MJF-NdeI (Tab. 8, 100 pmol/µl)	1 µl
Klon-Primer KP-MJF-SalI (Tab. 8, 100 pmol/µl)	1 µl
10 x PCR-Puffer (Dyna Zyme EXT, Finnzymes, F505B)	10 µl
MgCl ₂ -Lösung (Dyna Zyme EXT, Finnzymes, F-510MG, 50 mmol/l)	5 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mmol/l)	6 µl
Proof Reading Taq DNA-Polymerase (Dyna Zyme EXT, Finnzym, F505, 1 U/µl)	1 µl
Genomische DNA <i>Mcc. jannaschii</i>	2 µl
Reinstwasser	74 µl

PCR-Programm (Thermocycler: Mastercycler gradient, Eppendorf)

Als PCR-Programm wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 1.) 5 min 95 °C 1 Zyklus
- 2.) 2 min 94 °C - 2 min 57,4 °C (Annealing Temperatur - 2 min 72 °C) 30 Zyklen
- 3.) 10 min 72 °C 1 Zyklus
- 4.) ∞ 8 °C

Das spezifische S-Layer-Gen Amplifikat *slmj1* NdeI/SalI wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QUIAGEN) aufgereinigt. Die frische DNA wurde in 30 µl deionisiertem Wasser eluiert. Mit dem frisch eluierten PCR-Produkt wurde eine TA Klonierung (siehe 2.16.3) durchgeführt. Die Aufreinigung des Klonvektors erfolgte mit QIAprep Miniprep Kit (siehe 2.16.4).

Verwendete Stämme von *Escherichia coli***Tab. 9** Verwendete Stämme von *E. coli* und Plasmide

Stämme & Plasmide	Genotyp	Referenz / Quelle
JM 105 #370	<i>thi, rpsL, endA, sbcB15, hsdR4, Δ(lacproAB)/F' traD36, proAB, LacIqΔM15</i>	YANISCH-PERRON <i>et al.</i> , 1985 #Stammhaltung (AG Uden, IMW)
BL 21 (DE3)	<i>F' hsdS, gall, ompT, dcm</i>	STUDIER & MOFFAT, 1986
INFαF'	<i>F' endA1, recA1, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), SupE44, thi-1, gyrA96, relA1, Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169λ⁻</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
pET28a	Expressionsplasmid, kan ^R	Novagen, Madison, USA
pCR 2.1	Klonierungsvektor, kan ^R , amp ^R	Invitrogen, Carlsbad, USA

Isolierung des Vektor pET28a

Der *E. coli* Stamm JM 109#676 wurde in LB-Flüssigmedium (50 µg/ml Kanamycin) bei 30 °C über Nacht kultiviert und das Expressionsplasmid pET28a kan^R (Novagen) wurde aus diesen Zellen mit QIAprep Miniprep Kit (siehe 2.16.4) isoliert.

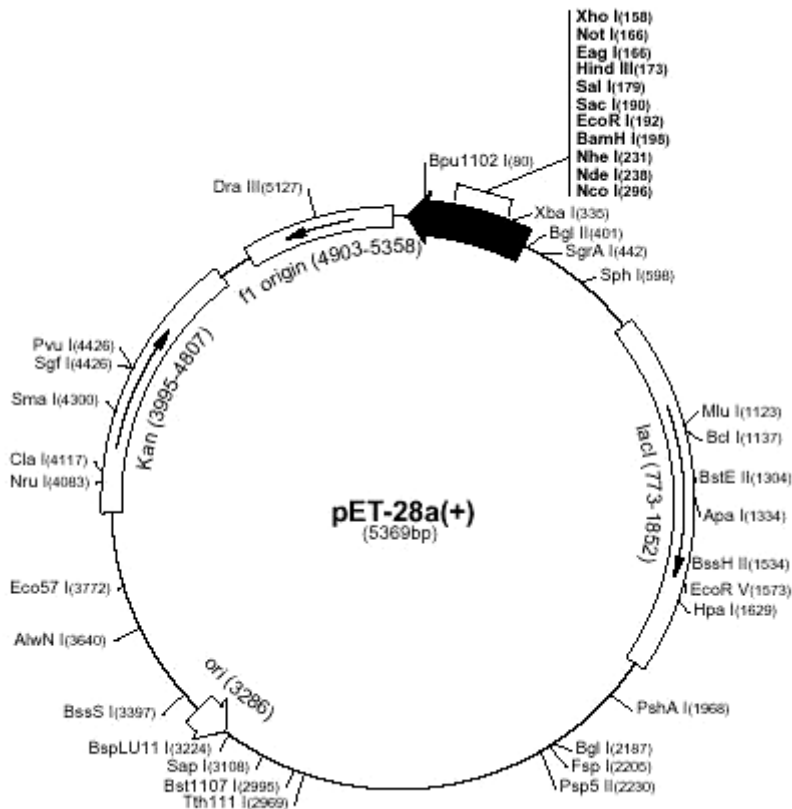


Abb. 6 Schematische Darstellung und Eigenschaften vom Vektor pET28a(+).

Schwarz hervorgehoben die Klonierungs- und Expressionsbox des Expressionsvektors. 5'-terminal schließt sich eine His-tag, Thrombinschnittstelle und Transkriptionsstartpunkt vom T7 Promotor und 3'-terminal optional eine His-tag an. Außerdem sind die Restriktionsschnittstellen in der Box und im Vektor gekennzeichnet.

2.17.2 Restriktion des Fusionsplasmids pCR 2.1-slmj1 und pET28a

Der Vektor pET28a (siehe Abb. 6) und das Fusionsplasmid pCR2.1-slmj1 mit den eingefügten Restriktionsschnittstellen NdeI und SalI wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und SalI verdaut. Der Restriktionsansatz (30 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

Plasmid	15 µl
10x Restriktionspuffer O ⁺ (MBI Fermentas)	3 µl
Restriktionsenzym NdeI (MBI Fermentas, 20 Units)	2 µl
Restriktionsenzym SalI (MBI Fermentas, 20 Units)	2 µl
Steriles deionisiertes Wasser	8 µl

Die Restriktion wurde bei 37 °C für 22 Stunden inkubiert und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (siehe 2.16.2) aufgereinigt. Die Restriktion vom Plasmidkonstrukt pCR2.1-slmj1 wurde elektrophoretisch aufgetrennt (SEALY & SOUTHERN, 1982), um das S-Layer-Gen mit den überlappenden Enden durch Gelelektion (siehe 2.16.2) zu isolieren. Durch eine Dephosphorylierung des linearisierten Vektors pET28a sollte eine Religation verhindert werden. Hierfür wurde eine alkalische Phosphatase (CIP) verwendet.

Dephosphorylierungs-Ansatz (50 µl):

Gereinigter Restriktionsansatz Vektor pET28a	30 µl
10x CIP-Puffer (MBI Fermentas)	5 µl
CIP (MBI Fermentas, 1 Unit)	1 µl
Steriles deionisiertes Wasser	14 µl

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (siehe 2.16.2) aufgereinigt.

2.17.3 Ligation des S-Layer-Gens slmj1 mit Expressionsvektor pET28a

Das S-Layer-Gen (slmj1) mit den überlappenden Enden wurde mit dem linearisierten Vektor pET28a für 24 Stunden bei 14 °C ligiert. Die Ligation des 1,7 kbp S-Layer-Gens erfolgte über die überlappenden Enden in pET28a (Novagen). Das Konstrukt umfasst die gesamte kodierende Sequenz vom S-Layer-Gen slmj1. Der Ligationsansatz (20 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

Dephosphorylierter Vektor pET28a	3 μ l
Eluat S-Layer-Gen slmj1	9 μ l
10x Ligationspuffer R+ (MBI Fermentas)	2 μ l
T4 DNA Ligase (MBI Fermentas, 1 Unit)	1 μ l
Steriles deionisiertes Wasser	5 μ l

Die Ligase wurde durch Butanolfällung entfernt. Die DNA wurde in 10 μ l sterilen deionisiertem Wasser aufgenommen und für die Elektroporation verwendet.

2.17.4 Transformation des Expressionsplasmids pET28a-slmj1 in *E. coli* JM 105

	g/l
SOC-Medium: Trypton	20
Hefe-Extrakt	5
NaCl	0,584
KCl	0,19
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,46
Glukose x H ₂ O	3,96

Das Expressionsplasmid pET28a-slmj1 wurde durch Elektroporation (peQLab, EQUIBIO-Elektroporator Easyjet Prima) in elektrokompente *E. coli* JM 105 #370 Zellen (siehe Tab. 9) bei 2500 Volt transformiert. Der Elektroporations-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Expressionsplasmid pET28a-slmj1	6,25 μ l
Kompetente <i>E. coli</i> Stamm JM 105 #370	50 μ l

Die *E. coli* JM 105 #370 Zellen wurden nach Elektroporation in 1 ml SOC-Medium (37 °C) überführt und bei 37 °C (Eppendorf, Thermomixer comfort, 750 Upm, 60 min) inkubiert. Nach der Erholungsphase im SOC-Medium wurden die Transformanten durch kurzfristiges Zentrifugieren sedimentiert und ein Teil des Überstandes verworfen. Mit dem restlichen Kulturmedium wurden die transformierten Zellen resuspendiert, auf LB-Kanamycin-Agarplatten

(50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Identifizierung der Transformanten erfolgte durch Entnahme ausgewählter Kolonien. Von den entnommenen Transformanten wurde in LB-Kanamycin-Flüssigmedium (50 µg/ml Kanamycin) jeweils eine Übernachtskultur (30 °C, 200 Upm) angelegt. Das Expressionsplasmid wurde mit QIAprep Miniprep Kit (siehe 2.16.4) isoliert. Die Identifizierung positiver Transformanten erfolgte durch eine Restriktionsanalyse mit den Endonukleasen NdeI und SalI. Die Restriktionsanalyse (30 µl) setzte sich folgend zusammen:

Plasmid DNA	15 µl
10x Restriktionspuffer R ⁺ (MBI Fermentas)	3 µl
Restriktionsenzym NdeI (MBI Fermentas 10 Units)	1 µl
Restriktionsenzym SalI (MBI Fermentas 10 Units)	1 µl
Steriles deionisiertes Wasser	10 µl

Der Restriktionsverdau wurde elektrophoretisch in einem 1,5%igen Agarosegel (0,5 x TAE) aufgetrennt.

2.17.5 Transformation des Expressionsplasmids pET28a-slmj1 in *E. coli* BL21 (DE3)

Das konstruierte Expressionsplasmid pET28a-slmj1 wurde in *E. coli* BL21 (DE3) (siehe Tab. 9) transformiert. Dieser Wirtstamm verfügt über eine chromosomale Kopie der T7 RNA Polymerase unter der Kontrolle des lac-Promotors. Aufgrund dieser genotypischen Eigenschaft von *E. coli* BL21 (DE3) wurde die heterologe Proteinexpression mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Transformation vom Expressionsplasmid pET28a-slmj1 wurde durch Elektroporation (peQLab, EQUIBIO-Elektroporator Easyjet Prima) in elektrokompente *E. coli* BL21 (DE3) Zellen bei 2500 Volt durchgeführt. Der Elektroporations-Ansatz mit *E. coli* BL21 (DE3) setzte sich wie folgt zusammen:

Isoliertes Expressionsplasmid pET28a-mjs11	6,25 µl
Kompetente <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Zellen	50 µl

Die folgende Transformation erfolgte wie unter 2.17.4 beschrieben. Der klonierte Bereich vom S-Layer-Protein wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung wurde mit den Primern T7 forward und reverse durchgeführt.

2.17.6 Expression und Reinigung des heterologen S-Layer-Proteins slmj1

Die heterologe Überproduktion vom S-Layer-Protein slmj1 wurde durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) im Wirtstamm BL21 (DE3) mit dem aufgenommenen Expressionplasmid pET28a-slmj1 induziert. Das S-Layer-Protein slmj1₁₋₅₅₈ umfasst die komplette Proteinsequenz und zusätzlich einen N-terminalen His-tag und eine Thrombinspaltstelle.

Die Zellen wurden in LB-Medium (50 μ g/ml Kanamycin) gezüchtet. Es wurden 1 l Schikankolben verwendet und maximal mit 300 ml Medium befüllt. Die Expressionskultur wurde zu 1% (v/v) aus einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen wurden aerob bei 30 °C (200 Upm) kultiviert. Bei einer OD₅₇₈ zwischen 0.8-1.0 wurde die Expression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Die Zellen wurden zwischen 4-5 Stunden inkubiert (30 °C) und durch Zentrifugation (Sorvall, Rotor GS3, 6500 Upm, 20 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde zweimal mit Phosphatpuffer (pH 5,9) gewaschen und zentrifugiert (Beckman, Rotor J2-21, 15000 Upm, 20 min, 4 °C).

Zellaufschluss und Affinitätschromatographie

Reinigungspuffer (Puffer I):	KH ₂ PO ₄ (pH 7,0)	50 mM
	Imidazol	20 mM
	KCl	300 mM
Waschpuffer:	Puffer I + 40 mM Imidazol	
Elutionspuffer:	Puffer I + 500 mM Imidazol	

Die gewaschenen Zellen wurden mit 15 ml Puffer I resuspendiert und anschließend in drei Durchgängen in der French Press (Press, SLM Amico) aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wurde durch Zentrifugation (Beckman, Rotor J2-21, 15000 Upm, 20 min, 4 °C) in lösliche und unlösliche Komponenten aufgetrennt. In der löslichen Fraktion befand sich ein Großteil vom S-Layer-Protein slmj1. Das Zellrohextrakt wurde 85 min bei 85 °C inkubiert, auf Eis

abgekühlt und durch Zentrifugation (Beckman, Rotor J2-21, 15000 Upm, 20 min, 4 °C) denaturierte Proteine von löslichen Proteinen getrennt.

Das His₆-markierte Protein wurde bei 4 °C durch Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Agarose Säule (Novagen) mit einem Säulenvolumen von 2 ml gereinigt. Die Säule wurde mit 16 ml Puffer I equilibriert und anschließend 8 ml Zellrohextrakt aufgetragen. Die Säule wurde mit 16 ml Waschpuffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 8 ml Elutionspuffer eluiert und in 8 Fraktionen zu je 1 ml fraktioniert. Nach der Elution wurde die Reinheit der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE überprüft. Die Fraktionen 3-7 vom Eluat wurden zusammengefasst, anschließend gegen deionisiertem Wasser dialysiert (Dialyserschlauch, Roth) und in einer Speed vac (Eppendorf, Concentrator 5301, 45 °C) aufkonzentriert. Die Reinheit der hochkonzentrierten Proteinlösung wurde durch SDS-PAGE überprüft. Für weitere Analysen wurde die Proteinlösung bei -20 °C gelagert.

2.18 Datenbanken zur Sequenzbewertung

- Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)
- HUSAR (<http://genome.dkfz.heidelberg.de>)
- ExPASy (<http://www.expasy.ch>)
- SRS (<http://srs.ebi.ac.uk>)
- Zuker (<http://www.bioinfo.rpi.edu/~zukerm/nph-home.cgi>)
- iProClass (<http://pir.georgetown.edu/iproclass/>)
- CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

3 Ergebnisse

Proteinchemische Eigenschaften

3.1 Löslichkeitsverhalten der S-Layer-Proteine in verschiedenen Agenzien

In früheren Untersuchungen (AKÇA, 2000) wurden für die Solubilisierung des S-Layer-Proteins mehrere Agenzien getestet: LiCl, Guanidiumchlorid, Harnstoff und Tris/HCl. Das Zellpräzipitat wurde mit den genannten Agenzien bei RT inkubiert und der Suspensionsüberstand durch SDS-PAGE überprüft (siehe Abb. 7). Die effektivste Ausbeute bei den Methanococcales wurde mit 1 M Tris/HCl (siehe Abb. 7 Spur 5) erhalten. Die chaotropen Agenzien erwiesen sich überraschenderweise als wenig geeignet (siehe Abb. 7 Spur 2; 4)

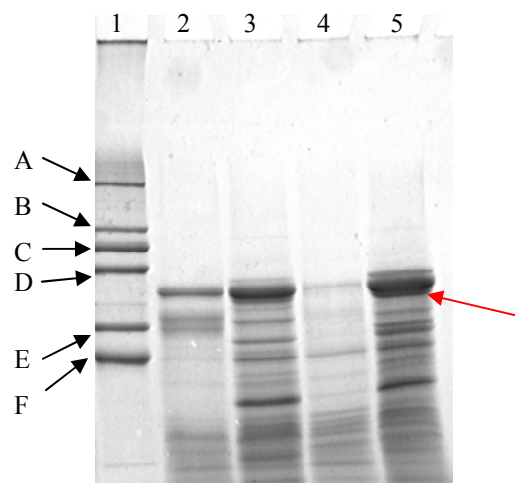


Abb. 7 Auftrennung der solubilisierten Zellen mit verschiedenen Agenzien (Beispiel: *Mt. igneus*).

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und Cromassie gefärbt. Die Spuren 2-5 zeigen das Löslichkeitsverhalten in 5 M Guanidiumchlorid, 6 M LiCl, 6 M Harnstoff und 1 M Tris/HCl an. S-Layer-Protein mit rotem Pfeil markiert. A-F kennzeichnen bekannte Standard Proteinmassen.

Spur 1: Proteinstandard Merck VIII

[A. Myosin 200,0 kDa; B. β -Galactosidase 116,3 kDa; Phosphorylase b 97,4 kDa; D. Ovotransferrin 78,0 kDa; E. Glutamatdehydrogenase 56,0 kDa; F. Ovalbumin 42,7 kDa]

Spur 2: Dialysat Zellwandextrakt mit 5 M Guanidiumchlorid

Spur 3: Dialysat Zellwandextrakt mit 6 M LiCl

Spur 4: Dialysat Zellwandextrakt mit 6 M Harnstoff

Spur 5: Dialysat Zellwandextrakt mit 1 M Tris/HCl

3.2 Reinigungen der S-Layer-Proteine der Ordnung Methanococcales

Die Zellen aus der Ordnung Methanococcales wurden mit Tris/HCl behandelt. Die Zellextrakte von *Mcc. jannaschii*, *Mt. igneus*, *Mtc. thermolithotrophicus* und *M. vannielii* wurden durch isoelektrische Fokussierung nach ihrer Nettoladung aufgetrennt. Dazu wurden die lyophilisierten S-Layer-Proteine aus dem Kulturmedium und der zellfreie Rohextrakt in einem geeigneten Laufpuffer aufgenommen. Dabei wurde durch die Verwendung vom Laufpuffergemisch MES/ Glycyl-Glycin im Verhältnis 4:1 (v/v) während der Trennung ein pH-Gradient von 3-6 geschaffen. Die S-Layer-Proteine der Ordnung Methanococcales haben ihren isoelektrischen Punkt in diesem Bereich (NUBER & KÖNIG, 1986; AKÇA *et al.*, 2002). Nach dem isoelektrischen Punkt aufgetrennten Proteine wurde die Proteinaktivität ermittelt und durch SDS-PAGE überprüft (siehe Abb. 8 Spur 2-10).

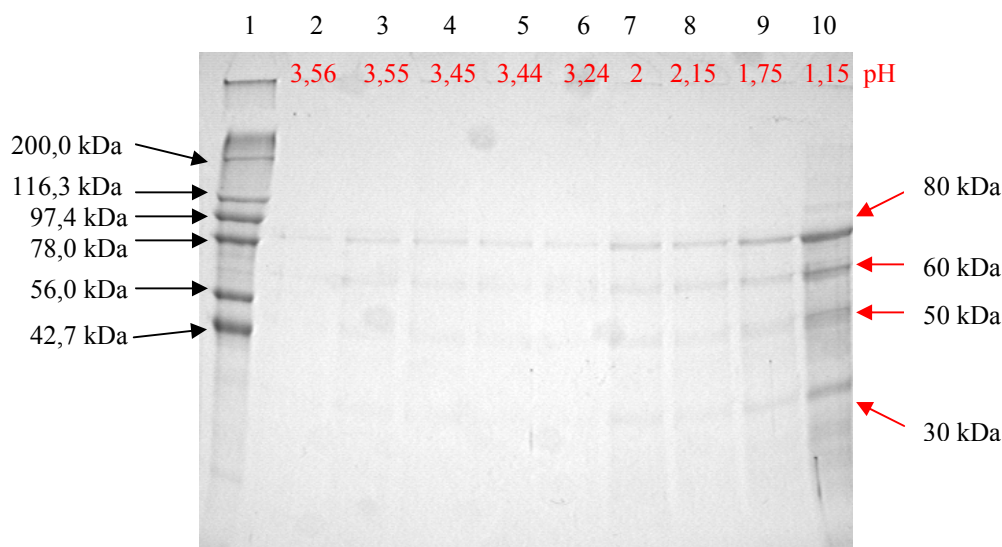


Abb. 8 Autrennung der Proteine nach der präparativen isoelektrischen Fokussierung des Zellextrakts aus *Mcc. jannaschii*.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und Cromassie gefärbt. Die pH-Werte der einzelnen Fraktionen sind Rot beschriftet. S-Layer-Proteine mit rotem Pfeil markiert.

Spur 1: Proteinstandard Merck VIII (siehe Abb. 7)

Spur 2-10: Fraktionen 1-9 (pH 1,15-3,56)

Das S-Layer-Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 80, 60 und 50 kDa trat in allen Fraktionen im pH-Bereich von 1,15-3,56 auf (siehe Abb. 8). Im pH-Bereich von 1-3 (siehe Abb. 8 Spur 7-10) war eine weitere Proteinbande mit einer apparenten Molekularmasse von etwa 30 kDa vorhanden. Das 30 kDa Protein wurde schon als Methyl-CoM-Reduktase

Untereinheit α bestimmt (AKÇA, 2000). Ab einem Gradienten über pH 4 wurden keine Proteine fokussiert (nicht gezeigt). Die Fraktionen im pH-Bereich von 3-4 wurden für die weitere Aufarbeitung des S-Layer-Proteins verwendet. Die präparative IEF ist für die Separation des Proteins geeignet und für die Ermittlung des isoelektrischen Punkts ungeeignet. Dieses Ergebnis bestätigte die Erwartung, dass der isoelektrische Punkt des S-Layer-Proteins im schwach sauren Bereich liegt (NUBER & KÖNIG, 1987; AKÇA *et al.*, 2002). Nach Dialyse und Gefriertrocknung der Proteinlösung war das S-Layer-Protein separiert (siehe Abb. 9 Spur 3). Die Reinigung der anderen S-Layer-Proteine der Ordnung Methanococcales erfolgte entsprechend wie bei *Mcc. jannaschii*.

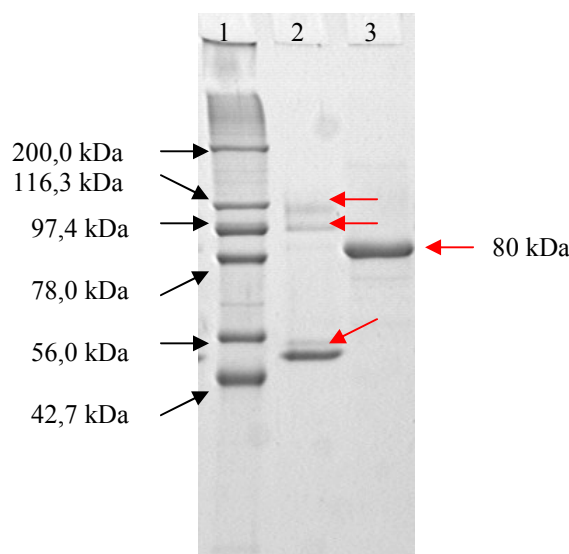


Abb. 9 Auftrennung des gereinigten S-Layer-Proteins von *Mcc. jannaschii*.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und Cromassie gefärbt. S-Layer-Proteine sind mit roten Pfeilen markiert.

Spur 1: Proteinstandard Merck VIII (siehe Abb. 7)

Spur 2: unbehandeltes S-Layer-Protein (15 μ g)

Spur 3: 2 min bei 99 °C inkubiertes S-Layer-Protein (15 μ g)

Nach der Inkubation des S-Layer-Proteins von *Mcc. jannaschii* bei 99 °C wurde eine apparente Molekularmasse von 80 kDa festgestellt (siehe Abb. 9 Spur 3), dagegen traten bei RT drei Proteinbanden von 50, 100 und 120 kDa auf (siehe Abb. 9 Spur 2). Das Protein weist offensichtlich verschiedene temperaturabhängige Konformationen auf. Die verschiedenen apparenten Massen des S-Layer-Proteins wurden ebenfalls im Kulturmedium von *Mcc. jannaschii* gefunden (AKÇA, 2000). Extrazelluläre S-Layer-Proteine wurden auch im Kulturüberstand von *Mt. igneus* gefunden (nicht gezeigt).

Isolierung des S-Layer-Proteins aus *Mt. igneus*

Die Isolierung des zellulären und extrazellulären S-Layer-Proteins von *Mt. igneus* wurde entsprechend wie bei den anderen Stämmen der Ordnung Methanococcales durchgeführt (siehe 2.7). Das Hüllprotein aus *Mt. igneus* wies eine apparente Molekularmasse von etwa 70 kDa auf (siehe Abb. 10 Spur 2).

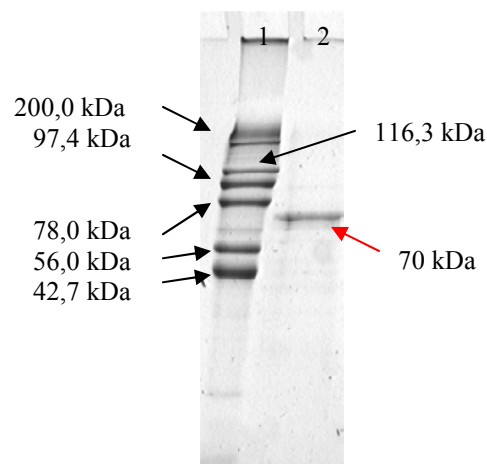


Abb. 10 Aufreinigung des gereinigten S-Layer-Proteins von *Mt. igneus*.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (15%) getrennt und Cromassie gefärbt. S-Layer-Protein mit rotem Pfeil markiert.

Spur 1: Proteinstandard Merck VIII (siehe Abb. 7)

Spur 2: gereinigtes S-Layer-Protein

3.3 Glykosilierung der S-Layer-Proteine

Für den Nachweis der Glykolisierung der S-Layer-Proteine wurden drei unterschiedliche Methoden verwendet:

1. Glykoprotein-Kit (Fuchsia Glycoprotein Gel Stain Kit, MoBiTec)

Für diesen Nachweis wurden zwei 10%ige Gele gegossen und auf beide Gele identische Proben aufgetragen. Das eine Gel wurde nach der Gelelektrophorese mit dem Pro-Q Reagenz und das andere mit SYPRO Ruby Proteinfärbelösung behandelt. Mit dem fuchsischen Reagenz können selektiv glykolisierte Proteine detektiert werden. Der Gesamtprotein-Nachweis erfolgte

te mit der SYPRO Ruby Färbelösung. Ein positiver Befund der kohlenhydrathaltigen Proteine war durch die Bildung einer roten Proteinbande nachweisbar. Nach der Gegenfärbung des Gels mit SYPRO Ruby Färbelösung konnten die nicht glykolisierten Proteine bei Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) durch Fluoreszenz ($\lambda = 590 \text{ nm}$) als leuchtende Proteinbanden nachgewiesen werden, die glykosilierten Proteine zeigten keine Fluoreszenz (siehe Abb. 11 Spur 4).

Nach dem Vergleich mit den Positiv- und Negativreferenzen zeigen die S-Layer-Proteine aus der Familie der *Bacillaceae* und *Mcc. jannaschii* keine Glykosilisierung auf (siehe Abb. 11). Mit dieser Methode können Proteine mit einem Kohlenhydratanteil unterhalb von einem Prozent allerdings nicht erfasst werden.

2. Chemische Deglykolisierung

Mit dem Hüllprotein von *Mcc. jannaschii* wurde eine chemische Deglykolisierung (VAN HOLST & VARNER, 1984) durchgeführt. Hierbei werden gebundene Kohlenhydratketten vom Protein abgespalten, was zu einer Reduktion der molekularen Masse führt. Eine Abspaltung der Zuckerreste wurde durch einen Vergleich sowohl der unbehandelten als auch der behandelten S-Layer-Proteine durch SDS-PAGE überprüft. Es war kein verändertes Laufverhalten beim S-Layer-Hüllprotein von *Mcc. jannaschii* feststellbar (nicht gezeigt).

3. Enzym-Immunoassay

Eine weitere Methode zum Nachweis kohlenhydrathaltiger Proteine war die Verwendung eines Enzym-Immunoassays (DIG Glycan Detection Kit, Roche). Mit diesem Enzym-Immunoassay können Glykoproteine mit einem Kohlenhydratgehalt unterhalb von einem Prozent detektiert werden.

Die Proteine wurden vor der Auftrennung durch SDS-PAGE in Lösung oxidiert und mit Dioxigenin markiert. Für den Nachweis wurden zwei 10%ige Gele gegossen und die derivatisierten Proben in identischer Reihenfolge aufgetragen. Zum Nachweis vom Gesamtprotein wurde das eine Gel mittels Coomassieblau R250 gefärbt (siehe Abb. 12a). Beim zweiten Gel wurde das elektrophoretisch aufgetrennte Protein durch Elektro-Blotten auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Nachweis der eingebauten Dioxigenins erfolgte auf der Nitrocellulose in einem Enzym-Immunoassay. Die kohlenhydrathaltigen Proteine erscheinen nach der Farbentwicklung als grau-schwarz gefärbte Proteinbande. Beim S-Layer-Protein von *Mcc. jannaschii* wurde nach Inkubation des Filters in der Färbelösung über Nacht eine Farbreaktion

detektiert (siehe Abb. 12b). Frühere Datenbankrecherchen zu Folge (Expasy, EMBL) besitzt das Protein insgesamt sieben Glykolisierungsstellen (AKÇA, 2000). Diese beiden Resultate deuten daraufhin, dass das Hüllprotein von *Mcc. jannaschii* voraussichtlich geringfügig glykolisiert vorliegt.

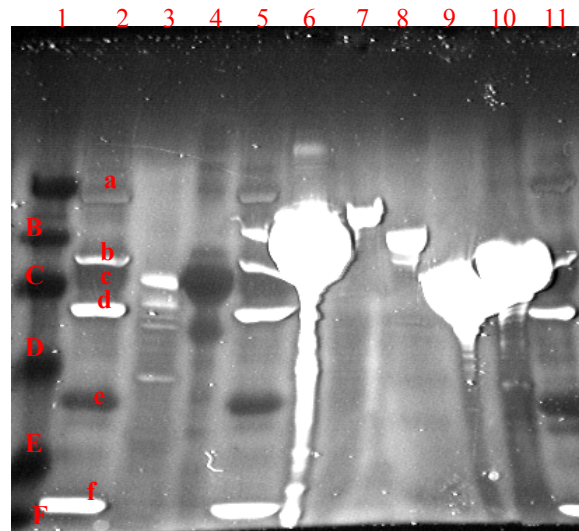


Abb. 11 Nachweis der Glykosilierung bei S-Layer-Proteinen.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und Cromassie gefärbt. Die Glykoproteine erscheinen auf dem SDS-Gel (10%) nach der Färbung mit SYPRO Ruby Färbelösung bei einer Anregung mit UV-Licht ($\lambda=302$ nm) oder durch Fluoreszenz ($\lambda=590$) als dunkle Proteinbanden. Die nicht glykolisierten Proteine erscheinen als helle Banden.

Spur 1: Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad):

[A. Myosin MW 203000, B. β -Galaktosidase MW 118000, C. Rinderserum Albumin MW 82000, D. Ovalbumin MW 50400, E. Kohlenhydrat-Anhydrase MW 33400, F. Trypsin-Inhibitor (Sojabohne) MW 26700]

Spur 2, 5, 11: CandyCane Glycoprotein-Standard Molecular Weight Standard (MoBiTec)

[a. α_2 -Makroglobulin MW 180000 (glykolisiert), b. Phosphorylase b MW 97000, c. Glukose Oxidase MW 82000 (glykolisiert), d. Rinderserum Albumin MW 66000, e. α_1 -Glykoproteinsäure 42000 (glykolisiert), f. Kohlenstoff-Anhydrase MW 29000]

Spur 3: S-Layer-Protein von *M. jannaschii*

Spur 4: S-Layer-Protein von *M. fervidus* (Positiv-Kontrolle)

Spur 6: S-Layer-Protein von *B. fusiformis* B3

Spur 7: S-Layer-Protein von *B. sphaericus* DSM 396

Spur 8: S-Layer-Protein von *Gb. stearothermophilus* DSM 22

Spur 9: S-Layer-Protein von *Gb. stearothermophilus* DSM 458

Spur 10: S-Layer-Protein von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358

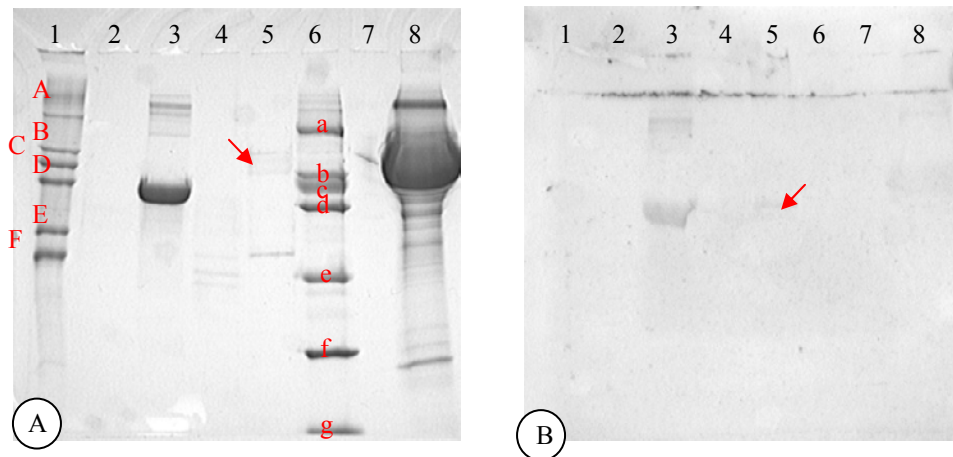


Abb. 12 Glykoprotein-Detektion mittels Enzym-Immunoassay (DIG Glycan Detection Kit, Roche).

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und Cromassie gefärbt. Hüllprotein von *Mcc. jannaschii* mit rotem Pfeil markiert.

- A) SDS-PAGE (10%) Gesamtprotein mit Coomassie R250 gefärbt.
 B) Auf Nitrocellulose transferierte Proteine. Die kohlenhydrathaltigen Proteinbanden erscheinen nach der Glykoprotein-Detektion als grau-schwarz gefärbte Proteinbanden.

Spur 1: Proteinstandard Merck VIII

[A. Myosin 200,0 kDa; B. β -Galactosidase 116,3 kDa; Phosphorylase b 97,4 kDa; D. Ovotransferrin 78,0 kDa; E. Glutamatdehydrogenase 56,0 kDa; F. Ovalbumin 42,7 kDa]

Spur 2: Creatinase, 10 μ g (nicht-glykolisiertes Kontrollprotein)

Spur 3: Transferrin, 10 μ g (glykolisiertes Kontrollprotein)

Spur 4: heterolog expremiertes S-Layer-Protein von *Mcc. jannaschii* hslmj1, 10 μ g

Spur 5: S-Layer-Protein *Mcc. jannaschii* (slmj1), 20 μ g

Spur 6: CandyCane Glycoprotein-Standard Molecular Weight Standard (MoBiTec)

[a. α_2 -Makroglobulin MW 180000, b. Phosphorylase b MW 97000, c. Glukose Oxidase MW 82000, d. Rinderserum Albumin MW 66000, e. α_1 -Glykoproteinsäure 42000, f. Kohlenhydrat-Anhydrase MW 29000, g. Avidin MW 18000]

Spur 7: -

Spur 8: S-Layer-Protein von *B. fusiformis* B3, 20 μ g (nicht-glykolisiertes Kontrollprotein)

3.4 Konformationsänderung des S-Layer-Proteins slmj1

Die hyperthermophile Spezies *Mcc. jannaschii* wurde ursprünglich von dem Sockel einer 2600 m tiefen marinen Hydrothermalquelle im ostpazifischen Rücken einer plattentektoni-

schen Subduktionszone entnommen. In dieser lebensfeindlichen Umgebung wird die Zelle nur durch eine S-Layerschicht abgegrenzt. Diese S-Layer-Proteinschicht sollte Anpassungen an die extreme Umweltbedingung aufzeigen. Deshalb wurde das Hüllprotein (slmj1) verschiedenen Standortbedingungen ausgesetzt und auf Konformationsänderungen hin untersucht. Basierend auf bekannte Hydrothermalwasserdaten wurde das Hüllprotein auf Wechselwirkung mit verschiedenen chemischen zweiwertigen Kationen, unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten untersucht. Die Auswertung erfolgte mit SDS-PAGE (10%).

Das S-Layer-Protein slmj1 von *Mcc. jannaschii* wurde im Temperaturbereich von 25-99 °C inkubiert. Im Verlauf der Temperaturerhöhung konnte eine Verschiebung der apparenten Masse des Proteins von 50 zu 80 kDa nachgewiesen werden (siehe Abb. 13). Bei Temperaturen unterhalb von 65 °C lag nur die 50 kDa Proteinbande vor (siehe Abb. 13 Spur 2,3). Ab einer Inkubationstemperatur von 65 °C waren beide apparenten Molekularmassen des S-Layer-Proteins vorhanden (siehe Abb. 13 Spur 4). Im weiteren Verlauf der Temperaturerhöhung nahm die 50 kDa Proteinbande ab, bei gleichzeitiger Zunahme der 80 kDa Bande (siehe Abb. 13 Spur 4-8). Bei der physiologischen Wachstumstemperatur von 85 °C wies das Hüllprotein eine apparente Molekularmasse von 80 kDa auf (siehe Abb. 13 Spur 7).

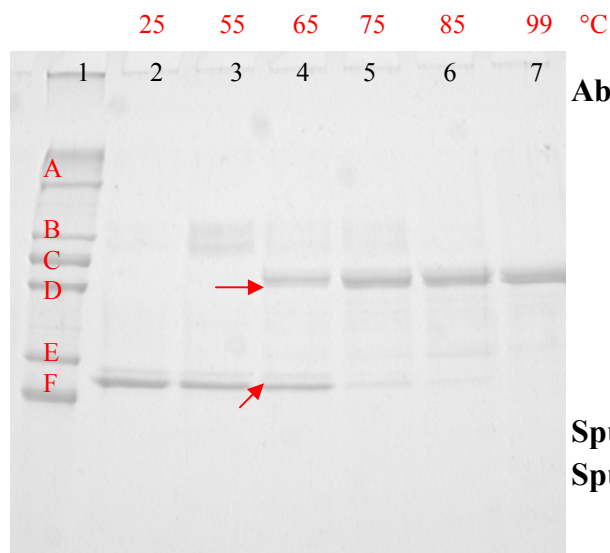


Abb. 13 Auftrennung des S-Layer-Proteins slmj1 von *Mcc. jannaschii* im Temperaturbereich von 25-99 °C.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und Cromassie gefärbt. S-Layer-Hüllprotein mit rotem Pfeil markiert.

Spur 1: Proteinstandard Merck VIII (siehe Abb. 12)
Spur 2-7: S-Layer-Protein (20 µg) im Temperaturbereich 25-99 °C

Außer der Temperatur wurde auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Protein-Konformation untersucht. Das S-Layer-Protein slmj1 wurde bei Raumtemperatur im pH-Bereich von 2-10 inkubiert. Das Protein wies nach der Inkubation bei den verschiedenen pH-Werten Konforma-

tionsänderungen auf (siehe Abb. 14). Im leicht sauren Milieu (pH 4-5) zeigte das Hüllprotein eine apparente Molekularmasse von 50 kDa (siehe Abb. 14 Spur 4-5). In diesem pH-Bereich liegt auch der theoretische isoelektrische Punkt des S-Layer-Proteins von *Mcc. jannaschii* (4,27). Außer der 50 kDa-Bande traten auch Proteine mit größerer Masse auf (siehe Abb. 14). Im sauren pH-Bereich (pH 3-2) war eine zweite Proteinbande mit einer apparenten Molekularmasse von 80 kDa nachweisbar (siehe Abb. 14 Spur 2-3). Diese beiden Massenzustände des Proteins 50 und 80 kDa deuten auf eine Konformationsänderung hin. Die großen Proteinbanden im pH-Bereich von 6-10 (siehe Abb. 14 Spur 6-10) wurden bereits früher als Dimer des S-Layer-Proteins gedeutet (NUBER, 1985).

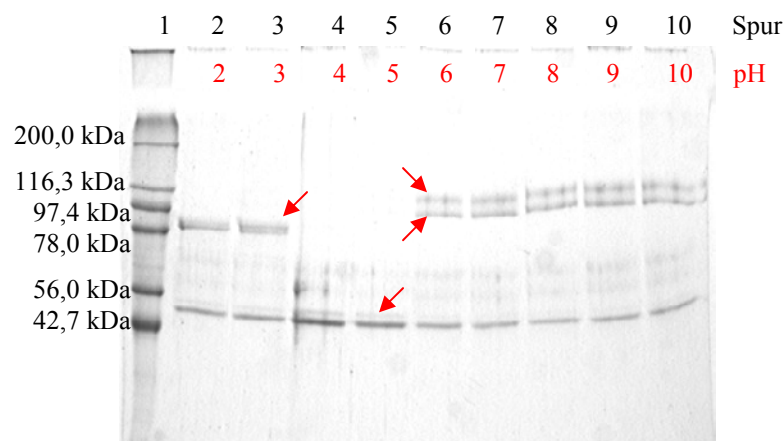


Abb. 14 Auftrennung des S-Layer-Proteins aus *Mcc. jannaschii* unter dem Einfluss verschiedener pH-Werte.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und Cromassie gefärbt. PH-Werte rot beschriftet. S-Layer-Hüllprotein mit rotem Pfeil markiert.

Spur 1: Proteinstandard Merck VIII (siehe Abb. 12)

Spur 2-10: S-Layer-Protein slmj1 (10 µg) pH-Bereich 2-10

Da die Proteinsequenz des S-Layer-Proteins eine Calciumbindungsdomäne aufwies (AKÇA, 2000) wurde das Hüllprotein von *Mcc. jannaschii* mit verschiedenen Kationen auf Wechselwirkungen hin untersucht (siehe 2.12.3). Nur mit dem zweiwertigen Mangan konnte eine Wechselwirkung mit dem Protein mittels SDS-PAGE festgestellt werden (nicht gezeigt). Vergleichend zu diesem Resultat wurden Daten der chemischen Zusammensetzung des Wassers der marinen Hydrothermalquelle des ostpazifischen Rückens (21° nördlicher Breitengrad) zu Rate gezogen. Aus den Daten ging hervor, dass Mangan als zweithäufigste chemische Komponente in einer Konzentration 1 mM vorkommt. Basierend auf diesem Ergebnis

wurde die Wirkung unterschiedlicher Mn^{2+} -Konzentrationen von 0,5-9 mM auf das S-Layer-Hüllprotein untersucht. Im Verlauf der Konzentrationserhöhung von Mn^{2+} konnte eine Verschiebung apparenten molekularer Masse des Proteins nachgewiesen werden (siehe Abb. 15). Ab einer Konzentration von 5 mM wirkte Mangan fördernd auf die Konformationsänderung von der 80 zur 50 kDa Bande (siehe Abb. 15 Spur 5-7). Bei Hitzebehandlung stabilisierte Mangan das Hüllprotein mit der apparente Molmasse von 50 kDa.

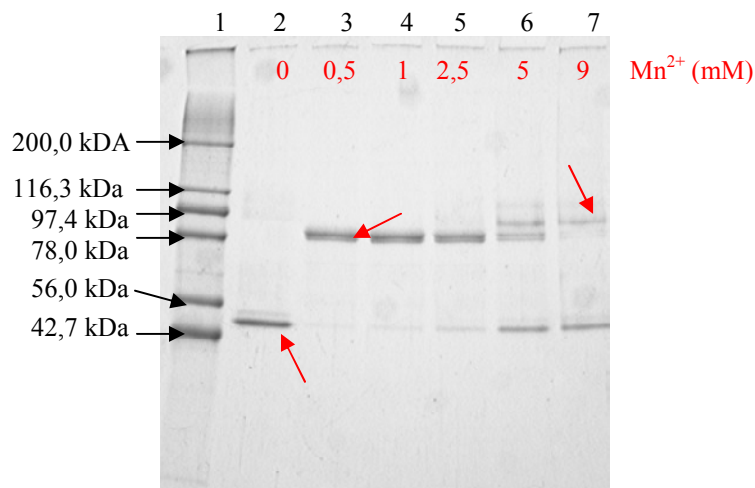


Abb. 15 Auftrennung der Wechselwirkung des S-Layer-Proteins *slmj1* aus *Mcc. jannaschii* mit verschiedenen Mn^{2+} -Konzentrationen.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und Cromassie gefärbt. Mn^{2+} -Konzentrationen rot beschriftet. S-Layer-Hüllprotein mit rotem Pfeil markiert.

Spur 1: Proteinstandard Merck VIII (siehe Abb. 12)

Spur 2: S-Layer-Protein (10 μ g) unbehandelt, nicht erhitzt

Spur 3-7: 2 min 99 °C S-Layer-Protein (10 μ g) mit direkter Zugabe der verschiedenen Mn^{2+} -Konzentrationen 0,5-9 mM

3.5 Isoelektrische Punkt der hyperthermophilen S-Layer-Proteine

Die S-Layer-Proteine der hyperthermophilen Stämme *Mcc. jannaschii* und *Mt. igneus* wurden zur experimentellen Bestimmung der isoelektrischen Punkte (pI) verwendet. Diese erfolgte über eine horizontale analytische isoelektrische Fokussierung. Das S-Layer-Protein *slmj1* von *Mcc. jannaschii* wies einen isoelektrischen Punkt von 3,5 bzw. 3,7 auf (siehe Abb. 16A). Für das S-Layer-Hüllprotein von *Mcc. jannaschii* wurde theoretisch ein schwach saurer pI von

4,27 berechnet (TIGR, ExPASy). Das S-Layer-Protein slmi1 von *Mt. igneus* wies einen isoelektrischen Punkt von 4,5 auf (siehe Abb. 16B), der mit der berechneten pI vom 4,68 besser übereinstimmt.

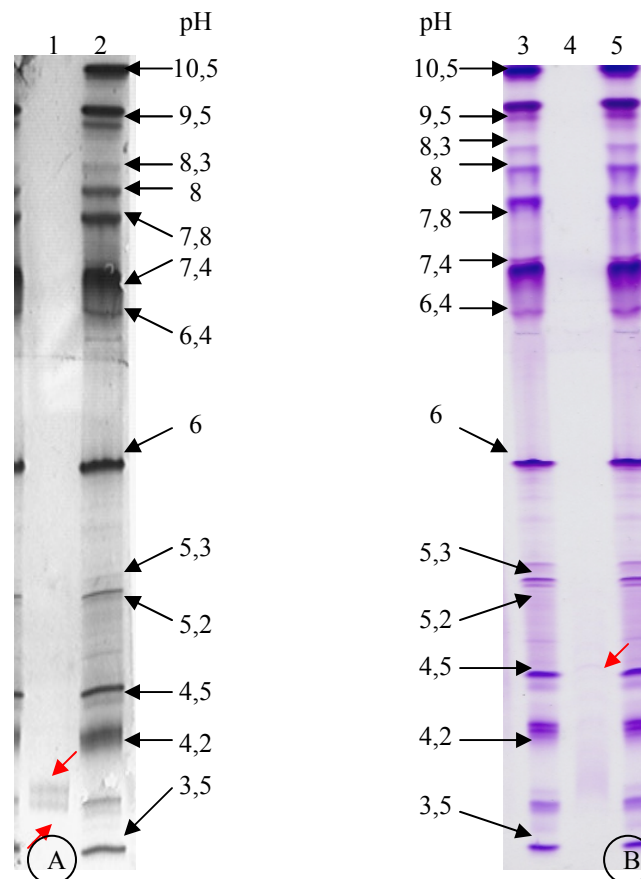


Abb. 16 Analytische isoelektrischen Fokussierung der S-Layer-Proteine von *Mcc. jannaschii* und *Mt. igneus*

S-Layer-Proteine mit dünnen Polyacrylamid-Gel (pH 3-10) aufgetrennt. S-Layer-Proteine mit rotem Pfeil markiert.

A) Isoelektrische Fokussierung vom S-Layer-Hüllprotein slmj1 von *Mcc. jannaschii*

B) Isoelektrische Fokussierung vom S-Layer-Hüllprotein slmi1 von *Mt. igneus*

Spur 1: S-Layer-Protein (50 µg) von *Mcc. jannaschii*

Spur 2,3,5: IEF Standard pH-Bereich 3-10

Spur 4: S-Layer-Protein (10 µg) von *Mt. igneus*

3.6 Aminosäuresequenz der S-Layer-Proteine der Bacillaceen

Die S-Layer-Proteine von *Gb. stearotherophilus* DSM 2358, *B. sphaericus* DSM 396, *B. fusiformis* DSM 2898T und Stamm B3 wurden über SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-

Membran geblottet. Mit den ausgeschnittenen Membranstückchen wurden einerseits N-terminale und andererseits nach proteolytischen Verdau interne Proteinsequenzen nach Edman bestimmt (EDMAN, 1967). Die Proteinsequenzen wurden im Labor von B. Schlott (IMB, Jena) nachgewiesen. Die erzielten Resultate sind in der Tabelle 10a und b zusammengefasst.

Tabelle 10a N-terminale S-Layer-Proteinsequenzen der Bazillen

Stamm	Masse (kDa)	N-terminale Proteinsequenz	Identifizierung (HUSAR)
<i>Gb. stearothermophilus</i> DSM 2358	98*	ATDVATVVSQ	<i>Gb. stearothermophilus</i> PV72 Mutante Gen sbsB
<i>B. sphaericus</i> DSM 396	126 ^{maldi} 85, 35*	AGFSDVAGNDHEV APEAGAAAVKAVNNT	<i>B. sphaericus</i> JG-A12 <i>B. sphaericus</i> DSM 396
<i>B. fusiformis</i> DSM 2898T	120*	GQLNDYFNKI	<i>B. sphaericus</i> WHO 2362
<i>B. fusiformis</i> B3	118 ^{maldi}	AQLNDFNKISGYA	<i>B. sphaericus</i> WHO 2362

* ermittelt nach SDS-PAGE; ^{maldi} bestimmt durch MALDI

Tabelle 10b Interne Aminosäuresequenzen nach proteolytischem Verdau

Stamm	Interne Proteinsequenz	Identifizierung
<i>B. sphaericus</i> DSM 396	EISNPYTGAIKYY	-
<i>B. fusiformis</i> B3	TIENVDATPKVVK	<i>B. sphaericus</i> WHO 2362

Die neu ermittelten N-terminalen Proteinsequenzen zeigten Sequenz-Übereinstimmungen mit anderen bekannten S-Layer-Proteinen (siehe Tab. 10a). Dies deutet auf konservierte Teilbereiche in der Proteinsequenz der jeweiligen Spezies hin. Bei dem N-Terminus der S-Layer-Hüllproteine von Bazillen handelt es sich um die zellwandbindende Region. Verantwortlich für diese Bindung sind konservierten Bereichen, die sogenannten SLH-Domänen der S-Layer-

Proteine. Basierend auf konservierten Sequenzen wurden die bekannten S-Layer-Gene einer Spezies zur Primerkonstruktion miteinander verglichen.

Molekulargenetische Eigenschaften

3.7 Identifizierung der S-Layer-Gene bei Prokaryoten

3.7.1 Nachweis der S-Layer-Gene der Ordnung Methanococcales

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Thermostabilität bei Proteinen wurde das S-Layer-Protein der methanogenen Archaeen gewählt. Hierfür wurden S-Layer-Hüllproteine mesophiler, thermophiler und hyperthermophiler Vertreter aus der Ordnung Methanococcales miteinander verglichen: *M. vannielii* ($T_{\text{Opt.}} 37\text{ °C}$), *Mtc. thermolithotrophicus* ($T_{\text{Opt.}} 65\text{ °C}$), *Mcc. jannaschii* ($T_{\text{Opt.}} 85\text{ °C}$) und *Mt. igneus* ($T_{\text{Opt.}} 88\text{ °C}$).

Teilsequenzen der S-Layer-Gene wurden durch Verwendung des Primerpaars MJ3SL/MJ4SL (siehe Tab. 8) nach Touchdown-PCR erhalten. Die verwendeten Oligonukleotide wurden nach einem Datenbankvergleich zweier Methanococcales S-Layer-Gene anhand von konservierten Nukleotidfolgen konstruiert. Mit diesem Primerpaar wurde für alle untersuchten Methanococcales eine Teilsequenz von etwa 1400 bp des S-Layer-Gens ermittelt (siehe Abb. 17). Diese bereits in früheren Arbeiten der AG König ermittelten Gensequenzen von *Mtc. thermolithotrophicus* 1440 bp (KARBACH, 2000) und *M. vannielii* 1476 bp (SCHULTZ, 2000) wurden mit der Zwei-Schritt-PCR N- und C-terminal vervollständigt (siehe Abb. 18). Nach DNA-Analyse wurde eine Gesamtsequenz von 2269 bp für *Mtc. thermolithotrophicus* und von 1889 bp für *M. vannielii* ermittelt. Die Gensequenz von *Mt. igneus* wurde durch die Verwendung des Primerpaars MJ3SL/MJ4SL und durch die Drei-Schritt-PCR erhalten. Für *Mt. igneus* wurde eine Gesamtsequenz von 1987 bp ermittelt. Basierend auf der Gesamtsequenz, umfassen die S-Layer-Gene von *Mt. igneus* 1557 Basen, von *Mtc. thermolithotrophicus* 1677 Basen und von *M. vannielii* 1698 Basen.

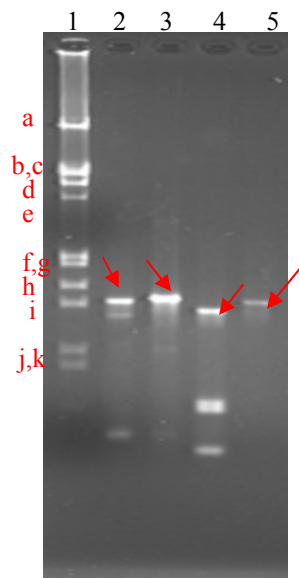


Abb. 17 Elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate aus der Ordnung Methanococcales.

Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Amplifikaten nach Touchdown-PCR von genomischer DNA von *Mt. igneus*, *Mcc. jannaschii*, *Mtc. thermolithotrophicus* und *M. vanniellii*. Bei den verwendeten Oligonukleotiden handelt es sich um MJ3SL/ MJ4SL (siehe Tab. 8). Mit rotem Pfeil sind die S-Layer-Gene markiert.

Spur 1: DNA-Standard Marker 3: Lambda DNA/ EcoRI + HindIII (MBI Fermentas)

[Basenpaare (bp): a=21226, b=5148, c=4973, d=4273, e=3530, f=2027, g=1904, h=1584, i=1375, j=947, k=831]

Spur 2: Amplifikat *Mcc. jannaschii*

Spur 3: Amplifikat *M. vanniellii*

Spur 4: Amplifikat *Mt. igneus*

Spur 5: Amplifikat *Mtc. thermolithotrophicus*

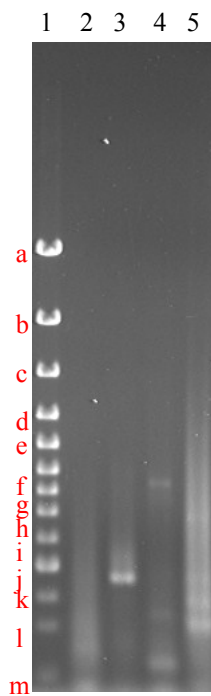


Abb. 18 Elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate nach der Zwei-Schritt-PCR.

Dabei wurde die genomische DNA von *Mtc. thermolithotrophicus* mit einem spezifischen vom N-Terminus abgeleiteten Oligonukleotid MCT-N2bio (siehe Tab. 8) des S-Layer-Proteins und den degenerierten Primern FP-MB1-4 (siehe Tab. 8) amplifiziert. Es entstanden spezifische und unspezifische Amplifikate. Die spezifischen PCR-Amplifikate wurden in einer zweiten PCR mit einem nested Primer MCT-N1 und degenerierten Primern amplifiziert.

Spur 1: DNA-Standard, 100 bp DNA-Leiter Plus (Peqlab)

[Basenpaare (bp): a=3000; b=2000; c=1500; d=1200; e=1031, f=900; g=800; h=700; i=600; j=500; k=400; l=300; m=200]

Spur 2: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB4

Spur 3: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB3

Spur 4: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB2

Spur 5: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB1

Analysen der N-terminalen Gensequenzen

Als essentielle Bereiche der Expression des S-Layer-Gens wurden die Promotor-, die Shine-Dalgarno-Region und der Translationsstart bestimmt. Die Promotorregion umfasst die BRE-, TATA-Box und den Transkriptionsstartpunkt. Die transkriptionelle und translationellen Erkennungsregionen der S-Layer-Gene der Ordnung Methanococcales wurden in der Tabelle 11 zusammengefasst (siehe Anhang 4).

Tab. 11 Vorschlag für transkriptionelle und translationelle Erkennungsregionen der S-Layer-Gene der Ordnung Methanococcales

Erkennungsregion	Sequenz	Position	Konsensus-Sequenz ¹⁾
<u>Promotor</u>			
a. BRE-Box			
<i>Mcc. jannaschii</i> (MJ0822)	-CGTAA-	-33 bis -29	-CGAAA-
<i>Mt. igneus</i> (AJ564995)	-GGTAA-	-35 bis -31	
<i>Mtc. thermolithotrophicus</i> (AJ308554)	-GGAAA-	-35 bis -31	
<i>M. vanniellii</i> (AJ308553)	-GGAAA-	-40 bis -36	
b. TATA-Box			
<i>Mcc. jannaschii</i>	-TTTATATA-	-26 bis -19	-AA/TT TATATA-
<i>Mt. igneus</i>	-TTTATATA-	-28 bis -21	
<i>Mtc. thermolithotrophicus</i>	-TATATATA-	-28 bis -21	
<i>M. vanniellii</i>	-TATAATAA-	-32 bis -25	
b. Transkriptionsstart			
<i>Mcc. jannaschii</i>	-ATAC-	1	-A/T TGC-
<i>Mt. igneus</i>	-ATCG-	1	
<i>Mtc. thermolithotrophicus</i>	-ATCC-	1	
<i>M. vanniellii</i>	-ATAC-	1	
Shine-Dalgarno-Sequenz			
<i>Mcc. jannaschii</i>	-AGGTGAT-	33 – 39	
<i>Mt. igneus</i>	-AGGTGAT-	37 – 43	
<i>Mtc. thermolithotrophicus</i>	-AGGGTGA-	64 – 70	
<i>M. vanniellii</i>	-AGGTGAA-	60 – 66	
Translationsstart			
<i>Mcc. jannaschii</i>	-ATG-	45	
<i>Mt. igneus</i>	-ATG-	49	
<i>Mtc. thermolithotrophicus</i>	-ATG-	77	
<i>M. vanniellii</i>	-ATG-	72	

¹⁾ THOMM (1996)

Die transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen des S-Layer-Gens von *Mcc. jannaschii* und *Mt. igneus* sind im Genom kompakter lokalisiert als bei *Mtc. thermolithotrophicus* und *M. vanniellii* (siehe Tab. 11). Diese kompakte Anordnung der Gensequenzen im Genom könnte eine Anpassung an die hyperthermophilen Temperaturen darstellen. Nach dem Vergleich der Promotorregionen der Ordnung Methanococcales wurden folgende mutmaßlichen Konsensus-Sequenzen ermittelt: die BRE-Box -C/G G T/A AA- und den Transkriptionsstartpunkt -AT C/A C/G-.

3.7.2 Die S-Layer Aminosäuresequenzen der Methanococcales

Für das S-Layer-Protein von *Mt. igneus* wurde nach DNA-Analysen die codierende Region auf dem Minus Strang lokalisiert. Entsprechend einer Nukleotidsequenz von 1557 Basen besteht das Protein von *Mt. igneus* aus 519 Aminosäuren mit einer Masse von 55,67 kDa (siehe Tab. 12). Das S-Layer-Protein von *Mtc. thermolithotrophicus* besteht aus 559 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 59,22 kDa und *M. vanniellii* aus 566 Aminosäuren mit einer Masse von 59,06 kDa (siehe Tab. 12).

Primärsequenz-Analysen

Anhand der abgeleitenden Aminosäuresequenzen der S-Layer-Proteine von *Mt. igneus*, *Mcc. jannaschii*, *Mtc. thermolithotrophicus*, *M. voltae* und *M. vanniellii* wurden nach Datenbankrecherchen (Expasy) charakteristische Proteineigenschaften festgestellt (siehe Tab. 12). Die Leadersequenz der S-Layer-Proteine hat eine Größe von 28 Aminosäuren mit sehr konservierter Aminosäure-Zusammensetzung (siehe Abb. 19).

MAMS LKKIGAIAVGGAMVATALASGVAA	<i>Mcc. jannaschii</i>	85 °C
MAMS LKKIGAIAVGGAMVASALASGVMA	<i>Mt. igneus</i>	88 °C
MAMS LKKIGAIAVGGAMVASALASGVMA	<i>Mth. thermolithotrophicus</i>	65 °C
MAMSMKKIGAIAVGGAMVASALATGALA	<i>M. vanniellii</i>	37 °C
MAMS LKKIGAIAGSAMVASALATGVFA	<i>M. voltae</i>	37 °C

■ Nonhydrophobic (n)-Region	■ Charged (c)-Region
■ Hydrophobic (h)-Region	

Abb. 19 Leadersequenzvergleich der S-Layer-Proteine der Methanococcales.

Die Leadersequenz setzt sich aus 28 Aminosäuren zusammen (siehe Anhang 3). Die Leadersequenz setzt sich bei Prokaryonten aus n-, h- und c-Region zusammen. Rot beschriftet sind Aminosäure-Austausche in der Leadersequenz.

Das Leaderpeptid setzt sich aus einer sieben Aminosäuren langen hydrophilen und einer 21 Aminosäuren langen hydrophoben Domäne zusammen. In der hydrophilen Domäne wurde nur bei *M. vanniellii* ein Aminosäure-Austausch von Leucin zu Methionin festgestellt (siehe Abb. 19). Ein verstärkter Aminosäure-Austausch wurde in der hydrophoben Domäne nachgewiesen.

Tab. 12 S-Layer-Gene und -Proteine von mesophilen and (hyper)thermophilen Methanococcales

Organismus	Wachstumstemperatur (°C)	Accession No. ³⁾ (Gen)	Protein- Sequenz (AS)	Molekulare Masse ¹⁾ (Dalton)	Isoelektri- scher Punkt ¹⁾	N- glykosidische Bindungsstel- len ²⁾	Cys ¹⁾ (mol%)	Ala ¹⁾ (mol%)
<i>Methanotorris igneus</i>	88	AJ564995 (<i>slmi1</i>)	519	55669	4.68	7	0.4	9.4
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	85	AJ311636 (<i>slmj1</i>)	558	60547	4.27	7	0.4	9.9
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	65	AJ308554 (<i>slmt1</i>)	559	59225	4.30	5	-	12.2
<i>Methanococcus van- nielii</i>	37	AJ308553 (<i>slmv1</i>)	566	59064	4.29	-	-	16.3
<i>Methanococcus vol- tae</i> ⁴⁾	37	M59200 (<i>sla</i>)	565	59707	4.15	2	-	14.0

¹⁾ ermittelt mit *ProtParam tool* ²⁾ ermittelt nach *PROSITE* ³⁾ Datenbank EMBL nucleotide sequence data base ⁴⁾ KONISKY *et al.* (1994)

Nur bei S-Layer-Proteinen der hyperthermophilen Spezies *Mt. igneus* und *Mcc. jannaschii* wurde die Aminosäure Cystein zu 0,4 mol% nachgewiesen (siehe Tab. 12). Außerdem konnte eine Abnahme im Aminosäuregehalt von Alanin von mesophilen hin zu (hyper)thermophilen S-Layer-Hüllproteinen festgestellt werden (siehe Tab. 12). Nach Datenbankrecherchen (ExPASy-Prosite) wurde für die S-Layer-Proteine eine Zunahme von N-glykosidischen Bindungsstellen von mesophil hin zu (hyper)thermophilen Spezies nachgewiesen (siehe Tab. 12).

3.7.3 Nachweis der S-Layer-Gene aus der Familie der *Bacillaceae*

Entsprechend dem Vergleich der S-Layer von methanogenen Archaeobakterien der Ordnung Methanococcales wurden die S-Layer-Proteine mesophiler und thermophiler Vertreter aus der Familie der *Bacillaceae* verglichen: *B. sphaericus* DSM 396 ($T_{\text{opt.}} 30\text{ °C}$), *B. fusiformis* DSM 2898T ($T_{\text{opt.}} 30\text{ °C}$), B3 ($T_{\text{opt.}} 30\text{ °C}$) und *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 ($T_{\text{opt.}} 55\text{ °C}$).

Die verwendeten Oligonukleotide für die PCR wurden nach Datenbankvergleichen bekannter S-Layer-Gene aus der Familie der *Bacillaceae* anhand von konservierten Nukleotidfolgen oder aus erhaltenen Teilsequenzen konstruiert. Für jeden der einzelnen Stämme *B. sphaericus*, *B. fusiformis* und *Gb. stearothermophilus* wurden stammspezifische Oligonukleotide für die S-Layer-Analyse konstruiert.

3.7.3.1 S-Layer-Gensequenz von *Bacillus sphaericus* DSM 396

Für die Konstruktion der PCR-Primer für den Stamm *B. sphaericus* DSM 396 wurde die bereits bekannte Teilsequenz und die interne Aminosäuresequenz eines S-Layer-Fragments (siehe Tab. 10b) verwendet. Anhand der internen Proteinsequenz wurde ein Reverseprimer konstruiert (siehe Abb. 20), der als degenerierter Primer bei der Amplifikation der stromabwärtsliegenden Gensequenz verwendet wurde. Basierend auf der bekannten Teilsequenz wurde die Gensequenz durch die modifizierte Zwei-Schritt-PCR bis zu einer Gesamtsequenz von 2675 bp vervollständigt. Die S-Layer-Gensequenz umfasst 2430 Nukleotide.

Aminosäuren	E	I	S	N	P	Y	T	G	A	I	K	Y	Y
Codon	GAR	ATH	AGY	AA Y	CCN	TAY	ACN	GGN	GCN	AAH	AAR	TAY	TAY
Anticodon	CTY	TAD	TCR	TTR	GGN	ATR	TGN	CCN	CGN	TTD	TTY	ATR	ATR
Reverseprimer	TAY TTD ATN GCN CCN GTR TAN GG												

Abb. 20 Primerdesign auf der Basis proteolytischen Fragments des S-Layer-Proteins von *B. sphaericus* DSM 396.

Basierend auf ein proteolytisches S-Layer-Fragment wurde ein unspezifischer Primer konstruiert. Blau markiert: unspezifischer Reverseprimer 396 C-Ed (siehe Tab. 4).
Abkürzungen [IUPAC Code]: D=(A,T,G); H=(A,T,C); N=(A,T,C,G); R=(A,G); Y=(T,C)

Analyse terminaler Gensequenzen

Zur Bestimmung der regulatorischen Bereiche in der Gensequenz des S-Layers wurden der Promotor, die Shine-Dalgarno-Region und der Translationsstart bestimmt.

Der Promotor umfasst die -35- und -10-Region (Pribnow-Box). Die -35-Box befindet sich stromaufwärts vom wahrscheinlichen Transkriptionsstart an der Position -27 und die Pribnow-Box an der Position -6. Die Shine-Dalgarno-Sequenz liegt stromabwärts bei Nukleotid 97 und Translationsstart bei Nukleotid 112 (siehe Abb. 21).

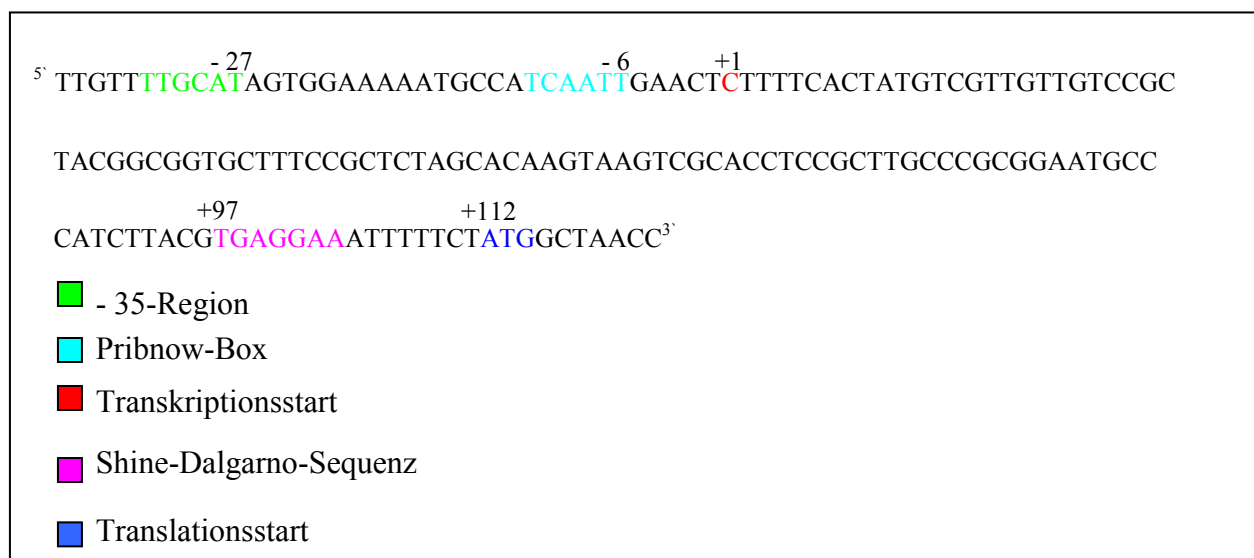


Abb. 21 Transkriptions- und translationsrelevante Regionen am 5'-Ende des S-Layer-Gens von *B. sphaericus* DSM 396 (siehe Anhang 2).

Am Transkriptionseende befindet sich wahrscheinlich eine Haarnadelstruktur (siehe Abb. 23). Die Genexpression endet mit einem Stopcodon (siehe Abb. 22).

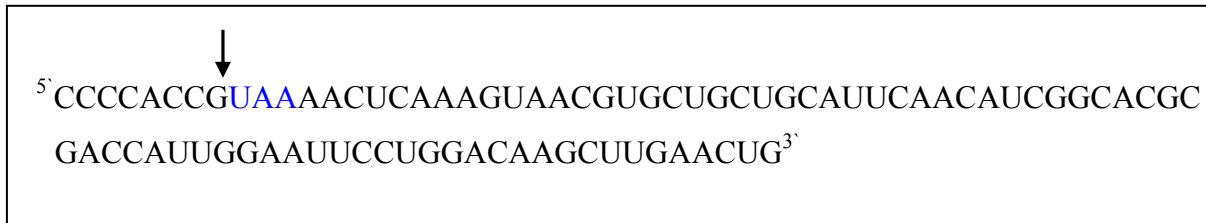


Abb. 22 Terminationsstelle der Genexpression des S-Layer-Gens von *B. sphaericus* DSM 396 (siehe Anhang 2).

Blau beschriftet ist das Stopcodon; senkrechter Pfeil markiert Endpunkt der Genexpression.

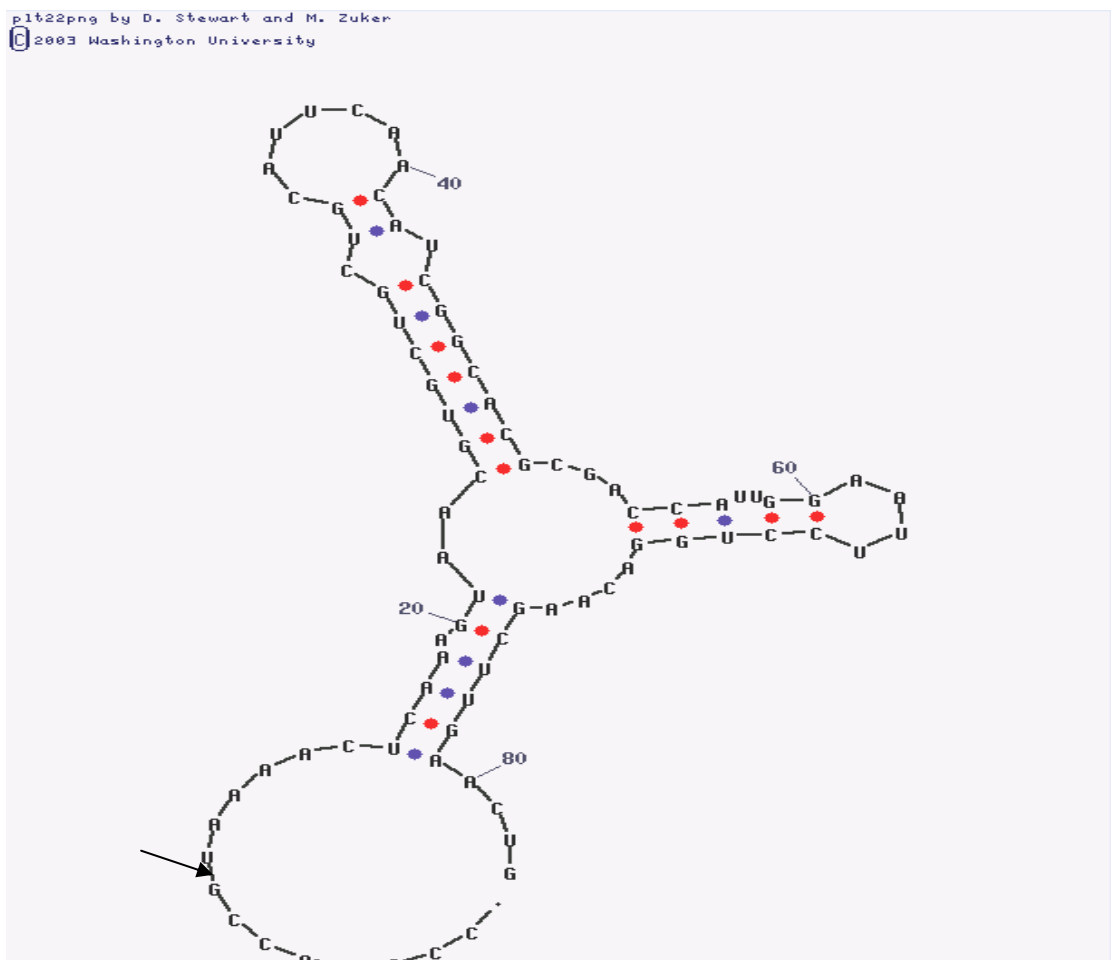


Abb.23 Wahrscheinliche Haarnadelstruktur am Transkriptions-Ende des S-Layer-Gens von *B. sphaericus* DSM 396. Senkrechter Pfeil markiert Endpunkt der Genexpression.

Aminosäuresequenz-Analysen

Entsprechend einer Nukleotidsequenz von 2430 Basen besteht das Protein von *B. sphaericus* DSM 396 aus 810 Aminosäuren. Anhand der abgeleitenden Aminosäuresequenz wurden nach Datenbankrecherchen (Expasy-ProtPran) eine molekulare Masse von 85,5 kDa und ein isoelektrischer Punkt von 5,56 kalkuliert. Für das reife S-Layer-Protein wurde ein theoretischer pI von 5,27 ermittelt der mit der in der Literatur beschriebenen pI von 5,35 übereinstimmen würde (siehe HASTIE & BRINTON, 1979).

Das gereinigte Hüllprotein wies nach SDS-PAGE eine apparente Molekularmasse von 120 kDa (siehe Abb. 26a Spur 4). Dies korrelierte mit Maldi-Messungen, nach denen das Protein eine Molmasse von 127 bzw. 106 kDa aufwies (siehe Abb. 25). Da die Kristallisation des S-Layer-Proteins erfolgreich war, wurden die Daten aus der Kristallisation mit den vorliegenden Proteindaten verglichen. Die Kristallisationsanalysen deuteten ebenfalls auf eine Proteinmasse von 85 kDa hin. Aufgrund dessen wurde die Masse des dreidimensionelle Kristalls (siehe Abb. 24) durch SDS-PAGE überprüft. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wies der S-Layer-Kristall zwei Proteinbanden mit einer apparenten Molekularmasse von 85 und 35 kDa auf (siehe Abb. 26b). Außerdem wurde die Proteinmasse des S-Layer-Kristalls, mit und ohne Mutterlauge, durch SDS-PAGE überprüft (siehe Abb. 26a). Der S-Layer-Kristall zerfällt in zwei Proteine mit einer apparenten Molekularmasse von 85 und 35 kDa (siehe Abb. 26a, Spur 2). Die Kristallisation des S-Layer-Proteins erfolgte im Labor von T. Debaerdemaeker (Universität Ulm) und J.- P. Declercq (Université Catholique de Louvain, Belgien).

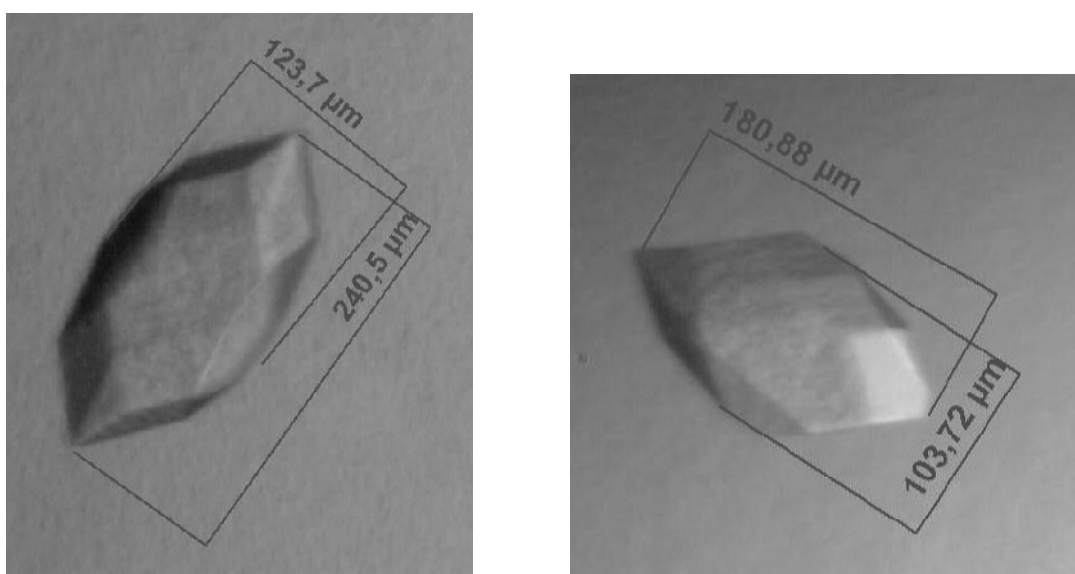


Abb. 24 Dreidimensioneller Kristall vom S-Layer-Protein aus *B. sphaericus* DSM 396.

(Aufnahme: T. Debaerdemaeker, Universität Ulm)

Nach Datenbankrecherchen (ExPASy-ScanProsite) besitzt das Protein insgesamt 11 N-glykosidische Bindungsstellen. Für das S-Layer-Hüllprotein wurde ein 0,4%iger Kohlenhydratgehalt am Gesamtprotein beschrieben (siehe HASTIE & BRINTON, 1979). Die Leadersequenz hat eine Größe von 31 Aminosäuren.

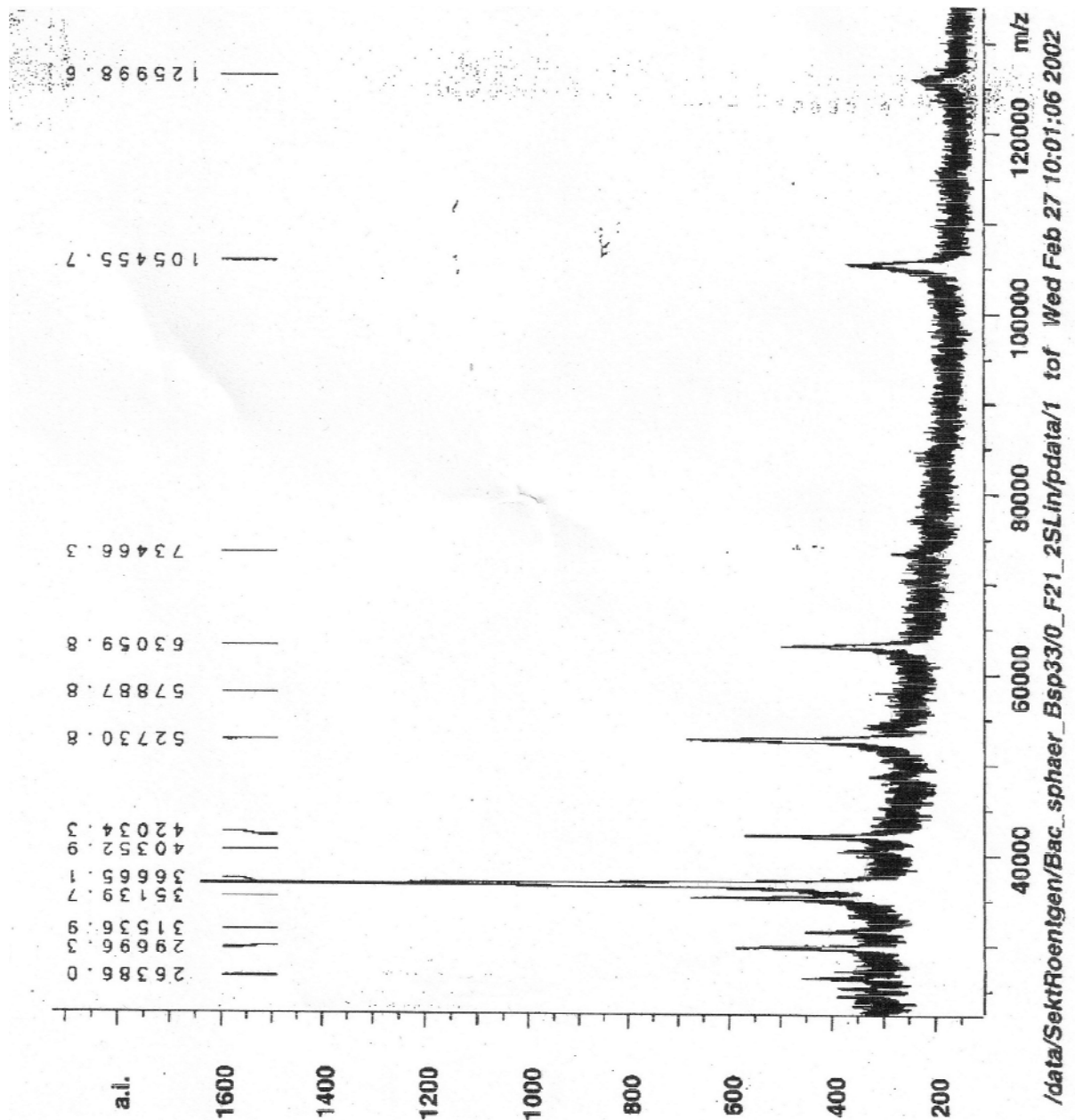


Abb. 25 Massenspektroskopie des S-Layer-Proteins aus *B. sphaericus* DSM 396.

Die Proteinanalytik wurde mit MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) durchgeführt. Das S-Layer-Hüllprotein wies eine molekulare Masse von etwa 126 kDa auf. (Messung: M. Wundelin, Universität Ulm)

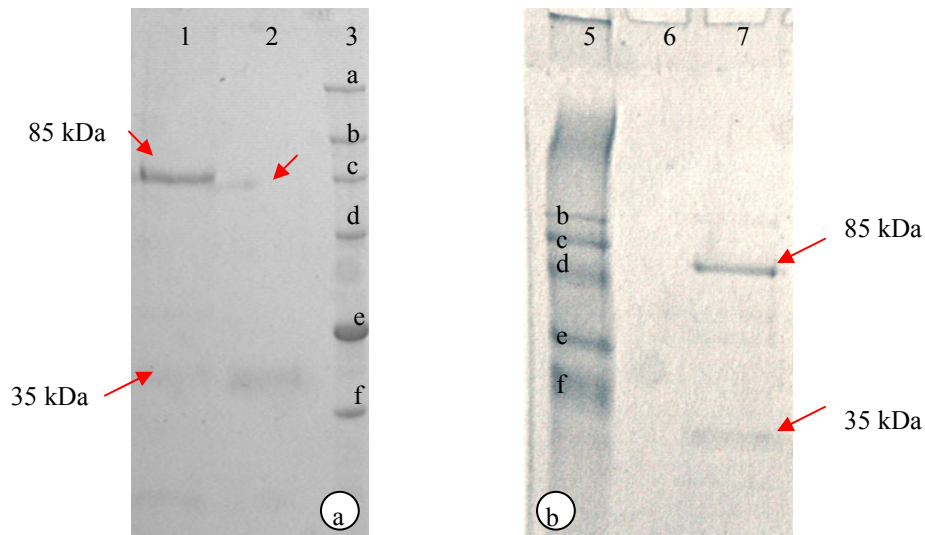


Abb. 26 Auftrennung des S-Layer-Proteins aus *B. sphaericus* DSM 396 in kristalliner Form.

Mit rotem Pfeil S-Layer-Hüllprotein markiert.

a) Kristalllauge mit S-Layer-Protein

b) S-Layerkristall

Spur 1: Kristall-Mutterlauge S-Layer-Protein

Spur 2: kristallines S-Layer-Protein

Spur 3: Proteinstandard Rotiload 10-150 (Roth)

A=150, B=100, C=80, D=60, E=40, F=30, G=20 kDa

Spur 4: Proteinstandard Merck VIII

[a. Myosin 200,0 kDa; b. β -Galactosidase 116,3 kDa; c. Phosphorylase b 97,4 kDa; d. Ovotransferrin 78,0 kDa; e. Glutamatdehydrogenase 56,0 kDa; f. Ovalbumin 42,7 kDa]

Spur 5:-

Spur 6: kristallines S-Layer-Protein mit Mutterlauge

3.7.3.2 S-Layer-Gensequenzen von *Bacillus fusiformis* DSM 2898T und B3

Die bekannten S-Layer-Gene vom *B. sphaericus* Stamm 2362 (LEWIS *et al.*, 1987; BOWDITCH *et al.*, 1989), P-1 (LEWIS *et al.*, 1987; Patent WO9519371) und CCM 2177 (PUM & SLEYTR 1994, ILK *et al.*, 1999) wurden auf konservierte Genbereiche hin untersucht. Dabei wurden konservierte Nukleotidfolgen gefunden, die zur Konstruktion der Oligonukleotide BSLV1B und BSLV2 dienten. Eine Teilsequenz (400bp) vom S-Layer-Gen aus *B. fusiformis* DSM 2898T und B3 wurde durch die Verwendung des Primerpaars BSLV1B/BSLV2 erhalten (siehe Abb. 27). Mit diesem Primerpaar wurde eine Nukleolidfolge von etwa 400 Basen ermittelt.

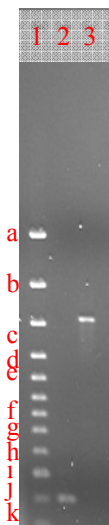


Abb. 27 Elektrophoretische Auftrennung von Amplifikaten aus einer PCR mit genomischer DNA von *B. fusiformis* B3.

Die verwendeten Oligonukleotide (BSLV1B, BSLV2, siehe Tab. 8) wurden nach einem Sequenzvergleich der S-Layer-Gene von drei *B. sphaericus* Stämmen anhand konservierter Nukleotidfolgen konstruiert.

Spur 1: DNA-Standard, 100 bp DNA-Leiter Plus (Peqlab)

[Basenpaare (bp): a=3000; b=2000; c=1500; d=1200; e=1031, f=900; g=800; h=700; i=600; j=500; k=400]

Spur 2: Amplifikat mit Primerpaar BSSV1B-BSLV2

Spur 3: Positivkontrolle Primerpaar NEubak5-NEubak3 (siehe Tab. 8)

Nach Datenbankrecherchen der Teilsequenz wurde eine 100%ige Gensequenzidentität mit dem S-Layer-Gen von *B. sphaericus* WHO 2362 nachgewiesen. Aufgrund dieses Resultats wurden die weiteren Oligonukleotide basierend auf der Gensequenz von *B. sphaericus* WHO 2362 konstruiert. Mit diesem Primersystem wurden bei *B. fusiformis* B3 1805 Basen und bei DSM 2898T 1841 Basen von der Gensequenz ermittelt (siehe Abb. 28). Die stromabwärtsliegende S-Layer-Gensequenz wurde durch die Drei-Schritt-PCR vervollständigt (siehe Abb. 29). Bei *B. fusiformis* B3 wurde eine Gesamtsequenz von 1983 Basen und bei DSM 2898T von 2005 Basen erhalten. Das S-Layer-Gen von *B. fusiformis* B3 umfasste 1725 Basen und

das von DSM 2898T 1728 Basen. Die Gensequenzen von *B. fusiformis* DSM 2898T und B3 zeigten eine hohe Identität zur S-Layer-Gensequenz von *B. sphaericus* WHO 2362 auf. Sequenzunterschiede wurden nur am C-terminalen Ende des Gens festgestellt. Die Gesamtsequenzen von *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T wiesen nach Sequenzalignment (Blast 2; NCBI) eine Identität von 95% auf.

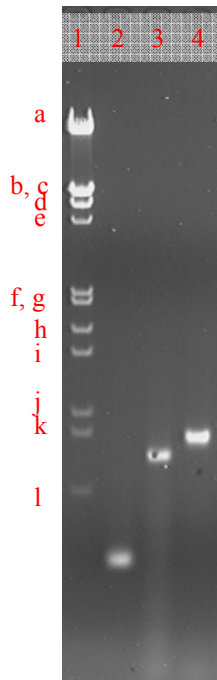


Abb. 28 Elektrophoretische Auftrennung der Produkte aus einer PCR mit genomischer DNA von *B. fusiformis* DSM 2898T.

Die verwendeten Primer (B3NLeader, B3 CSeq, B3CN1, B3CN2, B3CC1, B3CC3, siehe Tab. 8) wurden aus der Gensequenz von *B. sphaericus* WHO 2362 konstruiert.

Spur 1: DNA-Standard Marker 3: Lambda DNA/ EcoRI + HindIII (siehe Abb. 18)

Spur 2: Eluat von Amplifikat B3NLeader- B3 CSeq

Spur 3: Amplifikat B3CN1- B3CC1

Spur 4: Amplifikat B3CN2- B3CC3

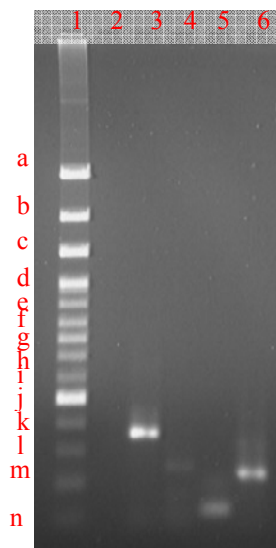


Abb. 29 Elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate der dritten PCR nach Drei-Schritt-PCR Methodik.

Dabei wurde die genomische DNA von *B. fusiformis* B3 mit einem spezifischen vom C-terminus abgeleiteten Oligonukleotid B3CC1T (siehe Tab. 8) des S-Layer-Proteins und den degenerierten Primern FP-MB1-4 (siehe Tab. 8) amplifiziert. Es entstanden spezifische und unspezifische Amplifikate. Die spezifischen PCR-Amplifikate wurden in einer zweiten PCR mit einem biotinylierten nested Primer B3-fCC1bio und degenerierten Primern FP-MB1-4 amplifiziert. Die spezifischen Produkte der zweiten PCR wurden in einer dritten PCR mit einem zweiten nested Oligonukleotid B3-fCC1nes und degenerierten Primern 1-4 amplifiziert.

Spur 1: DNA-Standard, 100 bp DNA-Leiter Plus (Peqlab)

[Basenpaare (bp): a=3000; b=2000; c=1500; d=1200; e=1031, f=900; g=800; h=700; i=600; j=500; k=400; l=300; m=200; n=100]

Spur 2: --

Spur 3: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB1

Spur 4: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB2

Spur 5: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB3

Spur 6: Amplifikat mit denegerierten Oligonukleotid FP-MB4

Aminosäuresequenz-Analysen

Die Nukleotidsequenzen der S-Layer-Gene von *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T wurden mit dem Programm Translate ExPasy in die Primärsequenz übersetzt. Entsprechend einer Nukleotidsequenz von 1725 Basen besteht das Protein von *B. fusiformis* B3 aus 575 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 61,87 kDa. Die Proteinsequenz des S-Layer-Proteins von *B. fusiformis* DSM 2898T besteht aus 576 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 62,01 kDa.

Für das gereinigte S-Layer-Protein von *B. fusiformis* B3 wurden nach MALDI-Messung eine Molmasse von 118 und 58,9 kDa ermittelt (siehe Abb. 30). Letztere korreliert sehr gut mit der theoretischen molekularen Masse von 58,91 kDa (ProtPram). Die größere Masse deutet daraufhin, dass das Protein vermutlich als Dimer vorliegt. Aufgrund dessen wurde das S-Layer-Protein über einen längeren Zeitraum mit 0,1 M Phosphorsäure und 5 M Natriumchlorid bei Raumtemperatur inkubiert und die resultierende Proteinmasse mit SDS-PAGE überprüft. Das Protein zerfällt unter diesen Bedingungen nach einer Woche in zwei Peptide mit einer Masse von 60 und 50 kDa (nicht gezeigt).

Die S-Layer-Proteinsequenzen von *B. sphaericus* WHO 2362, *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T wurden auf Identität hin untersucht (CLUSTAL W 1.7, siehe Abb. 30). Von der Gesamtproteinsequenz *B. sphaericus* 2362 (1176 Aminosäuren) wurde eine Teilsequenz von 601 Aminosäuren zum Proteinvergleich verwendet. Der Primärsequenzvergleich von *B. sphaericus* WHO 2362, *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T ergab eine Sequenzidentität von 69,18% (siehe Abb. 31). Beim Vergleich der S-Layer-Proteinsequenzen von *B. fusiformis* B3 und

DSM 2898T wurde eine Identität von über 95% nachgewiesen. Die drei Proteine wiesen in der N-terminalen Sequenz mit 284 Aminosäuren eine 100% ige Übereinstimmung auf (siehe Abb. 31).

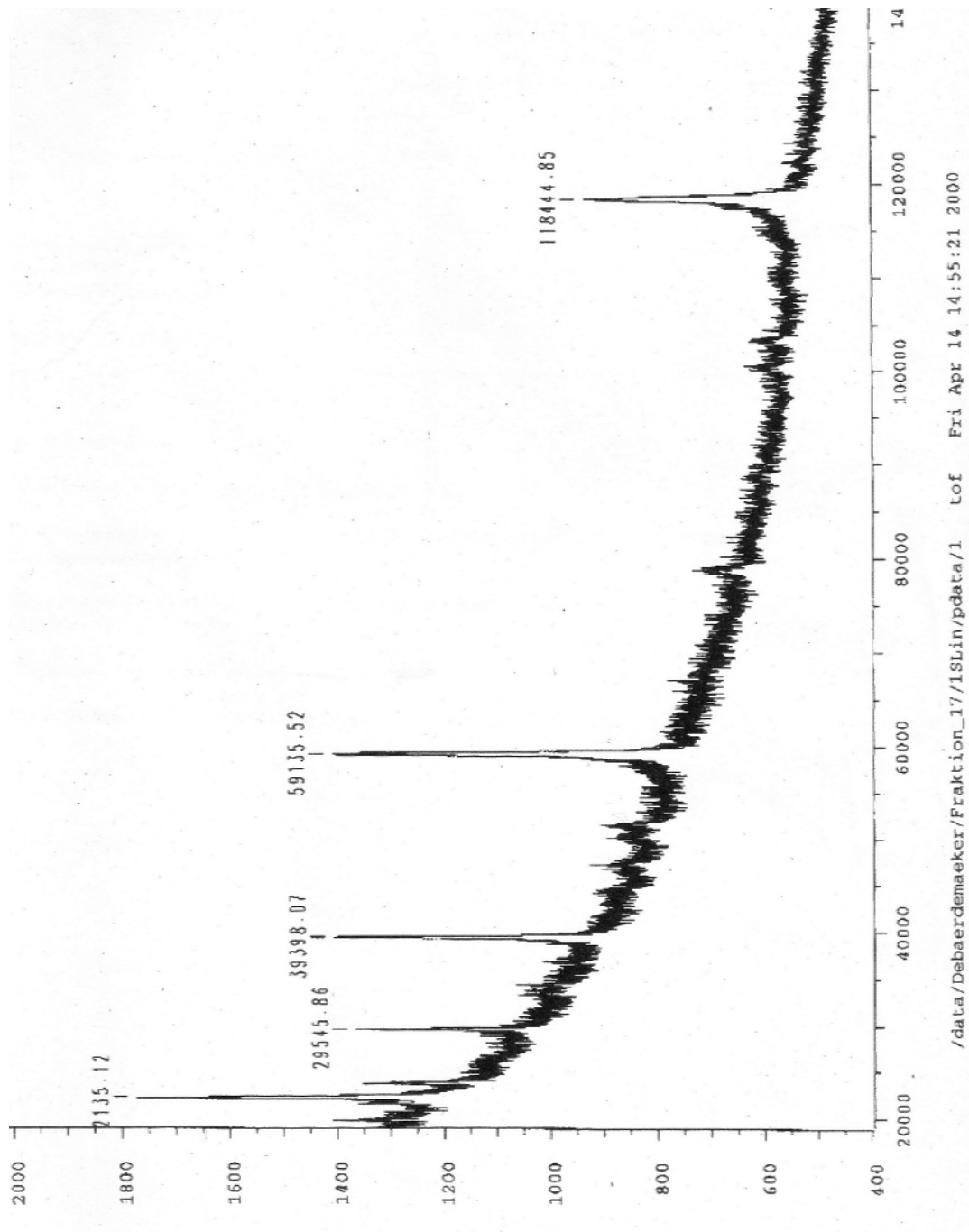


Abb. 30 Massenspektroskopie vom S-Layer-Protein *B. fusiformis* B3.

Die Proteinanalytik wurde mit MALDI durchgeführt. Das S-Layer-Hüllprotein wies eine molekulare Masse von etwa 118,4 kDa auf. (Messung: M. Wundelin, Universität Ulm)

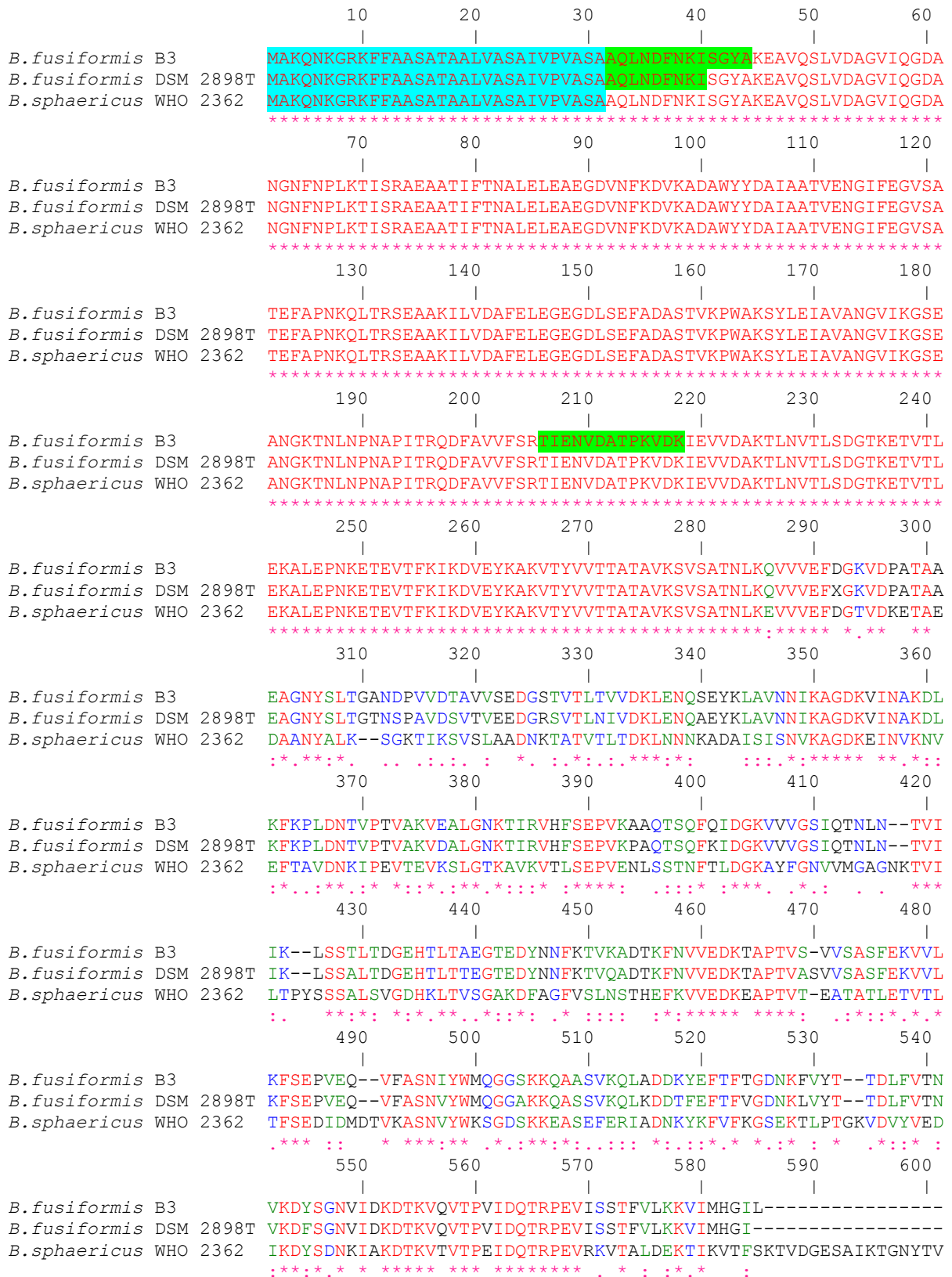


Abb. 31 Sequenz Aligment (CLUSTAL W 1.7) der S-Layer Aminosäure-Sequenzen von *B. sphaericus* WHO 2362, *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T.

Die Türkis schattierte Fläche ist die Leadersequenz; grün schattierte Flächen sind N-Terminale und interne Aminosäuresequenzen nach Edman bestimmt.

* Identische Aminosäuren; : Konservierte Aminosäuren ersetzt
 · Semi-Konservierte Aminosäuren

3.7.3.3 S-Layer-Gensequenz von *Geobacillus stearothermophilus* DSM 2358

Die bekannten S-Layer-Gene von *Gb. stearothermophilus* PV 72 (KUEN *et al.*, 1994) und ATCC 12980 (JAROSCH *et al.*, 2000) wurden auf konservierte Genbereiche hin untersucht. Anhand der konservierten Nukleotidfolgen wurden die Oligonukleotide BSSLV1 und BSSLV2 konstruiert. Mit diesem Primerpaar wurde für *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 eine S-Layer-Teilsequenz von 331 Nukleotiden ermittelt. Basierend auf der Teilsequenz wurde N- und C-terminal die Gensequenz durch Zwei-Schritt-, Drei-Schritt- und modifizierte Zwei-Schritt-PCR bis zu einer Gesamtteilsequenz von 1491 Nukleotiden bestimmt (siehe Abb. 32). Davon umfassen 1322 Nukleotide die unvollständige S-Layer-Gensequenz, die 439 Aminosäuren der Proteinsequenz codiert.

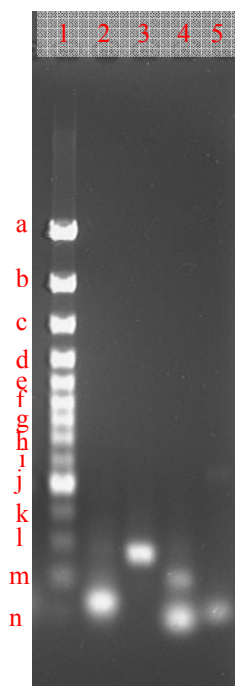


Abb. 32 Elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate (der zweiten PCR) nach Zwei-Schritt-PCR.

Dabei wurde die genomische DNA von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 mit einem spezifischen vom N-terminus abgeleiteten Oligonukleotid 2358 N1bio (siehe Tab. 8) des S-Layer-Proteins und den degenerierten Primern FP-MB1-4 (siehe Tab. 8) amplifiziert. Es entstanden spezifische und unspezifische Amplifikate. Die spezifischen PCR-Amplifikate wurden in einer zweiten PCR mit einem nested Primer 2358 N2nes amplifiziert.

Spur 1: DNA-Standard, 100 bp DNA-Leiter Plus (Peqlab)

[Basenpaare (bp): a=3000; b=2000; c=1500; d=1200; e=1031, f=900; g=800; h=700; i=600; j=500; k=400; l=300; m=200; n=100]

Spur 2: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB4

Spur 3: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB3

Spur 4: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB2

Spur 5: Amplifikat mit degenerierten Oligonukleotid FP-MB1

Die N-terminalen S-Layer-Gensequenzen von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 und ATCC 12980 (sbcC) wurden auf Identität hin untersucht (Blast2). Von der Gesamtsequenz von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 wiesen stromabwärts liegende 942 Basen eine Identität von 95% zu ATCC 12980 auf (siehe Abb. 33).

```

ATCC12980      AAAAAATGTATTATTATAGAAGACGTAGAACATTAAGGAATGATGTGAAAGTGC TAGCACT 120
DSM2358        -----GTGAAAGTGC TAGCACT 17
                *****

ATCC12980      GAATGATAGCCTTGC TAATAA GTCTATCATCTGGACACACAGGATGATCTTGGTTCATGT 180
DSM2358        GGATGATAGCCTTGC TAATAA GTCTATCATCTGGACACACAGGATGATCTTGGTTCATGT 77
                * *****

ATCC12980      TAGCACCTTTTAGGCAATGAATCTACTAAACGGCAGCCGTTTAGGATCATTGTCTTAAAG 240
DSM2358        TAGCACCTTTTAGGCAATGAATCTACTAAACGGCAGCCGTTTAGGATCATTGTCTTAAAG 137
                *****

ATCC12980      TTTCATAAAAACGAAGGGGGATTTTAGGCTTTATGACAAAAAGAAAGCAGTCAAACCTCG 300
DSM2358        TTTCATAAAAACGAAGGGGGATTTTAGGCTTTATGACAAAAAGAAAGCAGTCAAACCTCG 197
                *****

ATCC12980      CCACAGCCAGCGCTGTAGCAGCGAGCGCTTTCGTCGCAGCCAACCCGCATGCTTCCCAAG 360
DSM2358        CCACAGCCAGCGCTGTAGCAGCGAGCGCTTTCGTCGCAGCCAACCCGCATGCTTCCCAAG 257
                *****

ATCC12980      CAGCAACGGACGTGGCGACGGTCGTCAGCCAAGCGAAAGCGCAAATGAAAGAAGCATACT 420
DSM2358        CAGCAACGGACGTGGCGACGGTCGTCAGCCAAGCGAAAGCGCAAATGAAAGAAGCATACT 317
                *****

ATCC12980      ATACGTACAGCCATACGGTAACGGAAACGGGCCAATTCCCGGACATTAAAGATGTATATG 480
DSM2358        ATACGTACAGCCATACGGTAACGGAAACGGGCCAATTCCCGGACATTAAAGATGTATATG 377
                *****

ATCC12980      CCGCCTACAACAAAGCAAACAAGCGTATGCAAACGCGGTTGCTGTCGTGAACAAAGCCG 540
DSM2358        CCGCCTACAACAAAGCAAACAAGCGTATGCAAACGCGGTTGCTGTCGTGAACAAAGCCG 437
                *****

ATCC12980      GCGGCGCGAAAAAAGACGCGTATTTGGCTGATTTGCAAGCTATATACGAAACGATATG 600
DSM2358        GCGGCGCGAAAAAAGACGCGTATTTGGCTGATTTGCAAGCTATATACGAAACGATATG 497
                *****

ATCC12980      TCAAAGCCAACCCGAAATCGGGCGAAGCGCGGTGGCTACGTACATCGACGCTTACAAC 660
DSM2358        TCAAAGCCAACCCGAAATCGGGCGAAGCGCGGTGGCTACGTACATCGACGCTTACAAC 557
                *****

ATCC12980      ATGCGACAAAATTAGACAAAATGCGCCAAGAAGCTCAAAGCAGCCGTCGATGCGAAAGATC 720
DSM2358        ACGCAGTCAAGCTTGACGGTCTGCGTCAAGATCTGGCGAAAGCTGTCGAAGCAAAGACT 617
                * **      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *

ATCC12980      TGAAAAAAGCAGAAGAGCTCTACCACAAAATTTTCGTACGAGCTCAAACGCGCACGGTCA 780
DSM2358        TGAAAAAAGCAGAAGAGCTCTACCACAAAATTTTCGTACGAGCTCAAACGCGCACGGTCA 677
                *****

ATCC12980      TTCTCGACCGGCTCTACGGCAATCGACGCGGAACTCCTCCGTTTCGACGTTCAAAGCCG 840
DSM2358        TTCTCGACCGGCTCTACGGCAATCGACGCGGAACTGCTTCGCTCGCAATTCAAAGCCG 737
                *****

ATCC12980      ATGCTCAAGCATTGCGCGACAGATTGATCTACGACATCACCGTTGCCATGAAAGCGCGTG 900
DSM2358        AAGCGCAAAAAGCTGCGCGACAGATTGATCTACGACATCACCGTTGCCATGAAAGCGCGTG 797
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

ATCC12980      AAGCGCAAGACGCTGTCAAAGCCGGCAACTTGGACAAAGCGAAAGCCGCGCTTGACCAAG 960
DSM2358        AAGCGCAAGACGCTGTCAAAGCCGGCAACTTGGACAAAGCGAAAGCCGCGCTTGACCAAG 857
                *****

```

```

ATCC12980      TCAACCAATACGTATCGAAAGTAACCGATGCGTTCAAAGCCGAACTGCAAAAAGCAGCAC 1020
DSM2358       TCAACCAATACGTATCGAAAGTAACCGATGCGTTCAAAGCCGAACTGCAAAAAGCAGCAC 917
*****

ATCC12980      AAGACGCCAAGGCGGCGTATGAAGCAGCATTGACGCCAAGGTTGAGAGTGTAAGTGCGA 1080
DSM2358       AAGACGCCAAGGCGGCGTATGAAGCAGGCGTTCCTTTCAAAGTTGAGAGCGTGCCGTCG 977
***** ** * * ** * * *

```

Abb. 33 Alignment (CLUSTAL W 1.82) der N-terminalen S-Layer-Gensequenzen von *Gb. stearothermophilus* ATCC 12980 und DSM 2358 (siehe Anhang 2).

Schattierte Flächen: Grün -35-Box, türkis Pribnow-Box, lila Shine-Dalgarno-Sequenz; blau beschriftet Translationsstartpunkt.

* Identitische Basen

Anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 wurde eine Leadersequenz von 30 Aminosäuren ermittelt. Diese war zu 100% mit der Leadersequenz von *Gb. stearothermophilus* ATCC 12980 identisch (siehe Abb. 34). Außerdem wurde die N-terminale Proteinsequenz nach Edman-Methode bestätigt (siehe Tab. 10a). Diese war mit den abgeleiteten Primärsequenzen von *Gb. stearothermophilus* PV72 und ATCC 12980 identisch.

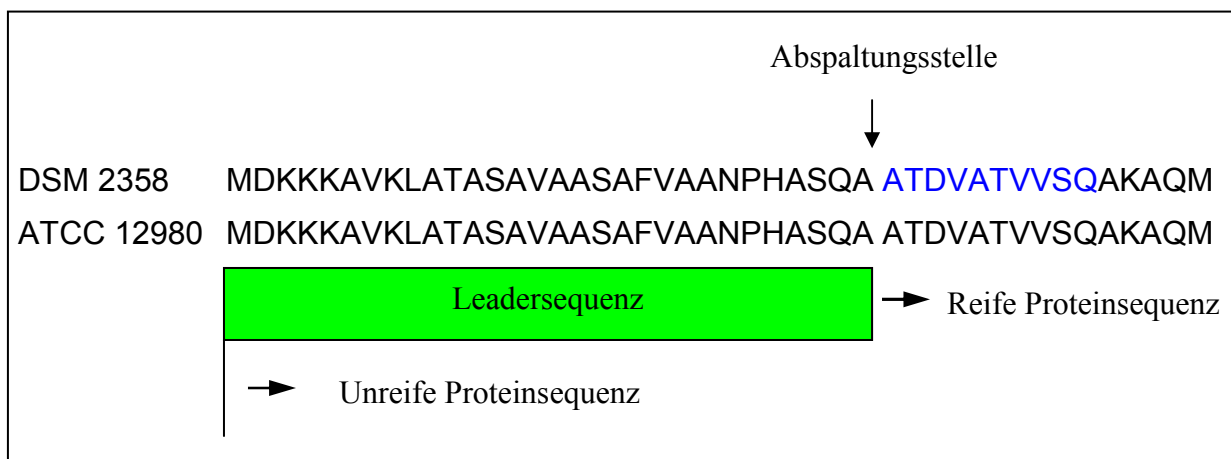


Abb. 34 Leaderpeptid von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 und ATCC 12980.

Die Leadersequenz setzt sich aus 30 Aminosäuren zusammen. N-terminale Proteinsequenz nach Edman-Methode blau beschriftet (siehe Tab. 10b).

3.8 Sequenzanalysen mit der 16S rRNA von Bacillaceae

Zur Identifizierung der Ribosomenbindungsstelle (RBS) bei S-Layer-Genen wurde die Nukleotidsequenz der 16S rRNA der kleineren Untereinheit der Ribosomen ermittelt. Diese bindet am C-terminalen Sequenzende homolog mit der Shine-Dalgarno-Konsensussequenz des Gens.

Von den untersuchten Stämmen war nur die 16S rRNA für *B. fusiformis* 2898T bekannt. Deswegen wurden für *Gb. stearothermophilus* DSM 2358, *Bacillus sphaericus* DSM 396 und B3 die 16S rRNA-Sequenzen ermittelt (siehe Tab. 13). Nach Datenbankanalysen (NCBI) wurde für die 16S rRNA von *B. sphaericus* B3 eine Sequenzidentität von 99% zum Stamm *B. fusiformis* 2898T nachgewiesen. Dieses Resultat deutet daraufhin, dass der Stamm B3 eher zu *B. fusiformis* einer Subspezies von *B. sphaericus* gehört. Aufgrund dessen wurde *B. sphaericus* B3 zu *B. fusiformis* B3 umbenannt. Außerdem wurde die bekannte 16S rRNA von *B. fusiformis* 2898T von 1515 auf 1547 Basen vervollständigt (siehe Anhang 5).

Tab. 4 16S rRNA-Nukleotidsequenzen von *B. sphaericus*, *B. fusiformis* und *Gb. stearothermophilus*

Stamm	16S rRNA (Anzahl der Nukleotide)
<i>B. fusiformis</i> B 3	1525
<i>B. fusiformis</i> 2858T	1547 (1515)
<i>Gb. stearothermophilus</i> DSM 2358	1589
<i>B. sphaericus</i> DSM 396	1563

3.9 Vergleiche der Gen- und Proteinsequenzen der S-Layer von Bacillaceae

Die ermittelten S-Layer-Gen- und Proteinsequenzen von *B. sphaericus* DSM 396, *Gb. stearothermophilus* DSM 2358, *B. fusiformis* DSM 2898T und B3 wurden auf gemeinsame Eigenschaften und Unterschiede hin untersucht. Hierfür wurden einerseits die transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen und andererseits die Proteineigenschaften der einzel-

nen S-Layer-Hüllproteine verglichen. Hierzu wurden weitere bekannte S-Layer-Proteine aus der Familie der *Bacillaceae* in Datenbankanalysen (Expasy) miteingezogen.

Aufgrund der Aminosäure-Merkmale und -Ähnlichkeiten können die untersuchten S-Layer-Proteine der *Bacillaceae* in drei Gruppen unterteilt werden (siehe Tab. 14).

Die Signalpeptide von *B. sphaericus* (P1, CCM 2177, WHO 2362) und *B. fusiformis* (B3, DSM 2898T) waren zu 100% identisch (siehe Abb. 35a). Alle Leadersequenzen setzen sich aus 30 Aminosäuren zusammen, außer bei *B. sphaericus* DSM 396 der 31 Aminosäuren aufwies (siehe Tab. 14). Beim *Gb. stearothermophilus* waren die Leadersequenzen der Stämme ATCC 12980, NRS 2004/3a und DSM 2358 identisch (siehe Abb. 35b).

Tab. 14 Eigenschaften der S-Layer-Proteine aus der Familie der *Bacillaceae*

	<i>Gb. stearothermophilus</i>				<i>B. sphaericus</i>				<i>B. fusiformis</i>	
	PV72	ATCC 12980	NRS 2004/3a	DSM 2358*	DSM 396	CCM 2177	P1	WHO 2362	B3	DSM 2898T
Primärsequenz (aa)	1228	1099	903	439	810	1268	1252	1176	575	576
Aminosäureeigenschaften (Anteil in mol%)										
Unpolar	45.2	46.3	45.0	44.9	48.3	48.2	48.6	44.2	47.1	47.4
Polar	31.4	30.5	31.8	30.5	32.3	34.8	32.9	29.2	28.2	27.7
Sauer	12.0	11.6	11.3	10.7	9.9	9.6	10.5	14.3	13.4	13.2
Basisch	11.3	11.4	11.9	13.9	9.6	7.4	8.3	12.3	11.3	11.4
Molmasse¹⁾(Dalton)	131076	115395	96640	47082	85509	132047	129935	125226	61874	62007
Isoelektrischer Punkt¹⁾	5.40	5.72	6.67	9.18	5.56	4.80	4.85	5.05	5.01	5.09
Hydrophathizität¹⁾	- 0.204	- 0.162	- 0.179	- 0.294	- 0.124	- 0.09	- 0.078	- 0.225	-0.155	- 0.151
Sequonstrukturen²⁾	18	8	8	0	13	21	20	17	4	3
SLH-Domäne²⁾	0	0	0	0	1	2	3	3	3	3
Signalpeptid (aa)	30	30	30	30	31	30	30	30	30	30
Glykosilierung	Unklar	+	+	n.b.	0.7-1.8%	n.f.	1.32 %	1.46 %	n.f.	n.b.
Accession Nummer³⁾	I40468	AAC12757	AAL46630	d. A.	d. A.	AAF22978	CAA02847	A33856	d. A.	d. A.

¹⁾ ermittelt mit *ProtParam tool* ²⁾ ermittelt nach *PROSITE* ³⁾ Datenbank EMBL * unvollständige Gensequenz; n.b.= nicht bestimmt; n.f.= nicht vorhanden; d. A. diese Arbeit

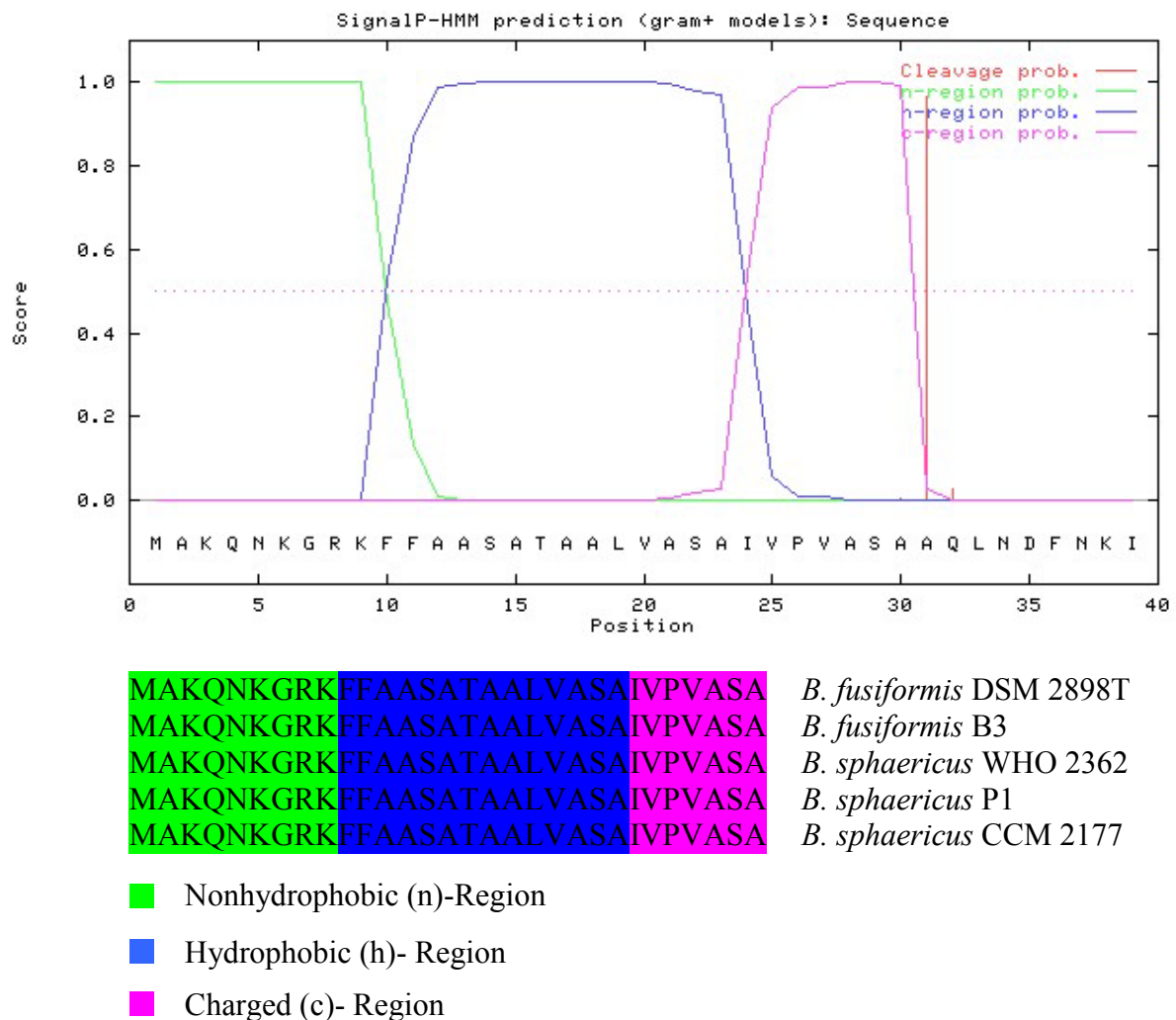


Abb. 35a Vergleich der Leadersequenzen der S-Layer-Proteine von *B. sphaericus* (P1, CCM 2177, WHO 2362) und *B. fusiformis* (B3, DSM 2898T).

Leaderpeptidanalyse mit SignalP V2.0.b2 (Expasy-CBS). Die Leadersequenz setzt sich bei Prokaryoten aus n-, h- und c-Region zusammen. Die drei spezifischen Leaderpeptid-Regionen wurden stochastisch durch Hidden Markov Model ermittelt. Score beschreibt Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Zustände 1=100%.

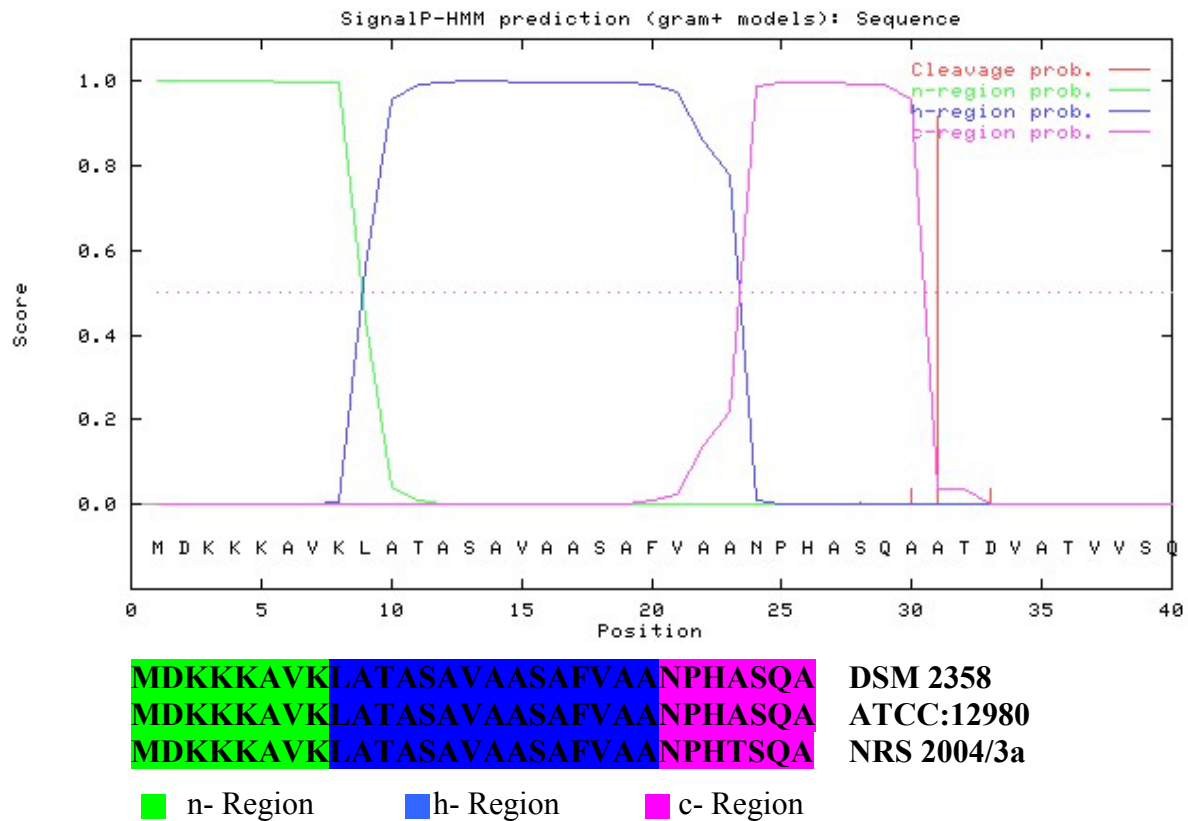


Abb. 35b Vergleich der Leadersequenzen der S-Layer-Proteine von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358, ATCC 12980, NRS 2004/3a.

Leaderpeptidanalyse mit SignalP V2.0.b.2 (ExPASy-CBS). Die Leadersequenz setzt sich aus n-, h- und c-Region zusammen. Die drei spezifischen Leaderpeptid-Regionen wurden stochastisch durch Hidden Markov Model ermittelt. Score beschreibt Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Zustände 1=100%.

Außer der Primärsequenz wurden auch transkriptionelle und translationelle Erkennungsregionen miteinander verglichen und auf Gemeinsamkeiten hin untersucht. Der Vergleich wies ebenfalls die gleichen Gemeinsamkeiten innerhalb einer Spezies wie bei der Leaderpeptidanalyse auf. Die -35-Box, die Pribnow-Box und Ribosomenbindungsstelle (RBS) waren bei *B. fusiformis* (B3, DSM 2898T) und *B. sphaericus* (WHO 2362, CCM 2177) identisch (siehe Tab. 15). Bei *Gb. stearothermophilus* Stamm DSM 2358, NRS 2004/3a und ATCC 12980 waren die 5'-terminalen Erkennungsregionen identisch zueinander (siehe Tab. 15). Aus den vorliegenden Daten der Protein- und Gensequenz können die untersuchten S-Layer-Proteine nach ihren Eigenschaften in drei Gruppen aufgeteilt werden. Die Aufteilung der untersuchten S-Layer-Gene erfolgte wie folgt: Erstens *B. fusiformis* (B3, DSM 2898T) und *B. sphaericus*

(WHO 2362, P1, CCM 2177), zweitens *Gb. stearothermophilus* und drittens *B. sphaericus* DSM 396.

Tab. 15 Vorschlag für transkriptionelle und translationelle Erkennungsregionen der S-Layer-Gene aus der Familie der *Bacillaceae*

Stamm	-35 - Box	-10 – Box	RBS
<i>Bacillus fusiformis</i> B 3	-TTGAAT-	-TATAAT-	-GGAGGAA-
<i>Bacillus fusiformis</i> 2898T	-TTGAAT-	-TATAAT-	-AGGGAGG-
<i>Bacillus sphaericus</i> WHO 2362	-TTGAAT-	-TATAAT-	-GGAGGAA-
<i>Bacillus sphaericus</i> CCM 2177	-TTGTAT-	-TATAAT-	-GGAGGAA-
<i>Bacillus sphaericus</i> DSM 396	-TTGCAT-	-TCAATT-	-TGAGGAA-
<i>Gb. stearothermophilus</i> DSM 2358	-TAGCAC-	-TAATAA-	-ATTTTAG-
<i>Gb. stearothermophilus</i> NRS 2004/3a	-TAGCAC-	-TAATAA-	-ATTTTAG-
<i>Gb. stearothermophilus</i> ATCC 12980	-TAGCAC-	-TAATAA-	-ATTTTAG-

Klonierungs und Expressionsdaten

Für die Klonierung und Überproduktion *slmj1* wurde das S-Layer-Protein des hyperthermophilen Archaeobakteriums *Mcc. jannaschii* verwendet. Das Gen wurde im Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) kloniert und expremiert.

3.10 Expression und Reinigung des S-Layer-Proteins *slmj1*

Das S-Layer-Gen *slmj1* wurde über die Restriktionsschnittstellen NdeI und SalI ins Expressionsplasmid pET28a kloniert. Das Fusionsprotein war N-terminal durch His-tag (His₆) markiert.

Das vollständige Gen *slmj1* wurde durch Polymerasekettenreaktion erhalten (siehe Abb. 36). Dabei wurde die genomische DNA von *Mcc. jannaschii* mit den Klonierungsprimern KP-MJF-NdeI und –SalI (siehe Tab. 8) amplifiziert, die die Restriktionsschnittstellen NdeI und SalI aufwiesen. Das Amplifikat wies etwa eine Größe von 1750 Basen auf (siehe Abb. 36). Zuerst wurde das PCR-Amplifikat durch Subklonierung in das Plasmid pCR2.1 integriert und

durch Restriktion mit den Endonukleasen NdeI/SalI die überlappenden Enden erzeugt. Dieses wurde über die Restriktionsschnittstellen NdeI und SalI in das linearisierte Expressionsplasmid pET28a integriert und durch Elektroporation in *E. coli* JM105 transferiert. Die Aufnahme des konstruierten Expressionsplasmids pET28a-slmj1 wurde durch Restriktionsanalyse und Vergleich mit dem Ursprungspasmid pET28a ermittelt (siehe Abb. 37). Für die Überproduktion wurde das S-Layer-Plasmidkonstrukt ins Überexpressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) durch Elektroporation transformiert.

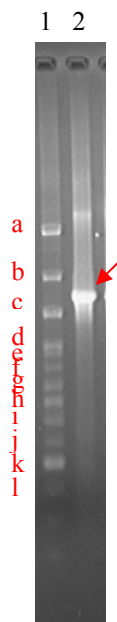


Abb. 36 Elektrophoretische Auftrennung des Amplifikats des S-Layer-Gens (slmj1).

Dabei wurde die genomische DNA von *Mcc. jannaschii* mit den Oligonukleotiden KP-MJF-NdeI und -SalI amplifiziert. Pfeil markiert S-Layer-Gen.

Spur 1: DNA-Standard, 100 bp DNA-Leiter Plus (Peqlab; siehe Abb. 32)

Spur 2: Amplifikat S-Layer-Gen (slmj1)

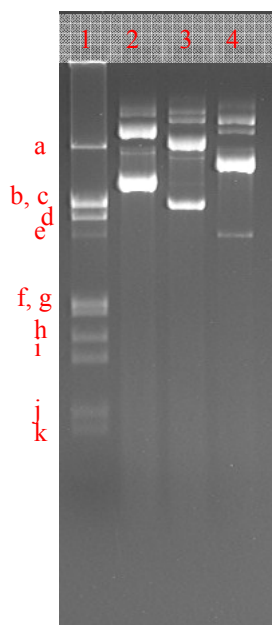


Abb. 37 Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der Plasmidkonstrukte mit dem Insert des S-Layer-Gens (slmj1) und dem Expressionsplasmid pET28a.

Spur 1: DNA-Standard Marker 3: Lambda DNA/ EcoRI + HindIII

[Basenpaare (bp): a=21226, b=5148, c=4973, d=4273, e=3530, f=2027, g=1904, h=1584, i=1375, j=947, k=831, l=564]

Spur 2: Plasmidkonstrukt pET28a-slmj1b

Spur 3: Plasmidkonstrukt pET28a-slmj1

Spur 4: Expressionsplasmid pET28a

Die Überproduktion des S-Layer-Proteins *slmj1* wurde durch SDS-PAGE (10%) vor und nach der Induktion mit IPTG überprüft (siehe Abb. 38). Zur Optimierung der Aufreinigung wurde die lösliche Fraktion einer Hitzebehandlung unterzogen, um thermostabile Proteine zu isolieren (siehe Abb. 38 Spur 5).

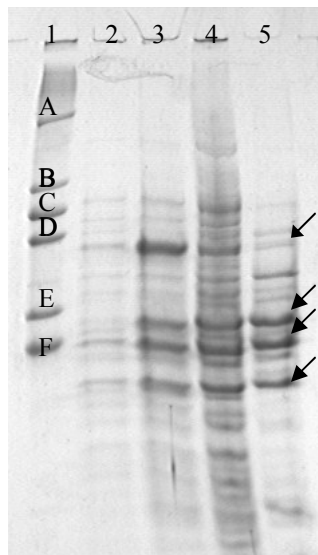


Abb. 38 Überproduktion und Reinigung von *slmj1*-His₆ aus *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-*slmj1*).

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und mit Coomassie gefärbt. Pfeile markieren das heterolog exprimierte Protein.

Spur 1: Proteinstandard Merck VIII (siehe Abb. 26)

Spur 2: Zellhomogenat vor der Induktion

Spur 3: Zellhomogenat nach 2.5 Std Induktion mit IPTG

Spur 4: Zellsuspension-Überstand (ÜS)

Spur 5: Zellsuspension-ÜS nach 30 min Inkubation bei 85°C

Nach der Induktion der Expression enthielt die lösliche Fraktion zwei Banden mit der zu erwartenden molekulare Masse von ca. 70 und 50 kDa (siehe Abb. 38). Die 40 und 30 kDa Proteinbanden werden vermutlich durch inkorrekte Faltungen des unlöslichen Proteins hervorgerufen (siehe Abb 38). Die lösliche Fraktion des Zellhomogenats wurde durch eine Ni²⁺-Chelat-Säule gereinigt. Das Fusionsprotein band an die Säule und wurde mit Imidazol eluiert. Das Imidazol wurde durch Dialyse entfernt. Das heterolog exprimierte S-Layer-Protein *slmj1* wurde mit dem nativen S-Layer-Protein *slmj1* verglichen (siehe Abb. 39).

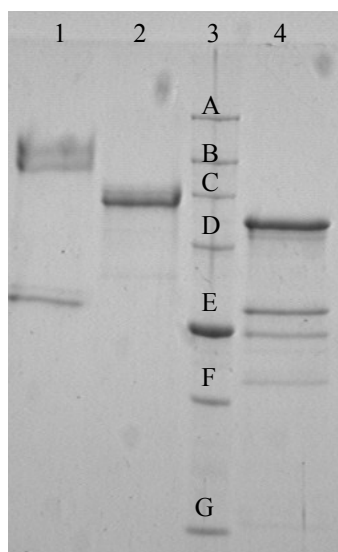


Abb. 39 Vergleich des nativen und des heterolog exprimierten S-Layer-Proteins *slmj1*.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und mit Coomassie gefärbt.

Spur 1: Bei RT vorliegendes S-Layer-Protein (20µg)

Spur 2: 2 min bei 99°C inkubierte S-Layer-Protein (20µg)

Spur 3: Proteinstandard Roti-Mark 10-150 (Roth)

A=150, B=100, C=80, D=60, E=40, F=30, G=20 kDa

Spur 4: Gekochtes Eluat der Ni-NTA-Agarose-Säule Fraktion 2-6 (10µg)

Das heterolog exprimierte Protein wies eine geringere apparente Molekularmasse auf, als das ursprüngliche S-Layer-Hüllprotein (siehe Abb. 39 Spur 1-2). Das Fusionsprotein hatte eine apparente molekulare Masse von 70 und 50 kDa. Für das S-Layer-Protein von *Mcc. jannaschii* wurde eine apparente Masse von 80 und 50 kDa angegeben (AKÇA, 2000). Die beiden anderen Faltungszustände vom Fusionsprotein 40 bzw. 30 kDa wurden voraussichtlich durch inkorrekte Faltungen vom unlöslichem Protein (Inclusion body = Einschlußkörperchen) des Proteins hervorgerufen.

3.11 Eigenschaften des heterolog exprimierten S-Layer-Proteins slmj1

Entsprechend wie beim nativen S-Layer-Protein slmj1 wurde das heterolog exprimierte S-Layer-Protein slmj1 verschiedenen „extremen“ Bedingungen ausgesetzt und auf Konformations-Änderungen hin untersucht. Das Fusionsprotein wurde einerseits auf temperaturbedingte und andererseits auf pH-abhängige Faltungszustände untersucht.

Durch schrittweise Erhöhung der Temperatur um 5 °C wurde im Temperaturbereich von 25-55 °C eine Konformations-Änderung bei dem Protein festgestellt (siehe Abb. 40). Ab einer Temperatur von 40 °C entstand ein neuer Faltungszustand mit einer apparenten Molmasse von 70 kDa. Mit fortschreitender Temperaturerhöhung wurde dieser Faltungszustand verstärkt (siehe Abb. 40 Spur 5-8).

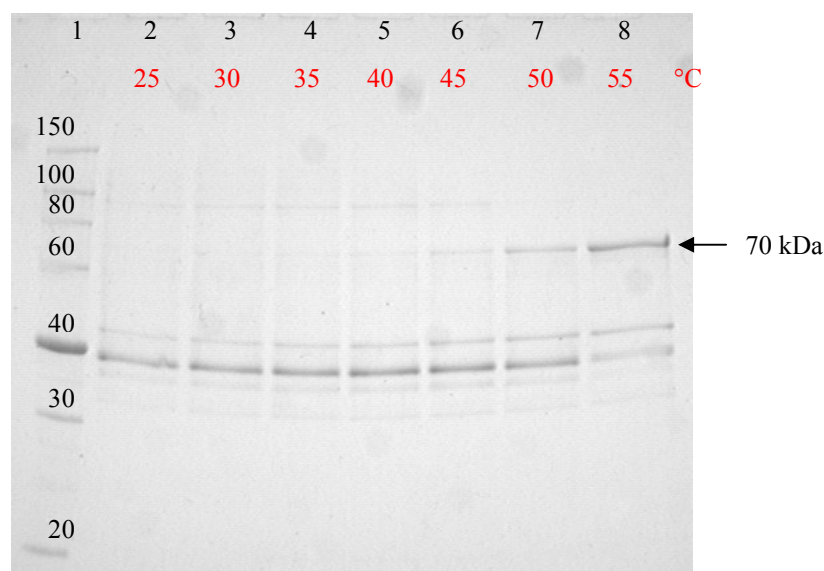


Abb. 40 Vergleich des heterolog exprimierten S-Layer-Proteins slmj1 im Temperaturbereich 25-55°C.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und mit Coomassie gefärbt. Heterolog exprimierte S-Layer-Protein mit schwarzem Pfeil gekennzeichnet

Spur 1: Proteinstandard Roti-Mark 10-150 (siehe Abb. 40)

Spur 2-8: heterolog expremiertes S-Layer-Protein (10 µg) in Temperaturbereich 25-55 °C

Außer der Temperatur wurde auch der Einfluss des pH-Werts auf die Proteinkonformation untersucht. Das heterolog expremierte S-Layer-Protein slmj1 wurde bei Raumtemperatur im pH-Bereich von 2-9 inkubiert. Bei allen pH-Bereichen wurden zwei apparente Proteinmassen von 50 und 40 kDa ermittelt (siehe Abb. 41). Nur im leicht sauren pH von 2-5 wurde ein Proteinfaltungszustand mit einer apparenten Masse von 70 kDa festgestellt (siehe Abb. 41 Spur 2-5).

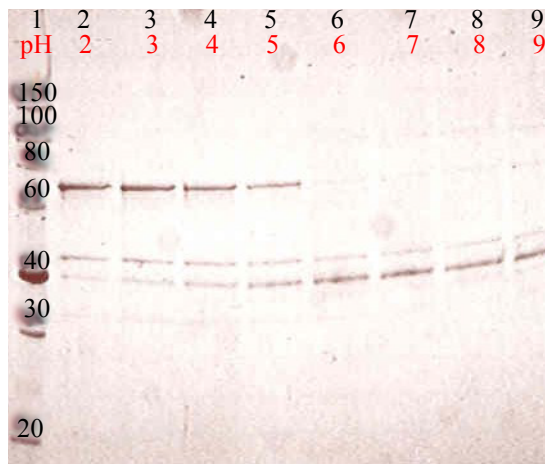


Abb. 41 Vergleich der Proteinkonformation des heterologen S-Layer-Proteins slmj1 unter dem Einfluss verschiedener pH-Werte. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt und Coomassie gefärbt. PH-Werte rot beschriftet

Spur 1: Proteinstandard Roti-Mark 10-150 (siehe Abb. 39)

Spur 2-9: heterolog expremiertes S-Layer-Protein slmj1 (10 µg) in pH-Bereich 2-10

Immunologischer Nachweis des S-Layer-Proteins slmj1

In Kaninchen wurde das Antiserum gegen das S-Layer-Protein slmj1 aus *Mcc. jannaschii* generiert. Der Nachweis der Spezifität der Primärantikörper-Bindung am S-Layer-Protein slmj1 erfolgte im Dot- und Western-Blot mit Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörper. Außerdem wurde durch indirekte Immunfluoreszenz die Primärantikörper-Bindung an der Zelloberfläche einzelner Bakterien mittels fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern nachgewiesen (nicht gezeigt).

3.12 Dot-Blot Analyse

Nach punktförmigem Auftragen von Proteinlösungen auf eine Membran wurde qualitativ und quantitativ die Bindung vom Primärantikörper gegen das hyperthermophile S-Layer-Protein slmj1 überprüft. Der Immunkomplex aus Primärantikörper und Protein (Antigen-Antikörper-Komplex) wurde durch die Bindung vom Enzym-markierten Sekundärantikörper gegen das Kaninchenantigen detektiert. Das native und heterolog expremierte S-Layer-Hüllprotein slmj1 zeigten eine spezifische Immunreaktion mit dem Primärantikörper slmj (siehe Abb. 42 Spur 1-2). Der Primärantikörper slmj bindet mit dem nativen und heterologen S-Layer-Protein aus *Mcc. jannaschii* (siehe Abb. 42 Spur 1,2).

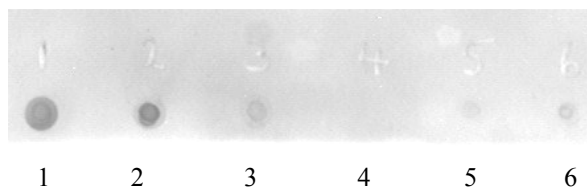


Abb. 42 Immunologischer Nachweis des nativen und heterolog expremierten S-Layer-Proteins slmj1 durch Dot-Blot.

Primärantikörper slmj1

Spur 1: S-Layer-Protein slmj1 von *Mcc. jannaschii* 1µg

Spur 2: heterolog expremiertes Protein slmj1 1,1µg

Spur 3: Membranprotein-Extrakt *Corynebacterium glaucum*

Spur 4: Ovalbumin 1µg

Spur 5: Albumin FV, 10µg

Spur 6: S-Layer-Protein *B. fusiformis* B3, 2,2 µg

3.13 Western-Blot Analyse

Durch Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran wurde mit Hilfe von Enzym-markierten Antikörpern das S-Layer-Protein slmj1 sichtbar gemacht. Nach dem Vergleich des Kontrollgels (siehe Abb. 43A) mit dem Western-Blot (siehe Abb. 43B) konnte eine hohe Spezifität der Bindung des Primärantikörpers slmj mit dem Antigen (S-Layer-Protein slmj1) nachgewiesen werden (siehe Abb. 43 Spur 2). Außerdem wurde die Identität des heterolog expremierten Proteins als S-Layer-Protein bestätigt (siehe Abb. 43 Spur 3).

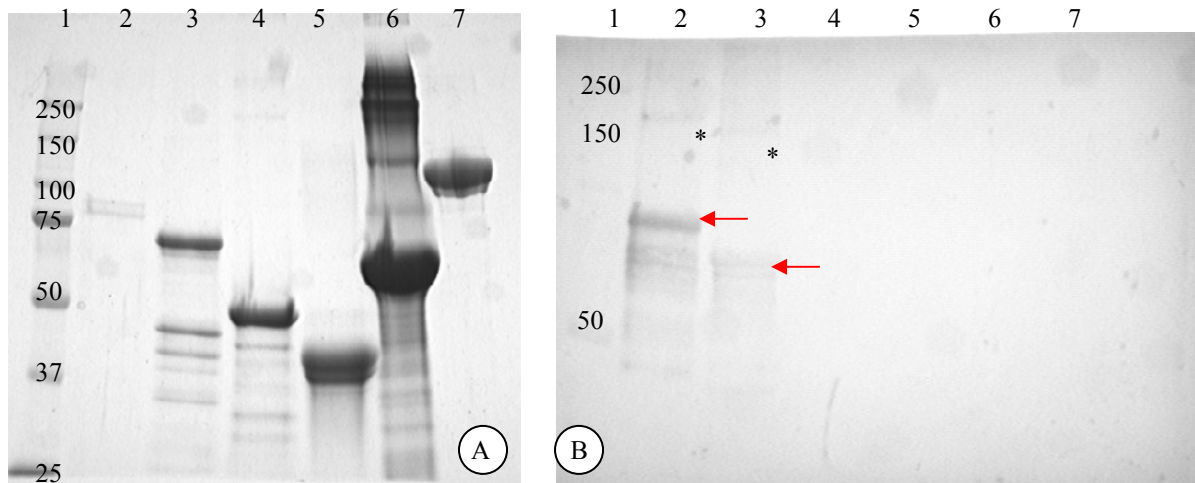


Abb. 43 Vergleich der deckungsgleich aufgetragenen und gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine vor und nach dem Transfer auf eine Membran.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) getrennt. Stern markiert Di- und Tri-merbildung vom S-Layer-Protein slmj1. Native und heterologe S-Layer-Protein mit rotem Pfeil markiert.

- A) Coomassie gefärbte Proteine.
- B) Auf eine Membran transferierte Proteine, mit Enzym-markiertem Antikörper visualisiert (Western-Blot).

Spur 1: Proteinstandard Precision Plus Protein (Roth)

Spur 2: S-Layer-Protein slmj1 von *Mcc. jannaschii*, 2 µg

Spur 3: heterolog expremiertes S-Layer-Protein slmj1, 20 µg

Spur 4: Membranprotein-Extrakt *Corynebacterium glaucum*

Spur 5: Ovalbumin, 20µg

Spur 6: Albumin, 20µg

Spur 7: S-Layer-Protein von *B. fusiformis* B3, 11µg

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene S-Layer-Proteine von Prokaryoten aus den Domänen der *Bacteria* und *Archaea* zu vergleichen und auf charakteristische Eigenschaften hin zu untersuchen. Hierfür wurden die methanogenen Archaeen aus der Ordnung Methanococcales, die unter mesophilen, thermophilen und hyperthermophilen Bedingungen leben, untersucht. Von den Bakterien wurden mesophile und thermophile Vertreter aus der Familie der *Bacillaceae* verwendet. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die heterologe Proteinexpression des S-Layer-Hüllproteins des hyperthermophilen *Methanocaldococcus (Mcc.) jannaschii*.

4.1 Isolierung und Charakterisierung der S-Layer-Proteine aus der Ordnung Methanococcales

Die S-Layer-Proteine von *M. vanniellii*, *Mth. thermolithotrophicus* und *Mcc. jannaschii* wurden einige biochemische und molekulargenetische Eigenschaften analysiert. Zuerst wurde die Aufreinigung des S-Layer-Proteins optimiert und die gereinigten Proteine durch N-terminale Sequenzierung nach Edman (EDMAN & BEGG, 1967) bestimmt (CLAUS *et al.*, 2001; AKÇA *et al.*, 2002).

Aus der Ordnung Methanococcales wurde der Stamm *Mt. igneus* DSM 5666 aus dem hyperthermophilen phylogenetischen Ast untersucht. Das S-Layer-Hüllprotein wurde nicht nur zellulär, sondern auch extrazellulär im Kulturmedium nachgewiesen. Eine Ausscheidung des S-Layer-Proteins in das Wachstumsmedium wurde vorher bereits bei *M. vanniellii*, *Mth. thermolithotrophicus* und *Mcc. jannaschii* gefunden (CLAUS *et al.*, 2001; AKÇA *et al.*, 2002) und bei einigen Bakterien beschrieben: *Clostridium thermosulfuricum*, *Clostridium thermosaccharolyticum* (SLEYTR & GLAUERT, 1976), *Acinetobacter sp.* (THORNE *et al.*, 1976), *Caulobacter crescentus* (SMIT *et al.*, 1981), *Bacillus thuringiensis* (LUCKEVICH & BEVERIDGE, 1989), *Aeromonas salmonicida* (GRIFFITH & LUNCH, 1990), *Bacillus brevis* (ADACHI *et al.*, 1991), *Bacillus stearothermophilus* (BREITWEISER *et al.*, 1992) und *Bacillus anthracis* (ETIENNE-TOUMELIN *et al.*, 1995). Charakteristisch für die Bacillaceae ist es, dass nur in der logarithmischen Wachstumsphase verstärkt S-Layer gebildet und in der späten exponentiellen bzw. frühen stationären Phase in das Wachstumsmedium ausgeschieden wird (SLEYTR & GLAUERT, 1976).

Untersuchungen über Codon-Usage, Ribosomenbindungsstellen und Promotorstrukturen verschiedener S-Layer-Gene zeigten eine Anpassung an eine hohen Transkriptions- und Transla-

tionsrate der Proteine (BOOT & POWELS, 1996). Die Ausscheidung der S-Layer-Proteine in das Kulturmedium bei der Ordnung Methanococcales lässt sich durch eine Überproduktion und keinesfalls durch Zellyse erklären. Protoplasten von *Methanococcus voltae* bauten innerhalb von 60 Minuten ihre S-Layerschicht auf, obgleich die mittlere Generationszeit 16 Stunden ist (PATEL *et al.*, 1993; FIRTEL *et al.*, 1995).

Für *Mt. igneus* wurde für das S-Layer-Protein nach SDS-PAGE eine apparente molekulare Masse von 70 kDa nachgewiesen. Die Isolierung des zellulären und extrazellulären Proteins erfolgte durch präparative isoelektrische Fokussierung. Die N-terminale Proteinsequenz des zellulären S-Layer-Hüllproteins von *Mt. igneus* war durch Edman-Methode nicht ermittelbar. Dies deutet voraussichtlich daraufhin, dass das Protein N-terminal maskiert (z.B. methyliert) vorliegen könnte. Deshalb wurde das extrazelluläre S-Layer-Protein aus dem Kulturfiltrat isoliert, um wie bei *Mcc. jannaschii* die N-terminale Proteinsequenz nachzuweisen (AKÇA *et al.*, 2002). Dennoch war es nicht möglich, die N-terminale Sequenz proteinchemisch zu ermitteln.

Die Gensequenz von *Mt. igneus* wurde durch die Verwendung von Primerpaar MJ3SL/MJ4SL mit der Drei-Schritt-PCR erhalten. Die Gensequenzen von *M. vannielii* und *Mth. thermolithotrophicus* wurden N- und C-terminal mit der Zwei-Schritt-PCR vervollständigt (AKÇA *et al.*, 2002). Basierend auf der Gensequenz umfasst das S-Layer-Protein von *Mt. igneus* 519 Aminosäuren, von *Mth. thermolithotrophicus* 559 Aminosäuren und von *M. vannielii* 566 Aminosäuren (Tab. 12). Die S-Layer-Proteine aus der Ordnung Methanococcales weisen gemäß der Primärsequenz eine molekulare Masse von 55669 bis 60547 Dalton und einen isoelektrischen Punkt von 4,15 bis 4,68 auf. Obwohl keine Glykolisierung mit der Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) detektierbar war, wurden für die Primärsequenzen der S-Layer-Proteine von *Mcc. jannaschii* und *Mt. igneus* sieben potentielle N-glykosidische Bindungsstellen (Sequonstruktur: Asn-Xaa-Ser/Thr; Xaa nicht Pro oder Asp) nachgewiesen. Für die S-Layer-Hüllproteine der mesophilen Stämme *M. voltae* und *M. vannielii* wurden zwei bzw. keine Sequonstrukturen angegeben. Deshalb wurde das S-Layer-Protein von *Mcc. jannaschii* mit einem sensitiveren Enzym-Immunoassay auf kohlenhydrathaltige Seitenketten hin untersucht und eine Glykolisierung detektiert. Nach vorherigen S-Layer-Proteinstudien mit *Mcc. jannaschii*, *Mth. thermolithotrophicus* and *M. vannielii* wurden keine zuckerhaltigen Seitenketten durch PAS-Färbung nachgewiesen (NUBER & KÖNIG, 1986). Dass die Proteine der Methanokokken auch kohlenhydrathaltige Seitenketten besitzen können, zeigt das Flagellin-

Protein von *Methanococcus maripaludis*, welches mittels PAS-Färbung als Glykoprotein bestimmt wurde (JARRELL *et al.*, 1996).

Die Sequenzen (Programm Blast 2) der einzelnen S-Layer-Proteine aus der Ordnung Methanococcales zeigten hohe Ähnlichkeiten zueinander (siehe Tab. 16).

Tab. 16 Vergleich der Aminosäuresequenz-Übereinstimmung (%) der S-Layer-Proteine aus der Ordnung Methanococcales

Spezies mit S-Layer-Protein	<i>M. vannielii</i>	<i>M. voltae</i>	<i>Mth. thermolithotrophicus</i>	<i>Mcc. jannaschii</i>	<i>Mt. igneus</i>
<i>M. vannielii</i>		47	49	44	31
<i>M. voltae</i>	44		48	38	31
<i>Mth. thermolithotrophicus</i>	49	50		53	40
<i>Mcc. jannaschii</i>	44	40	53		35
<i>Mt. igneus</i>	35	34	43	39	

Das S-Layer-Protein von *Mth. thermolithotrophicus* wies eine etwa 50 %ige Übereinstimmung mit den mesophilen und hyperthermophilen S-Layer-Proteinen (Ausnahme *Mt. igneus*) auf (siehe Tab. 16). Dies deutet vielleicht daraufhin, dass das thermophile S-Layer-Protein eine Übergangsform darstellt. Für die Proteine aus der Ordnung der Methanococcales wird ihre Evolution aus einem hyperthermophilen Vorfahren angenommen (KESWANI *et al.*, 1996; McDONALD *et al.*, 1999; CLAUS *et al.*, 2002).

Die meisten S-Layer-Proteine enthalten eine N-terminale Leadersequenz, die zur Ausscheidung durch die Zellwand benötigt wird (BOOT & POWELS, 1996; FERNANDEZ & BERENQUER, 2000; SÁRA & SLEYTR, 2000). Diese Signalpeptide weisen eine Sequenz von 19 (*Aeromonas hydrophila*) bis 34 Aminosäuren (*Haloferax volcanii*) auf. Die Abspaltung von dem Vorläuferprotein erfolgt meistens durch eine spezifische Peptidase (NG & JARRELL, 2003). Die Leadersequenz der S-Layer-Proteine aus der Ordnung Methanococcales (siehe Abb. 19) besteht aus 28 Aminosäuren und weist eine Sequenz-Übereinstimmung von ca. 68% auf. Dies deutet auf eine konservierte Anordnung im Leaderpeptidaufbau hin (AKÇA *et al.*, 2002). Die Leadersequenz setzt sich aus einer geladenen, hydrophoben und polaren Region zusammen (VON HEIJNE, 1985; NIELSEN *et al.*, 1997). Im polaren N-terminalen Bereich, bestehend aus acht

Aminosäuren, war die Aminosäuren Lysin verstärkt vertreten. Der hydrophobe Kern des Leaderpeptids setzt sich aus 13 und die polare Region aus sieben Aminosäuren zusammen. Am geladenen C-Terminus erfolgt nach einem Alaninrest die Aminosäurespaltung des Leaderpeptids (NIELSEN *et al.*, 1997).

Bei dem Vergleich der S-Layer-Proteine von mesophilen, thermophilen und hyperthermophilen Vertretern der Ordnung Methanococcales traten in der Aminosäure-Zusammensetzung zwei deutliche Unterschiede auf. Zum einen kennzeichnet die beiden hyperthermophilen S-Layer-Hüllproteine (*Mcc. jannaschii* und *Mt. igneus*) das Vorhandensein von Cystein und zum anderem eine Abnahme im Alanin-Gehalt (Tab. 12). Die beiden Cysteine liegen bei *Mcc. jannaschii* N-terminal und bei *Mt. igneus* sowohl N-terminal und als auch C-terminal in der Proteinsequenz. Das Vorhandensein von schwefelhaltigen Aminosäuren besonders von Cystein ist bei S-Layer-Proteinen im Allgemeinen gering (SLEYTR, 1997; SÁRA & SLEYTR, 2000). Nur bei den methanogenen hyperthermophilen Archaeen *Methanothermus fervidus*, *Methanothermus sociabilis*, *Mcc. jannaschii*, *Mt. igneus* und aus dem neuen Phylum der *Nanoarchaeota* bei *Nanoarchaeum equitans* Kin4-M wurden mehrere Cysteine in der Proteinsequenz ermittelt. Außerdem war bei den (hyper)thermophilen S-Layer-Hüllproteinen eine Zunahme an basischen Aminosäuren und eine Verminderung der nichtpolaren Aminosäuren gegenüber den mesophilen S-Layer-Proteinen nachweisbar (siehe Tab. 17; AKÇA *et al.*, 2002).

Außer den aufgeführten Vertreter der Methanococcales, wurden alle bekannten archaeobakteriellen S-Layer-Proteine von (hyper)thermophilen und mesophilen Spezies miteinander in ihrer Aminosäure-Zusammensetzung verglichen (siehe Tab. 17). Allgemein sind die S-Layer-Hüllproteine in ihrem Aufbau durch einen hohen Anteil an nichtpolaren Aminosäuren und einen niedrigen Gehalt von basischen Aminosäuren charakterisiert. Alle (hyper)thermophilen S-Layer-Hüllproteine weisen gegenüber den mesophilen eine Zunahme von geladenen und Abnahme von polaren Aminosäuren auf (siehe Tab. 17). In Sequenzvergleichen der archaeobakteriellen S-Layer-Proteine wurden Homologien der Hüllproteine zueinander nachgewiesen. Anhand der ermittelten Ähnlichkeiten wurden die Hüllproteine in vier Gruppen unterteilt (CLAUS *et al.*, 2001; CLAUS *et al.*, 2002; AKÇA *et al.*, 2002). Nach folgenden Gemeinsamkeiten und Eigenschaften wurden die S-Layer-Proteine in die vier Gruppen eingeteilt: Aminosäuresequenz-Übereinstimmung, Aminosäure-Zusammensetzung, transkriptionelle und translationelle Erkennungsregion und Leadersequenzidentität. In der vierten Gruppe sind alle S-Layer-Proteine zusammengefasst, die keine Gemeinsamkeiten zu den S-Layer-Hüllproteinen aus der Gruppe I-III aufzeigen.

Tab. 17 Eigenschaften der archaebakteriellen S-Layer-Proteine

Spezies	Wachstumstemperatur (°C)	Aminosäure-Zusammensetzung				Hydrophathizität ^b	Isoelektrischer Punkt ^b (pI)	Primärsequenz (Aminosäuren)	Molekulargewicht ^b (Dalton)	Accession Nummer ^c
		Unpolar ^a	Polar ^a	Sauer ^a	Basisch ^a					
<i>Methanococcus vannielii</i>	37	52.8	24.4	14.3	8.2	0.088	4.29	566	59064	AJ308553
<i>Methanococcus voltae</i>	37	48.5	24.2	18.6	8.6	- 0.091	4.15	565	59707	M59200
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	65	48.5	23.5	17.9	10.1	- 0.079	4.30	559	59.225	AJ308554
<i>Methanocaldococcus jan- naschii</i>	85	45.0	23.3	20.5	11.2	- 0.296	4.27	558	60547	AJ311636
<i>Methanotorris igneus</i>	88	47.2	25.9	15.4	11.1	- 0.157	4.68	519	55669	AJ564995
<i>Pyrococcus abyssi</i>	97	48.3	26.0	15.0	10.7	- 0.119	4.68	604	65985	CAB49670
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	95	45.3	24.1	18.2	12.3	- 0.308	4.62	236	26128	BAA30501
<i>Methanosarcina acetivo- rans C2A</i>	37-40	42.1	38.8	10	9	- 0.193	5.15	557	62086	AAM04705
<i>Methanosarcina mazei</i>	37	40.2	46.8	5.2	7.7	- 0.315	8.9	652	68878	X77929
<i>Methanobakterium ther- moautotrophicum</i>	65	46.5	39.4	6.1	7.9	- 0.086	8.75	574	61922	AAB85224
<i>Methanothermus fervidus</i>	85	43.7	36.9	9.1	10.2	- 0.236	8.47	593	65481	X58297
<i>Methanothermus sociabilis</i>	85	43.4	37.3	9.1	10.2	- 0.245	8.47	593	65503	X58296
<i>Halobacterium halobium</i>	37	40.6	33.4	21.6	4.4	- 0.543	3.60	852	89814	J02767
<i>Haloferax volcanii</i>	37	43.0	35.2	19.0	2.7	- 0.275	3.44	827	85189	M62816
<i>Haloarcula japonica</i>	37	43.0	30.2	23.5	3.2	- 0.462	3.40	862	89814	D87290
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	88	42.9	31.5	11.0	14.4	- 0.294	9.10	401	46681	NP_941609
<i>Euryarchaeate 37F11</i>	nicht bestimmt	43.9	34.9	15.3	5.8	- 0.154	4.10	564	61747	AAF97179
<i>Staphylothermus marinus</i>	92	47.6	37.5	19	2.7	0.169	4.44	1524	166325	S68553

^a mol (%) ermittelt nach KARLSON et al. (1994) ^b ermittelt nach ProtPram ^c Datenbank EMBL

Gruppe I Ordnung Methanococcales und Gattung *Pyrococcus*

Gruppe II Gattung *Methanosarcina*, *Methanobakterium* und *Methanothermus*

Gruppe III Gattung *Halobacterium*, *Haloferax* und *Haloarcula*

Gruppe IV Gattung *Nanoarchaeum*, *Staphylothermus* und *Euryarchaete*-Klon

Zur Überprüfung thermophiler Eigenschaften wurden die Primärsequenzen der S-Layer-Proteine von *Methanococcus (M.) voltae* und *M. vannielii* (mesophil), *Methanothermococcus thermolithotrophicus* (thermophil) und *Methanocaldococcus jannaschii* und *Methanotorris igneus* (hyperthermophil) auf Unterschiede hin untersucht. Während archaebakterielle S-Layer-Proteine im Allgemeinen vorwiegend durch nicht geladene Resten charakterisiert sind, zeigte die Überprüfung der Aminosäure-Zusammensetzung, dass thermophile und hyperthermophile Methanokokken einen gesteigerten Gehalt an geladenen Resten aufwiesen. Die gleiche Tendenz wurde auch für andere (hyper)thermophile Spezies beschrieben (CLAUS *et al.*, 2002). Eine Ausnahme bilden die hyperthermophilen S-Layer-Proteine von *Methanothermus (Mts.) fervidus* und *Methanothermus sociabilis* die einen höheren Gehalt an Asparagin anstatt Asparaginsäure aufweisen (BRÖCKL *et al.*, 1991). Für die Thermostabilität der Proteine wurden extrinsische Modifikationen (z.B. Glykosilierung), kovalente Querverbindungen oder Salzbrückenbindungen erörtert (ENGELHARDT & PETERS, 1998, VIEILLE & ZEIKUS, 2001). Nach Datenbankanalysen der Peptidsequenz der S-Layer-Proteine aus der Ordnung Methanococcales wurden theoretische N-glykosidische Bindungsstellen ermittelt. Diese nahmen von den hyperthermophilen zu den mesophilen Spezies ab. Deshalb wurde das hyperthermophile S-Layer-Protein von *Mcc. jannaschii* mit sieben potentiellen N-glykosidischen Bindungsstellen experimentell auf Glykosilierung hin untersucht. Die Ergebnisse bestätigten die theoretische Annahme (siehe Abb. 13). Es wurden nur bei wenigen S-Layer-Proteinen kohlenhydrathaltige Seitenketten wie z.B. bei *Mts. fervidus* (BRÖCKL *et al.*, 1991; KÄRCHER *et al.*, 1993), *Mts. sociabilis* (BRÖCKL *et al.*, 1991), *Sulfolobus spp.* (GROGAN, 1989), *Staphylothermus marinus* (PETERS *et al.*, 1995), *Geobacillus (Gb.) stearothermophilus* ATCC12980 (EGELSEER *et al.*, 2001) und *Gb. stearothermophilus* NRS 2004/3a (SCHAFFER *et al.*, 2002) experimentell nachgewiesen. Demnach könnte der Zuckeranteil vom S-Layer-Hüllprotein von *Mcc. jannaschii* bei der Ausbildung der Thermostabilität eine gewisse Rolle spielen. Ein häufig diskutierter Faktor der Thermostabilität von Proteinen ist die Ausbildung von Salzbrücken. So weisen die thermophilen und hyperthermophilen Spezies einen höheren Anteil an geladenen Resten als die mesophilen auf. Für hyperthermophile Proteine von *Pyrococcus furiosus* wurden

Netze von in einander gebundenen Salzbrücken beschrieben (YIP *et al.*, 1995). Aufgrund der Ladungszunahme könnte die Thermostabilität der S-Layer-Hüllproteine bei hohen Temperaturen auf gesteigerte Salzbrückenbindungen beruhen. Salzbrückenbindungen sind wichtig für die S-Layer-Stabilität bei extrem halophilen (SUMPER, 1993) und anderen Bakterien (SÁRA & SLEYTR, 1987). Auch von anderen Autoren (VOGT *et al.*, 1997; HANEY *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2000, CHRISTODOULOU & VORGAS, 2002) werden Salzbrücken für die Ausbildung der Thermostabilität von thermophilen Proteinen diskutiert. Ein umfassender Vergleich thermophiler und mesophiler Proteine offenbarte ebenfalls einen Anstieg von geladenen Resten in thermophilen Sequenzen (CAMBILLIAU & CLAVERIE, 2000; DAS & GERSTEIN, 2000, VIELLE & ZEIKUS, 2001). Außer der allgemeinen Aminosäure-Zusammensetzung können auch einzelne Aminosäuren wie z.B. Cystein die Stabilität eines Proteins erhöhen. Die beiden Cysteine in der Peptidsequenz der hyperthermophilen S-Layer-Proteine von *Mcc. jannaschii* und *Mt. igneus* könnten durch Disulfidbindung eine zusätzliche Proteinstabilisierung bei hohen Temperaturen bewirken. Cystein wurde interessanter Weise bei allen thermophilen Spezies gefunden (CLAUS *et al.*, 2002). Außerdem weisen die hyperthermophilen S-Layer-Hüllproteine der methanogenen Spezies einen höheren Gehalt an β -Faltblattstrukturen gegenüber den mesophilen S-Layer-Hüllproteinen auf, die ihnen ebenfalls eine Thermostabilität verleiht (BRÖCKL *et al.*, 1991). Weitere Faktoren die in der Literatur für die Thermostabilisierung bei intrazellulären Proteinen diskutiert werden, sind kompatible Solute, wie z.B. Mannosylglycerat und Diglycerinphosphate (BORGES *et al.*, 2002; SANTOS & DA COSTA, 2002).

Das hyperthermophile S-Layer-Protein slmj1 von *Mcc. jannaschii* wurde auf Wechselwirkungen mit verschiedenen Metall-Kationen, sowie Verhalten bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten untersucht. Für das Hüllprotein wurde im Verlauf der Temperaturerhöhung eine Verschiebung der apparenten molekulare Masse im SDS-Gel von 50 auf 80 kDa nachgewiesen (siehe Abb. 13 Spur 3, 4). Bei der physiologischen Wachstumstemperatur von 85 °C wies das S-Layer-Hüllprotein eine apparente Molmasse von 80 kDa auf. Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit anderen Proteinen gemacht, z.B. für das Sporenprotein cotA aus *Bacillus subtilis* (MARTINS *et al.*, 2002). Im Verlauf der Temperaturerhöhung wurde eine Verschiebung der apparenten molekulare Masse des cotA-Proteins von 30 auf 65 kDa nachgewiesen. Für das Auftreten der beiden Konformationszustände wurde angenommen, dass die 65 kDa und die 30 kDa Proteine vollständig und unvollständig entfaltete Formen des Enzyms darstellen. Diese Folgerung könnte auch für das S-Layer-Protein slmj1 zutreffen. Deshalb wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Proteinkonformation getestet. Bei Raumtemperatur und einem pH-Bereich von 2-10 liegen normalerweise zwei Proteine mit einer apparenten

Molmasse von 50 und 80 kDa vor. Nur im gemäßigt sauren pH-Bereich 4-5 lag das S-Layer-Protein nur als 50 kDa Proteinbande vor (siehe Abb. 14). Dieser pH-Bereich entspricht dem ermittelten isoelektrischen Punkt (pH 4,27) des Hüllproteins von *Mcc. jannaschii*.

Da die Proteinsequenz des S-Layer-Proteins von *Mcc. jannaschii* eine Calciumbindungsdomäne aufwies, wurde es mit verschiedener zweiwertigen Kationen auf Wechselwirkungen hin untersucht. Überraschender Weise konnte nur für Mangan ein Effekt festgestellt werden. Nach der Hitzebehandlung des S-Layer-Hüllproteins mit unterschiedlichen Mangankonzentrationen konnte eine bevorzugte Stabilisierung der apparenten molekularen Masse von 50 gegenüber 80 kDa aufgezeigt werden. Ab einer Konzentration von 5 mM verhinderte Mangan die temperaturabhängigen Konformationsänderung zum 80 auf 50 kDa. Dies könnte auch für das Überleben von *Mcc. jannaschii* in seinem ursprünglichen Biotop von Bedeutung sein. Nach den Daten der chemischen Zusammensetzung des Wassers aus der Hydrothermalquelle im ostpazifischen Rücken, liegt Mangan in einer Konzentration von etwa 1 mM vor. Es könnte sein, dass zweiwertige Kationen, (Mn^{2+})-Ionen, zur Stabilisierung benötigt werden. Vielleicht beruht die Stabilisierung auf der Ausbildung von Salzbrücken. Für das heterolog exprimierte Enzym Amylopullanase von *Pyrococcus furiosus* wurde eine Förderung der Thermostabilität, Enzymaktivität und Substrataffinität durch das zweiwertige Kation Ca^{2+} -Ionen aufgezeigt (DONG *et al.*, 1997). Ab einer Konzentration von 5 mM verhinderte Calcium die Konformationsänderung bei 85 °C von 50 auf 90 kDa. Diese Thermostabilisierung durch das zweiwertige Calcium förderte somit die Enzymaktivität der Amylopullanase. Außerdem vervierfachte sich die Halbwertszeit des Enzyms bei 90 °C von 11 auf 44 Stunden. Danach könnte auch das zweiwertige Mangan wie Calcium eine Thermostabilisierung des S-Layer-Proteins von *Mcc. jannaschii* mit einer apparenten Molmasse von 50 kDa bewirken. Basierend auf den Resultaten der Wechselwirkung des S-Layer-Hüllproteins mit Mn^{2+} , pH-Wert und Temperatur, könnte gefolgert werden, dass das Protein mit einer apparenten Molmasse von 50 kDa die tatsächliche physiologische Konformation darstellt. Eine weitere Annahme für die Konformationsänderung des Proteins wäre, dass das S-Layer-Protein vielleicht ein flexibles Protein darstellt.

Zur Analyse und dem Vergleich der Expressionsbereiche wurden die mutmaßlichen Promotor-, Shine-Daldarno-Regionen und der Translationsstartpunkt der S-Layer-Gene bestimmt. Basierend auf Literaturdaten (THOMM, 1996) wurden für die transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen der Ordnung Methanococcales Signalsequenzen vorgeschlagen (siehe Tab. 18). Die Promotorregionen (BRE-, TATA-Box und Transkriptionsstartpunkt) der

Ordnung Methanococcales entsprechen größtenteils der mutmaßlichen Konsensus-Sequenz der methanogenen Archaeen (THOMM, 1996). Die Transkription wird vom Promotor durch die jeweiligen Erkennungsregionen gesteuert. Die BRE-Box (transcription factor B recognition element) wird vom Transkriptionsfaktor TFB erkannt, der einen TFB-BRE Komplex bildet und die korrekte Positionierung der Transkriptionsfaktoren am Promotor unterstützt (THOMM, 2000). Die nachgeschaltete TATA-Box ist der entscheidende Impuls für die Promotorstärke, die auch die Position der Transkriptionsstelle bestimmt (THOMM, 2000).

Tab. 18 Vorschlag für Promotorregion, Shine-Dalgarno-Region und Translationsstart der S-Layer-Gene der Ordnung Methanococcales

Erkennungsregion	Sequenz	Position	Konsensus-Sequenz ¹⁾
<u>Promotor</u>			
a. BRE-Box			
<i>Mccj</i>	-CGTAA-	-33 bis -29	-CGAAA-
<i>Mti</i>	-GGTAA-	-35 bis -31	
<i>Mtct</i>	-GGAAA-	-35 bis -31	
<i>Mv</i>	-GGAAA-	-40 bis -36	
<i>Mvo I</i>	-GGTAA-	-34 bis -30	
<i>Mvo II</i>	-CGAAA-	- 33 bis -29	
b. TATA-Box			
<i>Mccj</i>	-TTTATATA-	-26 bis -19	-AA/TT TATATA-
<i>Mti</i>	-TTTATATA-	-28 bis -21	
<i>Mtct</i>	-TATATATA-	-28 bis -21	
<i>Mv</i>	-TATAATAA-	-32 bis -25	
<i>Mvo I</i>	-TATATATA-	-27 bis -20	
<i>Mvo II</i>	-AATAAAAA-	-26 bis -19	
c. Transkriptionsstart			
<i>Mccj</i>	-ATAC-	1	-A/T TGC-
<i>Mti</i>	-ATCG-	1	
<i>Mtct</i>	-ATCC-	1	
<i>Mv</i>	-ATAC-	1	
<i>Mvo I</i>	-ATTT-	1	
<i>Mvo II</i>	-ATAC-	1	
<u>Shine-Dalgarno-Sequenz</u>			
<i>Mccj</i>	-AGGTGAT-	33-39	
<i>Mti</i>	-AGGTGAT-	37-43	
<i>Mtct</i>	-AGGGTGA-	64-70	
<i>Mv</i>	-AGGTGAA-	60-66	
<i>Mvo I</i>	-AGGTGAA-	444-450	
<i>Mvo II</i>	-AGGTGAA-	204-210	
<u>Translationsstart</u>			
<i>Mccj</i>	-ATG-	45	
<i>Mti</i>	-ATG-	49	
<i>Mtct</i>	-ATG-	77	
<i>Mv</i>	-ATG-	72	
<i>Mvo I</i>	-ATG-	456	
<i>Mvo II</i>	-ATG-	216	

¹⁾ THOMM (1996); *Mccj* - *Methanocaldococcus jannaschii*; *Mti* - *Methanotorris igneus*; *Mtct* - *Methanothermococcus thermolithotrophicus*; *Mv* - *Methanococcus vannielii*; *Mvo* I und II - *Methanococcus voltae*

Die S-Layer-Gene der hyperthermophilen Spezies von *Mcc. jannaschii* und *Mt. igneus* wiesen eine hohe Übereinstimmung in den transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen zueinander und eine engere Anordnung der Gensequenzen im Genom auf (siehe Tab. 18). Dies könnte vermutlich eine Anpassung des Genoms an extremen Temperaturen darstellen. Nach dem Vergleich der Promotorregionen wurde folgende mutmaßlichen Konsensus-Sequenzen für die BRE-Box: -C/G G T/A AA-, die TATA-Box: -AA/TT TA AAA/TTT A- und den Transkriptionsstartpunkt: -AT A/T/C T/C/G- ermittelt. Im Allgemeinen besitzen die S-Layer-Gene der Ordnung Methanococcales nur einen Promoter, wobei für *M. voltae* ein Tandempromotor beschrieben wurde (KANSY *et al.*, 1994).

Die Ribosomenbindungsstelle befindet sich 3-9 Nukleotide stromaufwärts vom Translationsstartpunkt (DALGAARD & GARRETT, 1993) und bindet an eine komplementäre Region am 3'-Ende der 16 S ribosomalen RNA. Die Translation der S-Layer-mRNAs von *Mcc. jannaschii* und *Mth. thermolithotrophicus* wurde vermutlich durch eine Folge von acht bzw. drei Stopcodons beendet. Unter methanogenen Archaeen sind aufeinander folgende Stopcodons relativ oft vertreten (DALGAARD & GARRETT, 1993). Nach dem Translationsende folgte eine Poly A-/ Poly T-Sequenz die eine Haarnadelstruktur bildet, die die Transkription beendet. Diese Haarnadelstruktur zeichnet sich durch lange, unregelmäßige Wölbungen und innere Loops aus (DALGAARD & GARRETT, 1993). Die Haarnadelstrukturen für die S-Layer-Gensequenz von *Mcc. jannaschii* und *Mth. thermolithotrophicus* entsprechen dieser Form.

4.2 Gen-Klonierung und Charakterisierung des heterolog exprimierten S-Layer-Proteins (slmj1)

Aus der Literatur sind nur wenige archaebakterielle S-Layer-Proteine bekannt, die durch Klonierung analysiert wurden. So wurden die S-Layer-Gensequenzen von *Methanococcus voltae* (DHARMAVARAN *et al.*, 1991), *Methanosarcina mazei* S-6 (MAYERHOFER *et al.*, 1998), *Methanothermus fervidus* und *Methanothermus sociabilis* (BRÖCKL *et al.*, 1991) durch Klonierung in *E. coli* erhalten. Mit dem auch in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektor pET28a wurde das S-Layer-Mutantenprotein von *Geobacillus stearothermophilus* ATCC

12980 erfolgreich integriert (EGELSEER *et al.*, 2001). Das Gen für das unreife S-Layer-Protein *slmj1* von *Mcc. jannaschii* wurde über die Restriktionsschnittstellen NdeI/ SalI in den Expressionsvektor pET28a kloniert. Dieses Konstrukt wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) überführt, welches dort zu einer stabilen Überexpression führte.

Das erhitzte Fusionsprotein wies eine apparente molekulare Masse von 70 und 50 kDa auf. Die Übereinstimmung des Fusionsproteins wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen das S-Layer-Protein *slmj1* aus *Mcc. jannaschii* überprüft. Eine hohe Bindungsspezifität des Antikörpers wurde mit dem Antigen (S-Layer-Protein *slmj1*) nachgewiesen. Für das Hüllprotein von *Mcc. jannaschii* wurde eine apparente Molmasse von 80 und 50 kDa angegeben (CLAUS *et al.*, 2001; AKÇA *et al.*, 2002). Die Molekulargewichtsdifferenz zwischen dem nativen und heterolog expremierten S-Layer-Protein könnte einerseits durch Glykolisierung des nativen Hüllproteins oder andererseits durch einen veränderten Faltungszustand des Fusionsproteins bedingt sein. Für *E. coli* wird angenommen, dass im Allgemeinen an die Proteine keine kohlenhydrathaltigen Ketten angebunden werden. Aber dennoch wurden bei *E. coli* drei glykolisierte Proteine beschrieben (UPRETI *et al.*, 2003). Für das Hüllprotein von *Mcc. jannaschii* wurden sieben potentiellen N-glykosidische Bindungsseiten gefunden. Experimentell wurde für das S-Layer-Protein von *Mcc. jannaschii* eine Glykolisierung unterhalb von einem Prozent detektiert. Nach diesen Resultaten sollte die vorliegende Differenz nicht nur auf einer Glykolisierung, sondern auf einer veränderten Konformation des Fusionsproteins beruhen. Außerdem lag das Fusionsprotein in zwei weiteren Faltungszuständen mit einer apparenten molekularen Masse von 40 und 30 kDa vor. Diese beiden Molekulargewichte werden vermutlich durch inkorrekte Faltungen des unlöslichen Proteins hervorgerufen.

Das heterolog expremierte S-Layer-Protein wurde auf Wechselwirkungen mit verschiedenen chemischen Kationen und Reaktionen auf unterschiedliche Temperaturen und pH-Werte untersucht. Für das Fusionsprotein wurde im Verlauf der Temperaturerhöhung eine Verschiebung der apparenten Molmasse von 40 auf 70 kDa nachgewiesen (siehe Abb. 34). Das heterolog expremierte S-Layer-Protein wies eine temperaturbedingte frühere Konformationsänderung als das native Hüllprotein *slmj1* auf. Dies deutet auf eine erhöhte Temperaturempfindlichkeit des Fusionsproteins gegenüber dem nativen S-Layer-Proteins hin. Außerdem wurde das inkorrekt gefaltete Protein durch die Temperaturerhöhung teilweise in den korrekten Faltungszustand überführt. Konformationsänderungen bei einer Temperaturerhöhung wurden auch für das heterolog expremierte Enzym Amylopullanase von *Pyrococcus furiosus* beschrieben (DONG *et al.*, 1997). Außer der Temperatur wurde auch der Einfluss des pH-Werts

auf die Proteinkonformation untersucht. Auch bei Raumtemperatur und bei leicht bis stark sauren pH erschien der Proteinfaltungszustand mit einer apparenten molekularen Masse von 70 kDa (siehe Abb. 35).

Überhaupt keinen Einfluss auf die Proteinfaltung des heterologen Expressionsproteins hatten die zweiwertigen Kationen. Bei dem nativen S-Layer-Protein *slmj1* wurde mit Mangan ein Zusammenhang aufgezeigt. Dies deutet daraufhin, dass das Fusionsprotein bei extremen Temperaturbedingungen die Proteinkonformation in die apparente Molmasse von 70 kDa ändert. Der Unterschied bei der Thermostabilisierung mit Mangan könnte auf der veränderten Konformation beruhen.

4.3 Isolierung und Charakterisierung der S-Layer-Proteine aus der Familie der Bacillaceae

Die Hüllproteine aus der Familie der *Bacillaceae* wurden molekulargenetisch und proteinchemisch charakterisiert und analog zu den Archaeen auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten untersucht. Für den Vergleich wurden zuerst die S-Layer-Gen- und Proteinsequenzen von *Bacillus (B.) sphaericus* DSM 396, *Geobacillus (Gb.) stearothermophilus* DSM 2358, *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T ermittelt. Bei *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 wurde eine Teilsequenz von 439 Aminosäuren bestimmt.

Nach molekulargenetischen Analysen besteht das S-Layer-Protein von *B. sphaericus* DSM 396 aus 810 Aminosäuren. Das Protein hat eine kalkulierte molekulare Masse von 85,5 kDa und seinen isoelektrischen Punkt (pI) bei 5,56. Die meisten S-Layer-Hüllproteine benötigen eine N-terminale Leadersequenz zur Ausscheidung durch die Zellwand (BOOT & POWELS, 1996; FERNANDEZ & BERENQUER, 2000; SÁRA & SLEYTR, 2000). Die Signalsequenz von *B. sphaericus* DSM 396 besteht aus 31 Aminosäuren. Danach besitzt das reife Hüllprotein einen theoretischen pI von 5,27, der mit der in der Literatur beschriebenen pI von 5,35 übereinstimmt (HASTIE & BRINTON, 1979). In der SDS-PAGE wies das Protein eine apparente Molmasse von ca. 120 kDa auf. Dieses Resultat entspricht Maldi-Messungen, nach denen das Hüllprotein eine molekulare Masse von 126 und 106 kDa besitzt. Eine ähnliche Diskrepanz zwischen den theoretischen und experimentellen Daten wurde für das S-Layer-Protein von *Bacillus thuringiensis* Stamm 020 aufgezeigt. Das Protein hatte eine kalkulierte Masse von 87,2 kDa und eine belegte apparente Molmasse von 120 kDa (XU *et al.*, 2003). Um die Wi-

dersprüchlichkeit zwischen den theoretischen und experimentellen Daten von *B. sphaericus* DSM 396 aufzuklären, wurde die Masse des Protein-Kristalls (Debaerdemaeker, Universität Ulm) überprüft. Eine mögliche Erklärung für die 85 kDa S-Layer-Kristallmasse wäre eine spätere Proteinverkürzung. Nach der SDS-PAGE des Kristalls (Mutterlauge/Kristall) wurden zwei Proteinbanden mit einer apparenten Molekularmasse von 85 und 35 kDa detektiert (siehe Abb. 20b). Nach Proteinsequenzierung wurden für beide Proteinbanden die Sequenz A-PEAGAAAVKAVNNT ermittelt (siehe Tab. 10a). Mittels Sequenzvergleich wurde der N-Terminus als Teilsequenz des S-Layer-Proteins von *B. sphaericus* DSM 396 bestimmt. Dies deutet vermutlich auf eine Proteinabspaltung im Verlauf der Kristallisation hin. Eine posttranslationelle Prozessierung wurde für die zwei S-Layer-Proteine von *Clostridium difficile* nachgewiesen. Aus einem gemeinsamen S-Layer-Vorläufergen wurden die zwei S-Layer-Hüllproteine abgespalten (CALABI et al., 2001). Basierend auf diese Teilsequenz wurde für das S-Layer-Hüllprotein eine theoretische Molmasse von 61,7 kDa bestimmt (ProtPram). Dies deutet daraufhin, dass das Protein vermutlich als Dimer vorliegt. Zum anderem wurde überprüft, ob die ermittelte Gensequenz ein zweites nicht detektiertes Hüllprotein codiert wie in der Literatur für *B. sphaericus* WHO 2362 beschrieben (BOWDITCH et al., 1989). Bei diesem Stamm codiert das Gen 125 für das S-Layer-Hüllprotein mit einer Masse von 125 kDa, während das Gen 80 als stummes Gen vorliegt. Außerdem wies dieser Genbereich überhaupt keine Ribosomenbindungsstelle, N-terminale Leadersequenz oder SLH-Domäne auf. Dennoch hatte die Proteinsequenz von Gen 80 im Bereich von 13-618 Aminosäuren eine 81 %ige Übereinstimmung mit der Proteinsequenz von Gen 125. Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Massen könnte eine feste Bindung zwischen dem S-Layer-Protein und einem anderem Protein sein. Für das S-Layer-Protein von *Staphylothermus marinus* wurde eine feste Bindung mit einer Protease (STalk-assoziiated ArchaeBacterial Endoproteinase) nachgewiesen (MAYR et al., 1996; ENGELHARDT & PETERS, 1998).

Aus der Gattung *Bacillus* wurde eine die Subspezies *B. fusiformis* (Stämme: B3, DSM 2898T) von *B. sphaericus* zur S-Layer-Genanalyse verwendet. Für das S-Layer-Hüllprotein von *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T wurde eine Primärsequenz von 575 bzw. 576 Aminosäuren ermittelt. Der Vergleich der Primär- und Gensequenzen der S-Layer-Proteine von *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T zeigte eine 95%ige Sequenz-Übereinstimmung. Diese hohe Sequenzähnlichkeit spiegelt die verwandtschaftliche Nähe der beiden Stämme wider. Nach einem Vergleich der 16S rRNA wurde eine phylogenetische Übereinstimmung von 99% ermittelt. Ein ähnlicher Vergleich wurde mit den S-Layer-Genen aus der Familie der *Lactobazillen* durchgeführt. Danach wurde für die Layer-Gene von *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

(slpA) und dem nahverwandten *L. helveticus* eine 80%ige Sequenz-Übereinstimmung nachgewiesen (SLEYTR et al., 1999).

Die S-Layer-Proteinteilsequenz (1-576 AS) von *B. sphaericus* WHO 2362 wurde mit den beiden Hüllproteinen von *B. fusiformis* verglichen. Im N-terminalen Bereich der S-Layer-Proteinsequenz (1-292 AS) von *B. fusiformis* B3, DSM 2898T und *B. sphaericus* WHO 2362 wurde eine Sequenzähnlichkeit von 99,7% nachgewiesen, danach fiel im restlichen Teil der Sequenz die Übereinstimmung auf 42% ab. Ähnliche Resultate wurden bereits für die S-Layer-Proteine von *Geobacillus (Gb.) stearothermophilus* PV 72/p6 (SbsA) und ATCC 12980 (SbsC) (JAROSCH et al., 2000) und *Bacillus anthracis* Ames für die Gene EA1 und Sap (BAHL et al., 1997) erhalten. Für *Gb. stearothermophilus* wurde nach Sequenzvergleich der Hüllproteine SbsA und SbsC N-terminal (31-270 AS) eine 85% und bei *B. anthracis* N-terminal (1-200 AS) eine 66% Übereinstimmung aufgedeckt.

Alignments der bekannten S-Layer-Proteine aus der Familie der *Bacillaceae* zeigten für alle 439 N-terminalen Aminosäuren, dass sie eine Sequenzähnlichkeit von 20 bis 30% zueinander hatten (siehe Tab. 20). Eine Ausnahme bildeten die S-Layer-Proteine aus dem Stamm *Geobacillus stearothermophilus*, die nur mit phylogenetisch nah verwandten Hüllproteinen eine signifikante Homologie aufwiesen (siehe Tab. 20). Der N-Terminus der aufgeführten S-Layer-Proteine stellt offensichtlich ein konserviertes Strukturelement dar.

Die S-Layer-Proteine von Gram-positiven Bakterien, wie z.B. aus der Gattung *Bacillus* werden N-terminal durch SLH (S-Layer Homology)-Domänen charakterisiert. Für *B. fusiformis* B3 (siehe Abb. 44) und DSM 2898T wurden N-terminal drei SLH-Domänen ermittelt. Die SLH-Domänen sind für die Verankerung des S-Layer-Proteins über nichtkovalente Bindungen mit der darunter liegenden Zellgrenzfläche wie z.B. Peptidoglycan (SÁRA et al., 1998) (MESNAGE et al., 2000) oder an ein sekundäres Zellwandpolymer (RIES et al., 1997; SÁRA et al., 1998; ILK et al., 1999, JAROSCH et al., 2001) verantwortlich.

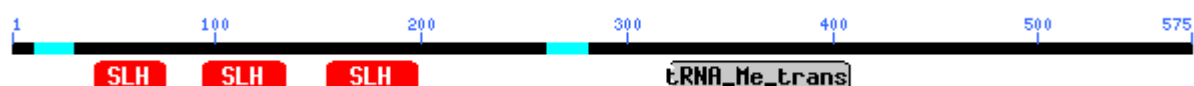


Abb. 44 Schematische Darstellung der Gesamtsequenz des S-Layer-Proteins von *B. fusiformis* B3 mit den drei N-terminal vorliegenden SLH-Domänen und einer Transfer RNA-Methyltransferase Domäne (Blast Search).

Nach Sequenzvergleichen von S-Layer-Proteinen aus Gram-positiven Bakterien wurde erstmals das Vorhandensein einer zellwandbindenden Domäne durch FUJINO *et al.* (1993) und LUPAS *et al.* (1994) vorgeschlagen. Die Autoren identifizierten ein Modul aus 55 Peptiden, das 10-15 konservierte Aminosäuren enthielt und als SLH-Domäne bezeichnet wurde. Bis heute sind über 40 Proteine von Gram-positiven Bakterien und auch einigen Gram-negativen Bakterien, mit einer bis drei SLH-Domänen, beschrieben (ENGELHARDT & PETERS, 1998).

Ein weiteres konserviertes Strukturelement ist das Signalpeptid, welches zur Ausscheidung des S-Layer Proteins durch die Zellwand benötigt wird (BOOT & POWWELS, 1996; FERNANDEZ & BERENQUER, 2000; SÁRA & SLEYTR, 2000). Für *B. sphaericus* (P1, CCM 2177, WHO 2362) und *B. fusiformis* (B3, DSM 2898T) wurde jeweils eine identische N-terminalen Leadersequenz von 30 Aminosäuren nachgewiesen (siehe Abb. 35a). Dies wiederum deutet auf eine konservierte Entwicklung der Leadersequenzen zur Ausschleusung oder Durchtritt durch die Zellwand hin. Das Signalpeptid vom *B. sphaericus* und *B. fusiformis* setzt sich ebenfalls wie bei der Ordnung Methanococcales aus drei typischen Bereichen zusammen: eine polare N-terminaler Bereich, einen hydrophoben Kern und ein positiv geladene C-terminale Region (VON HEIJNE, 1985; NIELSEN *et al.*, 1997).

Anhand der Proteinsequenz wurde für die Hüllproteine von *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T eine theoretische Molmasse von 62 kDa nachgewiesen. Die theoretisch und experimentell (120 kDa in SDS-PAGE) ermittelten molekulare Massen für die S-Layer-Proteine wiesen gravierende Unterschiede auf. In MALDI-Messungen wurden für das Hüllprotein von *B. fusiformis* B3 Molmassen von 118,4 und 58,9 kDa ermittelt (siehe Abb. 30). Letztere korreliert sehr gut mit der theoretischen Molmasse von 58,9 kDa für das reife S-Layer-Protein von *B. fusiformis* B3. Danach würde das Protein als Dimer bzw. Monomer vorliegen. Eine Dimerisierung könnte durch kovalente bzw. nichtkovalente Bindungen erfolgen. Nach den vorliegenden Resultaten kann eine nichtkovalente Bindung ausgeschlossen werden, da im Verlauf der Isolierung des S-Layer-Proteins eine solche Bindung aufbrechen würde. Allerdings könnte das MALDI-Signal bei 58,9 kDa auch ein messtechnisches Artefakt darstellen ($m/2$). Eine Dimerbildung wurde für das S-Layer-Protein aus *Methanosarcina mazei* S-6 über Disulfidbindungen nachgewiesen (JING *et al.*, 2002).

Die Sequenz-Übereinstimmung zwischen den S-Layer-Proteinen von *B. sphaericus* (P1, WHO 2362, CCM 2177) und *B. fusiformis* (B3, DSM 2898T) spiegelt sich auf der regulatorischen Genebene wider. Die Hüllproteine wiesen eine weitgehende Übereinstimmung der transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen auf (siehe Tab. 20). Die Promo-

torregion umfasst drei spezifische Erkennungsregionen die durch die RNA-Polymerase erkannt werden; Upstream Promotor (UP) Element, -35-Box und Pribnow-Box (siehe Abb. 45).

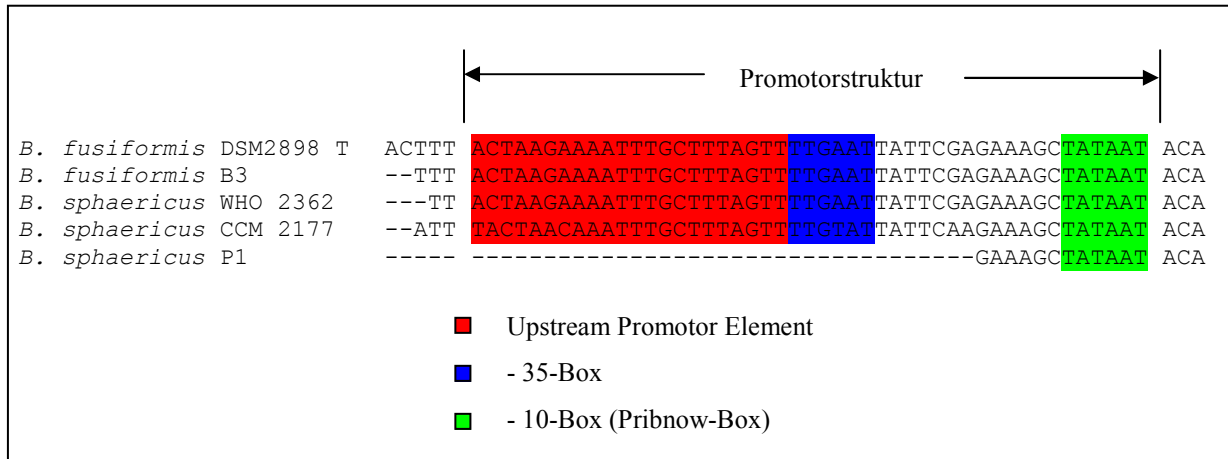


Abb. 45 Promotorstruktur der S-Layer-Gene von *B. fusiformis* (DSM 2898T, B3) und *B. sphaericus* (WHO 2362, CCM 2177, P1)

Stromaufwärts der -35-Box ist das UP-Element lokalisiert, das ein weiteres Bestandteil des bakteriellen Promotors darstellt, der die Transkription durch Interaktion mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase verstärkt (ESTREM *et al.*, 1998). Das UP Element befindet sich in einem AT-reichen Sequenzbereich zwischen -40 bis -60 mit 22 Nukleotiden. Für diese Erkennungsregion wurde die Consensus Sequenz 5' nnAAA A/T A/T T A/T TTTTnnAA-AAAnn 3' angegeben (ESTREM *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 1998). Die -10 - und -35-Box des Promotors werden durch die σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase erkannt (DOMBROSKI *et al.*, 1992). Alle drei Erkennungsregionen gemeinsam steuern die Transkriptionsrate des S-Layer-Proteins. Nach dem Vergleich der Promotorelemente wurden mutmaßlichen Konsensus-Sequenzen für die -35-Box -TGA A/T AT- und -10-Box -TATAAT- ermittelt (siehe Abb. 45). Nach den vorliegenden Daten besitzen die S-Layer-Gene von *B. sphaericus* (P1, WHO 2362, CCM 2177) und *B. fusiformis* (B3, DSM 2898T) nur einen Promotor zur Transkription. Bei *Lactobacillus brevis* wurden für die Expression des S-Layergens zwei Promotoren nachgewiesen (KAHALA *et al.*, 1997).

Aus dem thermophilen Ast der Familie *Bacillaceae* wurde für die Spezies *Geobacillus stearothermophilus* DSM 2358 eine Teilsequenz von 439 Aminosäuren des S-Layer-Proteins er-

mittelt. Für die unvollständige Proteinsequenz wurde ein alkalischer pI von 9,18 berechnet (TIGR, Expsy). Ein ähnlich alkalischer pI wurde für die N-terminale Proteinsequenz (31-269 AS) des S-Layer-Proteins sbsD von *Gb. stearothermophilus* ATCC 12980/G⁺ berechnet, während die restliche Sequenz (270-903 AS) einen pI von 4,84 aufwies. Außerdem besitzt das Hüllprotein sbsD N-terminal einen hohen Aminosäuregehalt an Lysin, Arginin und Tyrosin (EGELSEER *et al.*, 2001). Die gleiche Tendenz wurde auch für das S-Layer-Protein von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 aufgezeigt. Die Hüllproteine von *Gb. stearothermophilus* und *Lactobacillus* besitzen N-terminal keine SLH-Domänen (KUEN *et al.*, 1997; JAROSCH *et al.*, 2000; SÁRA & SLEYTR, 2000). Die S-Layer-Hüllproteine sind stattdessen über die N-terminale Proteinsequenz in dem darunter liegenden sekundäre Zellwandpolymer verankert (EGELSEER *et al.*, 1998; JAROSCH *et al.*, 2000, 2001).

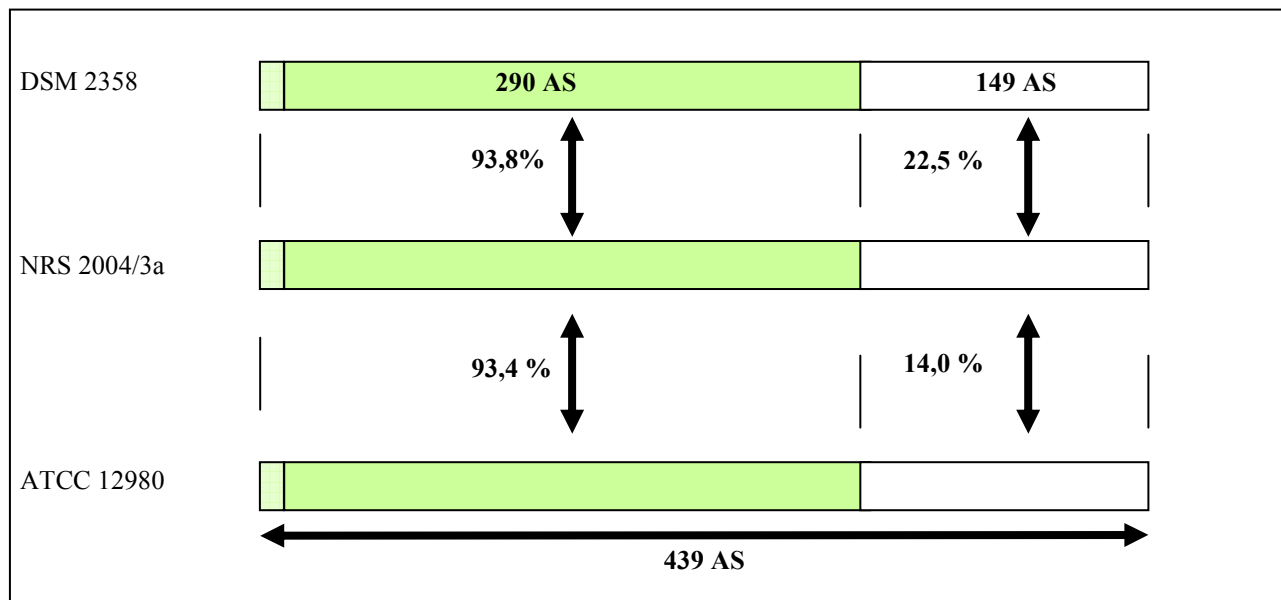


Abb. 46 Schematischer Vergleich der S-Layer-Teilsequenzen von *Gb. stearothermophilus* (DSM 2358, NRS 2004/3a, ATCC 12980).

Pfeil charakterisiert Übereinstimmung zwischen zwei Stämmen in einem definierten Aminosäuresequenz-Bereich. Sequenzidentitäten in % angegeben; N-Terminale Proteinsequenz grün; Leaderpeptid hellgrün schraffiert; C-Terminale Proteinsequenz weiß

Der Vergleich der unvollständigen Aminosäuresequenz des Hüllproteins von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 mit anderen bekannten S-Layer-Proteinen unter Verwendung des Blast-Programms ergaben eine Übereinstimmung von etwa 94% in der N-terminalen Proteinsequenz (1-290 AS) mit *Gb. stearothermophilus* ATCC 12980 (SbsC) und NRS 2004/3a (siehe

Abb. 46). Eine 85%iger Übereinstimmung im N-terminalen Bereich (31-270 AS) wurde bereits für die S-Layer-Proteine SbsA und SbsC von *Gb. stearothermophilus* PV 72/p6 und ATCC 12980 nachgewiesen (JAROSCH *et al.*, 2000). Dies deutet daraufhin, dass die S-Layer-Proteine von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358, NRS 2004/3a, ATCC 12980 und PV 72/p6 funktionell identische N-terminale Domänen besitzen. Außerdem sind die Leadersequenzen von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358, NRS 2004/3a und ATCC 12980 zu fast 100 % identisch (siehe Abb. 35b). Die Gensequenz-Übereinstimmung setzt sich in der transkriptionellen und translationellen Erkennungsregion fort (siehe Tab. 21).

4.4 Vergleich der S-Layer-Proteine aus der Familie der Bacillaceae

Die bekannten und in dieser Arbeit ermittelten Gen- und Primärsequenzen der S-Layer-Proteine aus der Familie der *Bacillaceae* wurden auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede hin untersucht. Die Analyse der mesophilen und thermophilen S-Layer-Hüllproteine erfolgte unter zwei Aspekten: Einerseits wurden die Proteine in Hinblick auf hitzeresistente Eigenschaften und andererseits auf phylogenetische Gemeinsamkeiten untersucht. Anhand des Vergleichs der Aminosäure-Zusammensetzung der mesophilen und thermophilen S-Layer-Proteine waren keine temperaturbedingten Unterschiede nachweisbar. Andererseits weisen die Hüllproteine aus der Familie der *Bacillaceae* charakteristische Eigenschaften bzw. Gemeinsamkeiten auf.

Tab. 19 S-Layer homologe Proteine aus der Familie der *Bacillaceae*

Spezies		Aminosäureeigenschaften				Primärsequenz (Aminosäuren)	Molmasse ^b (Dalton)	Isoelektrischer Punkt ^b	Leaderpeptid ^c (Aminosäuren)	SLH- Domäne ^d	Accession Nummer ^e
		Unpolar ^a	Polar ^a	Sauer ^a	Basisch ^a						
<i>Bacillus (B.) cereus</i>		39.9	37.5	10.2	12.4	577	64599	8.34	29	3	AAP07978
<i>B. anthracis</i> A- mes	Plasmid	42.5	31.2	12.9	13.5	404	45044	6.3	29	3	AAD32358
	Genom	47.7	27.5	12.4	12.2	862	91362	5.7	29	3	CAA68063
<i>B. licheniformis</i> NM 105		47.8	25.5	13.4	13.2	874	92735	5.71	29	3	JC4930
<i>B. thuringiensis</i> NRRL4045		47.4	24.1	14.7	13.7	821	87123	5.43	29	3	CAB63252
<i>B. pseudofirmus</i> OF4		47.8	34.9	10.6	6.6	931	96855	4.42	31	3	AAF68436
<i>B. sphaericus</i>	DSM 396	48.3	32.3	9.9	9.6	810	85509	5.56	31	1	
	CCM 2177	48.2	34.8	9.6	7.4	1268	132047	4.80	30	2	AAF22978
	P1	48.6	32.9	10.5	8.3	1252	129935	4.85	30	3	CAA02847
	WHO 2362	44.2	29.2	14.3	12.3	1176	125226	5.05	30	3	A33856
<i>B. fusiformis</i>	B3	47.1	28.2	13.4	11.3	575	61874	5.01	30	3	
	DSM 2898T	47.4	27.7	13.2	11.4	576	62007	5.09	30	3	
<i>Geobacillus Stea- rothermophilus</i>	ATCC 12980	46.3	30.5	11.6	11.4	1099	115395	5.72	30	0	AAC12757
	NRS 2004/3a	45.0	31.8	11.3	11.9	903	96640	6.67	30	0	AAL46630
	DSM 2358*	44.9	30.5	10.7	13.9	439	47082	9.18	30	0	
	PV 72	45.2	31.4	12.0	11.3	1228	131076	5.40	30	0	I40468
<i>Brevibacillus brevis</i>	HDP31	41.0	27.7	17.2	14.0	1116	123397	4.85	53	2	A35129
	47	40.6	24.6	20.0	14.6	1084	120768	4.65	24	2	A28555

^a mol (%) ermittelt nach KARLSON et al. (1994) ^b ermittelt mit ProtPrm tool ^c mit SignalP (CBS) ^d ermittelt nach NCBI Blast ^e Datenbank EMBL * unvollständig

Tab. 20 Vergleich der Übereinstimmung in der N-terminalen Proteinsequenz AS₁₋₄₃₉ der S-Layer-Proteine aus der Familie der *Bacillaceae*

Spezies		<i>B. anthracis</i>		<i>Bacillus</i>				<i>B. sphaericus</i>				<i>B. fusiformis</i>		<i>Gb. stearothermophilus</i>				<i>Brevibacillus brevis</i>	
		SAP	EA1	<i>lichini-formis</i>	<i>thuriengien-sis</i>	<i>pseudo-firmus</i>	<i>cereus</i>	DSM 396	CCM 2177	P1	WHO 2362	B3	DSM 2898T	ATCC 12980	NRS 2004/3a	DSM 2358	PV 72	HDP31	47
<i>B. anthracis</i>	SAP	-	45	43	45	30	26	22	26	26	22	24	23	37	27	22	-	25	20
	EA1	43	-	79	48	27	26	29	32	33	25	26	28	-	-	-	-	22	22
<i>B. licheniformis</i> NM 105		39	76	-	39	27	29	27	27	26	25	24	24	-	-	-	-	21	22
<i>B. thuriengiensis</i> NRRL 4045		42	45	39	-	28	27	26	25	26	24	26	25	28	29	26	25	26	22
<i>B. pseudofirmus</i> OF4		26	40	28	28	-	31	28	34	33	29	30	28	-	33	28	-	26	25
<i>B. cereus</i> ATCC 14579		26	29	29	28	31	-	28	39	37	37	37	37	-	-	-	-	24	23
<i>B. sphaericus</i>	DSM 396	20	27	29	25	28	29	-	30	38	30	30	30	-	-	-	-	-	-
	CCM 2177	28	29	26	26	26	39	42	-	71	57	57	56	-	-	-	-	27	25
	P1	25	28	28	25	33	37	39	67	-	56	45	44	-	-	-	-	27	23
	WHO 2362	24	26	24	25	31	37	30	62	63	-	69	69	-	-	23	-	28	26
<i>B. fusiformis</i>	B3	24	26	31	26	32	37	30	62	63	69	-	86	-	-	24	-	28	26
	DSM 2898T	23	26	31	26	30	37	30	62	63	69	86	-	-	-	22	-	28	26
<i>Gb. stearothermophilus</i>	ATCC 12980	38	-	-	32	-	-	-	-	-	-	35	-	-	63	60	55	-	-
	NRS 2004/3a	27	-	-	31	33	-	-	-	-	22	25	22	59	-	51	51	-	-
	DSM 2358	-	-	-	25	-	-	-	-	-	22	23	22	71	54	-	46	-	-
	PV 72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	28	61	60	57	-	-	-
<i>Brevibacillus brevis</i>	HDP 31	20	22	22	24	23	24	28	27	27	22	25	24	-	-	-	-	-	77
	47	20	23	23	23	25	26	-	25	24	23	24	24	-	-	-	-	74	-

Alignment von Primärsequenzen AS₁₋₄₃₉ (Blast 2.0, Tatusova & Madden 1999); Übereinstimmungsdaten in %; - = keine signifikante Homologie

Für die vorliegenden S-Layer-Hüllproteine der *Bacillaceae* wurden Signalpeptide von 29-31 Aminosäuren ermittelt, außer für *Brevibacillus brevis* 47 und HDP 31 (24 und 53 AS). N-terminal wurden 1-3 SLH-Domänen nachgewiesen (siehe Tab. 19). Ihre relative molekulare Masse liegt bei 60 bis 132 kDa, der pI zwischen 4 und 7. Außer der Primärsequenz wurden auch die transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen der S-Layer-Gene miteinander verglichen (siehe Tab. 21). Die Daten aus Peptidanalysen und Sequenzvergleichen der Hüllproteine zeigten N-terminal Homologien zwischen den einzelnen Proteinen auf. Nach dem Sequenzvergleich weisen die S-Layer-Proteine von *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T eine 95%ige (1-575 AS), *Gb. stearothermophilus* ATCC 12980, 2004/3a, DSM 2358 eine 93,5%ige (1-290 AS), *B. sphaericus* CCM 2177, P1, WHO 2362 eine 80%ige (1-192 AS) und *B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. thuringensis* eine 69%ige (1-201) Übereinstimmung auf. Ähnlich hohe Sequenz-Übereinstimmungen im N-terminalen Bereich wurden bereits für die Hüllproteine SbsA und SbsC von *Gb. stearothermophilus* (JAROSCH *et al.*, 2000), EA1 und Sap von *B. anthracis* (BAHL *et al.*, 1997) und zwischen *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (slpA) und *L. helveticus* (SLEYTR *et al.*, 1999) erhalten. Aber dennoch unterscheiden sich die jeweiligen Stämme in ihrer C-terminalen Proteinsequenz. Nach folgenden Gemeinsamkeiten und Eigenschaften wurden die S-Layer-Proteine in die vier Gruppen eingeteilt: Aminosäuresequenz-Übereinstimmung, Aminosäure-Zusammensetzung, N-Terminale Sequenzbereich, transkriptionelle und translationelle Erkennungsregion und Leadersequenzidentität. Basierend auf den N-terminalen Sequenz-Gemeinsamkeiten können die S-Layer-Proteine aus der Familie der *Bacillaceae* (siehe Tab. 20) in vier Gruppen eingeteilt werden:

Gruppe I *B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. thuringensis*

Gruppe II Subgruppe a: *B. sphaericus* (CCM 2177, P1, WHO 2362)

Subgruppe b: *B. fusiformis* (DSM 2898T, B3)

Subgruppe c: *B. pseudofirmus*, *B. sphaericus* DSM396, *B. cereus* ATCC 14579

Gruppe III *Gb. stearothermophilus* (ATCC 12980, 2004/3a, DSM 2358)

Gruppe IV *Brevibacillus brevis* (HDP 31, 47)

Die Sequenz-Übereinstimmung innerhalb der jeweiligen Gruppen setzt sich auch auf Genebene bei den transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen fort (siehe Tab. 21).

Tab. 21 Nukleotid-Sequenz der -35-, -10-Box und Ribosomenbindungsstelle (RBS) in den S-Layer-Genen der *Bacillaceae*

Stamm	-35 - Box	-10 - Box	RBS
<i>Bacillus fusiformis</i> B 3	-TTGAAT-	-TATAAT-	-GGAGGAA-
<i>Bacillus fusiformis</i> DSM 2898T	-TTGAAT-	-TATAAT-	-AGGGAGG-
<i>Bacillus sphaericus</i> DSM 2362	-TTGAAT-	-TATAAT-	-GGAGGAA-
<i>Bacillus sphaericus</i> CCM 2177	-TTGTAT-	-TATAAT-	-GGAGGAA-
<i>B. sphaericus</i> P-1	n. b.	-TATAAT-	-GGAGGAA-
<i>B. anthracis</i> Ames	-TTGTAT-	-TACTTT-	-GGAGGAA-
<i>B. licheniformis</i> NM105	-TTGTAT-	-TACTTT-	-GGAGGAA-
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 2358	-TAGCAC-	-TAATAA-	-ATTTTAG-
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC:12980	-TAGCAC-	-TAATAA-	-ATTTTAG-
<i>Bacillus sphaericus</i> DSM 396	-TTGCAT-	-TCAATT-	-TGAGGAA-
<i>B. thuringiensis</i> NRRL4049	-TGTATG-	-TTCTAT-	-GGAGGAA-

n. b. nicht bestimmt

Die Transkriptionsapparatur scheint nach den vorliegenden Daten in den jeweiligen S-Layer-Gruppen hochkonserviert vorzuliegen. Das Gleiche gilt auch für die Signalpeptide (siehe Abb. 35a und b).

Diese Resultate bestätigen die These, dass die Sequenz-Übereinstimmungen vom evolutionären Verwandtschaftsgrad abhängen und somit unter dieser Voraussetzung hohe Sequenz-Übereinstimmungen für funktionell homologe Domänen zu finden sind (SLEYTR et al., 1999). Der N-Terminus der S-Layer-Proteine der *Bacillaceae* stellt vermutlich ein konserviertes Strukturelement zur Verankerung in der Zellwand dar.

5 Zusammenfassung

S-Layer sind kristalline Proteinschichten, die als Komponenten von Zellwänden in allen wichtigen Zweigen der Bakterien und Archaeobakterien vorkommen. Aus zwei phylogenetischen Domänen *Archaea* und *Bacteria* wurden die S-Layer-Proteine von *Methanotorris igneus*, *Methanothermococcus thermolithotrophicus*, *Methanococcus vannielii*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus sphaericus* und *Bacillus fusiformis* molekulargenetisch und nach einigen biochemischen Eigenschaften analysiert. Aus der Ordnung Methanococcales aus der Domäne der *Archaea* wurden die Hüllproteine mesophiler (*M. vannielii*, *M. voltae*), thermophiler (*Mth. thermolithotrophicus*), und hyperthermophiler (*Mcc. jannaschii*, *Mt. igneus*) Vertreter verglichen. Die Zellwand dieser Organismen setzt sich nur aus einer Schicht, dem S-Layerschicht, zusammen, die die Zellen vor äußeren Einflüssen schützt. Somit sind die Proteine direkt äußeren Umwelteinflüssen ausgesetzt, ohne dass sie durch zelluläre Faktoren sekundär stabilisiert werden. Analog zu den Methanococcales wurden S-Layer-Proteine mesophiler und thermophiler Vertreter aus der Familie der *Bacillaceae* verglichen.

Ziel dieser Arbeit war es, die S-Layer-Gensequenzen von *Mt. igneus*, *Mth. thermolithotrophicus*, *M. vannielii*, *Gb. stearothermophilus* DSM 2358, *B. sphaericus* DSM 396, *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T zu ermitteln. Durch Vergleiche der Primärsequenzen mesophiler und (hyper)thermophiler S-Layer-Proteine sollten Hinweise auf thermostabilisierenden Faktoren abgeleitet werden.

Durch Verwendung geeigneter biochemischer und gentechnischer Arbeitsmethoden wurden die Gen- und Proteinsequenzen der zu untersuchenden S-Layer-Proteine ermittelt. Für die Reinigung der S-Layer-Hüllproteine aus der Ordnung Methanococcales wurde eine einfache Isolierungsmethode etabliert. Die unbekannt Genbereiche wurden durch die Entwicklung einer modifizierten Zwei-Schritt-PCR und Drei-Schritt-PCR ermittelt. Durch Datenbank- und Sequenzanalysen wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Aufbau der Proteine nachgewiesen.

Die Sequenzanalyse der archaeobakteriellen und bakteriellen S-Layer-Proteine erbrachte nur für erstere Hinweise auf thermostabilisierende Faktoren. Auffälligerweise hatten alle hyperthermophilen Spezies Cystein in der S-Layer-Proteinsequenz vorliegen. Zudem wiesen sie einen gesteigerten Gehalt an geladenen Resten auf. Die (hyper)thermophilen S-Layer-

Hüllproteine aus der Ordnung Methanococcales zeigten gegenüber den mesophilen folgende Unterschiede:

1. Zunahme von geladenen Resten
2. Abnahme von Alanin und unpolaren Resten
3. Vorhandensein von Cystein
4. Erhöhte Anzahl an N-glykosidischen Bindungsstellen

Die S-Layer-Hüllproteine der Methanococcales weisen eine Molekularmasse von 55669 bis 60547 Dalton und einen isoelektrischen Punkt von 4,15 bis 4,68 auf.

Das hyperthermophile S-Layer-Protein von *Mcc. jannaschii* wurde in *Escherichia coli* erfolgreich expremiert. Das heterologe und native hyperthermophile S-Layer-Protein wurde auf thermostabilisierende Eigenschaften hin untersucht. Für das native Hüllprotein wurde eine Glykosilierung detektiert, die in der Literatur als ein weiterer thermostabilisierender Faktor angenommen wird. Zudem wies das native S-Layer-Protein eine Konformationsänderung im Verlauf einer Temperaturerhöhung, bei verschiedenen pH-Werten und in Anwesenheit eines zweiwertigen Mangans auf. Auch das Expressionsprotein zeigte im Verlauf der Temperaturerhöhung und bei verschiedenen pH-Werten eine Konformationsänderung. Mn^{2+} hatte dagegen keinen Effekt und eine Glykosilierung war nicht nachweisbar.

Nach molekulargenetischen Vergleichen der transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen wurden für die Promotorregion der S-Layer-Gene aus der Ordnung Methanococcales, die mutmaßlichen Konsensus-Sequenz für die BRE-Box -C/G G T/A AA-, TATA-Box -AA/TT TA AAA/TTT A- und der Transkriptionsstartpunkt -AT C/A C/G- bestimmt. Basierend auf den Sequenzähnlichkeiten und Gemeinsamkeiten der archaeobakteriellen S-Layer-Proteine wurden diese in vier Gruppen eingeteilt.

Aus dem bakteriellen Zweig wurde die Gen- und Primärsequenz der S-Layer-Proteine von *Gb. stearothermophilus* DSM 2358, *B. sphaericus* DSM 396, *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T ermittelt. Die Proteine wiesen z. T. eine geringere molekulare Masse auf als die bekannten S-Layer-Hüllproteine aus der Familie der *Bacillaceae*. Das S-Layer-Protein von *B. sphaericus* DSM 396 zeigte eine Diskrepanz zwischen der theoretischen (85 kDa) und experimentell (120 kDa) ermittelten Molmasse. Für den S-Layer-Kristall wurde eine apparente Masse von 85 und 35 kDa nachgewiesen. Nach Proteinsequenzierung des Kristall-

Proteins wurde für beide Proteinbanden die gleiche N-terminale Sequenz APEAGAAAV-KAVNNT ermittelt. Die N-terminale Aminosäuresequenz wurde als Teilsequenz des S-Layer-Proteins von *B. sphaericus* DSM 396 bestimmt. Zudem wurde für diese Aminosäuresequenz eine theoretische molekulare Masse 61,7 kDa ermittelt. Danach könnte der Unterschied auf Protein-Prozessierung, Dimerbildung oder kovalente Bindung mit einem zweiten unbekanntem „Helferprotein“ beruhen. Zudem wurde erstmals für die S-Layer-Proteine von *B. fusiformis* B3 und DSM 2898T eine vermutliche Dimerbildung festgestellt. Für *Gb. stearothermophilus* DSM 2358 wurde eine Teilsequenz von 439 Aminosäuren ermittelt. Basierend auf den N-terminalen Sequenzähnlichkeiten und Gemeinsamkeiten wurden die S-Layer-Proteine aus der Familie der *Bacillaceae* in vier Gruppen eingeteilt. Jede Gruppe ist durch identische Promotorstrukturen und hohe Sequenz-Übereinstimmungen charakterisiert.

Um weitere Informationen zur Thermostabilität der S-Layer-Proteine zu erhalten, müssten die Proteine kristallisiert werden, denn dies ist Voraussetzung für die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse. Bei dem S-Layer-Hüllprotein von *B. sphaericus* DSM 396 sollte das S-Layer assoziierte Protein molekulargenetisch und Eigenschaften identifiziert und analysiert werden. Des Weiteren sollten prokaryontische Oberflächenproteine aus anderen extremen Standorten hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht werden. Diese Untersuchungen könnten möglicherweise Hinweise auf die Überlebensstrategien von extraterrestrischem Leben in unserem Sonnensystem liefern. Zurzeit wird in der Astrobiologie nur für den Mars, die Jupitermonde Europa, Callisto, Ganymed und Saturnmond Titan Leben vermutet.

6 Literaturverzeichnis

- Adachi T., Yamagata H., Tsukagoshi N., Udaka S. (1991): Repression of the cell wall protein gene operon in *Bacillus brevis* 47 by magnesium and calcium ions; J. Bact. 173: 4243-4245
- Akça E. (2000): Molekulare Charakterisierung der S-Layer-Proteine von Methanokokken; Diplomarbeit Universität Mainz
- Akça E., Claus H., Schultz N., Karbach G., Schlott B., Debaerdemaeker T., Declercq J.-P., König H. (2002): Genes and derived amino acid sequences of S-layer proteins from mesophilic, thermophilic, and extremely thermophilic methanococci; Extremophiles 6: 351-358
- Archibald A. R., Hancock I. C., Harwood C. R. (1993): Cell wall structure, synthesis and turnover. In *Bacillus subtilis* and other gram-positive Bacteria; In: Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. (Eds.); American Society for Microbiology, Washington, pp. 381-410
- Balch W.E., Fox G.E., Magnum L.J., Woese C.R., Wolfe R.S. (1979): Methanogens: reevaluation of a unique biological group; Microbiol. Rev. 43: 260-296
- Bahl H., und 30 andere Autoren (1997): Molecular biology of S-Layers; FEMS Microbiology Reviews 20: 47-98
- Baumeister W., Wildhaber I., Phipps B. M. (1989): Principles of organization in eubacterial and archaeobacterial surface proteins; Can. J. Microbiol. 35: 215-227
- Beveridge T. J., Graham L. L. (1991): Surface layers of bacteria; Microbiol. Rev. 55: 684-705
- Bock K., Schuster-Kolbe J., Altman E., Allmaier G., Stahl B., Christian R., Sleytr U. B., Messner P. (1994): Primary structure of the O-glycosidically linked glycan chain of the crystalline surface layer glycoprotein of *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L11-69. Galactosyl tyrosine as a novel linkage unit; J. Biol. Chem. 269: 7137-7144
- Boot H.J., Pouwels P.H. (1996): Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins; Mol. Microbiol. 21: 1117-1123
- Borges N., Ramos A., Raven N. D. H., Sharp R. J., Santos H. (2002): Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes; Extremophiles 6: 209-216
- Bowditch R. D., Baumann P., Yousten A. A (1989): Cloning and sequencing of the gene encoding a 125-kilodalton surface-layer protein from *Bacillus sphaericus* 2362 and of a related cryptic gene; J. Bacteriol. 171: 4178-4188
- Breitwieser A., Gruber K., Sleytr U.B. (1992): Evidence for an S-layer protein pool in the peptidoglycan of *Bacillus stearothermophilus*; J. Bact. 174: 8008-8015

- Bröckl G., Behr M., Fabry M., Hensel R., Kaudewitz H., Biendl E., König H. (1991): Analysis and nucleotide sequence of the genes encoding the surface-layer glycoproteins of the hyperthermophilic methanogens *Methanothermobacter feravidus* and *Methanothermobacter sociabilis*; Eur. J. Biochem. 199: 147-152
- Brosius J., Dull T., Sleeter DD, Noller H. F. (1981): Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4801-4805
- Calabi E., Ward S., Wren B., Paxton T., Panico M., Morris H., Dell A., Dougan G., Fairweather N. (2002): Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*; Mol. Microbiol. 40: 1187-1199
- Cambillau C., Claverie J. M. (2000): Structural and genomic correlates of hyperthermostability; J. Biol. Chem. 275: 32383-32386
- Carl M., Dasch G. A. (1989): The importance of the crystalline surface layer protein antigens of *Rickettsia* in T-cell immunity; J. Autoimmun. 2 Suppl.: 81-91
- Chapman J. A., Murray R. G. E., Salton M. R. J. (1963): The surface anatomy of *Lamprospira hyalina*; Proceedings of the Royal Society London, Section B 158: 498-513
- Claus H., Akça E., Evrard C., Debaerdemaeker T., Declercq J.-P., König H. (2002): Primary structure of selected archaeal mesophilic and extremely thermophilic outer surface layer proteins; System. Appl. Microbiol. 25: 3-12
- Claus H., Akça E., Schultz N., Karbach G., Schlott B., Debaerdemaeker T., Declercq J.-P., König H. (2001): Surface (glyco-)proteins: Primary structure and crystallization under microgravity conditions; In: Proc. First European Workshop on Exo-/ Astro-Biology: 313-320
- Christodoulou E., Vorgias C. E. (2002): The thermostability of DNA-binding protein HU from mesophilic, thermophilic, and extreme thermophilic *bacteria*; Extremophiles 6: 21-31
- Das R., Gerstein M. (2000): The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison; Funct. Integr. Genomics 1: 76-88
- Dalgaard J.Z., Garrett R.A. (1993): Archaeal hyperthermophile genes., pp.535-563; In: The biochemistry of *Archaea* (Archaeobacteria), (Eds. Kates M., Kushner D.J., Matheson A.T.), Elsevier, Amsterdam · London · New York · Tokyo
- De Boer W. E., Spit B. J. (1964): A new type of bacterial cell wall structure revealed by replica technique; Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology 30: 239-248
- Dharmavaram R., Gillevet P., Konisky J. (1991): Nucleotide sequence of the gene encoding the vanadate-sensitive membrane-associated ATPase of *Methanococcus voltae*; J. Bact. 173: 2131-2133

- Dombroski A.J., Walter W. A., Record M. T., Siegele D. A., Gross C. A. (1992): Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor $\sigma 70$ exhibit specificity of binding to promoter DNA; *Cell* 70: 501-512
- Dong G., Vielle C., Zeikus J. G. (1997): Cloning, sequencing and expression of the gene encoding amylopul-lunase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme; *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3577-3584
- Edman P., Begg G. (1967): A protein sequenator; *Eur. J. Biochem.* 1: 80-91
- Egelseer E. M., Danhorn T., Pleschberger M., Hotzy C., Sleytr U. B., Sára M. (2001): Characterization of an S-layer glycoprotein produced in the course of the S-Layer variation of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 and sequencing and cloning of the sbsD gene encoding the protein moiety; *Arch. Microbiol.* 177: 70-80
- Egelseer E. M., Leitner K., Jarosch M., Hotzy C., Zayni S., Sleytr U. W., Sára M. (1998): The S-layer proteins of the two *Bacillus stearothermophilus* wild-type strains are bound via their N-terminal region to a secondary cell wall polymer of identical chemical composition; *J. Bact.* 180: 1488-1495
- Engelhardt H., Peters J. (1998): Structural research on the surface layers: a focus on stability, surface layer domains, and surface layer–cell wall interactions; *J. Struct. Biol.* 124: 276-302
- Estrem S. T., Gaal T., Ross W., Gourse R. L. (1998): Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9761-9766
- Etienne-Toumelin I., Sirard J.-C., Dufлот E., Mock M., Fouet A. (1995): Characterization of the *Bacillus anthracis* S-layer: Cloning and Sequencing of the structural gene; *J. Bact.* 177: 614-620
- Fernández L.A., Berenguer J. (2000): Secretion and assembly of regular surface structures in gram-negative bacteria; *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 21-44
- Firtel M., Patel G. B., Beveridge T. (1995): S-layer regeneration in *Methanococcus voltae* protoplasts; *J. Microbiol.* 14: 817-824
- Firtel M., Southam G., Harauz G., Beveridge T. J. (1993): Characterization of the cell wall of the sheathed methanogen *Methanospirillum hungatei* GP1 as an S-layer; *J. Bact.* 1993; 7550-7560
- Firtel M., Southam G., Harauz G., Beveridge T. J. (1994): The organization of the paracrystalline multilayered spacer-plugs of *Methanospirillum hungatei*; *J. Struct. Biol.* 112: 160-171
- Fröhlich J. (1999): Entwicklung und Einsatz von Isoliertechniken zur phylogenetischen Charakterisierung symbiontischer Mikroorganismen im Darm von Termiten; Dissertation Universität Ulm

- Fujino T., Béguin P., Aubert J.-P. (1993): Organization of a *Clostridium thermocellum* gene cluster encoding the cellulosomal scaffolding protein CipA and a protein possibly involved in attachment of the cellulosome of the cell surface; *J. Bact.* 174: 464-470
- Glauert A. M. (1962): Fine structure and function in bacteria; In: Breese S. S. Jr. (Ed.) Proceedings of the 5th Internal Congress on Electron Microscopy; Academic Press, New York
- Griffiths S.G., Lunch W.H. (1990): Characterization of *Aeromonas salmonicida* variants with altered cell surfaces and their use in studying surface protein assembly; *Arch. Microbiol.* 154: 308-312
- Grogan D. W. (1989): Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains; *J. Bacteriol.* 171: 6710-6719
- Haney P.J., Badger J.H., Buldak G.L., Reich C.I., Woese C.R., Olsen G.J. (1999): Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3578-3583
- Hastie A. T., Brinton Jr. C. C. (1979): Specific interaction of the tetragonally arrayed protein layer of *Bacillus sphaericus* with its peptidoglycan sacculus; *J. Bact.* 138: 999-1009
- Houwink A. L. (1953): A macromolecular mono-layer in the cell wall of *Spirillum spec.*; *Biochem. Biophys. Acta* 10: 360-366
- Houwink A. L. (1956): Flagella, gas vacuoles and cell-wall structure in *Halobacterium halobium*; an electron microscope study; *J. Gen. Microbiol.* 15: 146-150
- Houwatson A. F., Russel W. C. (1964): Observations on cell-wall structure in *Bacillus subtilis*; *J. Appl. Phys.* 35: 3086-3087
- Ilk N., Vollenkle C., Egelseer E. M., Breitwieser A., Sleytr U. B., Sàra M. (2002): Molecular characterization of the S-layer gene, sbpA, of *Bacillus sphaericus* CCM 2177 and production of the functional S-layer fusion protein with the ability to recrystallize in a defined orientation while presenting the fused allergen; *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3251-60
- Ilk N., Kosma P., Puchberger M., Egelseer E. M., Mayer H.F., Sleytr U. B., Sàra M. (1999): Structural and functional analysis of the secondary wall polymer of *Bacillus sphaericus* CCM 2177 that serves as an S-layer specific anchor; *J. Bact.* 181: 7624-7646
- Jaenicke R. (1999): Stability and folding of domain proteins; *Progr. Biophys. Molecul. Biol.* 71: 155-241
- Jarosch M., Egelseer E. M., Mattanovich D., Sleytr U. B., Sàra M. (2000): S-Layer gene sbsC of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980: molecular characterization and heterologous expression in *Escherichia coli*; *Microbiology* 146: 273-281

- Jarosch M., Egelseer E. M., Huber C., Moll D., Mattanovich D., Sleytr U. B., Sàra M (2001): S-layer gene sbsC of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980: molecular characterization and heterologous expression in *Escherichia coli*; Microbiol. 146: 273-281
- Jarrell K. F., Bayley D. P., Kostyukova A. S. (1996): The archaeal flagellum: a unique motility structure; J. Bacteriol. 178: 5057-5064
- Jing H., Takagi J., Liu J.-h., Lindgren S., Zhang R.-g., Joachimiak A., Wang J.-h., Springer T. A. (2002): Archaeal surface layer proteins contain β Propeller, PKD, and β Helix Domains and are related to *Metazoan* Cell Surface proteins; Structure 10: 1453-1464
- Kahala M., Savijoki K., Palva A. (1997): In vivo expression of the *Lactobacillus* S-layer gene; J. Bacteriol. 179: 284-286
- Kandler O. (1998): The Keys to Molecular Evolution and the Origin of Life?; In: Wiegel J., Adams M. W. W. (Eds.); Thermophiles; Taylor & Francis, London pp.: 19-31
- Kansy W.J., Carinato M.E., Monteggia L.M., Konisky J. (1994): In vivo transcripts of the S-layer-encoding structural gene of the archaeon *Methanococcus voltae*; Gene 148:131-135
- Karbach G. (2000): Charakterisierung des S-Layer-Proteins von *Methanococcus thermolithotrophicus*; Diplomarbeit Universität Mainz
- Kärcher U., Schröder H., Haslinger H., Allmaier E., Schreiner R., Wieland R., Haselbeck F., König H. (1993): Primary structure of the heterosaccharide of the surface glycoprotein of the *Methanothermus fervidus*; J. Biol. Chem. 268: 26821-26826
- Karlson P., Doenecke D., Koolman J. (1994): Kurzes Lehrbuch der Biochemie; 14. neubearb. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart · New York
- Keswani J., Orkand S., Premachandran u., Mandelco L., Franklin M. J., Whitman W. B. (1996): Phylogeny and taxonomy of mesophilic *Methanococcus* spp. and comparison of rRNA, DNA hybridization, and phenotypic methods; Int. J. System. Bact. 46: 727-735
- König H. (1988): Archaeobacterial cell envelopes; Can. J. Microbiol. 34: 395-406
- Konisky J., Lynn D., Hoppert M., Mayer F., Haney P. (1994): Identification of the *Methanococcus voltae* S-layer structure gene; J. Bact. 176: 1790-1792
- Kotiranta A., Lounatmaa K., Kerosuo E., Haapasalo M. (1997): Function of S-layers; FEMS Microbiol. Rev. 20: 110-114
- Koval S.F. (1993): Predation on bacteria possessing S-layers; In: Advances in Paracrystalline Bacterial Surface Layers; T. J. Beveridge, Koval S. F. (Eds); Plenum, New York, pp.: 85-92

- Koval S.F., Hynes S. H. (1991): Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*; J. Bact. 173: 2244-2449
- Kuen B., Sleytr U. B., Lubitz W. (1994): Sequence analysis of the sbsA gene encoding the 130 kDa surface layer protein of *Bacillus stearothermophilus* PV 72; Gene 145: 115-120
- Kuen B., Koch A., Asenbauer E., Sára M., Lubitz W. (1997): Molecular characterization of the second S-layer gene sbsB of *Bacillus stearothermophilus* PV 72 expressed by oxidative stress; J. Bact. 179: 1664-1670
- Kushner D. J., Bayler S. T., Boring J., Kates M., Gibbons N. E. (1964): Morphological and chemical properties of the cell envelopes of the extreme halophile, *Halobacterium cutirubrum*; Can. J. Microbiol. 10: 483-497
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; Nature 227: 680-685
- Lechner J., Sumper M. (1987): The primary structure of a prokaryotic glycoprotein. Cloning and sequencing of the cell surface glycoprotein gene of *Halobacteria*; J. Biol. Chem. 262: 9724-9729
- Lewis L. O., Yousten A. A., Murray R. G. E. (1987): Characterization of the surface protein layers of the mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*; J. Bact. 169: 72-79
- Li W. -T., Shriver J.W., Reeve J.N. (2000): Mutational analysis of differences in thermostability between histones from mesophilic and hyperthermophilic *Archaea*; J. Bact. 182: 812-817
- Listgarten M. A., Socransky S. S. (1964): Electron microscopy of axial fibrils, outer envelope, and cell division of certain oral spirochetes; J. Bact. 88: 1087-1103
- Lupas A., Engelhardt H., Peters J., Santarius U., Volker S., Baumeister W. (1994): Domain structure of the *Acetogenium kivui* surface layer revealed by electron crystallography and sequence analysis; J. Bact. 176: 1224-1233
- Luckevich M.D., Beveridge T.J. (1989): Characterization of a dynamic S layer on *Bacillus thuringiensis*; J. Bact. 171: 6656-6667
- Martins L. O., Soares C. M., Pereira M. M., Teixeira M., Costa T., Jones G. H., Henriquest A. O. (2002): Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat; J. Biol. Chem. 277: 18849-18859
- Mayerhofer L. E., Conway de Maracrio E., Yao R., Macaria A. J. L. (1998): Structure, organization, and expression of the genes coding for envelope components in the archaeon *Methanosarcina mazei* S-6; Arch. Microbiol. 169: 339-345

- Mayr J., Lupas A., Kellermann J., Eckerskorn C., Baumeister W., Peters J. (1996): A hyperthermostable protease of the subtilisin family bound to the surface layer of the archaeon *Staphylothermus marinus*; *Curr. Biol.* 6: 739-749
- Mescher M. F., Strominger J. L. (1976): Purification and characterization of a prokaryotic glycoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarium*; *J. Biol. Chem.* 251: 2005-2014
- McCoubrey J., Starr J., Martin H., Poxton R. (2003): *Clostridium difficile* in a geriatric unit: a prospective epidemiological study employing a novel S-layer typing method; *J. Med. Microbiol.* 52: 573-578
- McDonald J. H., Grasso A. M., Rejto L. K. (1999): Patterns of temperature adaptation in proteins from *Methanococcus* and *Bacillus*; *Mol. NBiol. Evol.* 16: 1785-1790
- Mesnager S., Tosi-Couture E., Mock M., Gounon P., Fouet A. (1997): Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell associated antigen; *Mol. Microbiol.* 23: 1147-1155
- Mesnager S., Fontaine T., Mignot T., Delepierre M., Mock M., Fouet A. (2000): Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation; *The EMBL Journal* 19: 4473-4484
- Messner P. (1996): Chemical composition and biosynthesis of S-layers; In: Crystalline bacterial cell surface layer proteins (S-layers); Sleytr U.B., Messner P., Pum D., Sára M. (Eds.), Academic Press, Landes Company, Austin, Tex., pp.35-76
- Messner P. (1997): Bacterial glycoproteins; *Glycoconjugate J.* 14: 3-11
- Messner P., Sleytr U.B. (1991): Bacterial surface layer glycoproteins; *Glycobiology* 1: 545-551
- Messner P., Sleytr U.B. (1992): Crystalline bacterial cell-surface layers; *Adv. Microbiol. Physiol.* 33: 213-275
- Messner P., Hollaus F., Sleytr U. B. (1984): Paracrystalline cell wall surface layers of different *Bacillus stearothermophilus* strains; *Int. J. Syst. Bact.* 34: 202-210
- Messner P., Christian R., Kolbe J., Schulz G., Sleytr U. B. (1992): Analysis of a novel linkage unit of O-linked carbohydrates from the crystalline surface layer glycoprotein of *Clostridium thermohydrosulfuricum* S102-70; *J. Bact.* 174: 2236-2240
- Moens S., Vanderleyden J. (1997): Glycoproteins in prokaryotes; *Arch. Microbiol.* 168: 169-175
- Mohr V., Larson H. (1963): On the structural transformations and lysis of *Halobacterium salinarium* in hypotonic and isotonic solutions; *J. Gen. Microbiol.* 31: 267-280
- Murray R. G. E. (1993): In: *Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers*; Beveridge T. J., Koval S. F. (Eds.); Plenum, New York pp.: 3-9

- Ng S. Y., Jarrall K. F. (2003): Cloning and characterization of archaeal type I signal peptidase from *Methanococcus voltae*; J. Bact. 185: 5936-5942
- Nielsen H., Brunak S., von Heijne G. (1999): Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals; Protein Engng. 12: 3-9
- Noonan B., Trust T. J. (1995): Molecular analysis of an A-protein secretion mutant of *Aeromonas salmonicida* reveals a surface layer- specific protein secretion pathway; J. Mol. Biol. 248: 316-327
- Nuß E. (1985): Vergleichende Untersuchungen an S-Layern von methanogenen Bakterien; Diplomarbeit Universität Regensburg
- Nuß E., König H. (1986): S-Layer studies on the three species of *Methanococcus* living at different temperatures; Can. J. Microbiol. 33: 256-261
- Patel G. B., Choquet C. G., Nash J. H. E., Sprott G.D. (1993): Formation and regeneration of *Methanococcus voltae* protoplasts; Appl. Environ. Microbiol. 59: 27-33
- Peters J., Nitsch M., Kuhlorgen B., Golbik R., Lupas A., Kellermann J., Engelhardt H., Pfander J. P., Müller S., Goldie K., Engel A., Stetter K. O., Baumeister W. (1995): Tetrabrachion: a filamentous archaeobacterial surface protein assembly of unusual structure and extreme stability; J. Mol. Biol. 245: 385-401
- Peterson G. (1977): A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable; Anal. Biochem. 83: 346-356
- Phipps B. M., Huber R., Baumeister W. (1991): The cell envelope of the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrobaculum organotrophum* consists of two regularly arrayed protein layers: three-dimensional structure of the outer layer; Mol. Microbiol. 5: 253-265
- Pum D., Sleytr U. B. (1994): Large-scale reconstitution of crystalline bacterial surface layer proteins at the air-water interface and on lipid films; Thin Solid Films 244: 882-886
- Pum D., Weinhandl M., Hödl C., Sleytr U. B. (1993): Large-scale recrystallization of the S-layer of *Bacillus coagulans* E38-66 at the air/water interface and on lipid films; J. Bact. 175: 2762-2766
- Ries W., Hotzy C., Schocher I., Sleytr U. B., Sára M (1997): Evidence that the N-terminal part of the S-layer protein from *Bacillus stearothermophilus* PV 72/p2 recognizes a secondary cell wall polymer; J. Bact. 179: 3892-3898
- Ross W., Aiyar S. E., Salomon J., Gourse R. L. (1998): *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strengths: modular structure of bacterial promoters; J. Bact. 180: 5375-5383
- Salton, M. R. J., Williams R. C. (1954): Electron microscopy of the cell walls of *Bacillus megatarium* and *Rhodospirillum rubrum*; Biochem. Biophys. Acta 14: 455-458

- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd Edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Santos H., da Costa M. S. (2002): Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments; *Environ. Microbiol.* 4: 501-509
- Sàra M., Sleytr U.B. (1987); Charge distribution on the S-layer of *Bacillus stearothermophilus* NRS 1536/3c and importance of charged groups for morphogenesis and function; *J. Bact.* 169: 2804-2809
- Sàra M., Sleytr U. (2000): S-layer proteins; *J. Bact.* 182: 859-868
- Sàra M., Pum D., Sleytr U.B. (1992): Permeability and charge-dependent adsorption properties of the S-layer lattice from *Bacillus coagulans* E38-66; *J. Bact.* 174: 3487-3493
- Sàra M., Egelseer E. M., Dekitsch C., Sleytr U. B. (1998): Identification of two binding domains, one for peptidoglycan and another for a secondary cell wall polymer, on the N-terminal Part of the S-layer protein SBSB from *Bacillus stearothermophilus* PV 72/p2; *J. Bact.* 180: 6780-6783
- Schäffer C., Graninger M., Messner P. (2001): Prokaryotic glycosylation; *Proteomics* 1: 248-261
- Schäffer C., Wugoditsch T., Kahlig H., Schberl A., Zayni S., Messner P. (2002): The surface layer (S-Layer) glycoprotein *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a. Analysis of its glycosylation; *J. Biol. Chem.* 277: 6230-9
- Schultz N. (2000): Charakterisierung des S-Layer-Proteins von *Methanococcus vannielii*; Diplomarbeit Universität Mainz
- Schneitz C., Nuotio L., Lounatma K. (1993): Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer); *J. Appl. Bacteriol.* 74: 290-294
- Sealey P., Southern E. (1982): Gel electrophoresis of nucleotide acids – a practical approach; (Hrsg. Richwood D., Hames B. D.) IRL Press Oxford 39, Oxford
- Sleytr U.B. (1997): Basic and applied S-layer research: an overview; *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 5-12
- Sleytr U.B., Glauert A.M. (1976): Ultrastructure of the cell walls of two closely related *Clostridia* that possess different regular arrays of surface subunits; *J. Bact.* 126: 869-882
- Sleytr U.B., Beveridge T.J. (1999): Bacterial S-layers; *Trends Microbiol.* 6: 253-260
- Sleytr U. B., Adam H., Klaushofer H. (1967): Die elektronenmikroskopische Feinstruktur von Zellwand, Cytoplasmamembran und Geißeln von *Bacillus stearothermophilus*, dargestellt mit Hilfe der Gefrierätztechnik; *Mikroskopie* 22: 233-242
- Sleytr U. B., Adam H., Klaushofer H. (1968): Die Feinstruktur der Zellwandoberfläche von zwei thermophilen Clostridienarten, dargestellt mit Hilfe der Gefrierätztechnik, *Mikroskopie* 23:1-10

- Sleytr U. B., Adam H., Klaushofer H. (1969): Die Feinstruktur der Zellwand und Cytoplasmamembran von *Clostridium nigrificans*, dargestellt mit Hilfe der Gefrierätz- und Ultradünnschnittechnik, Arch. Mikrobiol. 66: 40-58
- Sleytr U. B., Messner P., Pum D., Sára M. (1993): Crystalline bacterial cell surface layers, Mol. Microbiol. 10: 911-916
- Sleytr U. B., Messner P., Pum D., Sára M. (1996): Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins, Academic Press, Austin, TX, Appendix pp.: 211-225
- Sleytr U. B., Messner P., Pum D., Sára M. (1999): Kristalline Zelloberflächen-Schichten prokaryotischer Organismen (S-Schichten): von der supramolekularen Zellstruktur zur Biomimetik und Nanotechnologie; Angew. Chem. 111: 1098-1120
- Smit J., Grano D.A., Glaeser R.M., Agabien N. (1981): Periodic surface array in *Caulobacter crescentus*: fine structure and chemical analysis, J. Bact. 146: 1135-1150
- Smit E., Jager D., Martinez B., Tielen F. J., Pouwels P. H. (2002): Structural and functional analysis of the S-layer protein crystallisation domain of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Evidence for protein-protein interaction of two subdomains, J. Mol. Biol. 324: 953-964
- Sørensen A. B., Duch M., Pedersen S. (1999): Isolation of unknown flanking DNA by a simple two-step polymerase chain reaction method, Dynalogue, Ausgabe 3/1999
- Studier F. W., Moffatt B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol. 189: 113-130
- Sumper M. (1993): S-layer glycoproteins from moderately and extremely halophilic *archaeobacteria*, In: Beveridge T. J., Koval S. F. (eds), Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers, Plenum, New York: 109
- Sumper M., Wieland F. T. (1995): New Comprehensive Biochemistry, In: Glycoproteins, Montreuil J., Vliegthart J. F. G., Schachter H. (Eds.), Elsevier, Amsterdam: 455-473
- Sumper M., Berg E., Mengele R., Strobel I. (1990): Primary structure and glycosylation of the S-layer protein of *Haloferax volcanii*, J. Bact. 172: 4417-4426
- Takagi A., Nakamura K., Ueda M. (1965): Electron microscope studies of the intracytoplasmic membrane system in *Clostridium tetani* and *Clostridium botulinum*, Japanese Journal of Microbiology 9: 131-143
- Tatusova T.A., Madden T.L. (1999): Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol. Lett. 174: 247-250

- Thomas S. R., Trust T. J. (1995): Tyrosine Phosphorylation of the Tetragonal Paracrystalline array of *Aeromonas hydrophila*: Molecular cloning and high-level expression of the S-layer protein gene, *J. Mol. Biol.* 245: 568-581
- Thomm M. (1996): Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 159-171
- Thomm M. (2000): Die Transkriptionsmaschinerie der *Archaea*, *Biospektrum, Spektrum Akademischer Verlag*, 3: 179-185
- Thorne K.J.I., Oliver R.C., Glauert A.M. (1976): Synthesis and turnover of the regularly arranged surface protein of *Acetobacter sp.* relative to the other components of the cell envelope. *J. Bact.* 127: 440-450
- Toba T., Virkola R., Westerlund B., Bjorkman Y., Sillanpaa J., Vartio T., Kalkkinen N., Korhonen T. K. (1995): A collagen-binding S-layer protein in *Lactobacillus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2467-2471
- Upreti R. K., Kumar M., Shankar V. (2003): Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications, *Proteomics* 3: 363-379
- Van Iterson W. (1956): Some thoughts on the possible relationship of bacterial flagella to cilia and flagella in other organisms, *Proceedings of the 3rd Internal Conference on Electron Microscopy*, London pp.: 602-607
- Van Holst G. J., Varner J. E. (1984): Reinforced polyproline II conformation in a hydroxyproline rich cell wall glycoprotein from carrot root; *Plant Physiol.* 74: 247-251
- Vieille C., Zeikus G. J. (2001): Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* pp.: 1-43
- Von Heijne G. (1985): Signal sequences. The limits of variation, *J. Mol. Biol.* 184: 99-105
- Vogt G., Woell S., Argos P (1997): Protein thermal stability, hydrogen bonds, and an ion pairs, *J. Mol. Biol.* 269: 631-643
- Wakei H., Nakamura S., Kawasaki H., Takada K., Mizutani S., Aono R., Horikoshi K. (1997): Cloning and sequencing of the gene encoding the cell surface glycoprotein of *Haloarcula japonica* strain TR-1, *Extremophiles* 1: 29-35
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M. L. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4507-4509
- Xu Z., Yao B., Sun M., Yu Z. (2003): Protection of mice infected with *Plasmodium berghei* by *Bacillus thuringiensis* crystal proteins, *Parasitol. Res.* In Press

-
- Yanisch-Perron C. J., Vierara J., Messing J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33: 103-119
- Yip K.S., Stillman T.J., Britten K.L., Artymiuk P.J., Baker P.J., Sedelnikova S.E., Engel P.C., Pasque A., Chiaraluce R., Consalvi V. (1995): The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure* 3: 1147-1458
- Yoshii Z. (1966): Macromolecular pattern in the cell wall of *Bacillus alveii*, In: Maruzen Co. (Ed.), Proceedings of the 6th International Congress of Electron Microscopy, Kyoto, Vol.2: 277

7 Anhang

Anhang 1: S-Layer-Proteinsequenzen aus der Familie der *Bacillaceae*

In dieser Arbeit wurden die S-Layer-Aminosäuresequenzen von *Bacillus sphaericus* DSM 396, *Bacillus fusiformis* (B3, DSM 2898T) und *Geobacillus stearothermophilus* (unvollständig) aus der sequenzierten Gensequenzen ermittelt.

Bacillus sphaericus DSM 396:

Proteinsequenz (810 AS)

T-**PRLIVCF**A-WKNAIN-TLFTMSLLSATAVLSALAQVSR**T**SACPRNAHLT-
 GNFS**MANQPKKFKFVATAATATLVASAI**VPV**ASAAGFSDVAGNDHEV**AINALADAGIINGYADGTFK
 PNQ**TINRGQ**VV**KLLGRYLEAQ**Q**Q**EIPADWNSK**Q**R**FNDLP**VTA**EAE**LVKYAALAKDAGVFN**GS**NGNLN
 ASQ**T**M**Q**R**Q**Q**MAV**V**L**VRAIKEIAGVDLVAEYK**KANF**VTEIGDL**DKAYS**AEQRTAIVALEYAGIT**NV**AHF
 NPGNSVTRGQFASFLYRTIEN**VVN****AP**E**AGAA**AV**KAV**NN**T**TVEVTFDEEVDNVQALN**FLISD**LEV**K**NA**A**
 VKQ**T**N**K**V**V**VL**T**TAPQ**TAD**KEYT**VS**L**GEE**IGTFKGIAAV**V**PT**K**VDLVEK**SV**Q**G**KL**G**Q**V**TL**KA**Q**V**T
 VAEGQTKAGIPV**TT**FIPGSANGVKSPV**TVE**AVTDENG**V**AS**Y**TYTRYAATND**T**VT**V**YANGDRSK**F**STGY
 VFWAVDQTLTIT**EV**TTGNTINNGANKTYK**V**TYKHPETGRPVSGK**V**LN**V**SVLENIDVTVD**KL**Q**N**V**T**VNG
 VAVVQ**T**SENNMRAAQIT**TD**SKGEAT**FT**ISGSNATVTP**V**V**F**EAA**ST**NVANTY**SP**KY**TAD**TLQAVASK**IT**F
 GAIQAA**Y**TIEVTRDG**GET**AATG**V**LN**GR**KYN**V**V**V**K**D**K**D**G**K**VAANEIV**NV**AF**N**EDIDGV**IST**VT**S**AQ**F**V**K**
 IENGKQ**V**GYNGK**IT**VT**T**NSKGEAS**F**VIGSDAVNS**Y**ATPIV**W**IDINN**Q**SGKDAN**L**DK**GE**PSAI**AP**IS**Y**F**Q**
 APYLDG**S**KL**V**SYK**GT**T**ET**DK**F**V**S**GETAT**F**K**V**Q**L**T**N**Q**S**G**K**V**V**Q**N**SS**Y**TT**K**D**V**TY**T**V**Y**NTGANN**V**K**V**G**D**
 VEIAPNRV**H**TLVAANGEID**V**TTVDG**K**SS**S**V**K**VLATG**V**AKDGN**KE**FAFNIPSSIG**V**SPISLSA**APP**-**NSK**-
 RAAAFNIGTRPLE**F**LD**K**LEL

Leadersequenz; N-Terminale Sequenz des reifen Proteins; N-Terminale Sequenz des Kristallproteins

Bacillus fusiformis B3:

Proteinsequenz (575 AS)

FSS**N**FT**K**K**I**C**F**S**F**E**L**F**E**K**A**I**H**K**F**R**Q**L**I**M**V**I**L**-**F**S**S**E-
 Y**Q**F**L**G**I**L**G**R**N**K**L****MAKQ**N**K****G**R**K****F****F**A**A**S**A**T**A**A**L**V**A**S**A**I**V**P**V**A**S**A**A****Q**L**N**D**F**N**K**I**S**G**Y**A**K**E**A**V**Q**S**L**V**D**A**G**V**I**
 Q**G**D**A**N**G**N**F**N**P**L**K**T**I**S**R**A**E**A**A**T**I**F**T**N**A**L**E**L**E**A**E**G**D**V**N**F**K**D**V**K**A**D**A**W**Y**Y**D**A**I**A**A**T**V**E**N**G**I**F**E**G**V**S**A**T**E**F**A**P
 N**K**Q**L**T**R**S**E**A**A**K**I**L**V**D**A**F**E**L**E**G**E**G**D**L**S**E**F**A**D**A**S**T**V**K**P**W**A**K**S**Y**L**E**I**A**V**A**N**G**V**I**K**G**S**E**A**N**G**K**T**N**L**N**P**N**A**P**I**T
 R**Q**D**F**A**V**V**F**S**R**T**I**E**N**V**D**A**T**P**K**V**D**K**I**E**V**V**D**A**K**T**L**N**V**T**L**S**D**G**T**K**E**T**V**T**L**E**K**A**L**E**P**N**K**E**T**E**V**T**F**K**I**K**D**V**E**Y**K**A
 K**V**T**Y**V**V**T**T**A**T**A**V**K**S**V**S**A**T**N**L**K**Q**V**V**V**E**F**D**G**K**V**D**P**A**T**A**E**A**G**N**Y**S**L**T**G**A**N**D**P**V**V**D**T**A**V**S**E**D**G**S**T**V**T**L**T
 V**V**D**K**L**E**N**Q**S**E**Y**K**L**A**V**N**N**I**K**A**G**D**K**V**I**N**A**K**D**L**K**F**K**P**L**D**N**T**V**P**T**V**A**K**V**E**A**L**G**N**K**T**I**R**V**H**F**S**E**P**V**K**A**A**Q**T**S**Q**
 F**Q**I**D**G**K**V**V**V**G**S**I**Q**T**N**L**N**T**V**I**I**K**L**S**S**T**L**D**G**E**H**L**T**A**E**G**T**E**D**Y**N**N**F**K**T**V**K**A**D**T**K**F**N**V**E**D**K**T**A**P**T**V**S**V**S
 A**S**F**E**K**V**V**L**K**F**S**E**P**V**E**Q**V**F**A**S**N**I**Y**W**M**Q**G**G**S**K**Q**A**A**S**V**K**Q**L**A**D**D**K**Y**E**F**T**T**G**D**N**K**F**V**Y**T**T**D**L**F**V**T**N**V**K**D
 Y**S**G**N**V**I**D**K**D**T**K**V**Q**V**T**P**V**I**D**Q**T**R**P**E**V**I**S**T**F**V**L**K**K**V**I**M**H**G**I**L**-
 K**T**T**A**I**T**H**S**I**F**C**S**A**C**P**K**S**K**Q**C**P**G**R**R**P**K**L**E**F**L**D**K**L**E**

Leadersequenz; N-Terminale Sequenz des reifen Proteins; innere Proteinsequenz nach enzymatischen Verdau

Bacillus fusiformis DSM 2898T:

Proteinsequenz (576 AS)

NG**I**LL**F**SS**N**FT**K**K**I**C**F**S**F**E**L**F**E**K**A**I**H**K**F**R**Q**L**I**M**V**I**L**-**F**S**S**E-
 Y**Q**F**L**G**I**L**G**R**N**K**L****MAKQ**N**K****G**R**K****F****F**A**A**S**A**T**A**A**L**V**A**S**A**I**V**P**V**A**S**A**A****Q**L**N**D**F**N**K**I**S**G**Y**A**K**E**A**V**Q**S**L**V**D**A**G**V**I**
 Q**G**D**A**N**G**N**F**N**P**L**K**T**I**S**R**A**E**A**A**T**I**F**T**N**A**L**E**L**E**A**E**G**D**V**N**F**K**D**V**K**A**D**A**W**Y**Y**D**A**I**A**A**T**V**E**N**G**I**F**E**G**V**S**A**T**E**F**A**P
 N**K**Q**L**T**R**S**E**A**A**K**I**L**V**D**A**F**E**L**E**G**E**G**D**L**S**E**F**A**D**A**S**T**V**K**P**W**A**K**S**Y**L**E**I**A**V**A**N**G**V**I**K**G**S**E**A**N**G**K**T**N**L**N**P**N**A**P**I**T
 R**Q**D**F**A**V**V**F**S**R**T**I**E**N**V**D**A**T**P**K**V**D**K**I**E**V**V**D**A**K**T**L**N**V**T**L**S**D**G**T**K**E**T**V**T**L**E**K**A**L**E**P**N**K**E**T**E**V**T**F**K**I**K**D**V**E**Y**K**A
 K**V**T**Y**V**V**T**T**A**T**A**V**K**S**V**S**A**T**N**L**K**Q**V**V**V**E**F**X**G**K**V**D**P**A**T**A**E**A**G**N**Y**S**L**T**G**T**N**S**P**A**V**D**S**V**T**V**E**D**G**R**S**V**T**L**N**I**
 V**D**K**L**E**N**Q**A**E**Y**K**L**A**V**N**N**I**K**A**G**D**K**V**I**N**A**K**D**L**K**F**K**P**L**D**N**T**V**P**T**V**A**K**V**D**A**L**G**N**K**T**I**R**V**H**F**S**E**P**V**K**P**A**Q**T**S**Q**F**
 K**I**D**G**K**V**V**V**G**S**I**Q**T**N**L**N**T**V**I**I**K**L**S**S**A**L**D**G**E**H**L**T**T**E**G**T**E**D**Y**N**N**F**K**T**V**Q**A**D**T**K**F**N**V**E**D**K**T**A**P**T**V**A**S**V**S
 A**S**F**E**K**V**V**L**K**F**S**E**P**V**E**Q**V**F**A**S**N**V**Y**W**M**Q**G**G**A**K**K**Q**A**S**S**V**K**Q**L**K**D**D**T**F**E**F**T**V**G**D**N**K**L**V**Y**T**T**D**L**F**V**T**N**V**K**D**
 F**S**G**N**V**I**D**K**D**T**K**V**Q**V**T**P**V**I**D**Q**T**R**P**E**V**I**S**T**F**V**L**K**K**V**I**M**H**G**I**L**-
 K**T**T**A**I**T**H**S**I**F**C**S**A**C**P**K**S**K**Q**C**P**G**R**R**X**A**X**E**F**L**D**K**L**E**

Leadersequenz; N-Terminale Sequenz des reifen Proteins

Geobacillus stearothermophilus DSM 2358:

Proteinsequenz (439 AS)

-KC-HWMIALLISLSSGHTG-SWFMLAPFRQ-IY-TAAV-DHCLKVS-
 KRRGILGFMDKKKAVKLATASAVAASAFVAANPHASQAATDVATVVVSOAKAQMKAEYYTYSHTVTE
 TGQFPDIKDVYAAYNKAKQAYANAVAVVNKAGGAKKDAYLADLQATYETYVFKANPKSGEARVAT
 YIDAYNYAVKLDGLRQDLAKAVEAKDLKKAEELYHKISYELKTRTVILDRVYGGSTRELLRSQFKAEA
 QKLRDSLIDITVAMKAREAQDAVKAGNLDKAKAALDQVNQYVSKVTDFAKAEKQAAQDAKAAEY
 AALPFKVESVAVVNAKQIEIKLNKAVDTSTASNKNYKQKSSDSSATALATLDGSADISISDDGKTVTI
 TTTNGVISQFSVANDAPFKFIVENLKDKYGKTLDSYSTNLVVKDTVAPTLKDVKATAKSTTRVTLVFS
 EPVQTNGAIAYVGGQAASVQPGSNVNEVILTTAQATHRIPGQA

Leadersequenz; N-Terminale Sequenz des reifen Proteins

Anhang 2: S-Layer-Gensequenzen aus der Familie der Bacillaceae

In dieser Arbeit wurden die S-Layer-Gene von *Bacillus sphaericus* DSM 396, *Bacillus fusiformis* (B3, DSM 2898T) und *Geobacillus stearothermophilus* DSM 2358 ermittelt. Zudem wurden die transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen der Gene bestimmt.

Bacillus sphaericus DSM 396

Gensequenz (2675 Nukleotide)

CCACTTGACCGCGGTTAATTGTTTGTGTTTGGCATAGTGGA AAAATGCCATCAATTGA ACTCTTTTCAC
 TATGTCGTTGTTGTCCGCTACGGCGGTGCTTTCCGCTCTAGCACAAGTAAGTCGCACCTCCGCTTGC
 CCGCGGAATGCCCATCTTACGTGAGGAAATTTTTCTATGGCTAACCAACCAAAGAAATACAAAAA
 TTCGTAGCGACGGCAGCAACGGCAACATTAGTAGCATCTGCTATCGTACCAGTGGCTTCTGCAGCA
 GGATTTTCAGATGTAGCAGGTAACGACCACGAAGTAGCAATCAACGCACTTGCTGATGCAGGTATC
 ATCAATGGATACGCTGACGGCACATTCAAACCAAACCAAACAATTAACCGCGGTCAAGTGGTTAA
 ATTATTAGGTGCTTATTTAGAAGCACAAGGCCAAGAAATTCAGCTGACTGGAATTCAAAACAACG
 CTTCAACGATCTACCAGTAACAGCTGAAGCAGAATTAGTAAAAATATGCTGCACTAGCAAAAAGATGC
 AGGCGTATTC AACGGTTCAAACGGCAACTTAAACGCTTCACAAA CAATGCAACGTC AACAAATGG
 CAGTAGTTTTAGTACGTGCTATTAAGAAATCGCTGGCGTAGACTTAGTAGCTGAGTACAAAAAG
 CGAATTTTCGTAACAGAAATTGGTGACTTAGACAAAGCTTACTCTGCAGAACACGCACAGCGATCG
 TTGCTTTAGAATATGCGGGTATTACAAATGTTGCTCACTTCAACCCAGGTAACAGCGTAACACGCG
 GACAATTCGCTTCATTCTTATACCGCACAAATCGAAAACGTGGTAAACGCTCCTGAAGCTGGCGCTG
 CGGCAGTGAAAGCTGTAAACAACACAACACTGTTGAAGTAACATTTCGACGAAGAAGTAGACAACGTA
 CAAGCTCTTA ACTTCTTAATCTCTGATTTAGAAGTGAAAACGCAGCTGTAAAACA AAATAACAAA
 AAAGTTGTTGTTTAACTACTGCACCTCAAACGTGTGACAAAAGAGTACTGTATCTCTTGGCGAA
 GAAAAAATTGGTACTTTCAAAGGTATCGCAGCTGTAGTTCTACTAAAGTAGATTTAGTAGAAAA
 TCAGTTCAAGGTA AACTTGCCAAACAAGTAACACTGAAAGCACAAGTAACAGTTGCTGAAGGTCA
 AACAAAAGCTGGTATTCCAGTAACTTTCTTCATCCCAGGTTCTGCTAATGGTGTGAAATCTCCAGTA
 ACAGTTGAAGCTGTAAACAGATGAAAACGGTGTGCTTCTTATACTTACACTCGTTACGCTGCAACA
 AACGACACAGTAACTGTATACGCGAACGGTGACCGTTCTAAATTCTCAACTGGTTATGTCTTCTGG
 GCTGTTGATCAAACATTAACGATTACTGAAGTAACA ACTGGTAATAACAATCAACAACGGAGCTAAC
 AAAACGTATAAAGTCACTTACAAACACCCGGA AACTGGTAGACCGGTATCAGGTAAGTACTAAA
 CGTTTCTGTACTTGAAAACATTGATGTAACCGTTGATAAATTACAAAACGTTACGGTGAATGGTGT
 GCGGTAGTTCAAACGAGCGAAAATAACATGCGAGCTGCACAAATCACA ACTGATCaAAAGGTGAA
 GCAACATTCACaaTTTCAGGTTCTAACGCTaCAGTTACTCCAGTAGTaTTGAAGCTGCTTCaACTAAT
 GTTGCaAACTTACTCTCCAAAATATACAGCAGATACaCTACAAGCTGTTGCGTCTAAAATaaCaTT
 TGGTGCTATTCAAGCTGCTTATACAATTGaGTA ACTCGtGATGGTGGTGA AACTGCTGCTACTGGA
 GTTTTAAACGGACGTAAATACAATGTAGTGGTTAAAGATAAAGATGGTAAAGTAGCTGCTAACGA
 AATTGTAAACGTGGCATTTAACGAAGATATTGATGGCGTAATTTCTACAGTTACTTCTGCTCAATTC
 GTAAAAATCGAAAACGGTAAACAAGTTGGCTACAATGGTAAGAAAATTACGGTTACAACAAACTC
 TAAAGGTGAAGCAAGCTTCGTCATCGGAAGTGACGCTGTA AATTCTTACGCTACACCAATCGTTTG
 GATTGACATCAATAACCAAAGTGGTAAAGATGCAA ACTTAGACAAAAGGTGAGCCTCAGCAATTG
 CACCAATTTCACTTCCAAGCACCATATTTAGATGGTTCTAAATTAGTATCTTACAAAGGTACAAC
 TGAAACTGACAAATTTGTTAGTGGAGAAACTGCAACATTTAAAGTACA ACTTACGAACCAAAGTGG
 TAAAGTCGTACGGAATTCTAGTTACACAACAAAGGATGTTACGTACTGTTTACAAACTGGTGC
 TAATAATGTAAAAGTTGGCGATGTTGAAATCGTCCAAACCGCGTGCATACATTAGTTGCCGCAAA
 CGGTGAAATCGACGTTACTACTGTAGATGGTAAATCTTCTGTGAAAGTTCTTGTACTGGTGTGA
 CGGAAGGACGGAACAAAGAATTCGCATTTAATATACCGtCTTCGATAGGGATCGTGTCTCCATC
 AGTTTATCGGCAGCCCCACCGTAAA ACTCAAAGTAACGTGCTGCTGCATTCAACATCGGCACGCGA
 CCATTGGAATTCCTGGACAAGCTTGA ACTG

-35-Box, -10-Box, Shine-Dalgarno-Sequenz, Translationsstartpunkt, Translationsende

Bacillus fusiformis B3

Gensequenz (1983 Nukleotide)

CTTTTTCTAGTAACTTTACTAAGAAAATTTGCTTTAGTTT**TTGAATT**TATTCGAGAAAGCT**TATAAT**ACA
TAAATTTAGGCAACTAATTATGGTGATACTATAGTTTTTCATCGGAATAATATCAATTTTTAGGAATA
TTAG**GGAGGA**TAAATTA**ATG**GCAAAGCAAACAAAGGCCGTAAGTTCTTCGCGGCATCAGCAAC
AGCTGCATTAGTTGCATCAGCAATCGTACCTGTAGCATCTGCTGCACAATTAACGACTTCAACAA
AATCTCTGGCTACGCTAAAGAAGCAGTACAATCTTTAGTAGACGCTGGTGTAAATCCAAGGGGATGC
TAACGGCAACTTCAACCCACTTAAACTATCTCACGTGCGGAAGCTGCTACAATCTTACTAATGC
TCTAGAATTAGAAGCAGAAGGTGATGTAAACTTCAAAGACGTTAAAGCTGATGCTTGGTACTACGA
TGCTATCGCAGCAACTGTAGAAAACGGAATTTTTGAAGGTGTAAGTGCTACTGAATTCGCACCAAA
CAAACAATTAACCTCGTTCTGAAGCTGTAAAATTTAGTAGATGCTTTTGAAGTTAGAGGGTGAAGG
CGATCTAAGCGAATTCGCTGACGCTTCTACTGTTAAACC**a**TGGGCTAAATCTTACTAGAAATCGCA
GTTGCAAACCGCGTTATCAAAGGTTCTGAAGCAAATGGTAAAACAAACTTAAACCCAAATGCTCCA
ATTACTCGCCAAGACTTCGCAGTGGTATTCTCACGTACTATTGAAAACGTAGATGCTACTCCAAAA
GTTGACAAAATCGAAGTAGTTGACGCTAAAACCTTAAACGTTACTTTATCTGACGGTACTAAAGAA
ACTGTTACTTTAGAAAAAGCTTTAGAGCCTAACAAAGAAACAGAAGTTACTTTCAAATTAAGGAT
GTTGAATACAAAGCTAAAGTTACTTATGTTGTAACCTACAGCTACTGCAGTTAAATCTGTATCTGCAA
CTAACCTTAAACAAGTAGTAGTAGAGTTTCGACGGTAAAGTTGATCC**g**CTACAGCTGCTGAAGCAG
GTAACCTATTCTTACTGGTGCTAACGATCCTGTAGTTGATACTGCAGTAGTTTCTGAAGATGGTAG
CACTGTAACCTTAACTGTTGTTGACAACTTGAGAACCAATCTGAGTATAAATTAGCTGTAAACAA
CATTAAAGCTGGCGATAAAGTTATCAATGCTAAAGATTTAAAATTCAAGCCACTTGATAATACAGT
GCCAACTGTAGCTAAAGTAGAAGCTTTAGGTAACAAAACCTATTTCGCGTACACTTCAGCGAGCCAGT
AAAAGCTGCTCAAACCTCACAATTCCAAATTGATGGTAAAGTAGTTGTTGGTTCAATTCAAACTAA
CTTAAACACTGTTATCATTAAATTATCTTCTACTTTAAACAGATGGAGAACACACTCTAACTGCTGAA
GGTACTGAAGATTACAACAACCTTCAAACAGTGAAAGCTGACACTAAATTC AACGTTGTTGAAGAT
AAAACCTGCTCCAACCTGTATCAGT**t**GTAAGTGCTTCATTTGAGAAAAGTAGTTCTTAAATTTCTCTGAGC
CAGTTGAACAAGTATTTGCTTCTAACATTTATTGGATGCAAGGTGGATCTAAAAAGCAAGCTGCAT
CTGTAAAACAACCTTGCTGATGATAAATATGAATTCACATTTACTGGTGACAATAAATTTGTTTATAC
AACAGATTTATTTGTTACTAACGTAAAAGACTACTCTGGTAACGTAATTGATAAAGATACTAAAGT
TCAAGTAACTCCTGTAATCGATCAAACCTCGTCCAGAAGTAATTAGCTCTACATTTGTTCTGAAAAA
GGTGATCATGCATGGAATTTCT**T**AAAAAACTACAGCAATTACCCACTCAATTTTTTGCAGCGCTTGT
CCAAAAGTAAACAATGCCCTGGAAGAAGGCCCAAACCTGGAATTCCTGGACAAGCTTGAAC
- 35 Box; - 10 Box; Shine-Dalgarno-Sequenz; Translationsstartpunkt, Translationsende

Bacillus fusiformis DSM 2898T

Gensequenz (2005 Nukleotide)

AGAATGGTATTCTACTACTCTTTTCTAGTAACTTTACTAAGAAAATTTGCTTTAGTTT**TTGAATT**TATTC
GAGAAAGCT**TATAAT**ACATAAATTTAGGCAACTAATTATGGTGATACTATAGTTTTTCATCGGAATAA
TATCAATTTTTAGGAATATT**AGGGAGG**AATAAATTA**ATG**GCAAAGCAAACAAAGGCCGTAAGTT
CTTCGCGGCATCAGCAACAGCTGCATTAGTTGCATCAGCAATCGTACCTGTAGCATCTGCTGCACA
ATTAACGACTTCAACAAAATCTCTGGCTACGCTAAAGAAGCAGTACAATCTTTAGTAGACGCTGG
TGTAATCCAAGGGGATGCTAACGGCAACTTCAACCCACTTAAACTATCTCACGTGCGGAAGCTGC
TACAATCTTACTAATGCTCTAGAATTAGAAGCAGAAGGTGATGTAAACTTCAAAGACGTTAAAGC
TGATGCTTGGTACTACGATGCTATCGCAGCAACTGTAGAAAACGGAATTTTTGAAGGTGTAAGTG
TACTGAATTCGCACCAACAACAATAAATTAACCTCGTTCTGAAGCTGCTAAAATTTAGTAGATGCTTTC
GAATTAGAGGGTGAAGGCGATCTAAGCGAATTCGCTGACGCTTCTACTGTTAAACCATGGGCTAAA
TCTTACTAGAAATCGCAGTTGCAAACGGCGTTATCAAAGGTTCTGAAGCAAATGGTAAAACAAC
TTAAACCCAAATGCTCCAATTACTCGCCAAGACTTCGCAGTGGTATTCTCACGTACTATTGAAAAC
GTAGATGCTACTCCAAAAGTTGACAAAATCGAAGTAGTTGACGCTAAAACCTTAAACGTTACTTTA
TCTGACGGTACTAAAGAACTGTTACTTTAGAAAAAGCTTTAGAGCCTAACAAAGAAACAGAAGTT
ACTTTCAAATTAAGGATGTTGAATACAAAGCTAAAGTTACTTATGTTGTAACCTACAGCTACTGCA
GTTAAATCTGTATCTGCAACTAACCTTAAACAAGTAGTAGTAGAGTTTCGWCGGTAAAGTTGATCCA
GCTACAGCTGCTGAAGCAGGTAACCTACTCTTACAGGTAATAATTCCTGCAGTTGATTACAGTAA
CTGTTGAAGAAGATGGTCGTTCTGTAACCTTAAATATTGTTGACAACTTGA AAAACCAAGCTGAAT
ACAAATTAGCTGTAAACAACATTAAGCTGGCGATAAAGTTATCAATGCTAAAGATTTAAAATTCA
AGCCTCTTGACAACACAGTGCCAACCTGTAGCTAAAGTAGACGCTTTAGGTAACAAAACAATTCGTG
TACACTTCAGTGAGCCAGTGAAACCAGCTCAAACCTCACAATTCAAAATTGATGGTAAAGTTGTTG
TAGGTTCTATTCAAACGAACCTTAAACACTGTAATTATTAATTTATCTTCTGCTTTAAACAGATGGAGA
ACACACTCTAACTACTGAAGGTACTGAAGATTACAACAACCTTTAAAACAGTTCAAGCTGACACTAA

ATTCAATGTTGTTGAAGACAAAACCTGCTCCAACCTGTAGCTTCAGTAGTAAGTGCTTCATTCGAAAA
 AGTAGTACTTAAATTCTCTGAGCCAGTTGAACAAGTATTTGCTTCTAACGTTTACTGGATGCAAGGT
 GGAGCTAAAAACAAGCTTCTTCTGTAAAACAACTTAAAGATGATACATTTGAATTTACATTCGTA
 GGTGACAATAAACTGGTTTACACAACCTGATTTATTTGTAACCTAACGTAAAAGACTTCTCTGGCAAC
 GTAATTGATAAAGATACTAAAGTTCAAGTAACTCCTGTAATCGATCAAACCTCGTCCAGAAGTAATT
 AGCTCTACATTTGTTCTGAAAAAGGTGATCATGCATGGAATTCTCTAAAAAACTACAGCAATTACC
 CACTCAATTTTTTGCAGCGCTTGTCCAAAAAGTAAACAATGCCCTGGAAGAAGGCCsGCCkAGAAT
 TCCTGGACAAGCTTGAAC

- 35 Box; - 10 Box; Shine-Dalgarno-Sequenz; Translationsstartpunkt, Translationsende

Geobacillus stearothermophilus DSM 2358

Gensequenz (1486 Nukleotide)

GTGAAAGTGCTAGCACTGgATGATAGCCTTGCFAATAAGTCTATCATCTGGACACACAGGATGATC
 TTGGTTCATGTTAGCACCTTTTAGGCAATGAATCTACTAAACGGCAGCCGTTTAGGATCATTGTCTT
 AAAGTTTCATAAAAACGAAGGGGGGATTTTAGGCTTTATGGACAAAAAGAAAGCAGTCAAACCTCGC
 CACAGCCAGCGCTGTAGCAGCGAGCGCTTTCGTGCGAGCCAACCCGCATGCTTCCCAAGCAGCAAC
 GGACGTGGCGACGGTCGTACGCCAAGCGAAAGCGCAAATGAAAGAAGCATACTATACGTACAGCC
 ATACGGTAAACGGAACGGGCCAATTCCCAGCATTAAGATGTATATGCCGCCTACAACAAAGCA
 AAACAAGCGTATGCAAACGCGGTTGCTGTCGTGAACAAAGCCGGCGCGGAAAAAGACGCGTA
 TTTGGCTGATTTGCAAGCTACATACGAAACGTATGTATTCAAAGCCAACCCGAAATCGGGCGAAGC
 GCGCGTGGCTACGTACATCGACGCTTACAACCTACGCAGTCAAGCTTGACGGTCTGCGTCAAGATCT
 GCGAAAAGCTGTGCAAGCAAAAAGACTTGA AAAAGGCAGAAGAGCTCTACCACAAAATTTTCGTACG
 AGCTCAAACCGCGCAGGTCATTCTCGACCGCTCTACGGCCAATCGACGCGGAACTGCTTCGCT
 CGCAATTCAAAGCCGAAGCGCAAAAACCTGCGCGACAGCTTGATCTACGACATCACCGTTGCCATGA
 AaGCGCGTGAAGCGCAAGACGCTGTCAAAGCCGGCAACTTGGACAAAGCGAAAGCCGCGCTTGAC
 CAAGTCAACCAATACGTATCGAAAGTAACCGATGCGTTCAAAGCCGAACTGCAAAAAGCAGCACA
 AGACGCCAAGCGGCGTATGAAGCGGCGCTTCTTTCAAAGTTGAGAGCGTGGCCGTCGTAAATGC
 TAAACAAATTGAAATTAACCTGAATAAAGCAGTCGACACTTCAACAGCAAGCAATAAAAAACAACT
 ATAAAGTTCAAAAAGCTCTGATAGCAGCGCTACAGCACTTGCAACGTTGGATGGCTCTGCTGACA
 TTTTCGATATCTGATGATGGTAAAACCTGTAACGATTACAACAATAATGGAGTCATTTACAGTTCA
 GCGTTGCCAATGATGCTCCGTTCAAGTTTATCGTCGAGAATTTGAAAGATAAATATGGCAAAACGC
 TAGATTCATACTCGACTAATTTAGTTGTGAAAGATACAGTGGCGCCGACATTGAAAGATGTGAAAG
 CTACTGCGAAATCTACAACGACAAGAGTGACGCTTGTATTTAGCGAGCCGTTCAAACCTAACGGGG
 CAATTGCCTATGTGGGCGGCCAAGCTGCTTCAGTTCAACCAGGTTCAAATGTAAACGAAGTGATT
 TGACAACAGCTCAGGCCACGCATAGAATTCCTGGACAAGCT

- 35 Box; - 10 Box; Shine-Dalgarno-Sequenz; Translationsstartpunkt

Anhang 3: S-Layer-Proteinsequenzen aus der Ordnung Methanococcales

In dieser Arbeit wurden die S-Layer-Aminosäuresequenzen von *Methanococcus vannielii* DSM 1224, *Methanothermococcus thermolithotrophicus* DSM 2095 und *Methanotorris igneus* DSM 5666 aus der sequenzierten Gensequenzen ermittelt.

Methanococcus vannielii DSM 1224

Proteinsequenz (566 AS)

GDAIEISGKEKTYATVWRGYIEDQGKGIIRMDGILRQNTKAGIGDKGYL-KN-NIINR-
 TNMAMSMKKIGAIAVGGAMVASALATGALAEKVGDVDAFAANAVTNGNVNVDIVVGSNAAAKDV
 VSAANIAAKVGLMFKEGSATDGNKAVTVSASSKSDNIKNIWDAGNFAATNEVFLFAAADDDYTGT
 AAGTGVPNYLLGKTFMDYTVPPAAQVIDLEDLQTLAAVSDADPSGWDIFGTNKDFEAAEVA AVIRTQ
 QPAAALFNTGADLQVSEDEAFYMSLA FEEDKYGSALADYARLFPGM RIPFLGQEMV VVKLDTDDDLVI
 LGKEYVDGVVKGQGDNYDLGNGYAVKVN NVLTQGAAYKADVQLLDGKVVASKFDTIDGNGNQITIV
 YKDIGIVVND AWEDIGGNYGFAEMVITKDVVTLELGEEYINDWEAYAVRATAAGLIESDSATSTAAVP
 VVGIALKYVGGDDVKIRKDKTFSIANYAKLDFEEDSGDMAVQFLMDDAKDVTLSIGQKVSVLNAEIKL
 NELMADAKQSVPM TAPIAKLDAEASLSAANKDLILVGGPVVKKLAKELADKGLIAIDNASPATLAVAK
 GAANGKDVLLVAGGDRDKTAXXQNSWTSLN-S

Leadersequenz; N-Terminale Sequenz des reifen Proteins

Methanothermococcus thermolithotrophicus DSM 2095

Proteinsequenz (559 AS)

RSPNLIPTQRS-VGIF-E-I-VCYIRQYKSINIYFNPFKKVANICNFFVFEYIFLK-FFLRRLRLIYKV-
 CHETIVTTVSNKGKVVYISKMSKVLS-KN-KVKSQNKVEYKN-KIKG-
 IY**MAMSLKKIGAI**AVGGAMVASALASGVMA**ATTSGDVAGFMKNAI**KE**DGTPNVDIVVGS**GAAVMDV
 VSAADVAAKIGSMAYKTGVVEDRSVVKVSAKAESDDVNIFTLNATNEDIALVAAADSDYAKGFINGS
 DQLKVTDQLASGSIQDVNDADFNATSLGDVSTMLKVPDIDPSDWYSNDDDDAGEVVFTRIVYDSDKLSI
 DEDQILYASIAYKNDEDVFNNDNTVTLKPGMRIPFLGEEYAVVKIDDEDDIYLGKEAKDGVLKEGEXF
 AVGNNGYEVKIASILKSGDTSTEYSVNVQILKDGKVVKEKTDTVGGSSSAQLKLAYKDVGVVVNDawe
 DIAGTTGYAEVLITKDTKALELGEEYIPDWEAYAALNNSDKLEIKKDITESDKANIIGIALKYVGDKXXX
 LGDRDEVDIANYLKLVFDEDEDKNDVLKVKFLMDESKEVTLDIGQKATVLNAEVRLKDILADAQQSVK
 LTAPIAKLDSEVSLDTADKNLILVGGPVVNALTKELVDAGKVAIDNTSPATLAVVEGAANGNDVLVVA
 GGREAKTREAALKALLEMI-ISYIYFFIFLLGIDLFI-I-
 SIIQRDQRGRYDMAMSLKKIGAI**AVGGAMVASALASGVMAATTSGDVAGFMKNAI**KE**DG**

Leadersequenz; N-Terminale Sequenz des reifen Proteins

Methanotrorris igneus DSM 5666

Proteinsequenz (519 AS)

SSLSRNSGGGLNSQSYNPRVELYHK-LIRMWMSFHHTIFVFKFIPNCFYNFLILFSNIQIYQNNFFIL-
 KSCKFLQPFYFKFDQFKSNKSKK-SEINIFIV-NYCYNCFRW-DLYTTSVVCIIVNT-NLKTCTNR--
SMAMSLKKIGAIAVGGAMVASALASGVMA**ATTIGDVAGFMKNAV**KDGQPNVXIVVGSAA**TMDVVS**
 AADIAAKIGSMCYKTGAVEDGKAVINAKVSQETETYDLVNGSNVILATPDKDNALSKVDGETVNPNFK
 KELNVLMKIKNAMPEEYGYKDYDAVEEYANVTANLTTNETSIPKGLAYLSVLTDDNGNSLKVLPK
 GVRPLPFLGSEKVVYKYDDKIIILGDLAYSIGSEGESVAIGDGYEVKVAAMYSSSTPLEAEIQILKDGKVIK
 EDRLKLNESNPDDLITDDNKVAVLGFKGLKNIGETKGYAEVIVVKDLMELEAGEEYMDKWEIRWVKN
 DSTFQKGDVDDTVAGIALVYTNDDGVKSDVLEDKDDTFDIKYPGLYLKRTTAKEENPELRIGAELSK
 EELSVGQSVSIFNADIKLKDIDAKADAQQAVPVTAPIAKLDTEVSLDTAEKNLILVGGPVANKLTKELVDM
 GKVNITNDSPATLTSLEVGACKRTRMILVVXGPPPNVSWTSLN-

Leadersequenz

Anhang 4: S-Layer-Gensequenzen aus der Ordnung Methanococcales

In dieser Arbeit wurden die S-Layer-Gene von *Methanococcus vannielii* DSM 1224, *Methanothermococcus thermolithotrophicus* DSM 2095 und *Methanotrorris igneus* DSM 5666 ermittelt. Zudem wurden die transkriptionellen und translationellen Erkennungsregionen der Gene bestimmt.

Methanococcus vannielii DSM 1224

Gensequenz (1889 Nukleotide)

CCGGTGATGCAATAGAAATTTCTGGAAAAGAAAAACCTATGCAACAGTCTGGAGAGGATACATT
 GAAGACCAA**GGAA**GGG**TATAATA**AGGATGGATGGTATTTTAAGACAGAA**TAC**CAAAGCAGGAAT
 CGGCGATAAGGGGTATTTGTGAAAAAATTTAAACATCATAAAC**AGGTGA**ACTAAT**ATGG**CTATGA
 GCATGAAAAAAATCGGTGCTATTGCTGTAGGCGGTGCAATGGTTGCATCCGCTTTAGCAACTGGTG
 CTTTAGCTGCTGAAAAAGTTGGAGATGTAGATGCATTTGCTGCTAACGCAGTAACAAATGGAAACG
 TAAACGTAGATATTGTAGTAGGTTCAAACGCTGCTGCAAAAGACGTTGTTTCAGCTGCAAACATCG
 CTGCAAAAGTAGGCTCATTAAATGTTTAAAGAAGGTTCCGCAACTGACGGTAACGCAAAAGTTACTG
 TAAGTGCAAGTTCAAAATCTGACAATATTTAAATAATCTGGGATGCAGGTAATGCTTTTCGCTGCTA
 CAAATGAAGTATTTTATTTGCTGCTGCTGACGATGACTATACAGGTACCGCTGCAGGA**ACTGGTG**
 TTCCTAACTACTTACTCGGTA**AAACATTCATGGACTACACAGTTCCTCCTGCTGCACAGGTTATTGA**
 TTTAGAAGACTTACAAACATTAGCTGCAGTAAGTGACGCTGATCCTTCAGGATGGGATATATTTGG
 AACAAATAAAGACTTCGAAGCTGCAGAAGCTGTTGCAGCAGTAATTAGGACCCAACAACCTGCTG
 CCGCCCTATTTAACACCGGTGCAGACTTACAGGTAAGTGAAGACGAAGCATTCTATATGTCATTAG
 CATTGAAGAAAGACAAATACGGTAGTGCATTGCTGATTATGCAAGACTCTTCCAGGTATGAGAA
 TTCCATTCTTAGGCCAGGAAATGGTTGTAGTAAAACCTTGATACCGATGATGACTTAGTTATCTTAGG
 TAAAGAAGTATACGATGGAGTAGTTAAACAAGGTGACAACACTACGATTTAGGAAACGGTTACGCTG
 TAAAAGTAAACAACGTTTTAAACAAGGTGCAGCTTACAAAGCAGATGTTCAACTTTTAAAGATG
 GAAAAGTTGTAGCTTCAA**AAATTCGATA**CAATTGATGGTAACGGTAACCAAAATTACAATAGTTTACA
 TGGTTATTACAAAAGATGTAGTAACATTAGA**ACTTGGTGA**AGAATACATAAAATGATTGGGAAGCAT
 ACCGAGTAAGGGCTACGACGAGTGGATTAATTGAATCAGACAGTGCAACAAGCACCGCTGCAGTT
 CCAGTTGTAGGTATTGCTTTAAATACGTTGGAGACGACGTAGATAAAATTAGAAAAGACAAAAC

ATTCTCAATTGCAAACCTATGCAAAATTAGACTTTGATGAAGACAGTGGCGATATGGCTGTTCAATT
 CTTAATGGATGATGCAAAAGATGTAACATTAAGCATTGGTCAAAAAGTTTCAGTATTAAATGCTGA
 AATTAATTAATGAATTAATGGCTGATGCTAAACAATCAGTTCCAATGACTGCACCAATTGCAAA
 ATTAGACGCTGAAGCTTCATTAAGTGCTGCTAACAAAGATTAACTTAGTTGGTGGACCAGTTGT
 AAAAAAAGCTCGCAAAAGAATTAGCTGACAAAGGCTTAATTGCAATTGACAACGCTTCCCCTGCAAC
 CTTAGCTGTAGCTAAAGGCGCTGCAAAACGGAAAAGATGTATTGGTTGTAGCTGGTGGAGACAGAG
 ATAAAACAGCGCMCMTMCAGAATTCCTGGACAAGCTTGAAC**TGA**AGC

BRE-Box, **TATA-Box**, **Transkriptionsstartpunkt**, **Shine-Dalgarno-Sequenz**, **Translationsstartpunkt**, **Translation-
 sende**

Methanothermococcus thermolithotrophicus DSM 2095

Gensequenz (2269 Nukleotide)

CCGGTCCCCAAATCTGATACCTACTCAACGAAGTTGAGTAGGTATATTTTAGGAGTAGATTTAAGT
 TTGTTATATCCGACAATATAAATCTATAAATATTTATTTAATCCATTTAAAAAAGTTGCAAATATT
 TGCAACTTTTTTGTGTTTGAATACATCTTCTTAAAATAGTTCTTTCTTAGATTAAGATTAATATATA
 GGTTAATGCCATGAAACCATTGTTACAACCGTTTCAAAT**GGAAAGGTATATATA**TCAAAAATGTC
 GAAGGTATT**ATCGT**GAAAAGAATTA AAAAGTCAAAAAGTCAAAAATAAGGTTGAATATAAAAACTAAA
 AAATCAA**AGGGTGA**ATATAT**ATG**GCTATGAGTTTAAAGAAAATTGGTGAATTGCAGTTGGAGGG
 GCTATGGTAGCTTCCGCATTAGCAAGTGGTGAATGGCAGCAACCACATCAGGAGATGTTGCAGGA
 TTTATGAAAAATGCTATTAAGAAGATGGAACACCAAACGTAGATATTGTAGTTGGTTCAGGAGCT
 GCTGTAATGGATGTTGTTTCAGCTGCTGACGTTGCTGCAAAAATAGGTTCAATGGCATACAAAAACA
 GGAGTTGTTGAAGACCGAAGTGCAGTAGTAAAGTTTCAGCAAAAAGCTGAATCTGACGATGTAAT
 ATTTTACTTTAAATGCTACTAATGAAGATATTGCCCTGTAGCTGCTGCAGACTCAGACTATGCAA
 AAGGATTTATTAATGGTAGTGACCAACTTAAGGTTACAGATCAATTAGCCAGCGGTAGCATACAAG
 ATGTGAACGACGCCGATTTAATGCTACATCATTAGGTGACGTTAGCACAATGTTGAAAGTACCTG
 ACATTGACCCATCAGACTGGTACAGCAACGACGACGATGCGGGAGAAGTTCGTATTTACAAGAATT
 GTATATGACAGCGATAAATTATCAATAGACGAAGACCAAATATTATATGCATCAATTGCATACAAA
 AATGACGAAGATGTATTCAACGATAATAACACAGTTACCTTAAAACCTGGTATGAGAATACCATT
 CTTGGTGAAGAGTACGCTGTTGTA AAAATCGACGATGAAGATGACATAATATACCTCGGTAAAGA
 AGCAAAAGATGGTGTGTTTAAAAGAAGGAGAAWCATTTCGAGTTGGAAACGGCTACGAAGTTAAAA
 TAGCAAGTATTTTAAAGAGTGGAGATACATCAACTGAATACAGTGTTAACGTTCAAATATTTAAAG
 ATGGAAAAGTTGTA AAAAGAAAAAACTGATACAGTTGGCGGTAGTAGTTCAGCACAGTTAAAACCTC
 GCATACAAAGATGTTGGTGTGTTGTTGTA AACGATGCATGGGAAGATATTGCAGGAACAACAGGTTAC
 GCTGAAGTATTAATTACAAAAGATACCAAAGCTCTCGAACTTGGTGAAGAATACATACCAGACTGG
 GAAGCATATGCAGCACTCAACAATAGTGATAAATTAGAAATCAAAAAGATATTACCGAGTCTGA
 TAAAGCTAATATAATAGGTATTGCATTA AAAATACGTTGGAGACAAGAAGAAGGTTAGGAGATA
 GAGACGAAGTAGATATTGCAAACCTATCTCAAATTAGTATTTGACGACGAAGACAAGAACGACGTA
 TAAAAGTTAAATTTCTGATGGACGAATCAAAAAGAAGTAACATTAGACATTGGTCAAAAAGCAAC
 AGTATTAACCGCAGAAGTTAGATTA AAAAGACATCTTAGCAGATGCACAACAATCAGTTAAATTAAC
 AGCACCAATTGCAAAAATTGGACTCAGAAGTATCATTAGATACTGCTGACAAAACTTAATCTTAGT
 TGGTGGACCAGTTGTA AACGCATTAACAAAAGAATTAGTAGACGCTGGTAAAGTTGCAATTGACA
 ACACAAGCCCAGCAACATTAGCTGTTGTTGAAGGTGCAGCAAACGGAAACGATGTTTTAGTTGTTG
 CAGGTGGCGACAGAGAAGCAACAAGAGAAGCTGCAAAAAGCATTATTAGAAATGATT**TAA**ATTTCT
 TATATCTATTTTTTTATTTTTTTATTTGGGTATAGATTTGTTTATT**TA**AAT**TA**ATCAATAATCCAACG
 AGATCAAAGGGGGAGATATGATATGGCTATGAGTTTAAAGAAAATTGGTGAATTGCAGTTGGAG
 GGGCTATGGTAGCTTCCGCATTAGCAAGTGGTGAATGGCAGCAACCACATCAGGAGATGTTGCAG
 GATTTATGAAAAATGCTATTAAAGAAGATGGA

BRE-Box, **TATA-Box**, **Transkriptionsstartpunkt**, **Shine-Dalgarno-Sequenz**, **Translationsstartpunkt**, **Translation-
 sende**

Methanoterris igneus DSM 5666

Gensequenz (1987 Nukleotide)

CAGTTCAAGCTTGCCAGGAATTCTGGTGGGGCCCTAAATTCTCAATCCTATCCCTAAAACCCACGT
 GTTGAACCTTACCATAAATGATTAATTCGTATGTGGATGTCATCATTCCACCATAACATTTTTGTATT
 TAAATTTATACCAATATTGTTTTTATAATTTTTTAATTAATTTTCAAATATTCAAATTTATCAAATA
 ACTTCTTCACTCTAATAAAAAGTTGCAAAATTTTGAACCTTTTTTAAATTTTAAATTTGACCAATTTAA
 ACCAACAAATCAAAAAATAAATCTGAAATAAATATTTTCATTGTGTGAAACTATTGTACAACTGTT
 TCAGAT**GGTAA**GATTT**ATATA**CCACTAGTGTAGTATGTATT**ATCGT**CAATACCTAAAACCTAAAAA
 CAAAACCAAT**AGGGTGA**TAAAGT**ATG**GCTATGTCATTAAGA AAAATTGGTGTCTATTGCAGTTGGAG

GGGCAATGGTTGCATCAGCATTAGCAAGCGGTGTAATGGCAGCAACCACAATAGGAGATGTTGCA
 GGATTTATGAAAAATGCTGTTAAAGACGGACAACCAAACGTANAAATTGTAGTTGGTTCAGGAGCT
 GCAACAATGGACGTTGTCTCAGCAGCAGACATTGCAGCAAAAATAGGTTCAATGTGCTACAAAAC
 AGGAGCTGTTGAAGATGGAAAAGCTGTAATAAATGCAAAAAGTTTCACAAGAACTGAAACATACG
 ATTTAGTTAATGGATCTAATGTAATATTGGCAACACCTGACAAAGATAATGCATTAAGTAAAGTGG
 ATGGAGAAAACCGTAAATCCTAATTTTAAAAAAGAATTAATGTATTGATGAAAATTAATAATGCA
 ATGCCAGAAGAATACTATGGATACAAAGATTATGATGCTGTAGAAGAAATATATGCCAATGTA
 ACTGCAAACCTTAACAACAAATGAAACCAAGTATACAAAAGGAAAACCTCGCATACTTATCTGTATTA
 ACTGACGATAATGGTAATAGTTTAAAAGTATTAACCAGGAGTTAGGTTGCCATTCTTAGGTTCA
 GAA
 AAAGTATATGTAATAATGATGACAAAAAATAATATTAGGAGATCTTGCATATTCAGGAATTATT
 TCCGAAGGAGAATCTGTTGCTATTGGTGACGGTTACGAAGTAAAAGTTGCAGCAATGTATAGTTCA
 ACCCACTTGAAGCAGAGATACAAATATTAAGAATGGTAAGGTAATTAAGAAGATAGGTTAA
 A
 GTTAAACGAATCAAACCTGATGATTTAATAACCGACGACAATAAAGTTGCAGTTTTAGGATTC
 AA
 AGTTTTAAAGAATATTGGTGAAACAAAAGGATATGCAGAAGTTATTGTTGTGAAAGATTTAATGGA
 ATTGGAAGCTGGAGAAGAGTATATGGACAAGTGGGAAATTAGATGGGTTAAAAATGATAGTACAT
 TCCAAAAAGGAGATGTAGATGATACAGTTGCAGGTATTGCATTAGTATATACAAACGATGACGGTG
 TAAAAATCCGATGTATTGGAAGATAAAGATGATACATTTGACATTAAACCATACCCAGGATTACT
 TGAAAAGAACAACAGCAAAAGAGGAAAACCCAGA
 AACTTAGAATAGGCGCAGAACTCTCAAAA
 AGAAGAGTTATCTGTTGGACAAAGTGTATCAATATTCAATGCAGATATTAATTA
 AAAAGACATAAA
 AGCAGATGCACAGCAAGCAGTTCCAGTAACAGCACCAATCGCAAAATTAGATACAGAAGTATCAT
 TAGACACAGCAGAGAAAACTTAATCTTAGTTGGAGGTCCAGTTGCAAACAATTAACAAAAGAG
 TTAGTAGATATGGGTAAAGTAAACATTACCAATGACAGTCCAGCAACATTGACAAGCTTGGTTGAA
 GGCGCTTGCAAACGGACACGTATGATTTT
 AGTTGTAGsAGGCCCCCCCGAATTCTTGACAAGCT
 TGA
 AACTGA

BR-Box, TATA-Box, Transkriptionsstartpunkt, Shine-Dalgarno-Sequenz, Translationsstartpunkt, Translationse
 sende

Anhang 5: 16S rRNA-Sequenzen von *Bacillus sphaericus* DSM 396, *Bacillus fusiformis* (B3, DSM 2898T) und
Geobacillus stearothermophilus DSM 2358

Bacillus sphaericus DSM 396

16S rRNA-Sequenz (1563 Nukleotide)

GCGGCCGCAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCG
 AGCGAACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTATTGTCCCTCA
 TGGGACAATACTGAAAGACGGTCTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
 GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
 GACTGAGACACGGsCCArACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAA
 G
 ACCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTGCGTTTCGTA
 AAAACTCTGTTGTAAGGGA
 AGAACAAGTACAGTAGTA
 AACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
 CGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTG
 GGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTG
 GAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTATCTGGTCTGTA
 AACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG
 GAGCAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG
 TTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACT
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
 CGAAGCAAC
 GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTTGACCACTGTAGAGATATGGTTTTCCCTTCGGGG
 ACAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
 GCTACAATGGACGATACAAACGGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTC
 AGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT
 GCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGcCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACC
 CGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGATAGATGAATGGGGTGAAGT
 CGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTGCGGCCG

RBS

Bacillus fusiformis B3

16 S rRNA-Sequenz (1525 Nukleotide)

ACGAACGCTGGCGGyGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAkAAAGGAGCTTGCTCCTTCGA
 CGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAA
 ACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCATGGTGAACACTGAAAGACGGTTTCGGCTGT
 CGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGAT
 GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAgACTCCTACGGG
 AGGCAGcAgTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAG
 AAGGATTTTCGGTTCGTA AAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTA ACTGGCTGTACCT
 TGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
 AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
 CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAA
 TTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTATCTG
 GTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
 AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGT
 TGACCACTGTAGAGATATAGTTTCCCTTCGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTC
 AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC
 ATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
 TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATACAAACGGTTGCCAACT
 CGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAT
 GAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
 ACCGcCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCgGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCC
 GCCGAAgGTGGGATAGATGATtGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTG
 GATCACTcCTTtT

RBS

Bacillus fusiformis DSM 2898T

16S rRNA-Sequenz (1547 Nukleotide)

CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGC
 TTGCTCCTTCGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTTATAGTTTGGGA
 TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCATGGTGAACACTGAAAGAC
 GGTTTCGGCTGTCTGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
 AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCG
 CGTGAGTGAAGAAGGATTTCCGGTTCGTA AAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAA
 CTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
 TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTC
 TGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG
 AGGATAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
 GCGACTATCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATA
 CCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGC
 AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT
 CTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATAGTTTCCCTTCGGGGCAACGGTGACAGGTGGTG
 CATGGTTGTCTGCTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGAT
 CTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
 GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATACAAA
 CGGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA
 ACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
 GGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCT
 TTTGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATC
 GGAAGGTGCGGCTGGATCACTCCTTCTGCGGCCGCTT

RBS

Geobacillus stearothermophilus DSM 2358

16S rRNA-Sequenz (1589 Nukleotide)

TATATATAAGCGGCCGACAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACAT
 GCAAGTCGAGCGGACCGGATTGGGGCTTGCCTTGATTCGGTCAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACAC
 GTGGGCAACCTGCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCG
 AAGACCGCATGGTCTTCGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGGCTGTCACTTGC GGATGGGCCCCGCGGCG
 ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGGCTGAGAGGGTGAC
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAcACTCCTACGGGAGGCAGtAGTAGGGAATCTTCCGCA
 ATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGaAGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTG
 TTGTGAGGGACGTAGGaGCGCCGTTCTGAAGAGGGCGGCGCrGTGACGGTACCTCACGAGAAAGCCC
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC
 GTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC
 ATTGAAACTGGGGGACTTGAGGGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGC
 GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGCACCTGACGCTGAGGCGC
 GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
 GTGTTAGAGGGGTACACCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
 GCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
 TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTT
 CCCCCTTCGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG
 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCATTTCGGTTGGGCACTCTAGAG
 GGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACC CGGAGGGGGAGCGAATCCC
 AAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAA
 TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA
 GAGCTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCCGCACGGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGGCAA
 GTGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTTCTTTCTG
 CGGCCGCTTATATATAT

RBS

Anhang 6: Zugriffsnummern der S-Layer-Sequenzen soweit sie in der EMBL-Datenbank hinterlegt sind

<i>Methanotrorris igneus</i> DSM 5666	AJ564995
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> DSM 2095	AJ308554
<i>Methanococcus vannielii</i> DSM 1224	AJ308553

Anhang 7: Zugriffsnummern der 16S rRNA-Sequenzen soweit sie in der EMBL-Datenbank hinterlegt sind

<i>Bacillus sphaericus</i> DSM 396	AJ311894
<i>Bacillus fusiformis</i> B3	AJ311893

Danksagung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden durch das Ministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie und des Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt (Bonn) unterstützt.

Hiermit erkläre ich:

Die Dissertation mit dem Titel „ Charakterisierung von S-Layer-Proteinen bei Prokaryoten“ habe ich ohne unzulässige Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Dr. Harald Claus

Herr Prof. Dr. Tony Debaerdemaeker

Herr Dr. Bernhard Schlott

Herr Dr. Jürgen Fröhlich

Herr Dr. Markus Wunderlin

Herr Dr. Reinhard Rachel

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorgelegte Arbeit habe ich noch nie im Inland oder Ausland, weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Promotionsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt oder veröffentlicht.

(Datum, Unterschrift)

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Erol Akça
Geburtstag: 28. Juli 1973 in Kirn
Eltern: Adem Akça (verstorben 1996)
Esmâ Akça, geb. Dursun (verstorben 1993)
Geschwister: Eine Schwester (Aliye Akça)
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

Schulbildung:

August 1980 – Juli 1985 Grundschule Hennweiler
August 1985 – Juli 1990 Hauptschule Kirn
August 1990 – Juni 1991 freiwilliges 10. Schuljahr Hauptschule Kirn
August 1991 – Juni 1994 Staatliches Aufbaugymnasium Alzey
Abschluß: Abitur (Allgemeine Hochschulreife)

Hochschulausbildung:

Seit Oktober 1994 Student der Biologie (Diplom) an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Diplom-Vorprüfung: 13. Dezember 1996
Diplom-Hauptprüfung: 26. Juli 2000
Seit Oktober 2000 Promotionsarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinfor-
schung unter der Betreuung von Prof. H. König an der Jo-
hannes Gutenberg-Universität Mainz