

Physiologie und Molekularbiologie acidophiler Nanoorganismen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER
NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und
Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Sabrina Gfrerer

1. Referent: Prof. Johannes Gescher
 2. Referentin: Prof. Anne-Kristin Kaster
- Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2021

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die folgende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Texten entnommenen Stellen sind von mir durch Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Prüfungsleistung.

Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KIT beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut für Angewandte Biowissenschaften archiviert.

Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2018 bis Juni 2021 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

gezeichnet: Sabrina Gfrerer

Ort, Datum: Karlsruhe, den 09.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
1 Einleitung	1
1.1 Die Zellhülle der Archaea	2
1.2 Euryarchaeota	5
1.2.1 Thermoplasmatales	5
1.3 TACK-Archaea	10
1.4 Asgard-Archaea	12
1.5 DPANN-Archaea	12
1.5.1 <i>Nanoarchaeum equitans</i>	13
1.5.2 Micrarchaeota	14
1.6 Mikroorganismen aus dem Bergwerk „Drei Kronen und Ehrh“ .	15
1.6.1 Die Anreicherung	16
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Organismen und Stämme	19
2.1.2 Plasmide	19
2.1.3 Tyramid-Konjugate	20
2.1.4 Primer und Sonden	20
2.1.5 Antikörper	22
2.1.6 Chemikalien, Enzyme und Kits	23
2.2 Methoden	23
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	23
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	35
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	38
2.2.4 Bioinformatische Methoden	41
3 Ergebnisse und Diskussion	44
3.1 B_DKE	44
3.1.1 Allgemeine Wachstumsbedingungen	44
3.1.2 Temperaturoptimum	48
3.1.3 Metabolisches Potential	51
3.1.4 Sauerstoffeinfluss	55
3.1.5 Zellhülle	58
3.1.6 Einordnung innerhalb der Thermoplasmatales	61

3.2	A_DKE	64
3.2.1	Allgemeine Wachstumsbedingungen	64
3.2.2	Temperaturoptimum	66
3.2.3	Metabolisches Potential	69
3.2.4	Sauerstoffeinfluss	74
3.2.5	Zellhülle	77
3.2.6	Phylogenetische Einordnung und Strategien zur Gene- rierung einer Reinkultur	84
3.3	Interaktion	88
3.3.1	Veränderte Wachstumsmorphologie	88
3.3.2	Glykosylierung	90
3.3.3	Vergleichendes Transkriptom	92
3.3.4	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	95
3.3.5	Möglicher Mechanismus der Interaktion	97
4	Ausblick	100
	Anhang	122

Zusammenfassung

Viele Aspekte der Archaea - einer der Domänen des Lebens - sind trotz ihrer weltweiten Verbreitung weiterhin nicht verstanden. So waren lange keine parasitischen Archaea bekannt. Mit der Entdeckung der DPANN-Archaea - einem Superphylum, das mutmaßliche archaeelle Symbionten umfasst - änderte sich diese Ansicht. Über die genaue Lebensweise der Vertreter ist jedoch wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde eine Cokultur aus dem Micrarchaeon A_DKE - einem DPANN-Archaeon - und seinem mutmaßlichen Wirtsorganismus B_DKE charakterisiert. Bei Letzterem handelt sich es um ein weiteres Archaeon, einen Vertreter der Thermoplasmatales.

Im Zuge dieser Arbeit wurde sowohl das A_DKE-, als auch das B_DKE-Genom vollständig sequenziert und beide Organismen wurden benannt. Während für das Micrarchaeon der Name „*Micrarchaeum harzensis* A_DKE“ vorgeschlagen wird, soll der Thermoplasmatales-Vertreter den Namen „*Scheffleriplasma hospitalis* B_DKE“ tragen.

Mit Hilfe von Analysen auf Genom-, Transkriptom-, Proteom- und Metabolitenebene, sowie Wachstumsversuchen konnten für beide Organismen mögliche physiologische und molekularbiologische Eigenschaften identifiziert werden. B_DKE, der auch in Reinkultur vorliegt, nutzt im Citratzyklus generierte Reduktionsäquivalente mittels einer Elektronentransportkette, sowie den Abbau von Aminosäuren zur Energiegewinnung. Außerdem konnten vollständige Stoffwechselwege zur Synthese von Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleotiden identifiziert werden. Das Genom des Micrarchaeons hingegen stellte sich als stark reduziert heraus. So ist A_DKE zwar in der Lage, selbstständig Energie über den Citratzyklus und den Abbau von Nukleotiden und Aminosäuren zu gewinnen, scheint jedoch für viele anabole Stoffwechselwege, auf die Aufnahme von Intermediaten von B_DKE angewiesen zu sein.

Bei der Charakterisierung der Organismen fiel auf, dass sie sich in ihren Zellhüllen unterscheiden. Während B_DKE - wie die meisten Thermoplasmatales-Vertreter - neben der Cytoplasmamembran nur von einer Glykokalyx umgeben ist, wird das Micrarchaeon von einem S-Layer umhüllt. Bei einer näheren Untersuchung des entsprechenden S-Layer-Proteins ließ sich dessen posttranslationale Glykosylierung feststellen. A_DKE stellt damit den zweiten Vertreter der DPANN-Archaea dar, bei dem ein S-Layer nachgewiesen werden konnte.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass A_DKE bevorzugt in Aggregaten in räumlicher Nähe zum Thermoplasmatales-Vertreter wächst und die Cokultivierung mit A_DKE diese Aggregatbildung fördert. Da sich mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen direkte Zellkontakte zwischen beiden Organismen erfassen ließen und nur wenige Transporter-Gene in den Genomen von A_DKE und B_DKE identifiziert werden konnten, wurde ein Interaktionsmechanismus über direkten Zellkontakt und cytoplasmatische Brücken postuliert. Beschrieben wurde ein ähnlicher Mechanismus bereits zwischen dem DPANN-Archaeon *Nanoarchaeum equitans* und seinem Wirt *Ignicoccus hospitalis*. Auch von anderen DPANN-Archaea ist Wachstum in enger räumlicher Nähe zu ihren potentiellen Wirten bekannt.

Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse, deuten darauf hin, dass alle DPANN-Archaea einen ähnlichen Mechanismus zur Interaktion mit ihren jeweiligen Wirten verwenden und stellen so einen wichtigen Schritt zum Verständnis der Lebensweise dieses Superphylums dar.

Tabellenverzeichnis

1	Physiologische Eigenschaften von Vertretern der Ordnung Thermoplasmatales	9
2	In dieser Arbeit verwendete Organismen und Stämme	19
3	Verwendete Plasmide mit relevanten Eigenschaften	19
4	Lösungen zur Synthese der Tyramid-Konjugate	20
5	Verwendete Primer und Sonden.	21
6	In dieser Arbeit verwendete oder erstellte Antikörper	22
7	Zusammensetzung von <i>lysogeny broth</i> -Medium.	23
8	Zusammensetzung des modifizierten <i>Picrophilus</i> -Mediums . .	24
9	Zusammensetzung der Spurenelementlösung (<i>Wolfe 's mineral elixir</i>) für modifiziertes <i>Picrophilus</i> -Medium.	25
10	Vitaminlösung.	26
11	Verwendete CARD-FISH-Lösungen	27
12	Verwendete CARD-FISH-Puffer	28
13	Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes	36
14	Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes	37
15	Kultivierungsbedingungen der Wachstumsversuche	45
16	Differentiell exprimierte B_DKE-Gene	57
17	Zellwand-Komponenten von B_DKE	59
18	Physiologische Eigenschaften von Vertretern der Ordnung Thermoplasmatales	62
19	Ergebnisse des Versuchs zur Untersuchung des Sauerstoffeinflusses auf A_DKE	75
20	Zellwand-Komponenten von B_DKE und A_DKE	78
21	Eigenschaften des potentiellen S-Layer-Proteins SLP _{A_DKE} . . .	79
22	Ergebnisse einer Lektin-Analyse der Glykokalyx der Rein- und Cokultur	90
23	Differentiell exprimierte B_DKE-Gene in Rein- und Cokultur .	93
24	Auflistung der Gene und Expressionsraten von Abbildung 11 .	115
25	Auflistung der Gene und Expressionsraten von Abbildung 12 .	117
26	Auflistung der Gene und Expressionsraten von Abbildung 17 .	119
27	Auflistung der Gene und Expressionsraten von Abbildung 18 .	120

Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht über phylogenetische Stammbäume der Archaea . . .	1
2	Struktur der Lipide in Zellmembranen von Bacteria und Archaea	3
3	Zellwandaufbau verschiedener Archaea	4
4	Phylogenetischer Stammbaum offiziell benannter Thermoplasmales-Arten auf Basis ihrer 16S-rDNA	6
5	Unterschiedliche Morphologie von Archaea in elektronenmikroskopischen Aufnahmen	11
6	Phylogenetischer Stammbaum der bekanntesten Micrarchaeota-Vertreter auf Basis ihrer 16S-rDNA	15
7	Übersicht der Anreicherung und Untersuchung der in dieser Arbeit beschriebenen Kultur	17
8	Vergleich von B_DKE-Wachstumskurven	46
9	Anteile verschiedener Gase in der B_DKE-Gasphase	47
10	Vergleich der B_DKE-Wachstumsversuche bei 22 °C und 37 °C .	49
11	Genexpressionsraten von Genen für Proteine verschiedener Stoffwechselwege zur Energiegewinnung in B_DKE	53
12	Genexpressionsraten von Genen für Proteine verschiedener kataboler Stoffwechselwege in B_DKE	54
13	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Thermoplasmales-Vertreterers B_DKE	60
14	Phylogenetischer Stammbaum offiziell benannter Thermoplasmales-Arten auf Basis ihrer 16S-rDNA	62
15	Veränderung verschiedener Parameter im Verlauf einer A_DKE-B_DKE-Kultivierung	65
16	Vergleich der Cokultur-Wachstumsversuche bei 22 °C und 37 °C	67
17	Genexpressionsraten von Genen verschiedener Stoffwechselwege zur Energiegewinnung in A_DKE	71
18	Genexpressionsraten von Genen verschiedener kataboler Stoffwechselwege in A_DKE	73
19	Prüfung der Funktionalität und Spezifität der beiden Antikörper gegen SLPMh	81
20	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Micrarchaeons A_DKE	83
21	Phylogenetischer Stammbaum der bekanntesten Micrarchaeota-Vertreter auf Basis ihrer 16S-rDNA inklusive A_DKE	85
22	Mikroskopische Aufnahmen einer CARD-FISH-gefärbten Rein- bzw. Cokultur	89

23	Mikroskopische Aufnahmen einer Lektin- und CARD-FISH-gefärbten Rein- bzw. Cokultur	91
24	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der A_DKE-B_DKE-Cokultur	96
25	Schematische Darstellung des möglichen Interaktionsmechanismus von A_DKE und B_DKE	98
26	Cokultur-Wachstumsversuche bei 22 °C	121

Abkürzungsverzeichnis

AK Antikörper

AP Alkalische Phosphatase

Ara Arabinose

ARMAN *Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms*

CARD-FISH *Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence in situ Hybridisation*

BCIP 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

BSA Rinderserumalbumin

bzw. beziehungsweise

DAPI 4,6-Diamidin-2-phenylindol

ddH₂O doppelt destilliertes Wasser

DKE Drei Kronen und Ehrt

DMSO Dimethylsulfoxid

DPANN Akronym aus Diapherotrites, Aenigmarchaeota, Parvarchaeota, Nanoarchaeota und Nanohaloarchaeota, archaeelles Superphylum

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EPS extrazelluläre polymere Substanzen

G₁P Glycerol-1-Phosphat

G₃P Glycerol-3-Phosphat

GC Gaschromatographie

KLH Napfschnecken-Hämocyanin

MS Massenspektrometrie

MSTFA N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid

MVA Mevalonat

NBT Nitroblautetrazoliumchlorid

NCBI *National Center for Biotechnology Information*

ori *origin of replication*

PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR Polymerase-Ketten-Reaktion

PTFE Polytetrafluorethylen

qPCR quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

RT Raumtemperatur

SDS Natriumlaurylsulfat

SLP S-Layer-Protein

SSC Natriumcitrat-Salzlösung

TACK Akronym aus Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota und Korarchaeota, archaeelles Superphylum

taq *Thermus aquaticus*

Tat *twin arginine translocation*

TBS TRIS-gepufferte Salzlösung

1 Einleitung

Archaea

Auch Jahrzehnte nach ihrer Entdeckung durch Woese *et al.* sind viele wichtige Aspekte der Archaea noch nicht vollständig verstanden und Forscher gelangen immer wieder zu überraschenden Erkenntnissen über diese Domäne des Lebens.

Während man lange Zeit der Überzeugung war, dass Archaea hauptsächlich Standorte mit extremen Bedingungen besiedeln, kristallisierte sich durch den vermehrten Einsatz von kultivierungsunabhängigen Untersuchungsmethoden heraus, dass diese Organismen ubiquitär verbreitet sind und teilweise eine wichtige Rolle in biogeochemischen Stoffkreisläufen einnehmen (DeLong *et al.*, 2001; Cavicchioli, 2011; Pace, 2009).

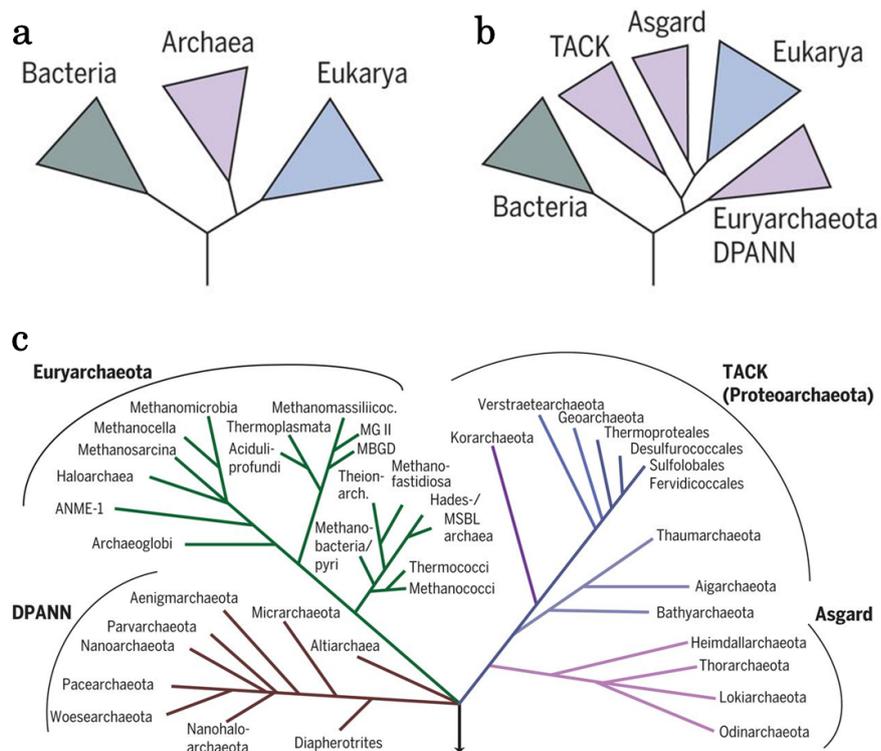


Abbildung 1: Übersicht über phylogenetische Stammbäume der Archaea. (a) Schema der Drei-Domänen-Hypothese, nach der Archaea neben Bacteria und Eukarya die dritte Domäne des Lebens bilden. (b) Schema eines aktuelleren phylogenetischen Stammbaums, der darauf hindeutet, dass es sich bei Eukarya um eine Untergruppe der Archaea handelt (Zwei-Domänen-Hypothese). (c) Übersicht über die vier Superphyla und zugeordnete Gruppen mit hohem taxonomischen Rang. Abbildung verändert nach Spang *et al.* (2017).

Die 1990 postulierte Drei-Domänen-Hypothese (Woese *et al.*, 1990) nach der Archaea eine monophyletische Gruppe mit den Eukarya bilden, wurde

mit aktualisierten phylogenetischen Stammbäumen durch die Zwei-Domänen-Hypothese ersetzt (Williams *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2014). Nach dieser Theorie existieren nur zwei Domänen - die der Archaea und der Bacteria - die Eukarya stellen in diesem Modell eine Untergruppe der Archaea dar. Die Zwei-Domänen-Hypothese ist demnach besser vereinbar mit der Endosymbiontentheorie, nach der es sich beim Vorfahr der Eukarya um ein Archaeon handelt, das ein Bakterium in sich aufnahm. Der Stammbaum der Archaea ist durch die Entdeckung von immer mehr archaellen Arten einem ständigen Wandel unterzogen. Aktuell werden Archaea vier Superphyla zugeordnet; den Euryarchaeota, den TACK-Archaea, den Asgard-Archaea und den DPANN-Archaea (Spang *et al.*, 2017). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Vertretern dieser vier Superphyla sind in Abbildung 5 zu sehen.

1.1 Die Zellhülle der Archaea

Obwohl sie sich in ihrer Physiologie und der Wahl des Lebensraums ähneln, unterscheiden sich Archaea in einigen Aspekten grundlegend zu Bacteria.

Während die Zellmembran von Bacteria größtenteils aus Glycerol-3-Phosphat(G₃P)-Fettsäuren besteht, die durch Esterverbindungen verlinkt sind, werden archaelle Membranlipide durch Isoprenoid-Seitenketten gebildet, die über Etherbindungen an Glycerol-1-Phosphat (G₁P) gebunden sind. Diese bilden entweder eine Doppelschicht von Diethern (Archaeolen) oder eine Monoschicht von Tetraethern (d.h. GDGTs). Archaeelle Kopfgruppen können eine Vielfalt an polaren Verbindungen enthalten (Kates, 1992). Eine Darstellung der Zellmembran-Bausteine in Bacteria und Archaea ist in Abbildung 2 zu sehen. Die Isoprenoid-Bausteine werden durch eine der vier Varianten des archaellen Mevalonat(MVA)-Wegs synthetisiert, die sich hinsichtlich der Enzyme unterscheiden, welche die letzten drei enzymatischen Schritte vermitteln (Koga *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2014).

Der Hauptzellwandbestandteil der Bacteria - das Peptidoglycan - ist in archaellen Zellwänden nicht vorhanden. Stattdessen besitzen Archaea eine große Vielfalt an Zellwandpolymeren und im Aufbau ihrer Zellhülle allgemein.

Die Cytoplasmamembran wird entweder von einer Polymerschicht, einer Schicht aus sogenannten *surface-layer*-Proteinen (S-Layer) oder einer Kombination aus Beiden umhüllt (König *et al.*, 2007). Bekannte Zellwandpolymere in Archaea sind Glutaminylglykan, Heterosaccharide, Methanochondroitin oder

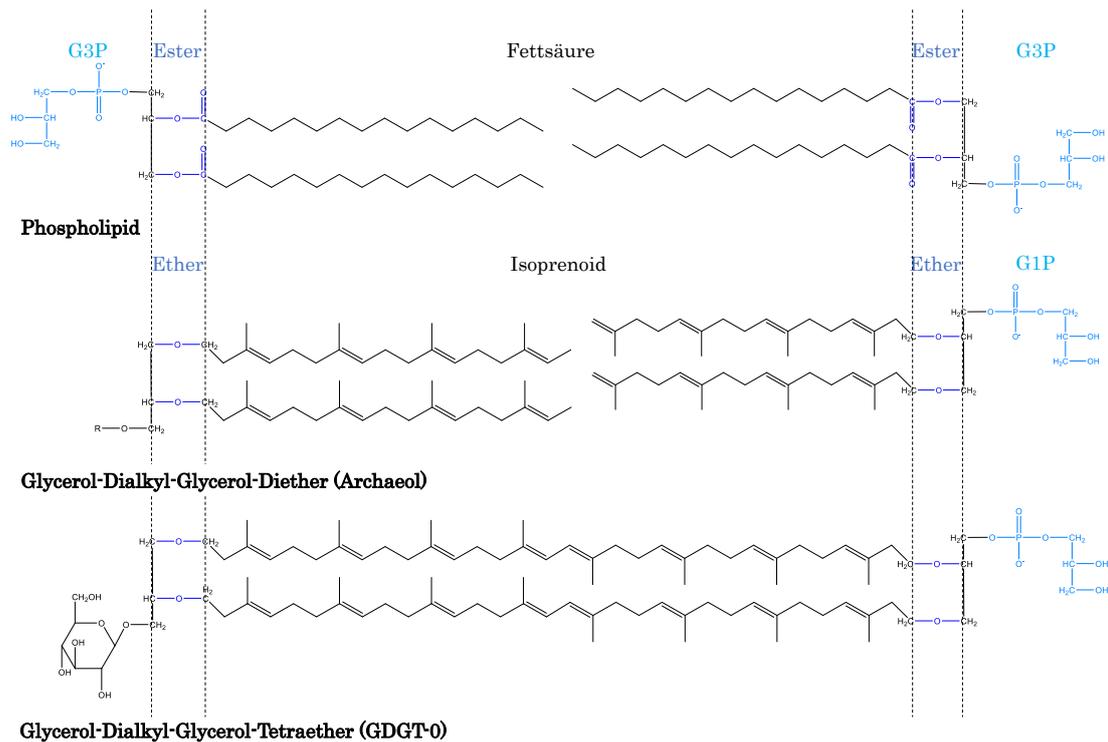


Abbildung 2: Struktur der Lipide in Zellmembranen von Bacteria und Archaea. Zu sehen ist die Struktur eines bakteriellen Phospholipid, eines archaeellen Glycerol-Dialkyl-Glycerol-Diethers und eines Tetraethers. Die drei Unterschiede zwischen archaeellen und bakteriellen Lipiden sind gekennzeichnet. G1P: Glycerol-1-Phosphat, G3P: Glycerol-3-Phosphat.

Pseudomurein. Schematische Darstellungen von Zellwandaufbauten bekannter Archaea sind in Abbildung 3 zu sehen.

S-Layer bestehen aus ein oder zwei (Glyko-)Proteinen, die selbständig ein zweidimensionales Gitter ausbilden, das die gesamte Zelle bedeckt (Sumper *et al.*, 1990; König *et al.*, 2007; Albers *et al.*, 2011). Dabei bilden entweder ein (p1), zwei (p2), drei (p3), vier (p4) oder sechs (p6) Proteine eine morphologische Untereinheit (Sára *et al.*, 2000; Sleytr *et al.*, 2014). Die im Gitter angeordneten Untereinheiten bilden regelmäßig angeordnete Poren, die unter dem Elektronenmikroskop sichtbar sind (siehe Abbildung 3) (Taylor *et al.*, 1982; Baumeister *et al.*, 1991). Die Proteine sind dabei entweder direkt oder indirekt in der darunter liegenden Cytoplasmamembran verankert (König *et al.*, 2007).

Die Funktion, die S-Layer innehaben, ist noch nicht vollständig geklärt. In verschiedenen *Haloferax*-Stämmen wurde gezeigt, dass S-Layer eine Rolle bei der Erkennung und Interaktion von Zellen spielen (Shalev *et al.*, 2018). Außerdem wird vermutet, dass S-Layer die Zellform prokaryotischer Zellen stabilisieren, sowie als Schutz vor äußeren Einflüssen fungieren (Engelhardt,

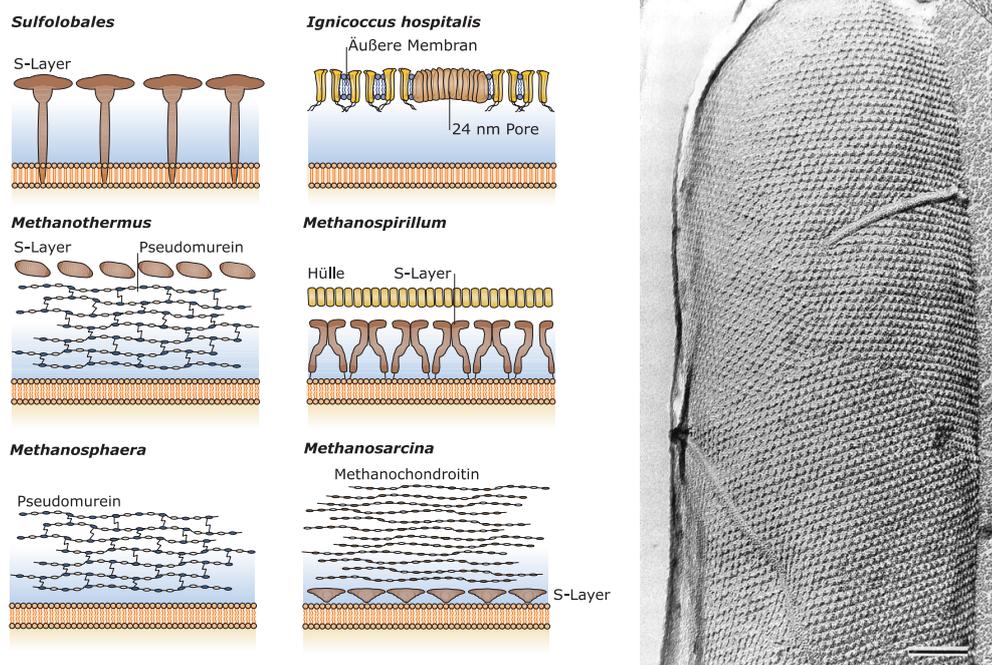


Abbildung 3: Zellwandaufbau verschiedener Archaea. Schematische Darstellung archaeeller Zellwände links (mit freundlicher Genehmigung verändert nach Albers *et al.*, 2011) und elektronenmikroskopische Aufnahme einer gefriergetrockneten, metallschattierten Zelle mit deutlich sichtbarem S-layer mit p6-Symmetrie rechts. Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm (Sára *et al.*, 2000).

2007). Die Poren, die die S-Layer-Proteine ausbilden, dienen dabei als molekularer Sieb für kleine Moleküle (Sleytr *et al.*, 2014).

Archaeelle Membranbestandteile sind häufig glycosyliert. An Membranproteinen wurden sowohl N- als auch O-verknüpfte Glykosylierungen gefunden (Albers *et al.*, 2011). Während über O-Glykosylierung in Archaea wenig bekannt ist, wurde der Mechanismus der N-Glykosylierung in den letzten Jahren in *Methanococcus*- und *Haloferax*-Stämmen genauer untersucht (Van Dyke *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2009; Abu-Qarn *et al.*, 2007; Magidovich *et al.*, 2010; Yurist-Doutsch *et al.*, 2010). Bei der Glykosylierung werden Nucleotid-aktivierte Zucker von Glykosyltransferasen an einem Lipid-Carrier verknüpft. Die so an der cytoplasmatischen Seite der Membran entstehende Oligosaccharidkette wird nach Verknüpfung des letzten Zuckers von einer unbekanntem Flippase an die Außenseite der Membran befördert und dort von der Oligosaccharyltransferase AgIB auf ein entstehendes Protein transferiert (Albers *et al.*, 2011).

1.2 Euryarchaeota

Das Superphylum der Euryarchaeota enthält sowohl phylogenetisch, als auch morphologisch diverse Organismen (Garrity *et al.*, 2001; Oren, 2019). Es sind Vertreter mit aeroben bis anaeroben Lebensweisen ebenso beschrieben, wie chemoautotrophe und heterotrophe Mitglieder. Außerdem beinhaltet das Superphylum alle bekannten methanogenen Archaea (Garrity *et al.*, 2001). Viele Vertreter der Euryarchaeota sind extremophil, so sind halophile (Halarchaea), acidophile (Thermoplasmatales), thermophile und hyperthermophile (z. B. *Archaeoglobus* und *Pyrococcus*) Arten bekannt. Auch der Aufbau der Zellwand variiert in Euryarchaeota stark. Während viele Arten einen S-Layer besitzen, wurden auch zusätzliche Zellwandbestandteile wie Pseudomurein bei *Methanobacterium* (Kandler *et al.*, 1978) und Methanochondroitin bei *Methanosarcina* (Kandler *et al.*, 1977) gefunden. Eine Besonderheit stellen die Vertreter der Thermoplasmatales dar, die - bis auf eine Familie - keine Zellwand besitzen.

1.2.1 Thermoplasmatales

Thermoplasmatales (Reysenbach, 2001) stellen eine Ordnung innerhalb der Euryarchaeota dar, die durch acidophile und thermo- und mesophile Vertreter mit mixotrophen und heterotrophen Lebensweisen charakterisiert ist (Huber *et al.*, 2006). Wie oben erwähnt besitzen drei von vier beschriebenen Familien der Thermoplasmatales neben der Cytoplasmamembran keine weitere Zellhülle (Huber *et al.*, 2006; Golyshina *et al.*, 2016; Abbildung 5d). Eine Ausnahme stellen Mitglieder der Picrophilaceae dar (Schleper *et al.*, 1996). Eine weitere Besonderheit der Thermoplasmatales ist ihre pleomorphe Form durch die sie in der Lage sind, sich in Extremfällen durch Filter mit 0,1 µm Porengröße zu zwingen (Ghuneim *et al.*, 2018). Ein Stammbaum der offiziell benannten Thermoplasmatales-Arten ist in Abbildung 4 zu sehen.

Thermoplasmaceae Die Familie der Thermoplasmaceae enthält neben dem ersten beschriebenen Thermoplasmatales-Vertreter *Thermoplasma acidophilum* (Darland *et al.*, 1970) einen weiteren Vertreter dieser Gattung: *Thermoplasma volcanium* (Seegerer *et al.*, 1988). Beide Arten sind fakultative Aerobier, die heterotroph auf Hefeextrakt und Kohlenhydraten wie Saccharose, Glukose und Mannose wachsen. Unter anaeroben Bedingungen bedienen sie sich der Schwefelatmung und produzieren H₂S (Seegerer *et al.*, 1988). Die optimalen Wachstumsbedingungen der beiden thermoacidophilen Organismen liegen

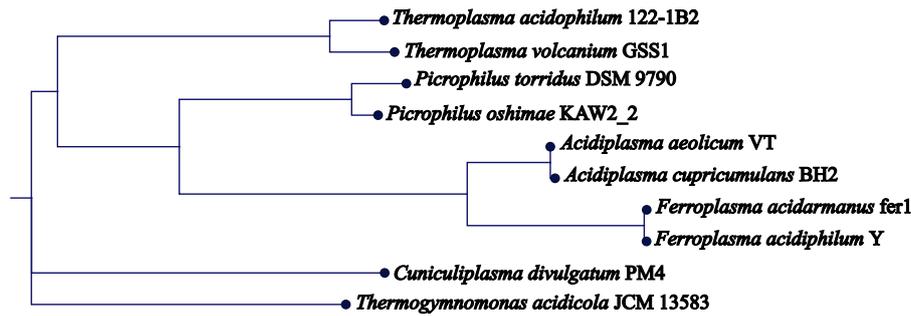


Abbildung 4: Phylogenetischer Stammbaum offiziell benannter Thermoplasmatales-Arten auf Basis ihrer 16S-rDNA.

bei einer Temperatur von 60 °C und einem pH-Wert von 2,0 (Reysenbach *et al.*, 2014), wobei *T. volcanium* mit 33-67 °C bei einem größeren Temperaturspektrum wachsen kann als *T. acidophilum* (45-63 °C). Außerdem unterscheiden sich die beiden Organismen durch den GC-Gehalt ihrer Genome. Mit 46 % ist dieser bei *T. acidophilum* (Darland *et al.*, 1970) höher als bei *T. volcanium* mit etwa 38 % (Segerer *et al.*, 1988). Mit Größen von etwa 1,6 Mb sind beide Genome sehr klein im Vergleich zu anderen Euryarchaeota (Ruepp *et al.*, 2000; Kawashima *et al.*, 2000). Zudem besitzen sie Glykoproteine in der Cytoplasmamembran, deren Zusammensetzung bei *T. acidophilum* näher bestimmt wurde (Yang *et al.*, 1979; Vinogradov *et al.*, 2012). Die Zellen beider Arten sind pleomorphe Kokken mit Durchmesser zwischen 0,2 und 5 µm (Reysenbach *et al.*, 2014).

Picrophilaceae Mitglieder der Familie der Picrophilaceae gehören zu den am säureliebendsten, bekannten Organismen (Schleper *et al.*, 1996). Die beiden obligat aeroben, heterotrophen Mitglieder, *Picrophilus torridus* und *Picrophilus oshimae*, sind in der Lage bei pH-Werten von 0 bis 3,5 zu wachsen, optimales Wachstum wurde bei einem pH-Wert von 0,7 beobachtet (Schleper *et al.*, 1995). Während die allgemeine und optimale Wachstumstemperatur der einzigen zwei Picrophilaceae-Vertreter mit 47-65 °C und 60 °C, denen der Thermoplasmaceae ähneln, unterscheiden sie sich in der Morphologie (Schleper *et al.*, 1995).

Als einzige Mitglieder der Ordnung Thermoplasmatales bilden *P. torridus* und *P. oshimae* einen S-Layer als Zellhülle aus (Schleper *et al.*, 1995). Dieser ist etwa 40 nm hoch und besitzt eine Kristallstruktur mit p3-Symmetrie, sowie

einem Porenabstand von 20 nm (Schleper *et al.*, 1995). Es wird angenommen, dass der S-Layer sowohl an der Ausbildung der Zellform von unregelmäßigen Kokken mit 1,0-1,5 µm Größe (Schleper *et al.*, 1995), als auch bei der Erhaltung des intrazellulären pH-Werts von etwa 4,6 (Vossenbergh *et al.*, 1998) in der immens sauren Umgebung beteiligt ist (Baker-Austin *et al.*, 2007). Der GC-Gehalt beider Genome entspricht etwa 36 % (Schleper *et al.*, 1996), die Größe des *P. torridus*-Genoms 1,55 Mb (Fütterer *et al.*, 2004).

Ferroplasmaceae Mitglieder der Ferroplasmaceae unterscheiden sich auf physiologischer Ebene von Vertretern der anderen Thermoplasmatales-Familien durch ihre Fähigkeit zur Fe²⁺-Oxidation (Golyshina *et al.*, 2000). Es sind bislang zwei Gattungen bekannt, die den Ferroplasmaceae zugeordnet werden (Golyshina, 2011). Diese beinhalten die vier Arten: *Ferroplasma acidiphilum* (Golyshina *et al.*, 2000), *Ferroplasma acidarmanus* (Edwards *et al.*, 2000; Dopson *et al.*, 2004), *Acidiplasma aeolicum* (Golyshina *et al.*, 2009) und *Acidiplasma cupricumulans* (Hawkes *et al.*, 2006).

Mitglieder der Ferroplasmaceae sind in der Lage, bei deutlich niedrigeren Temperaturen zu wachsen als Vertreter der Thermoplasmaceae oder Picrophilaceae (Golyshina, 2011). Die Temperaturoptima für die Gattung *Acidiplasma* sind dabei mit 53,6 °C bei *A. cupricumulans* (Hawkes *et al.*, 2006) und 45 °C bei *A. aeolicum* (Golyshina *et al.*, 2009) höher, als die der zweiten Gattung mit 35 °C und 42 °C bei *F. acidiphilum* (Golyshina *et al.*, 2000) und *F. acidarmanus* (Dopson *et al.*, 2004).

Ferroplasmaceae-Vertreter gehören neben den Picrophilaceae zu den wenigen Organismen, die in der Lage sind, bei einem pH-Wert nahe 0 zu wachsen (Golyshina, 2011). Ihr pH-Optimum liegt allerdings zwischen 1 und 1,7. Erwähnenswert ist dabei, dass der *A. aeolicum*-Stamm Wachstum bis zu einem pH-Wert von 4 zeigt, während die anderen Ferroplasmaceae-Vertreter lediglich in der Lage sind, in pH-Wert-Bereichen zwischen 0 und 2,2 zu wachsen (Golyshina *et al.*, 2000; Dopson *et al.*, 2004; Hawkes *et al.*, 2006; Golyshina *et al.*, 2009).

Während *A. aeolicum* heterotroph wächst, besitzen *F. acidiphilum* und *A. cupricumulans* eine mixotrophe Lebensweise, *F. acidarmanus* kann auf beide Arten wachsen. Während *F. acidiphilum* obligat aerob wächst (Golyshina *et al.*, 2000), handelt es sich bei den anderen drei Arten um fakultative Aerobier (Dopson *et al.*, 2004; Hawkes *et al.*, 2006; Golyshina *et al.*, 2009). Unter anaeroben Bedingungen reduzieren sie Fe³⁺, während sie Hefeextrakt als Kohlenstoffquelle nutzen (Golyshina *et al.*, 2009). Der GC-Gehalt der Genome der vier

Organismen liegt bei 34-37% und ist damit ähnlich zu Vertretern der Picrophilaeae. Ihre Zellform wird als pleomorph oder als unregelmäßige Kokken beschrieben. Die Größe variiert dabei mit der Inkubationszeit und -weise. So bildet *F. acidarmanus* pleomorphe Zellen mit einer Größe von $0,66 \pm 0,18 \mu\text{m}$ unter heterotrophen Bedingungen aus, während unter mixotrophen Bedingungen unregelmäßige Kokken mit $0,57 \pm 0,20 \mu\text{m}$ Größe zu beobachten sind (Dopson *et al.*, 2004).

Cuniculiplasmaceae Die Familie der Cuniculiplasmaceae enthält bisher eine Art - *Cuniculiplasma divulgatum* - (Golyshina *et al.*, 2016). Die Art ist mesophil wie Vertreter der Ferroplasmaceae und wächst optimal bei 37-40 °C. Wachstum wurde bei Temperaturen im Bereich von 10 bis 48 °C beobachtet. *C. divulgatum* ist strikt heterotroph und unterscheidet sich somit physiologisch von Ferroplasmaceae-Vertretern. Der fakultative Anaerobier zeigt optimales Wachstum bei pH-Werten von 1,0-1,2, ist aber in der Lage in einem Bereich mit pH-Werten von 0,5 bis 4,0 zu wachsen. Die pleomorphen Zellen sind dabei auf die Anwesenheit von Hefeextrakt angewiesen. Der GC-Gehalt des *C. divulgatum*-Genoms beträgt 37%.

In dieser Arbeit wird eine weitere Art - „*Candidatus* Scheffleriplasma hospitalis“ - beschrieben, die laut phylogenetischen Analysen zusammen mit *C. divulgatum* in der Familie der Cuniculiplasmaceae gruppiert ist.

Tabelle 1: Physiologische Eigenschaften von Vertretern der Ordnung Thermoplasmatales. (1) *Thermoplasma*, (2) *Picrophilus*, (3) *Ferroplasma*, (4) *Acidiplasma*, (5) *Thermogymnomonas* (6) *Cuniculiplasma*.

	1	2	3	4	5	6
S-Layer	-	+	-	-	-	-
Wachstumstemperatur [°C]						
Bereich	33-67 /45-63	47-65	15-45	15/22- 65	38-68	10-48
Optimum	60	60	35/42	45/53,6	60	37-40
pH-Wert						
Bereich	0,5-4	0-3,5	1,3-2,2	0-4 /0,4-1,8	1,8-4	0,5-4
Optimum	1-2	0,7	1,7	1-1,6	3	1-1,2
Wachstum						
Fe ²⁺ - Oxidation	-	-	+	+	-	-
anaerob	+	-	-/+	+	-	+
heterotroph	+	+	+	-/+	+	+
mixotroph	-	-	-/+	-/+	-	-
Genom						
Größe [Mb]	1,56/1,58	1,53/1,55	1,83/1,94	1,73/1,78	1,73	1,88
GC- Gehalt [mol%]	38-46	36	37	34-37	56	37
Morpho- logie	pleo- morphe Kokken	unregel- mäßige Kokken	pleo- morph /Kok- ken	pleo- morph /Kok- ken	unregel- mäßige Kokken	pleo- morph

Thermogymnomonas acidicola Einen weiteren Thermoplasmatales-Vertreter, der keiner Familie zugeordnet werden konnte, stellt *Thermogymnomonas acidicola* dar (Itoh *et al.*, 2007). Der heterotrophe, strikt aerobe Organismus besitzt eine Zellform von unregelmäßigen Kokken mit einem Durchmesser von 1,0 bis 3,0 µm. Optimales Wachstum wurde bei 60 °C und einem pH-Wert von 3,0 beobachtet, Wachstum ist jedoch bei Temperaturen von 38-68 °C und pH-Werten von 1,8-4,0 möglich. Mit 56 % ist der GC-Gehalt des Genoms der

höchste der Thermoplasmatales-Vertreter.

Die physiologischen Eigenschaften der genannten Thermoplasmatales-Vertreter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

1.3 TACK-Archaea

Das sehr diverse Superphylum der TACK-Archaea umfasst die namensgebenden Phyla Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota und Korarchaeota, sowie als weitere Gruppen höherer Ordnung die Geoarchaeota, Bathyarchaeota und Verstraetearchaeota (Guy *et al.*, 2011; Kozubal *et al.*, 2013; Guy *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2015; Vanwonterghem *et al.*, 2016).

Thaumarchaeota (Brochier-Armanet *et al.*, 2008) sind Ammonium-Oxidierer, die sowohl aquatisch, als auch terrestrisch einen großen Beitrag zu Stickstoff- und Kohlenstoffkreisläufen leisten (DeLong, 1992; Fuhrman *et al.*, 1992; Spang *et al.*, 2010).

„*Candidatus* Caldiarchaeum subterraneum“ ist der einzige näher charakterisierte Vertreter des vorgeschlagenen Phylums **Aigarchaeota** (Nunoura *et al.*, 2010). Im Genom dieses Organismus wurden genetische Informationen für ein System zur Proteinmodifikation gefunden, das der eukaryotischen Ubiquitinierung ähnelt.

Das Phylum der **Crenarchaeota** (Woese *et al.*, 1990) ist eine sehr heterogene Gruppe. Neben dem Modellorganismus *Sulfolobus acidocaldarius* (Brock *et al.*, 1972), handelt es sich bei den Mitgliedern größtenteils um acidothermophile Anaerobier (Guy *et al.*, 2011). Crenarchaeota variieren in Zellform, -größe und Zellwandaufbau (Guy *et al.*, 2011).

Im Zellwandaufbau stellt der Vertreter *Ignicoccus hospitalis* dabei eine Besonderheit dar. Die kokkenförmigen Zellen mit 1,0-6,0 µm Durchmesser besitzen keinen S-Layer, sondern eine äußere Membran, die einen periplasmatischen Raum mit variabler Größe abschließt (Paper *et al.*, 2007; Abbildung 5a). Diese Art ist auch der Wirt des DPANN-Vertreters *Nanoarchaeum equitans*.

Der Typstamm der **Korarchaeota** und die bisher einzige näher untersuchte Art, „*Ca. Korarchaeum cryptofilum*“, zeichnet sich durch ihre ungewöhnliche Zellform aus (Elkins *et al.*, 2008). Mit Durchmessern unter 0,2 µm bilden sie Filamente unterschiedlicher Länge aus (15 µm im Durchschnitt).

In marinen Habitaten machen **Bathyarchaeota** häufig einen großen Teil der mikrobiellen Population aus. Genomische Untersuchungen zeigten, dass diese Organismen vielfältige Lebensweisen besitzen (Evans *et al.*, 2015). Anaerobe Standorte mit hohem Methangehalt zeichnen den Lebensraum von

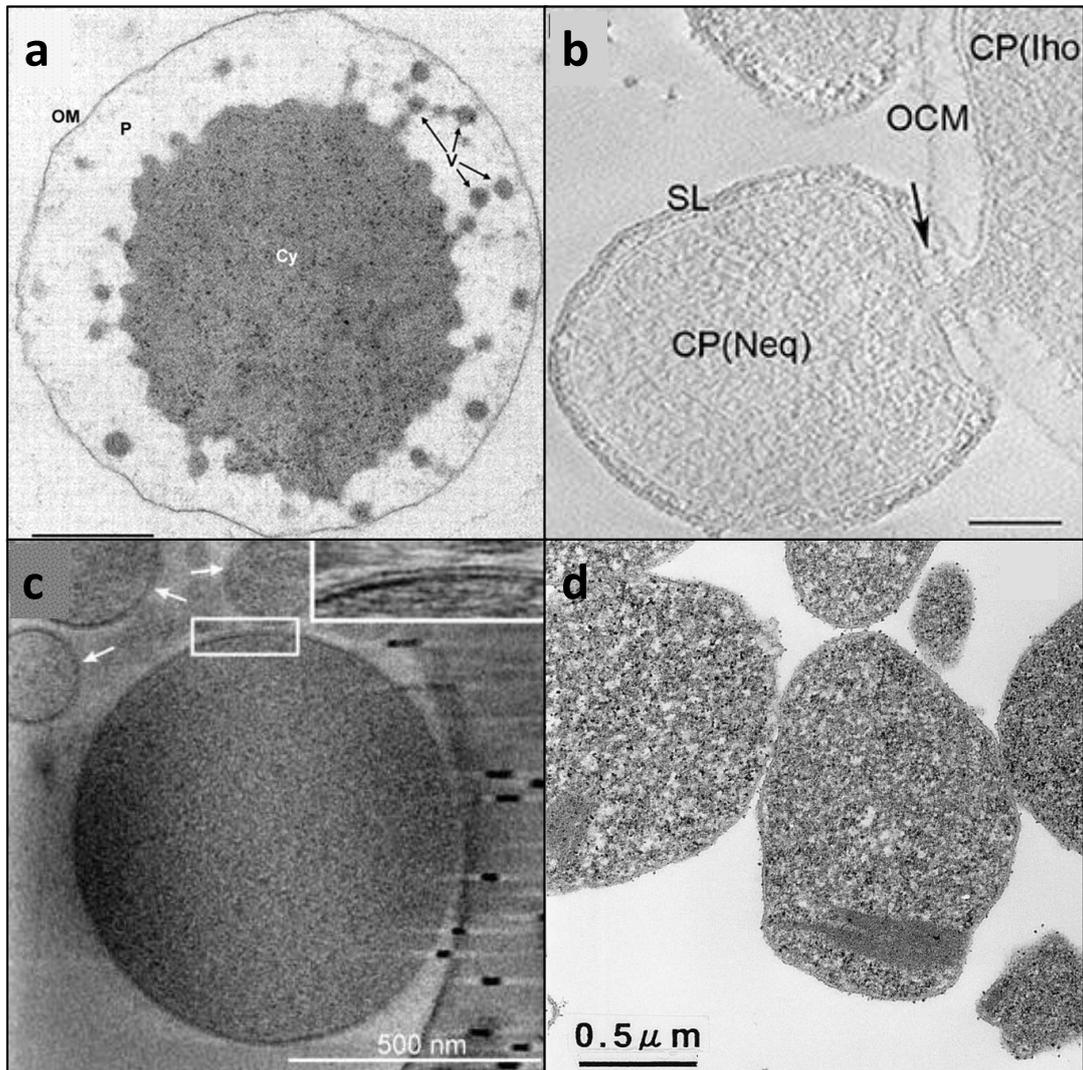


Abbildung 5: Unterschiedliche Morphologie von Archaea in elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Zu sehen sind (a) ein Ultradünnschnitt einer *Ignicoccus hospitalis*-Zelle mit Cy: Cytoplasma, P: Periplasma, V: Vesikel, OM: Äußere Membran, (b) Schnitte eines Tomograms einer *Nanoarchaeum equitans*-Zelle (Neq) in Interaktion mit einer *I. hospitalis*-Zelle (Iho), mit CP: Cytoplasma, OCM: Äußere Membran und SL: S-Layer. Der Pfeil zeigt dabei auf Strukturen, die das Nanoarchaeon zur Stabilisierung der Interaktion ausbildet. (c) Ultradünnschnitt eines Lokiarchaeons, die Pfeile zeigen dabei auf Membranvesikel, der vergrößerte Ausschnitt die Zellhülle des Archaeons. (d) Ultradünnschnitte von Thermoplasmatales-Zellen. Die Maßstabsbalken entsprechen 1 μm (a), 100 nm (b) und 500 nm (c,d). Abbildungen verändert nach (Paper *et al.*, 2007; Heimerl *et al.*, 2017; Imachi *et al.*, 2020; Yasuda *et al.*, 1995)

Verstraetearchaeota (Vanwonterghem *et al.*, 2016) aus, während **Geoarchaeota** bisher in Biofilmen von Fe²⁺-haltigen, sauren, heißen Quellen des „Yellowstone National Parks“ (Norris-Geysir-Becken, Wyoming, Vereinigte Staaten von Amerika) nachgewiesen wurden (Kozubal *et al.*, 2013).

1.4 Asgard-Archaea

Das jüngste der Superphyla beinhaltet die sechs Phyla Lokiarchaeota, Thorarchaeota, Odinararchaeota, Heimdallarchaeota (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017), Helarchaeota (Seitz *et al.*, 2019) und Gerdarchaeota (Cai *et al.*, 2020), sowie sechs weitere, erst kürzlich beschriebene Phyla (liu *et al.*, 2021). Der erste bekannte Vertreter - ein Lokiarchaeon - wurde an einem Schwarzen Raucher gefunden, der die namensgebende Bezeichnung *Loki's castle* trägt (Spang *et al.*, 2015; Abbildung 5c). Die ubiquitär verbreiteten Archaea (Cai *et al.*, 2021) gruppieren in phylogenetischen Stammbäumen nahe mit den Eukarya, weshalb vermutet wird, dass es sich beim Vorfahr der Eukarya um einen Verwandten der Asgard-Archaea handelt (López-García *et al.*, 2020; liu *et al.*, 2021).

1.5 DPANN-Archaea

Lange Zeit waren keine Archaea mit parasitischer Lebensweise bekannt. Dies änderte sich mit Entdeckung des DPANN-Vertreters *Nanoarchaeum equitans* an hydrothermalen Schloten. Dieser nur 400 nm große Organismus besitzt eines der kleinsten beschriebenen Genome mit nur 0,49 Mb (Huber *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2003). Die geringe Genom- und Zellgröße gehören zu den Eigenschaften, die alle Vertreter des DPANN-Superphylums teilen. Dieses beinhaltet neben den namensgebenden Phyla (Diapherotrites, Aenigmarchaeota, Parvarchaeota, Nanoarchaeota und Nanohaloarchaeota, (Rinke *et al.*, 2013)) auch die Woese- und Pacearchaeota (Castelle *et al.*, 2015), Huberarchaeota (Probst *et al.*, 2018), Micrarchaeota (Baker *et al.*, 2006), Altiarchaeota (Probst *et al.*, 2014), Undinarchaeota (Dombrowski *et al.*, 2020) und Mamarchaeota (Castelle *et al.*, 2018b; Castelle *et al.*, 2021) sowie mehrere bisher nicht definierte Phyla (Castelle *et al.*, 2018b; Dombrowski *et al.*, 2019; Castelle *et al.*, 2021). DPANN-Archaea sind ubiquitär verbreitet (Ghuneim *et al.*, 2018). Die geringe Genomgröße zusammen mit der Beobachtung, dass in den Genomen vieler DPANN-Vertreter essentielle Enzyme des anabolen und katabolen Stoffwechsels fehlen, führte zur Schlussfolgerung, dass dieses Superphylum potentielle archaeelle Symbionten umfasst, die auf Wirtsorganismen aus ihrer Umgebung angewiesen sind (Castelle *et al.*, 2018a; Castelle *et al.*, 2018b).

1.5.1 *Nanoarchaeum equitans*

Während viele Informationen über Mitglieder dieses Superphylums aus genomischen Daten abgeleitet wurden, ist die Interaktion zwischen dem ersten beschriebenen Vertreter *N. equitans* und seinem Wirtsorganismus *Ignicoccus hospitalis* ausführlich beschrieben (Huber *et al.*, 2002; Heimerl *et al.*, 2017). Einer der Gründe dafür ist die Tatsache, dass *N. equitans* - neben weiteren wenigen (Huber *et al.*, 2002; Wurch *et al.*, 2016; Krause *et al.*, 2017; Golyshina *et al.*, 2017b; St. John *et al.*, 2018; Hamm *et al.*, 2019; La Cono *et al.*, 2020) - einen der DPANN-Vertreter darstellt, der bislang stabil unter Laborbedingungen kultiviert werden konnte. Dabei ist *N. equitans* zwingend auf Kontakt mit Wirtszellen angewiesen, ohne den die Organismen nicht zur Zellteilung in der Lage sind (Huber *et al.*, 2002). Dies deckt sich mit der geringen Größe und dem geringen metabolischen Potential des *N. equitans*-Genoms (Waters *et al.*, 2003), die darauf hindeuten, dass das Nanoarchaeon zum Überleben auf Interaktionspartner angewiesen ist. Ergebnisse aus genomischen, proteomischen und metabolomischen Studien deuten ebenfalls auf eine enge Interaktion der beiden Organismen hin (Jahn *et al.*, 2008; Giannone *et al.*, 2011; Hamerly *et al.*, 2015). So konnte beispielweise gezeigt werden, dass das Nanoarchaeon seine Membranlipide von *I. hospitalis* erwirbt (Jahn *et al.*, 2004; Jahn *et al.*, 2008).

Der genaue Mechanismus der Interaktion war jedoch lange unbekannt. Heimerl *et al.* konnten 2017 erstmals eine direkte cytoplasmatische Verbindung der Interaktionspartner zeigen (Abbildung 5b). *N. equitans* scheint dabei mit einer stielähnlichen Struktur von 20-30 nm Durchmesser die beiden Membranen von *I. hospitalis* zu durchdringen, um eine Verbindung der beiden Cytoplasmen herzustellen. Dies ermöglicht den direkten Austausch von Metaboliten und Proteinen. Die Komponenten des hexagonalen S-Layers, der die einzige äußere Hülle von *N. equitans* darstellt (Huber *et al.*, 2002), scheinen spezifisch an der Kontaktstelle beider Organismen abgebaut zu werden (Heimerl *et al.*, 2017).

Obwohl das Nanoarchaeon allem Anschein nach auf direkten Kontakt mit einem Wirtsorganismus angewiesen ist, konnten auch freilebende Zellen beobachtet werden (Heimerl *et al.*, 2017). Der Grad der Abhängigkeit von *N. equitans* zu Wirtsorganismen ist somit - ebenso wie der weiterer DPANN-Archaea - nicht vollständig geklärt (Dombrowski *et al.*, 2019).

1.5.2 Micrarchaeota

Eine Untergruppe des DPANN-Superphylums, die sich durch acidophile Mitglieder auszeichnet, ist das Phylum der Micrarchaeota. Diese wurden erstmals 2006 von Baker *et al.* zusammen mit dem Phylum der Parvarchaeota als Vertreter der Gruppe der ARMAN (Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms) beschrieben. Der Name ARMAN leitet sich von der Mine in Kalifornien ab, in der die sauren Biofilme (pH 0,5-1,5) bei Temperaturen von 30-47 °C lokalisiert sind, bei deren Untersuchung die ersten Vertreter dieses Phylums entdeckt wurden (Baker *et al.*, 2006). Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass Micrarchaeota weit verbreitet in unterschiedlichen Habitaten, wie in Boden, Torf, hypersalinen Biofilmen und Süßwasser vorkommen (Chen *et al.*, 2017). Dabei wurden Standorte auf der ganzen Welt mit pH-Werten von 0,5-4,0 und Temperaturen von 13-73 °C untersucht.

In allen untersuchten Habitaten mit Micrarchaeota-Vorkommen waren auch Vertreter der Thermoplasmatales vorhanden (Ziegler *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2017; Golyshina *et al.*, 2019). Da Micrarchaeota-Genomen Gene, die für Enzyme mit Funktion in zentralen Zucker-Stoffwechselwegen, sowie beim Aufbau von Nukleotiden und Aminosäuren codieren, fehlen (Chen *et al.*, 2017) und Zell-Zell-Kontakte von Micrarchaeota- mit Thermoplasmatales-Zellen beobachtet werden konnten (Comolli *et al.*, 2009; Comolli *et al.*, 2014), gelten Thermoplasmatales-Arten als mögliche Micrarchaeota-Wirte. Dennoch wurden auch frei lebende Zellen gefunden (Baker *et al.*, 2010; Comolli *et al.*, 2009). Dieses Phänomen konnte durch die Beschreibung einer bis dahin unbekannt Art und dem damit verbundenen Vorschlag der Einführung zweier Familien durch Kadnikov *et al.* (2020) geklärt werden. Demnach zählen die bisher beschriebenen Micrarchaeota mit einem reduzierten Genom von etwa 1 Mb Größe zur Familie der Micrarchaeaceae, während das neu entdeckte Archaeon der Familie der Fermentimicrarchaeaceae angehört.

Mitglieder der letztgenannten Familie zeichnen sich durch ein größeres Genom von etwa 1,2 Mb, sowie die Anwesenheit von Genen, die für Stoffwechselwege zum Abbau von Aminosäuren und Zuckern, für einen zentralen Zuckerstoffwechsel und die Möglichkeit zur ATP-Generation, sowie dem Aufbau von Nukleotiden codieren, aus (Kadnikov *et al.*, 2020). Dies deutet auf eine unabhängigere Lebensweise als *scavenger* hin. Kadnikov *et al.* spekulieren, dass Micrarchaeota zunächst frei lebende Zellen waren, die sich immer mehr an eine symbiontische Lebensweise anpassten und dabei genomische Informationen verloren und Informationen für eine symbiontische Lebensweise erwarben.

Bislang sind vor allem fünf Arten näher beschrieben: „*Ca. Micrarchaeum* sp. ARMAN-1“, „*Ca. Micrarchaeum acidiphilum* ARMAN-2“ (Baker *et al.*, 2010), „*Ca. Mancarchaeum acidiphilum* Mia14“ (Golyshina *et al.*, 2017b), „*Ca. Fermentimicrarchaeum limneticum* Sv326“ (Kadnikov *et al.*, 2020) und die in dieser Arbeit beschriebene Art „*Ca. Micrarchaeum harzensis* A_DKE“. Während die Interaktionspartner von ARMAN-1 und ARMAN-2 nicht näher bekannt sind, ist Mia14 mit *C. divulgatum* und A_DKE mit „*Ca. Scheffleriplasma hospitalis*“ assoziiert (Golyshina *et al.*, 2017b; Krause *et al.*, 2021). Ein phylogenetischer Stammbaum dieser Arten - mit Ausnahme des in dieser Arbeit beschriebenen Vertreters - ist in Abbildung 6 zu sehen. A_DKE stellt dabei den einzigen stabil kultivierten Vertreter dar, obgleich Mia14 zeitweise erfolgreich kultiviert werden konnte (Krause *et al.*, 2017; Golyshina *et al.*, 2017b).

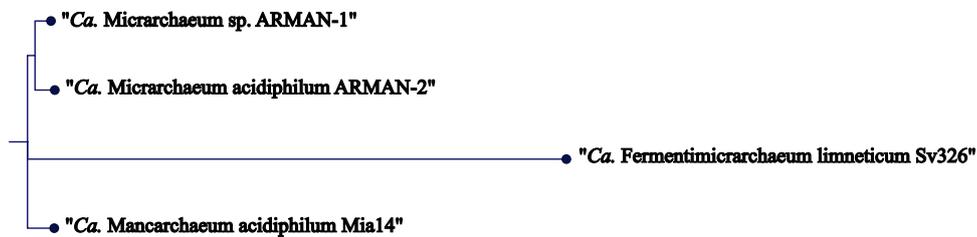


Abbildung 6: Phylogenetischer Stammbaum der bekanntesten Micrarchaeota-Vertreter auf Basis ihrer 16S-rDNA. Das Intron, das in den 16S-rDNA-Genen aller Vertreter vorkommt wurde vor dem Alignment manuell entfernt.

1.6 Mikroorganismen aus dem Bergwerk „Drei Kronen und Ehart“

In einem Konsortium von Mikroorganismen aus der ehemaligen Pyritmine „Drei Kronen und Ehart“ (Harzgebirge, Deutschland) wurde die Anwesenheit von Vertretern der Thermoplasmatales und der Micrarchaeota nachgewiesen (Ziegler *et al.*, 2009). Das gallertartige, stalaktitförmige Konsortium, das von angesäuertem Minenwasser (*acid mine drainage*) mit pH-Werten von 2,0-2,5 durchflossen wird, war an der Decke der Mine lokalisiert. Die Temperaturen im Inneren der Mine betragen 13-16 °C (Ziegler, 2012). Aus diesem Konsortium wurde eine Anreicherung der beiden oben genannten Mikroorganismen generiert, die Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit ist.

1.6.1 Die Anreicherung

Zur Anreicherung von Micrarchaeota-Vertretern, wurde das Konsortium in Flüssigmedium mit pH 2,5 stehend bei Raumtemperatur kultiviert. Fe^{3+} diente dabei als Elektronenakzeptor und Aminosäuren als Kohlenstoffquelle. Zur Selektion auf Archaea wurden dem Medium Antibiotika und Fungizide beigemischt. Als Gefäß dienten Hungates mit einem Volumen von 15 ml, die mit einer Gasmischung aus Stickstoff und Wasserstoff (80:20) gefüllt wurden, um anaerobes Wachstum sicherzustellen (Krause *et al.*, 2017; Krause, 2017). Beim Auftreten eines sichtbaren Farbumschlags des Mediums durch Fe^{3+} -Reduktion, wurde die Anreicherung in einem Verhältnis von 1 zu 10 in neues Medium überführt. Wachstum und Diversität der Mikroorganismen in der Anreicherung wurden über die Bestimmung der Fe^{2+} -Konzentration des Mediums, PCR- und CARD-FISH-Analysen ermittelt.

Nach 1,5 Jahren konnten keine Bacteria mehr detektiert werden und die Zugabe der Antibiotika, sowie der Fungizide wurde unterlassen (Krause *et al.*, 2017; Krause, 2017). Nach 2,5 Jahren Inkubation waren nur noch vier Organismen in der Anreicherung nachweisbar: ein Micrarchaeota-Vertreter, ein bisher nicht kultivierter Thermoplasmatales-Vertreter, *Cuniculiplasma divulgatum* C_DKE - ein weiterer Vertreter der Thermoplasmatales - und ein acidophiler Pilz mit *Acidothrix acidophila* als nächsten Verwandten. Die Anreicherung zeigte ein stabiles Wachstum und wurde etwa alle 10 Wochen überführt (Krause *et al.*, 2017).

Durch Senkung des pH-Werts von 2,5 auf 2,0 und der zeitweisen Inkubation der Anreicherung bei erhöhter Temperatur konnte eine Cokultur des bisher nicht kultivierten Vertreters der Thermoplasmatales und des Micrarchaeons generiert werden (Krause, 2017; Gfrerer, 2018; Krause *et al.*, 2021). Eine Inkubation der Cokultur unter aeroben Bedingungen führte außerdem zum Verlust des Micrarchaeons und der Bildung einer Reinkultur des Thermoplasmatales-Vertreters (Krause, 2017). Beide Kulturen wurden in Medium mit pH 2,0 bei 22 °C anaerob inkubiert und etwa alle 6,5 Wochen überimpft.

Im Verlauf der Kultivierung wurden die Anreicherung und die Kulturen in Vorarbeiten und während dieser Arbeit mehrfach untersucht. Dabei kamen Untersuchungsmethoden auf DNA-, RNA-, Protein-, Metaboliten-, Lipid- und Glykoproteinebene zum Einsatz. Zum besseren Verständnis wurde der Verlauf der Kultivierung graphisch dargestellt (Abbildung 7).

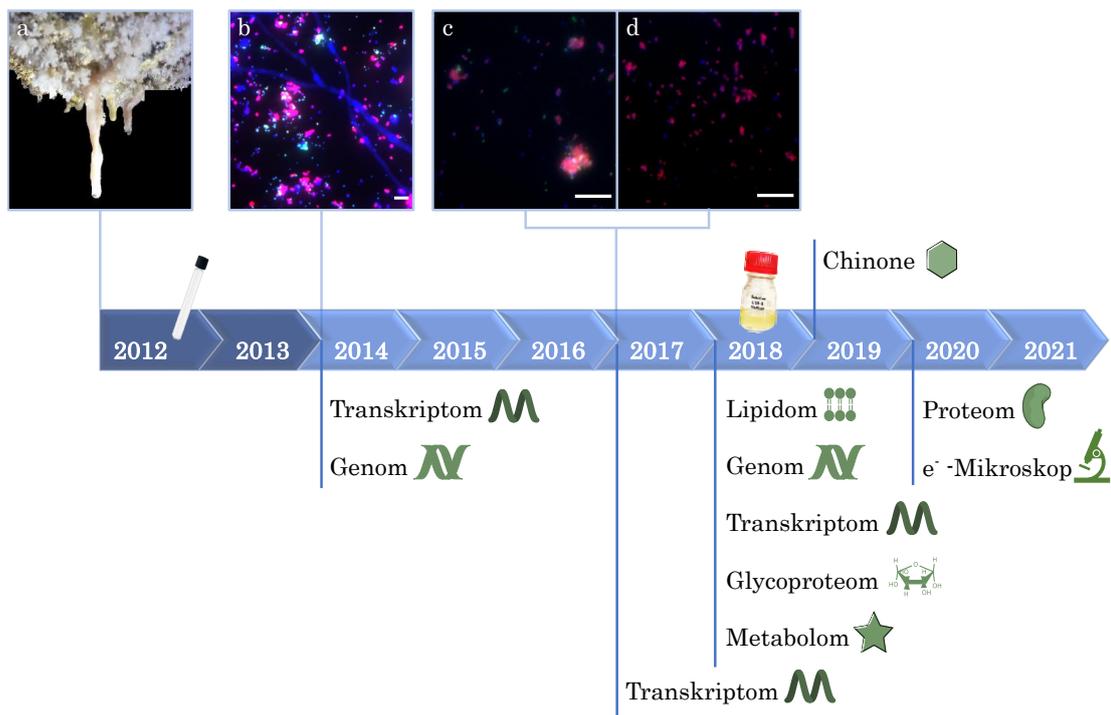


Abbildung 7: Übersicht der Anreicherung und Untersuchung der in dieser Arbeit beschriebenen Kultur. Zu sehen ist ein Zeitstrahl, der den Zeitraum von 2012 bis 2021 umfasst. Dunkelblau hinterlegte Jahre zeigen dabei Kultivierung in Anwesenheit von Antibiotika und Fungiziden, Symbole von Hungates (Überführung 1:10) bzw. Flaschen (Überführung 1:5) den Wechsel der Kultivierungsgefäße. Die Bilder zeigen eine Fotografie des Konsortiums in der Höhle (Dr. Sibylle Bartsch) (a) und Mikroskopbilder von CARD-FISH-gefärbten Zellen (grün: ARMAN980-Sonde, rot: Arch915-Sonde, blau: DAPI) der Anreicherung (Dr. Susanne Krause) (b), sowie der Cokultur (c) und der Reinkultur (d). Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die genauere Untersuchung der in Vorarbeiten aus einem sauren Biofilm generierten Kulturen. Dies eröffnete die Möglichkeit, nach *Nanoarchaeum equitans* die Lebensweise eines weiteren DPANN-Archaeons zu enträtseln.

Im Zuge dessen, sollten die angereicherten Organismen benannt, ihre Kultivierung verbessert und das Wachstum bei wechselnden Kultivierungsbedingungen wie Sauerstoffgehalt oder Temperatur charakterisiert werden. Ein Zusammenspiel aus Analysen auf Genom-, Transkriptom-, Proteom- und Metabolombasis sollte genutzt werden, um mögliche Stoffwechselwege zu identifizieren, die die beiden acidophilen Organismen nutzen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ermöglichten die Charakterisierung der Zellhülle beider Archaea.

Die Gegebenheit, dass sowohl eine A_DKE-B_DKE-Cokultur, als auch eine Reinkultur des mutmaßlichen A_DKE-Wirtsorganismus generiert werden konnten, ermöglichte es mit Hilfe von vergleichenden Analysen der Frage nachzugehen, wie die beiden Organismen miteinander interagieren. Dabei sollte besonders der Einfluss der Cokultivierung mit A_DKE auf das Wachstum und das Transkriptom des Thermoplasmatales-Vertreters betrachtet werden. Anhand dieser Erkenntnisse sollte ein möglicher Mechanismus der Interaktion zwischen A_DKE und B_DKE postuliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen und Stämme

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Organismen und Stämme verwendet.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Organismen und Stämme.

Nummer	Bezeichnung	Referenz
-	„ <i>Candidatus</i> Scheffleriplasma hospitalis B_DKE“	Krause (2017)
-	„ <i>Candidatus</i> Micrarchaeum harzensis A_DKE“ + „ <i>Candidatus</i> Scheffleriplasma hospitalis B_DKE“	Gfrerer (2018)
1512	<i>E. coli</i> Rosetta pRARE pBAD202_PROKKA_1418_CT	Hoang (2018)
1522	<i>E. coli</i> DH5Z1_ARM_Thermo	Krause (2017)

2.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 dargestellt. Aufgelistet sind außerdem Eigenschaften der Plasmide, die für die Nutzung in dieser Arbeit von Bedeutung sind.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide mit relevanten Eigenschaften. Aufgeführt sind der Replikationsursprung, das verwendete Promotorsystem, der Selektionsmarker des Plasmids und die Funktion, für die es in dieser Arbeit genutzt wurde.

Bezeichnung	Funktion	Replikations- ursprung	Promotor- system	Selektions- marker
pBAD202 _PROKKA_ 1418_CT	Expression des Proteins SLP _{A_DKE} His aus A_DKE	<i>pUC ori</i>	Ara minimal Promotor	Kanamycin- Resistenz
pRARE	Expression von tRNAs mit geringem Vorkommen in <i>E. coli</i>	<i>p15a ori</i>	konstitutiv	Chloram- phenicol- Resistenz

2.1.3 Tyramid-Konjugate

Zur Synthese der Tyramid-Konjugate, die bei der CARD-FISH-Analyse verwendet werden, aus Tyramin und dem jeweiligen Alexa-Succimidylester wurde ein Protokoll nach Wendeborg *et al.* (2008) genutzt.

Dabei wurden die Succimidylester (Tabelle 4) in 1,1-fach molarer Konzentration zu einer Tyramin-Stammlösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) gegeben und 8 bis 12 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit Ethanol auf eine Konzentration von 1 mg/mL Succimidylester verdünnt, in 25 µL Aliquots aufgeteilt und bei 40 °C in einer Thermo Scientific™ Savant™ SpeedVac™ (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) getrocknet. Bis zur Verwendung wurden die Tyramid-Konjugate bei -20 °C gelagert. Zur Nutzung wurde ein Aliquot in 25 µL ddH₂O resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4: Lösungen zur Synthese der Tyramid-Konjugate.

Name	Substanz	Menge
Tyramin-HCl-Stammlösung	Tyramin-HCl	10 mg
	Triethylamin	10 µL
	Dimethylformamid	1000 µL
Succimidylester-Stammlösung	Alexa-Succimidylester (Alexa488, Alexa546, Alexa647)	1 mg
	Dimethylformamid	100 µL

2.1.4 Primer und Sonden

In dieser Arbeit verwendete Primer zur Überprüfung der Kulturzusammensetzung per PCR oder Zellquantifizierung mittels qPCR, sowie die bei der CARD-FISH-Analyse verwendeten Sonden sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Primer und Sonden.

Primer			
Nummer/ Name	Sequenz	Beschreibung	Referenz
247 ARM979F	TAT TAC CAG AAG CGA CGG C	Primer zur Überprüfung der Kulturenzusammensetzung spezifisch für 23S-rDNA A_DKE forward	Baker <i>et al.</i> (2006)
248 ARM1365R	AGG GAC GTA TTC ACC GCT CG	Primer zur Überprüfung der Kulturenzusammensetzung spezifisch für 23S-rDNA A_DKE reverse	Baker <i>et al.</i> (2006)
1540 Bacteria 27F deg.	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Primer zur Überprüfung der Kulturenzusammensetzung spezifisch für 16S-rDNA Bacteria forward	Rainey <i>et al.</i> (1992)
1541 Bacteria 1525R deg.	AGA AAG GAG GTG WTC CAR CC	Primer zur Überprüfung der Kulturenzusammensetzung spezifisch für 16S-rDNA Bacteria reverse	Rainey <i>et al.</i> (1992)
2130 Susi_A_vor	CTT AGT ACA GTG GGT GAC GC	qPCR-Primer spezifisch für 23S-rDNA A_DKE forward	Krause (2017)
2131 Susi_A_rev	GGT TGG GAC AGT GGA ACA ATC	qPCR-Primer spezifisch für 23S-rDNA A_DKE reverse	Krause (2017)
2132 Susi_cons_for	GGG TTT GCT ACT TCG ATG TCG	qPCR-Primer spezifisch für 23S-rDNA B_DKE+C_DKE forward	Krause (2017)
2133 Susi_cons_rev	CGT TCC TCT CGT ACT AAA GGC	qPCR-Primer spezifisch für 23S-rDNA B_DKE+C_DKE reverse	Krause (2017)
2136 Susi_B_for	CCT GTT GAA AGA TAG GGG AG	Primer zur Überprüfung der Kulturenzusammensetzung spezifisch für 23S-rDNA B_DKE forward	Krause (2017)
2137 Susi_B_rev	GGA ATG GAG TGA ATA CCC AG	Primer zur Überprüfung der Kulturenzusammensetzung spezifisch für 23S-rDNA B_DKE reverse	Krause (2017)

Sonden				
Sonde	Sequenz	Formamid- konzentration [%]	Spezifität	Referenz
Arch915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	20	16S Archaea	Stahl (1991)
TH1187	GTA CTG ACC TGC CGT CGA C	20	Thermo- plasma- tales	Bond <i>et al.</i> (2001)
ARM980	GCC GTC GCT TCT GGT AAT	30	ARMAN	Baker <i>et al.</i> (2006)

2.1.5 Antikörper

Zur Immunodetektion und in Isolationsversuchen mit *magnetic beads* kamen in dieser Arbeit die in Tabelle 6 aufgeführten Antikörper zum Einsatz.

Antikörper gegen das A_DKE-Protein SLP_{A_DKE} wurden von GenScript Biotech B. V. (Leiden, Niederlande) hergestellt. Dazu wurden 14 Aminosäurenlange Peptide des Proteins mit der OptimumAntigen™ design-Anwendung auf ihre Eignung als Antigen untersucht. Die beiden ausgewählten Peptide wurden über ein zusätzliches Cystein am C-Terminus an Napfschnecken-Hämocyanin (KLH) fusioniert und das Konjugat zum Immunisieren zweier Kaninchen verwendet.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete oder erstellte Antikörper.

Antikörper	Klonalität	Tier	Hersteller	Verdünnung	
				Western Blot	Isolations- versuche
AK _{SLP133–146}	polyklonal	Kaninchen	GenScript Biotech B. V.	1:2 000	1:100
AK _{SLP326–339}	polyklonal	Kaninchen	GenScript Biotech B. V.	1:1 000	1:50
Anti- Kaninchen- IgG-AP- Konjugat	polyklonal	Ziege	Sigma- Aldrich Chemie GmbH	1:30 000	-

2.1.6 Chemikalien, Enzyme und Kits

Falls nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Labormaterialien von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland), VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland), Häberle Labortechnik GmbH & Co. KG (Lonse-Ettlenschieß, Deutschland), GE Healthcare Europe GmbH (München, Deutschland), Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland), B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) und Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen, Deutschland) bezogen.

Weitere Enzyme und Kits wurden durch New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland), Meridian Bioscience Inc. (früher Bioline) (Memphis, Tennessee, USA), Invitek Molecular GmbH (Berlin, Deutschland) und GenScript Biotech B. V. (Leiden, Niederlande) geliefert.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Kultivierung

Bei der Kultivierung der in Tabelle 2 aufgelisteten Organismen kamen zwei Kulturmedien zum Einsatz.

Bakterienstämme wurden bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm), nach der Zugabe des entsprechenden Antibiotikums beziehungsweise Induktors in *lysogeny broth*-Medium inkubiert. Die Zusammensetzung des Mediums ist Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Zusammensetzung von *lysogeny broth*-Medium.

Substanz	Menge	Endkonzentration (w/v)
Trypton/Pepton	10 g/L	1 %
Hefeextrakt	5 g/L	0,5 %
NaCl	10 g/L	1 %

Archaea wurden bei 22 °C stehend in modifiziertem *Picrophilus*-Medium inkubiert (siehe Tabelle 8).

Dabei wurden zunächst die drei aufgeführten Salze in ddH₂O gelöst und der pH-Wert dieser Lösung mit H₂SO₄ auf einen Wert von 2,0 eingestellt.

Die restlichen Substanzen und Lösungen wurden gesondert vorbereitet, sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren hinzugegeben. Zur Anaerobisierung des Mediums wurde die Salzlösung vor dem Autoklavieren aufgeköcht, um gelöste Gase zu entfernen und anschließend für 20 min mit einem Gasgemisch aus N₂/CO₂ (80/20) durchströmt. Nach der Komplementierung des Mediums wurde die Gasphase durch N₂ ersetzt, um eventuelle, durch das Komplementieren verursachte Sauerstoffkontaminationen zu entfernen.

Die Gasphase der verwendeten Kultivierungsgefäße wurde vor dem Sterilisieren durch eine Gasmischung aus 95 % N₂ und 5 % H₂ ersetzt.

Alle zur Mediumsvorbereitung verwendeten Behältnisse wurden vorher mit verdünnter Schwefelsäure gewaschen und anschließend mindestens zweimal mit ddH₂O gespült.

Tabelle 8: Zusammensetzung des modifizierten *Picrophilus*-Mediums.

Substanz	Menge	Endkonzentration
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mg/L	1,51 mM
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	500 mg/L	2,03 mM
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	250 mg/L	1,70 mM
Casein-Hydrolysat (10 % w/v), Standard	11,1 mL/L	0,1 %
Hefeextrakt (10 % w/v), mikro-granuliert	11,1 mL/L	0,1 %
Fe ₂ (SO ₄) ₃ (10 % w/v)	88,8 mL/L	20 mM
<i>Wolfe 's mineral elixir</i> (1000x)	2 mL/L	-
Vitaminlösung (100x)	2 mL/L	-

Der pH-Wert wurde mit H₂SO₄ auf 2,0 eingestellt.

Die mittlere Inkubationszeit der Archaea-Kulturen betrug 6,5 Wochen. Inokuliert wurde dabei in einem Verhältnis von 1 zu 10. Zur Generierung einer größeren Menge an Zellmasse, wurde die Kultivierung der Organismen von 10 ml Kultur in Hungates auf 100-5000 ml Kultur in anaeroben Flaschen erhöht. Die Flaschen wurden dabei mit demselben Gasgemisch gefüllt, das auch bei der Inkubation in Hungates Anwendung fand. Mit dem Wechsel zur Kultivierung in Flaschen wurde das Überimpfen der Kulturen in einem Verhältnis von 1 zu 5 durchgeführt. Die Änderung der Kultivierungsbedingungen resultierte in einem sichtbar dichteren Zellwachstum.

Da aufgrund von Wechselwirkungen mit Fe³⁺ dem Medium kein Reduktionsmittel zugegeben werden kann, lassen sich keine absolut anoxischen Bedingungen garantieren. Deshalb wird die Standard-Kultivierung als mikroaerob bezeichnet. Um Wachstum unter oxischen Bedingungen zu testen, wurde auf die Anaerobisierung des Mediums, sowie auf den Austausch der

Gasphase der Kulivierungsgefäße verzichtet. Anoxische Bedingungen wurden erreicht, indem das verwendete ddH₂O zwei Tage unter Rühren in einer anoxischen Umgebung inkubiert wurde und die Herstellung des Mediums ebenfalls in anoxischer Umgebung stattfand. Um die Wachstumsbedingungen bei verschiedenen Bedingungen zu testen, wurde auf die Zugabe von Fe³⁺ verzichtet oder dieses durch 40 mM Fe₂SO₄ ersetzt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Spurenelementelösung (*Wolfe's mineral elixir*) für modifiziertes *Picrophilus*-Medium.

Substanz	Menge	Endkonzentration
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	30,00 g/L	121,71 mM
MnSO ₄ x H ₂ O	5,00 g/L	29,58 mM
NaCl	10,00 g/L	171,12 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00 g/L	3,60 mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,80 g/L	7,57 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,00 g/L	6,80 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,80 g/L	6,26 mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,10 g/L	0,41 mM
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,18 g/L	0,38 mM
H ₃ BO ₃	0,10 g/L	1,62 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,10 g/L	0,41 mM
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	2,80 g/L	7,09 mM
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,10 g/L	0,30 mM
Na ₂ SeO ₄	0,10 g/L	0,53 mM

pH-Wert wurde vor Zugabe der Substanzen mit H₂SO₄ auf 1,0 eingestellt.

Tabelle 10: Vitaminlösung.

Substanz	Menge	Endkonzentration
Vitamin B ₁₂	50 mg/L	0,04 mM
Pantothensäure	50 mg/L	0,23 mM
Riboflavin	50 mg/L	0,13 mM
Pyridoxamin HCl	10 mg/L	0,03 mM
Biotin	20 mg/L	0,08 mM
Folsäure	20 mg/L	0,06 mM
Nicotinsäure	25 mg/L	0,20 mM
Nicotinamid	25 mg/L	0,20 mM
(R)-Liponsäure	50 mg/L	0,24 mM
4-Aminobenzoessäure	50 mg/L	0,36 mM
Thiaminhydrochlorid	50 mg/L	0,15 mM

Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence in situ Hybridisation (CARD-FISH)

Zur regelmäßigen Bestimmung der Diversität archaeeller Kulturen wurden die Zellen spezifisch mittels CARD-FISH angefärbt.

Das Prinzip dieser Methode besteht in der Spezifität von DNA-Sonden, die komplementär zu 16S-rRNA-Sequenzen bestimmter Mikroorganismen sind. Bei der CARD-FISH-Variante sind diese Sonden an eine Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, die in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid einen Tyramid-haltigen Fluoreszenzfarbstoff in ein Radikal umwandelt. Der radikalisierte Farbstoff bindet kovalent an sich in räumlicher Nähe befindliche Tyrosin-Seitenketten und markiert so farblich die Zielsequenz der Sonden. Da eine Peroxidase mehrere Farbstoffmoleküle umwandeln kann, wird das Signal der Sonde im Vergleich zu FISH um ein Vielfaches verstärkt. Bei letztgenannter Methode werden Sonden verwendet, die direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. In dieser Arbeit wurde wegen der geringen Größe der untersuchten Zellen bzw. ihrer geringen Ribosomenanzahl CARD-FISH verwendet.

Standardmäßig wurden für CARD-FISH-Analysen 200 µl einer Kultur unter sterilen Bedingungen entnommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen wie folgt fixiert. Die Proben wurden 2 min bei 16 000 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in Picophilus-Salzlösung

mit 4 % Formaldehyd resuspendiert. Nachdem die Zellen auf diese Weise bei 4 °C für eine Stunde fixiert wurden, folgten zwei Waschschrirte mit 1-fach PBS (Tabelle 11). Falls nicht anders angegeben, wurden bei Zentrifugationsschritten immer die eingangs erwähnten Bedingungen verwendet. Anschließend wurden die fixierten Zellen in 200 µl eines 1:1-Gemisches aus 1-fach PBS und 100 % Ethanol resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 11: Verwendete CARD-FISH-Lösungen.

Substanz	Menge pro Liter	Substanz	Menge pro Liter
20x SSC-Puffer		10x PBS-Lösung	
NaCl	175,2 g	NaCl	80 g
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	88,2 g	KCl	2 g
Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 6 eingestellt.		Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	7,64 g
Amplifikationspuffer		KH ₂ PO ₄	2,4 g
10 x PBS	4 ml	Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt.	
5 M NaCl	16 ml	Einbettpuffer	
Dextransulfat	4 g	Citiflour (Citifluor Limited, London, UK)	11 ml
10 % Blocking Reagent (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)	0,4 ml	Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA)	2 ml
ddH ₂ O	19,6 ml	1 x PBS	1 ml
Endvolumen	40 ml	Endvolumen	14 ml
Den gesamten Ansatz auf 40-60 °C erhitzen bis alle Komponenten gelöst sind, danach auf Eis abkühlen			

Zur Färbung der Zellen wurden diese auf einem PTFE-beschichteten Objektträger (Diagnostic Microscope Slide, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) immobilisiert. Dazu wurden 10 µl einer Probe auf eine Vertiefung des Objektträgers aufgetropft und bei 37 °C getrocknet.

Eine Inkubation des Objektträgers in 0,1 M HCl über 10 min sollte vorhandene, zelleigene Peroxidasen inaktivieren, um unspezifische Farbreaktionen zu vermeiden. Nach kurzem Eintauchen in ddH₂O und anschließendem Trocknen bei 37 °C konnte mit der Hybridisierung begonnen werden.

Dafür wurden je 15 µl Hybridisierungslösung (0,5 µl Sonde (50 ng/µl) in 75 µl Hybridisierungspuffer (Tabelle 12)) auf jede Vertiefung getropft und der Objektträger in einer feuchten Kammer platziert. Diese enthielt eine für die jeweils verwendete Sonde optimierte Konzentration an Formamid (Tabelle 5). Die Hybridisierung erfolgte in der feuchten Kammer für 1,5-3 h bei 46 °C.

Anschließend wurde der Objektträger in auf 48 °C vorgewärmten Waschpuffer (Tabelle 12) getaucht und danach 15 min ebenfalls bei 48 °C in Waschpuffer inkubiert, um ungebundene Sonden zu entfernen. Nach einem weiteren Waschschrift bei Raumtemperatur für 15 min in 1-fach SSC wurden alle weiteren Schritte im Dunkeln durchgeführt, um die lichtempfindlichen Farbstoffe zu schützen.

Tabelle 12: Verwendete CARD-FISH-Puffer.

Substanz	Menge für 20 % Formamid	Menge für 30 % Formamid
Hybridisierungspuffer		
5 M NaCl	3,6 ml	3,6 ml
1 M TRIS-HCl, pH 8	0,4 ml	0,4 ml
ddH ₂ O	2 ml	2 ml
Dextransulfat	2 g	2 g
20 % SDS	0,02 ml	0,02 ml
ddH ₂ O	8 ml	6 ml
SDS und Dextransulfat fallen aus, durch Erwärmen lösen, auf Eis abkühlen		
10 % Blocking Reagent (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)	2 ml	2 ml
Formamid	4 ml	6 ml
Waschpuffer		
5 M NaCl	4,3 ml	2,04 ml
1 M TRIS-HCl, pH 8	2 ml	2 ml
0,5 M EDTA, pH 8	1 ml	1 ml
20 % SDS	0,05 ml	0,05 ml
ddH ₂ O	93 ml	95 ml

Zur Amplifikation des Sondensignals durch die Peroxidase wurden auf die Vertiefungen je 15 µl Amplifikationslösung (500 µl Amplifikationspuffer

(Tabelle 11), 5 μl verdünntes H_2O_2 und 0,5 μl Tyramid) gegeben. Davor wurde der Objektträger um die Vertiefungen herum getrocknet, um eine starke Verdünnung der Amplifikationslösung zu verhindern. In einer feuchten Kammer wurde der Objektträger bei 37 °C für 20 min inkubiert.

Beim anschließenden Waschschrift wurde nicht gebundenes Tyramid vom Objektträger entfernt. Dazu wurde der Objektträger zweimal für 15 min bei RT in 1-fach SSC inkubiert und danach in ddH_2O getaucht.

Im Falle einer Doppelhybridisierung wurden nun wie zuvor beschrieben die Peroxidasen mit HCl inhibiert, um falsch-positive Färbungen zu vermeiden. Anschließend wurde eine weitere Hybridisierung mit den zuvor beschriebenen Wasch- und Amplifikationsschritten durchgeführt. Im Falle einer Einfachhybridisierung wurden diese Schritte ausgelassen.

Zur abschließenden unspezifischen Färbung aller in der Probe enthaltenen Zellen wurde DAPI genutzt. Dazu wurde je ein Tropfen DAPI-Lösung (1 mg/ml in ddH_2O) auf die Vertiefungen gegeben und diese 5 min inkubiert. Danach wurde die Lösung mit ddH_2O heruntergewaschen, der Objektträger zweimal 1 min in ddH_2O gewaschen und anschließend kurz in 100 % Ethanol getaucht.

Die Vertiefungen des getrockneten Objektträgers wurden mit Einbettpuffer (Tabelle 11) bedeckt, ein Deckglas vorsichtig daraufgelegt und dieses nach kurzer Zeit fest angedrückt. Der Einbettpuffer schützt die Fluoreszenz der verwendeten Farbstoffe.

Der Objektträger kann mehrere Jahre bei -20 °C aufbewahrt werden.

Für die CARD-FISH-Färbung von Zellsuspensionen wurde mit einer stark ankonzentrierten Zellsuspension nach demselben Protokoll vorgegangen und dieselben Puffer und Lösungen verwendet. Die Färbung fand in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß statt. Nach der Färbung wurden die Zellen in 500 μl PBS-Lösung resuspendiert, die 1 mg/ml DAPI enthielt. Bis zur Verwendung wurden die gefärbten Zellsuspensionen bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Für eine Kombination der CARD-FISH-Markierung mit einer Lektinfärbung wurden die Proben nach der Fixierung in PBS-Lösung bei 4 °C gelagert und auf eine DAPI-Färbung verzichtet.

Lektinfärbung

Ein initiales Screening mit 70 kommerziell erwerbbaaren Fluoreszenz-gekoppelten Lektinen wurde von Dr. Thomas R. Neu und Ulrike Kuhlicke (beide Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Magdeburg) durchgeführt. Zwölf

der in diesem Screening als bindend identifizierten Lektine wurden im Rahmen dieser Arbeit für vertiefende Analysen verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Dr. Thomas R. Neu zur Verfügung gestellt.

Zur Unterscheidung von A_DKE- und B_DKE-Zellen in Cokultur-Proben wurde eine CARD-FISH-Markierung mit der Lektinfärbung gekoppelt. Dazu wurde ein Protokoll von Bennke *et al.* (2013) verwendet. Nach durchgeführter CARD-FISH-Färbung wurden vor dem Einbetten etwa 100 µl der jeweiligen Lektin-Lösung (0,1 mg/ml) auf die Vertiefungen gegeben. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei RT wurde die Lektinlösung mit PBS-Lösung abgewaschen. Die Objektträger wurden danach bei 37 °C getrocknet und wie bei der CARD-FISH-Analyse beschrieben eingebettet.

Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Präparation von Proben für elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Vorbereitung der Proben, sowie deren Aufnahme und Analyse wurden von Prof. Reinhard Rachel (Universität Regensburg, Zentrum für Elektronenmikroskopie) durchgeführt.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung von A_DKE- und B_DKE-Zellen wurden 3 mL einer dichten Co- bzw. Reinkultur bei 10 000 g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im verbleibenden Überstand (ca. 15 µL) resuspendiert, auf einen Goldträger übertragen und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Nach dem Transfer in ein Hochvakuum-Gefriergerät ($p < 10^{-5}$ mbar; CFE-50, Cressington, Watford, UK) wurden die Proben bei einer Probentemperatur von -97 °C gefriergebrochen. Das Oberflächenwasser wurde durch Sublimation bei dieser Temperatur für 4 min entfernt ("Gefrierätzung"). Um die Struktur der Zelloberfläche sichtbar zu machen, wurden die resultierenden Probenoberflächen mit 1,5 nm Pt/C (Abschattungswinkel: 45 Grad) und 15 nm C (Abschattungswinkel: 90 Grad) beschichtet. Die beiden Elemente besitzen eine unterschiedliche Färbung auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Der unterschiedliche Abschattungswinkel gewährt so Einblicke in die räumliche Ausdehnung der Zellen bei Betrachtung der Proben. Die resultierenden Replikat wurden für 17 h in Schwefelsäure (70 % (v/v)) gereinigt, bevor sie zweimal mit ddH₂O gewaschen und für die Bildgebung auf hydrophilierten Kupfergittern (600 mesh, hexagonal) aufgenommen wurden.

Während bei gefriergeätzten, metallschattierten Zellen vor allem die Zelloberfläche betrachtet wurde, konnte durch Kryo-Elektronenmikroskopie die

Zellhülle und das Cytoplasma anhand von Schnitten der Zellen untersucht werden. Für die Kryo-Elektronenmikroskopie von Zellsuspensionen wurden ca. 2 mL einer gewachsenen Cokultur durch Zentrifugation (5 000 g, 5 min) schonend ankonzentriert und in einer minimalen Menge Überstand (ca. 10 μ L) resuspendiert. 3 μ L der Zellsuspension wurden auf ein Cu-Gitter mit einem perforierten Kohlenstofffilm (Quantifoil R 2/2; Quantifoil, Jena, Deutschland) aufgetragen, geblottet und in flüssigem Ethan mit einem Leica EM-GP2 Eintauchfroster (Leica, Wetzlar, Deutschland) kryo-immobilisiert. Die Gitter wurden bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Mikroskopie

Zum Mikroskopieren von CARD-FISH-Proben wurde ein Leica DM5500 B Mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit 64x-Objektiv (HCX PL APO) und einem 10x-Okular (HC PLAN s (25) M) genutzt. Es wurde jeweils die gesamte Vertiefung des Objektträgers betrachtet und die Menge an spezifisch angefärbten Zellen abgeschätzt. Zusätzlich wurden mit einer Leica DFC 360 FX CCD-Kamera und der dazugehörigen Software (Leica LAS AF) (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) Bilder von den Proben angefertigt.

Bilder von Proben, die einer Kombination aus CARD-FISH- und Lektin-Färbung unterzogen wurden, wurden mit einem Konfokalmikroskop LSM 880 von Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland) erstellt.

Kryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden an einen cryoARM 200 (Z200FSC; JEOL GmbH, Freising, Deutschland) erstellt. Die Proben wurden während aller Bildgebungsschritte bei Temperaturen unter -177°C gehalten. Die Bilder wurden unter strengen Niedrigdosis-Bedingungen mit einer Rio16 CMOS-Kamera (Ametek-Gatan GmbH, München, Deutschland) bei einer nominalen Vergrößerung von 20 000 x (Pixelgröße: 0,39 nm) mit Hilfe der SerialEM Version 3.8.6-Software (Mastronarde, 2005) aufgenommen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von gefriergeätzten Proben wurden am Transmissionselektronenmikroskop JEM-2100F (JEOL GmbH, Freising, Deutschland) mit einer CMOS-Kamera (F416; TVIPS GmbH, Gauting, Deutschland) bei relativen Vergrößerungen von 10 000 bis 40 000 x (Pixelgröße: 0,25-1 nm) mit den Softwarepaketen SerialEM 3.8.6 (Mastronarde, 2005) oder EM-MENU 5 (TVIPS GmbH, Gauting, Deutschland) aufgenommen.

Die Bestimmung des Gitterabstands des A_DKE-S-Layers und die Ausmessung der Periplasmabreite erfolgten mit implementierten Algorithmen beider Softwarepakete.

Bestimmung der Fe²⁺-Konzentration mit Hilfe des Ferrozin-assays

Zur Bestimmung des Fe²⁺-Ionen-Gehalts in Proben verschiedener Wachstumsversuche mit A_DKE- und B_DKE-Kulturen wurde ein Ferrozin-assay (Stookey, 1970) durchgeführt. Dafür wurde den Kulturen in regelmäßigen Abständen etwa 200 µl Probe entnommen und diese, falls sie länger als eine Stunde aufbewahrt wurden, bei -20 °C gelagert. Eine Ansäuerung der in dieser Arbeit verwendeten Proben - wie sie zur Konservierung anderer Proben beschrieben ist - war wegen des niedrigen pH-Wertes des verwendeten Mediums nicht nötig.

Beim Ferrozin-Test wird die spezifische Violett-Färbung von Ferrozin (Dinatrium-4,4'-(3-(pyridin-2-yl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl)bis(benzolsulfonat)) in Anwesenheit von Fe²⁺-Ionen genutzt. Diese wurde photometrisch bestimmt und anhand von Standardproben mit bekannten Fe²⁺-Konzentrationen quantifiziert. Je nach Fe²⁺-Konzentration der Proben mussten diese in 1 M HCl verdünnt werden. Dabei wurden 0,1 % (w/v) Ferrozin in einer 50 % (w/v) Ammoniumacetat-Lösung gepuffert, da der Komplex aus Fe²⁺ und Ferrozin nur bei pH-Werten von 4-9 stabil vorliegt. 180 µl dieser Lösung wurden mit 20 µl der Proben in einer 96well-Mikrotiterplatte gemischt und anschließend die Absorption der Proben bei 595 nm mit dem Microplate Reader iMark™ (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt.

Analyse der Gasphase von Kulturen mittels Gaschromatographie

Zur Bestimmung der Zusammensetzung der Gasphase von Kokulturen und Reinkulturen wurde ein Agilent 490 Mikro-Gaschromatograph (mikroGC) (Teckso, Neukirchen-Vluyn, Deutschland) verwendet. Die Detektion der Gase erfolgte mit einem Mikro-Wärmeleitfähigkeitsdetektor über zwei Säulen (Molekularsieb 5A PLOT (MS5A) (0,25 mm ID, 10 m) und PoraPLOT U PLOT (PPQ) (0,25 mm ID, 10 m)). Als Trägergas diente Argon 5.0.

Die Probennahme erfolgte mit Hilfe einer integrierten Membranpumpe mit einer Pumpzeit von 15 s. Dazu wurde die Oberfläche des Kultivierungsgefäßes desinfiziert und das Schlauchsystem der mikroGC über eine Kanüle mit der Gasphase der Kulturen verbunden. Während der Messungen wurde die Temperatur der MS5A-Säule auf 70 °C, die der PPQ-Säule auf 45 °C und der Druck auf 150 kPa gehalten, während die Temperatur des Injektors 110 °C betrug. Die Säulen wurden regelmäßig durch Ausheizen gereinigt und kalibriert.

Metabolom

Ein Triplikat einer B_DKE-Reinkultur und einer A_DKE-B_DKE-Cokultur wurden unter Standardbedingungen (oben beschrieben) für 42 (Reinkultur) bzw. 49 Tage (Cokultur) kultiviert, bis das verfügbare Fe^{3+} vollständig reduziert und eine stationäre Wachstumsphase erreicht wurde. Während dieser Kultivierung wurde für die metabolomische Untersuchung alle sieben Tage 1 mL Kultur entnommen und bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zusätzliche Proben wurden für die Fe^{2+} -Quantifizierung, sowie zur Diversitätsbestimmung über PCR und CARD-FISH-Analyse verwendet.

Die Metabolit-Analyse über Gaschromatographie/Massenspektrometrie mit vorheriger Probenvorbereitung wurde von Carsten Reuse unter der Leitung von Dr. Kerstin Schmidt-Hohagen und Prof. Karsten Hiller (alle Technische Universität Braunschweig, Institut für Bioinformatik und Biochemie/ Braunschweig Integrated Centre for Systems Biology (BRICS)) durchgeführt.

Aufgrund des niedrigen pH-Werts des Kulturmediums wurden $500\ \mu\text{l}$ der Probe einer Schwefelfällung durch Zugabe einer Spatelspitze CaCO_3 unterzogen. Diese Behandlung führte ebenfalls zur Zellyse, so dass auch intrazelluläre Metabolite in die Analyse einbezogen wurden. Nach 5 min Zentrifugation bei $14\ 000\ \text{rpm}$ und RT wurden $50\ \mu\text{l}$ des Überstandes in Glasfläschchen überführt und unter Vakuum bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Die getrockneten Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Metabolit-Derivatisierung wurde mit einem Gerstel MPS2 Autosampler (Mülheim an der Ruhr, Deutschland) durchgeführt. Die getrockneten Metabolite wurden in $15\ \mu\text{l}$ Methoxyaminhydrochlorid (2 % in Pyridin) bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln gelöst. Nach 90 min wurde ein gleiches Volumen N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) zugegeben und die Proben erneut für 30 min einer $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Inkubation unterzogen. Ein Mikroliter der Probe wurde in einen SSL-Injektor bei $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Splitless-Modus injiziert. Die Gaschromatographie/ Massenspektrometrie (GC/MS)-Analyse wurde mit einem Agilent 7890A GC durchgeführt, der mit einer 30-m-DB-35MS 5-m-Duraguard-Kapillarsäule ausgestattet war. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von $1,0\ \text{ml}/\text{min}$ verwendet. Die Temperatur des GC-Ofens wurde dabei für 2 min auf $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten und dann mit $10\ \text{K}/\text{min}$ auf $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöht. Nach 3 min wurde die Temperatur auf $325\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöht. Der Gaschromatograph war an einen Agilent 5975C inert XL MSD angeschlossen, der unter Elektronenionisierung bei $70\ \text{eV}$ arbeitete. Die MS-Quelle wurde auf $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ und der Quadrupol auf $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Gesamtlaufzeit für eine Probe betrug

60 min. Alle GC/MS-Chromatogramme wurden mit Hilfe der Metabolite Detector Software 67 bearbeitet.

Zellseparation mit Hilfe von *magnetic beads*

Zur Isolation von A_DKE-Zellen aus der Cokultur wurde eine Separation über SLP_{A_DKE}-spezifische Antikörper und *magnetic beads* getestet. Dazu wurde AK_{SLP133–146} bzw. AK_{SLP326–339} in Kombination mit *magnetic beads* (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet, die mit Anti-Kaninchen-Antikörpern aus einer Ziege beschichtet waren. AK_{SLP133–146} und AK_{SLP326–339} sollen dabei die A_DKE-Zelloberfläche spezifisch markieren, die *magnetic beads* die markierten Zellen schonend von der Kultur trennen. Bei der Entwicklung des Protokolls wurde sich an den Herstellerangaben orientiert.

Für den Versuch wurden 2 µl *magnetic beads* verwendet, die zunächst dreimal mit je 50 µl PBS-Lösung gewaschen wurden, um deren BSA-haltigen Aufbewahrungspuffer zu entfernen. Dafür wurden die *magnetic beads* mit Hilfe eines *magnetic racks* an den Rand des Reaktionsgefäßes pelletiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Während des Versuchs wurde entgegen der Herstellerangaben eine PBS-Lösung mit einem pH-Wert von 5,0 verwendet, um die acidophilen Zellen zu schonen.

Nach den Waschschritten wurden die *magnetic beads* in 20 µl PBS-Lösung resuspendiert, die 0,01 µg/µl AK_{SLP133–146} oder AK_{SLP326–339} enthielt. Eine Inkubation der Suspension unter ständiger Bewegung für 2,5 h bei 4 °C ermöglichte die Kopplung der Antikörper an die *magnetic beads*. Nach viermaligem Waschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden 50 µl einer durch Zentrifugation ankonzentrierten Cokultur-Zellsuspension in PBS-Lösung zu den *magnetic beads* gegeben. Eine Inkubation bei 4 °C unter ständiger Bewegung über 30 min sollte die Bindung des Antikörperkonjugats an die Oberfläche von A_DKE gewährleisten. Die darauffolgende Pelletierung über 30 min bei RT stellte die Separation aller Zellen sicher, die zu diesem Zeitpunkt an die *magnetic beads* gebunden waren. Der Überstand wurde abgenommen und die *magnetic beads* in modifiziertem Picrophilus-Medium resuspendiert. Die anschließende Kultivierung der so separierten Zellen fand unter anoxischen Bedingungen und bei RT statt.

Zur Überprüfung der Separation wurden der Zellüberstand und die resuspendierten *magnetic beads* einer qPCR zur Bestimmung der Zellzahl und einer CARD-FISH-Analyse unterzogen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

DNA-Isolation für Genom-Sequenzierung

DNA für die Sequenzierung der Genome von A_DKE und B_DKE wurde nach einem Protokoll von Lo *et al.* (2007) aus mehreren Cokulturen isoliert. Die isolierte DNA aus insgesamt 70 ml Kultur von drei Cokulturen aus A_DKE und B_DKE erfüllte im Hinblick auf Reinheit und Menge die Voraussetzungen für eine Sequenzierung mit PacBio. Bis zur Sequenzierung wurde die DNA bei 4 °C gelagert.

DNA-Isolation mit dem Invisorb® Spin Forensic Kit

DNA-Isolation aus Proben der B_DKE-Wachstumskurven (Kapitel 3.1.1) wurde mit dem Invisorb®Spin Forensic Kit (Invitex, Berlin, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Den Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen steril Proben entnommen. Für die DNA-Isolation wurden 500 µl davon in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen 5 min bei 16 000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet bis zur DNA-Isolation bei -20 °C aufbewahrt. Bei der Isolation wurde nach dem Protokoll für eukaryotische Zellpellets ($10^4 - 10^5$) vorgegangen und in 60 µl Elutionspuffer eluiert. Die eluierte DNA wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Bestimmung der DNA-Konzentration mit Hilfe des Qubit-Kits

Zur Bestimmung der Menge an isolierter DNA wurde das *Qubit® ds DNA HS Assay*-Kit genutzt. Im Rahmen der in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Wachstumsversuche, diente die Bestimmung der DNA-Menge auch zur Abschätzung der Zellzahl. Bei der Durchführung der Methode wurde nach Herstellervorgaben vorgegangen und die DNA-Menge anhand der mitgelieferten Standards quantifiziert. Die DNA-Menge wurde danach auf das bei der DNA-Isolation eingesetzte Kulturvolumen normalisiert.

PCR zur Überprüfung der Diversität in Kulturen

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) handelt es sich um eine der fundamentalsten Methoden der Molekularbiologie. Bei dieser Methode wird ein bestimmter Abschnitt der DNA vervielfältigt.

Zur qualitativen Überprüfung der Diversität in Kulturen, wurde in dieser Arbeit ein PCR-Ansatz mit MangoMix™ (Meridian Bioscience, Tennessee, USA) und den in Tabelle 5 aufgeführten Primern verwendet (Tabelle 13) und

die PCRs im Thermal Cycler C1000™ oder S1000™ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 13: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen
MangoMix™	7,5 µl
Primer forward (10 µM)	0,75 µl
Primer reverse (10 µM)	0,75 µl
DMSO	0,8 µl
DNA	1 µl
ddH ₂ O	4,2 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Die Amplifikation und Größe der amplifizierten Fragmente wurde mit Hilfe einer Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurde der gesamte PCR-Ansatz in die Taschen eines Agarosegels gegeben (TAE-Puffer, 1 % (w/v) Agarose, 0,02 % (v/v) Midori Green Advance) und die DNA bei einer konstanten Spannung von 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Überprüfung der Größe der amplifizierten Fragmente erfolgte mit Hilfe der *Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland). Bilder der Gele wurden mit dem ChemiDoc™ XRS+ Molecular Imager® (Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA) angefertigt.

qPCR zur Bestimmung der Zellzahl

Die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) funktioniert nach dem Prinzip einer einfachen PCR. Durch die Zugabe eines sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs, der in doppelsträngige DNA interkaliert, kann ein DNA-Abschnitt nicht nur vervielfältigt, sondern auch quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde die qPCR zur Quantifizierung der Zellzahl von A_DKE und B_DKE in Cokultur-Wachstumskurven genutzt.

Dazu wurden je 500 µl einer Kulturprobe für 5 min bei 16 000 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 40 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschall (40 s) aufgeschlossen. Vom Zelllysate wurde 1 µl in der qPCR eingesetzt.

Während der qPCR wurde die 23S-rDNA mit Hilfe der in Tabelle 5 aufgeführten Primer amplifiziert und quantifiziert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Standardkurve für die 23S-rDNA von B_DKE und A_DKE

verwendet. Diese bestand aus Zellverdünnungen des in Tabelle 2 aufgeführten *E. coli*-Stamms 1522, deren Zellzahlen vorher mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt wurden. Die Zellen der Standardkurve wurden dabei genauso behandelt wie die Cokultur-Zellen. Die qPCRs wurden mit dem SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix in einem CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Die Komponenten eines qPCR-Ansatzes sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	10 µl
Primer forward (4 µM)	2,5 µl
Primer reverse (4 µM)	2,5 µl
DNA	1 µl
ddH ₂ O	4 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Sequenzierungen

Sequenziertechniken der dritten Generation fanden in dieser Arbeit bei zwei Fragestellungen Anwendung.

Zunächst wurden die Genome von A_DKE und B_DKE mit einer Kombination aus den Sequenziermethoden von Illumina und PacBio sequenziert.

Die Probenvorbereitung wurde dabei von Carola Berg unter der Leitung von Dr. Catrin Spröer und Dr. Boyke Bunk am Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Braunschweig durchgeführt.

Eine SMRTbell™-Template-Bibliothek wurde nach den Anweisungen des Herstellers (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) gemäß dem Protokoll *Procedure & Checklist - Greater Than 10 kb Template Preparation* hergestellt. *End-repair* und Ligation an *hairpin adapters* wurde mit Komponenten aus dem DNA/Polymerase Binding Kit P6 (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die *BluePippin™ Size-Selection* auf mehr als 4 kb große Fragmente wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt (Sage Science, Beverly, MA, USA). Die Bedingungen für das Annealing der Sequenzierprimer und die Bindung der Polymerase an das gereinigte SMRTbell™ *template* wurden mit dem Calculator in *RS Remote*

(PacificBiosciences, Menlo Park, CA, USA) bewertet. Eine SMRT-Zelle wurde auf dem PacBio RSII (PacificBiosciences, Menlo Park, CA, USA) sequenziert.

Bibliotheken für die Sequenzierung auf der Illumina-Plattform wurden unter Anwendung des *Nextera XT DNA Library Preparation*-Kit (Illumina, San Diego, USA) mit Modifikationen gemäß Baym *et al.* (2015) vorbereitet und auf dem Illumina NextSeq™ 500 (Illumina, San Diego, USA) sequenziert.

Die Transkriptomte von insgesamt neun Proben (drei Cokulturen, drei mikroaeroben Reinkulturen und drei aeroben Reinkulturen) wurden von IMGGM Laboratories auf einem *Illumina NextSeq® 500 NGS system* sequenziert. Die RNA-Isolation wurde ebenfalls durch IMGGM Laboratories durchgeführt. Dabei fand das *RNeasy Micro-Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) Anwendung. Die Isolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Generierung der Bibliotheken wurde das *Illumina TruSeq® Stranded Total RNA*-Kit verwendet.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Proteom

Das Proteom von je einem Duplikat der Co- und Reinkultur wurde in dieser Arbeit analysiert. Dazu wurden je 100 ml einer dichten Kultur für 2 min bei 15 500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 500 µL TRIS-HCl-Puffer (pH 6,8) resuspendiert. Die Zellen wurden mit einem Branson Digital Sonifier Modell 102C (Branson Ultrasonics Co. Ltd., Shanghai) für 2 min (0,5 s Puls, 20 s Pause) bei 60 % Intensität lysiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 9 000 g und 4 °C pelletiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde anhand eines Bradford-*assays* bestimmt (Bradford, 1976). Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) auf eine Protein-Endkonzentration von 0,1 µg/µl gemischt, für 10 min bei 95 °C inkubiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Versand bei -80 °C gelagert.

Die Analyse des Proteoms über Massenspektrometrie wurde von Dr. Yohann Couté und Julia Novion Ducassou (beide Université Grenoble Alpes, CEA, Inserm, BIG-BGE) durchgeführt.

Die Proteine wurden in einem 4-12 % NuPAGE-Gel (Invitrogen, Carlsbad, USA) elektrophoretisch aufgetrennt, mit Coomassie Brilliantblau R-250 angefärbt und anschließend mit Trypsin (Sequencing Grade, Promega, Madison, Wisconsin, USA) wie in Casabona *et al.* (2013) beschrieben *in-gel* verdaut. Die resultierenden Peptide wurden mittels Online-Nanoliquid-Chromatographie

gekoppelt an ein Tandem-MS (Ultimate 3000 RSLCnano und Q-Exactive HF, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) analysiert.

Die Peptide wurden auf einer 300 m × 5 mm PepMap C18-Vorsäule (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) gesampelt und auf einer 75 m × 250 mm C18-Säule (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1,9 m, Dr. Maisch) unter Verwendung eines 200-min-Gradienten getrennt. MS- und MS/MS-Chromatogramme wurden mit der *Xcalibur*-Software (Thermo Scientific, Schwerte, Scientific) aufgenommen.

Peptide und Proteine wurden mit *Mascot* (Version 2.6.0, Matrix Science) durch einen Abgleich mit dem annotierten Proteom von A_DKE und B_DKE und einer hauseigenen Datenbank üblicher Kontaminanten identifiziert. Als Enzym wurde Trypsin/P gewählt und es wurden zwei Fehlsplattungen zugelassen. Die Fehlertoleranzen für Vorläufer- und Fragmentmasse wurden auf 10 bzw. 25 mmu festgelegt. Die *Proline*-Software (Bouyssié *et al.*, 2020) wurde verwendet, um die Ergebnisse zu filtern. *Proline* wurde verwendet, um eine Zusammenstellung, Gruppierung und MS₁-Quantifizierung der Proteingruppen auf der Basis von Razor- und spezifischen Peptiden durchzuführen. Für jedes Replikat wurden die Werte der intensitätsbasierten absoluten Quantifizierung (iBAQ; Schwanhäusser *et al.* (2011)) durch die Summe der iBAQ-Werte in der analysierten Probe normalisiert. Die normalisierten iBAQ-Werte wurden dann summiert, um den mittleren iBAQ-Wert jedes quantifizierten Proteins zu erhalten.

Eine Tabelle der Gennummern mit dazugehörigem iBAQ-Wert ist im digitalen Anhang (Tabelle A1) zu finden.

Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer Molekülgröße über ein elektrisches Feld aufgetrennt (Laemmli, 1970). Bei der SDS-Gelelektrophorese wird SDS und β -Mercaptoethanol zu den Proteinproben gegeben, was zur Denaturierung der Proteine führt. Zusätzlich dazu werden die Proben 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Außerdem überdeckt SDS die Eigenladung der Proteine proportional zu deren Molekulargewicht. Dies hat den Zweck, dass alle Proteine ohne Einfluss ihrer Ladung oder Sekundärstrukturen, lediglich anhand ihres Molekulargewichts getrennt werden.

Aufgetrennt werden die Proteine über ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Gel. Die chemische Zusammensetzung eines 4 % Sammelgels und eines einem 10 % Trenngels ermöglichten die Ankonzentration und darauf folgende Trennung der geladenen Proteine anhand ihres Molekulargewichts.

In dieser Arbeit wurden Lysate verschiedener Zellsuspensionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Falle von Cokultur- und Reinkultur-Zelllysaten wurden dabei stark ankonzentrierte (50-fach) Zellsuspensionen in HEPES-Puffer genutzt. *E. coli*-Zellsuspension lag weniger stark ankonzentriert ebenfalls in HEPES-Puffer vor. Die genaue Probenvorbereitung wird in Winkler (2021) beschrieben.

Die Zellsuspensionen wurden mit der entsprechenden Menge Lade-Puffer (50 % Glycin, 150 mM TRIS-HCl, 6 % SDS, 15 % β -Mercaptoethanol) gemischt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben wurden anschließend auf ein Polyacrylamid-Gel (TRIS-Glycin) geladen und aufgetrennt.

Für die Gelelektrophorese wurde ein *Mini-PROTEAN® Tetra Cell*-System bei einer konstanten Spannung von 150 V genutzt.

Anschließend an die SDS-PAGE wurde entweder eine Coomassie-Färbung oder ein Western Blot mit darauf folgender Immunodetektion durchgeführt.

Bei der Coomassie-Färbung handelt es sich um eine unspezifische Protein-färbung, die auf der nicht-kovalenten Bindung von Coomassie Brilliantblau R-250 an die basischen und hydrophoben Seitenketten von Aminosäuren basiert. Das Polyacrylamid-Gel wurde in Coomassie-Färbelösung (InstantBlue™ Protein Stain, Expedeon, Over, UK) inkubiert, bis deutliche Banden zu erkennen waren und anschließend mit dem ChemiDoc™ XRS+ Molecular Imager® (Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA) fotografiert.

Western Blot und Immunodetektion

Um einzelne Proteine spezifisch anfärben zu können, wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür wurde das Trans-Blot Turbo® System (Bio-Rad, München, Deutschland) für 12 min bei einer konstanten Stromstärke von 1,3 A genutzt.

Eine Immunodetektion mit $AK_{SLP133-146}$ und $AK_{SLP326-339}$ wurde genutzt, um SLP_{A_DKE} auf der Nitrocellulosemembran nachzuweisen. Als signalgebender Antikörper wurde der in Tabelle 6 aufgeführte Anti-Kaninchen-IgG verwendet, der an eine Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Das Enzym wandelt das Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) in Verbindung mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) zu einem unlöslichen Indigo-Farbstoff um.

Die Nitrocellulosemembran wurde nach Durchführung des Western Blots über Nacht in Blockierlösung (3 % Milchpulver in TBS-Puffer (10 mM TRIS, 150 mM NaCl)) inkubiert. Dadurch sollte eine unspezifische Hintergrundfärbung vermieden werden. Nach dem Blockieren über Nacht folgte die Bindung

von $AK_{SLP133-146}$ bzw. $AK_{SLP326-339}$, die 1:2 000 bzw. 1:1 000 in TBS-Puffer mit 3 % BSA gelöst waren. Nach einer Inkubation für 1,5 h wurde die Membran zweimal 10 min mit TBSTT-Puffer (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween20, 0,2 % Triton X-100) und einmal 10 min mit TBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.

Der Sekundärantikörper wurde nach Herstellerangaben für eine Stunde in einer Verdünnung von 1:30 000 in Blockierlösung auf die Membran gegeben. Auch unspezifisch gebundene Sekundärantikörper wurden danach in vier Waschschritten (je 5 min) mit TBST-Puffer (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween20), gefolgt von fünf dH₂O-Waschschritten für insgesamt 10 min entfernt.

Für die signalgebende Reaktion wurde das *BioRad AP Detection Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Die Membranen wurden dabei so lange inkubiert, bis eine Farbreaktion beobachtet werden konnte, höchstens jedoch 24 h. Aufnahmen der gefärbten Membran wurden mit dem ChemiDoc™ XRS+ Molecular Imager® (Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA, USA) angefertigt.

Um $AK_{SLP133-146}$ und $AK_{SLP326-339}$ unter nativen Bedingungen zu testen, wurde ein DotBlot mit Zellsuspensionen durchgeführt. Dafür wurden je 2 µl von ankonzentrierten Co- und Reinkulturen auf eine Nitrocellulosemembran getropft. Ein Teil der Proben wurde vorher in Anwesenheit von SDS für 5 min bei 95 °C denaturiert und dienten als Kontrolle.

Nach Trocknen der aufgetropften Proben bei RT, wurde mit der Membran wie oben beschrieben verfahren.

2.2.4 Bioinformatische Methoden

Genom-Assemblierung und Genom-Annotation

Die Genom-Assemblierung und -Annotation wurde von Dr. Boyke Bunk (Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig, Deutschland) durchgeführt.

Die Genom-Assemblierung wurde mit der *RS_HGAP_Assembly.3*-Anwendung durchgeführt, welche in *SMRT Portal Version 2.3.0* enthalten ist. Die Assemblierung ergab zwei Haupt-*Contigs*. Potentiell falsch assemblierte, künstliche *Contigs* mit geringer Abdeckung, die in anderen Replikons enthalten waren, wurden aus der Assemblierung entfernt. Redundanzen an den Enden der beiden Haupt-*Contigs* ermöglichte deren Zirkularisierung der *Contigs*. Die Replikons wurden auf *smc* (Chromosomenteilungsprotein Smc) als erstes Gen eingestellt.

Die Fehlerkorrektur erfolgte durch *mapping* der *Illumina Short Reads* auf die fertigen Genome mit Hilfe des *Burrows-Wheeler Aligner bwa 0.6.2* im *paired end*-Modus unter Verwendung der Standardeinstellungen (Li *et al.*, 2010) mit anschließendem *variant and consensus calling* mittels *VarScan 2. 3.6* (Wilson *et al.*, 2012). Die automatisierte Genom-Annotation wurde mit *Prokka 1.8* (Seemann, 2014) durchgeführt. Die annotierten Genome sind in der NCBI-Datenbank unter den Zugangsnummern CP060530 (A_DKE) und CP060531 (B_DKE) zu finden.

Vergleichende Transkriptomauswertung

Die vergleichende Transkriptomauswertung, die den Einfluss einer Cokultivierung mit dem Micrarchaeon A_DKE auf das Transkriptom von B_DKE untersucht, wurde von Dr. Susanne Krause (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Angewandte Biologie) durchgeführt. Dabei wurde *Kallist v0.45.0* in Kombination mit der R-Anwendung *DESeq2 1.24.0* genutzt.

Zum Vergleich des B_DKE-Transkriptoms unter mikroaeroben Bedingungen mit aneroben Bedingungen wurde eine Analyse mit der *CLC Genomics Workbench 20.0.1* (QIAGEN, Aarhus, Denmark) durchgeführt.

Nach dem Import der Sequenzierdaten, wurden die *reads* einer Qualitätskontrolle mit *trimming* unterzogen. Für die vergleichende Analyse wurde die *Create Expression Browser 1.1*-Anwendung mit Standardeinstellungen genutzt. Die Ergebnisse wurden nach einem *log fold change* von größer 2, bei einem p-Wert kleiner als 0,01 gefiltert.

Identifikation möglicher Stoffwechselwege

Zur Identifikation möglicher Stoffwechselwege wurde die *Pathway Tools*-Software (Version 24.5) (Karp *et al.*, 2020) genutzt. Dazu wurde mit Hilfe der *PathoLogic*-Anwendung eine Datenbank der mit *Prokka* annotierten Genome von A_DKE und B_DKE erstellt. Dabei wurden die Standardeinstellungen und die *MetaCyc*-Datenbank (Caspi *et al.*, 2013; Karp *et al.*, 2020; Caspi *et al.*, 2020) zum Abgleich verwendet. Zur Visualisierung von Transkriptomdaten kam das *Omics Dashboard* zum Einsatz.

Erstellung Phylogenetischer Stammbäume

Die, in dieser Arbeit gezeigten Stammbäume wurden mit Hilfe der *ClustalW*-Anwendung der *CLC Main Workbench* (QIAGEN, Aarhus, Dänemark)

erstellt und mit *Inkscape* (Inkscape project) bearbeitet. Bei der Erstellung wurden die Standardeinstellungen gewählt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Über die zuvor beschriebenen, in Vorarbeiten isolierten Organismen war vor Beginn dieser Arbeit so gut wie nichts bekannt. Deshalb sollten die physiologischen Eigenschaften des Thermoplasmatales-Vertreterers und des Mitglieds der Micrarchaeota hier zunächst einzeln charakterisiert werden, bevor auf eine Interaktion der beiden in Cokultur lebenden Organismen genauer eingegangen werden sollte.

3.1 B_DKE

Aus einem sauren Biofilm wurde in Vorarbeiten eine Reinkultur eines bisher nicht kultivierten Vertreterers der Thermoplasmatales isoliert (Krause, 2017). In dieser Arbeit sollte der Organismus phylogenetisch eingeordnet und benannt werden. Dazu wurden phänotypische Eigenschaften genauso betrachtet, wie genotypische. Der Organismus wird dabei wie schon in vorherigen Publikationen als B_DKE bezeichnet (Krause *et al.*, 2017).

3.1.1 Allgemeine Wachstumsbedingungen

Die Kultivierungsbedingungen sind in Kapitel 2.2.1 genauer beschrieben. Fe^{3+} diente dabei unter Standardbedingungen als Elektronenakzeptor, Caseinhydrolysat und Hefeextrakt als Kohlenstoffquelle. Fe^{3+} stellte dabei nicht die einzige Eisenquelle im Medium dar. Zur Charakterisierung der phänotypischen Eigenschaften B_DKEs wurde dessen Wachstum bei verschiedenen Bedingungen getestet. Aus Vorversuchen war bekannt, dass B_DKE in der Lage ist, sowohl mikroaerob, als auch aerob zu wachsen. Deshalb wurden die Wachstumsversuche, um die Handhabung zu vereinfachen, unter oxidischen Bedingungen durchgeführt.

Da das verwendete Medium auf Veränderungen des pH-Werts mit starker Präzipitation reagiert, wurde darauf verzichtet, das Wachstum bei verschiedenen pH-Werten zu charakterisieren. Aus Vorversuchen war bekannt, dass die Kultur bei pH-Werten zwischen 2,0 und 2,5 in der Lage ist, zu wachsen. Für die Wachstumsversuche wurde ein pH-Wert von 2,0 gewählt.

Es wurde das Wachstum des Thermoplasmatales-Vertreterers bei Temperaturen zwischen 5 °C und 45 °C, unter oxidischen, mikrooxidischen und anoxischen Bedingungen, sowie der An- und Abwesenheit von Fe^{3+} im Medium miteinander verglichen. Dazu wurden je 40 ml Flüssigmedium in einem Verhältnis von 1:5 mit B_DKE-Kultur inokuliert. Für jede Bedingung wurde der Versuch in

einem biologischen Triplikat durchgeführt. Mikrooxische Wachstumsbedingungen wurden in diesem Fall durch das Hinzufügen von steriler Luft in die Gasphase der inokulierten Medien bis zu einem Anteil von 7% O₂ erreicht. Die Kontrolle des Sauerstoffgehalt in der Gasphase erfolgte, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Zum besseren Verständnis sind die Kultivierungsbedingungen in Tabelle 15 zusammengefasst.

Da die Präzipitation des Mediums die Wachstumskontrolle über eine Absorbionsmessung unmöglich machte, wurde das Wachstum der Mikroorganismen wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben über DNA-Isolation mit anschließender Qubit-Messung quantifiziert. Außerdem wurde in regelmäßigen Abständen die Fe²⁺-Konzentration des Mediums überprüft. Die Inkubationszeit betrug 56 Tage, bei den Kulturen, die anaerob kultiviert wurden 49 Tage. Alle sieben Tage wurden Proben entnommen. Die Probenahme bei der anaeroben Kultivierung fand unregelmäßiger statt. Die Ergebnisse der DNA-Konzentrationsbestimmung sind in Abbildung 8 zusammengefasst.

Tabelle 15: Kultivierungsbedingungen der Wachstumsversuche. Aufgeführt sind die Nummern der Kulturen aus Abbildung 8, sowie der Sauerstoffgehalt, die An- oder Abwesenheit von Fe³⁺ im Medium und die Temperatur die diese Kultivierungsbedingungen definierten.

Ansatz	Fe ³⁺	O ₂ [%]	Temp [°C]
1	+	20	22
2	-	20	22
3	+	20	5
4	+	20	30
5	+	20	37
6	+	20	45
7	+	7	22
8	+	0	RT

Eine Erhöhung der DNA-Menge und damit Wachstum wurde bei Temperaturen von 22, 30 und 37 °C, sowie unter mikrooxischen und anoxischen Bedingungen detektiert, jedoch nicht bei Temperaturen von 5 und 45 °C oder ohne Zugabe von Fe³⁺ zum Medium. Kein Wachstum wurde außerdem in Anwesenheit von Fe²⁺ und gleichzeitiger Abwesenheit von Fe³⁺ unter oxischen Bedingungen beobachtet (nicht gezeigt).

Die lag-Phase unterschied sich zwischen den Kultivierungsbedingungen. Während bei 30 und 37 °C keine lag-Phase detektierbar war, konnte bei den aneroben Kulturen nach 14 Tagen, bei 22 °C und oxischer Inkubation nach 21

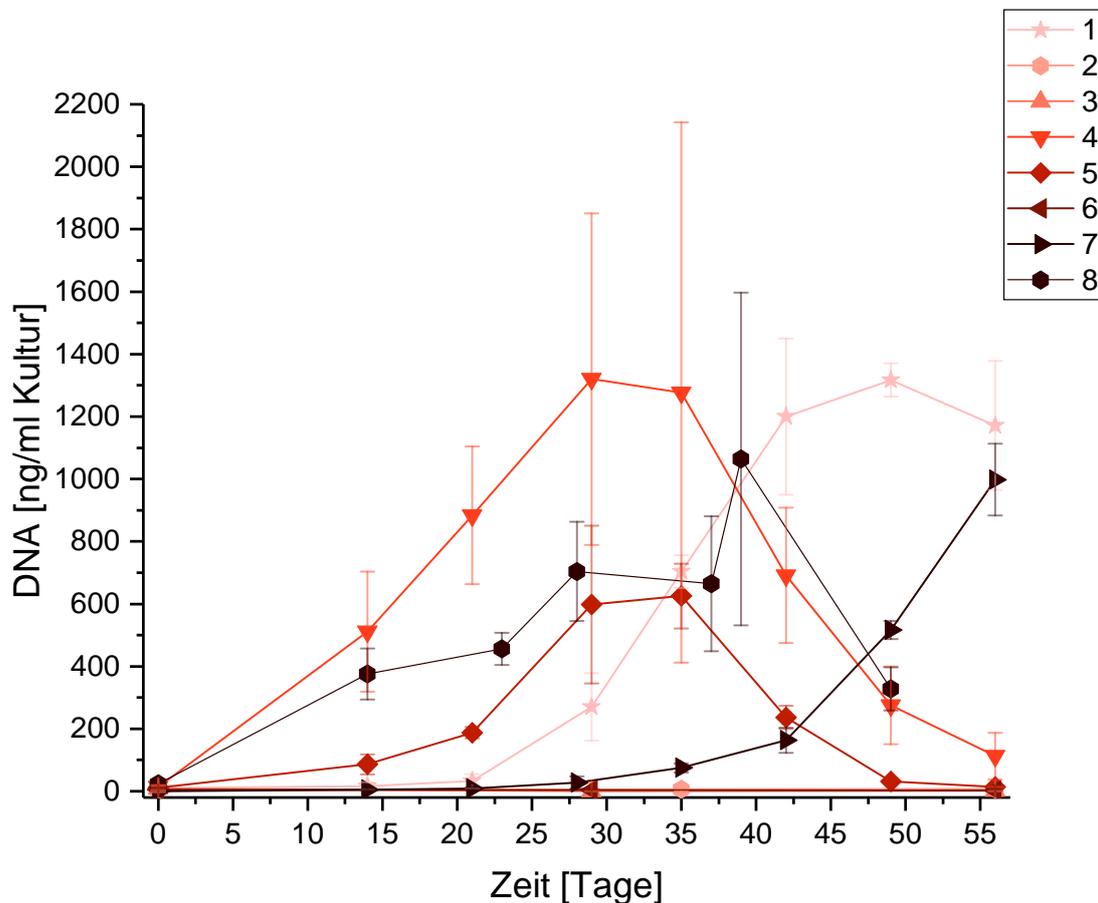


Abbildung 8: Vergleich von B_DKE-Wachstumskurven. Die verschiedenen Kultivierungsbedingungen sind Tabelle 15 zu entnehmen. Gezeigt ist die DNA-Menge über die Zeit in ng/ml Kultur. Die Werte entsprechen jeweils den Mittelwerten eines biologischen Triplikats, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Tagen und bei 22 °C und mikrooxischer Inkubation nach 28 Tagen Wachstum beobachtet werden. Nach der lag-Phase gingen alle Kulturen in eine exponentielle Phase des Wachstums über, auf die eine stationäre Phase folgte. Erstere war bei den verschiedenen Kultivierungsbedingungen unterschiedlich lang ausgeprägt. Während Kulturen, die bei 30 °C oder 37 °C kultiviert wurden, bereits nach 14 Tagen die maximale DNA-Menge erreichten, dauerte dies bei den 22 °C-Kulturen 21 bzw. 25 Tage unter oxischen und mikrooxischen bzw. anoxischen Bedingungen. Die maximale DNA-Menge war bei 37 °C-Kulturen dabei etwa halb so hoch, wie bei den anderen Kulturen. Nach sieben Tagen sank die DNA-Menge bei Kultivierung bei Temperaturen über 22 °C wieder.

Der Thermoplasmatales-Vertreter ist somit in der Lage, aerob, mikroaerob und anaerob, jedoch nicht ohne Fe^{3+} zu wachsen. Auch in Anwesenheit des möglichen Elektronenakzeptors Sauerstoff ist er auf Fe^{3+} als Elektronenakzeptor angewiesen. Der Einfluss von Sauerstoff auf das Wachstum von B_DKE wird in Kapitel 3.1.4 weiter beleuchtet. Da in Vorarbeiten B_DKE-Wachstum

bei 18 °C gezeigt werden konnte (Krause, 2017), lässt sich aus diesen Versuchen schließen, dass der Temperatur-Bereich, in dem B_DKE wachsen kann, 18 bis 37 °C umfasst. Die optimale Wachstumstemperatur wird in Kapitel 3.1.2 genauer diskutiert.

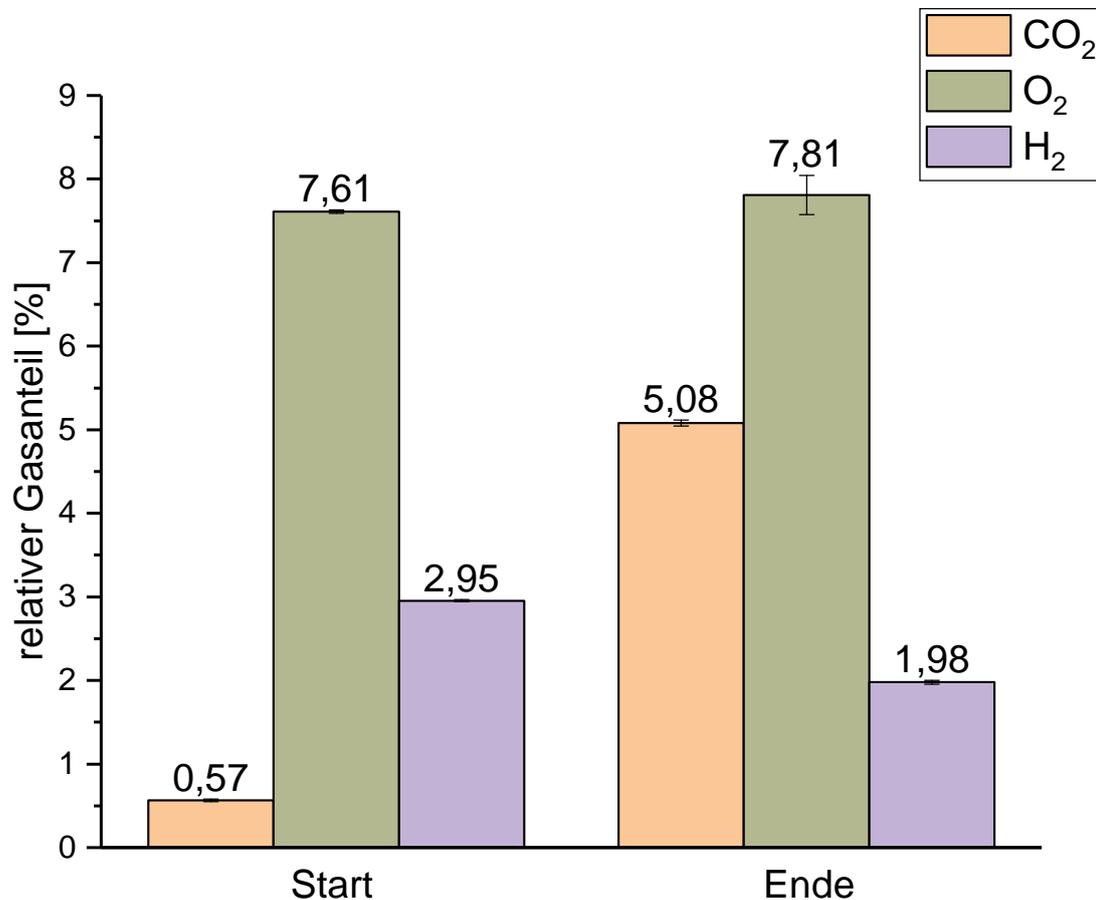


Abbildung 9: Anteile verschiedener Gase in der B_DKE-Gasphase. Die Werte wurden jeweils zu Beginn und nach Beendigung (65 Tage nach Inokulation) der Wachstumsversuche gemessen. Sie entsprechen jeweils den Mittelwerten eines biologischen Duplikats, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. N₂, das den restlichen Anteil an der Gasphase ausmachte, ist nicht gezeigt.

In Kulturen, die unter mikrooxygenen Bedingungen kultiviert wurden, wurde zusätzlich zu Beginn und nach 65 Tagen Kultivierung die Zusammensetzung der Gasphase wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben bestimmt. Da in diesem Fall nur zwei der drei biologischen Replikate mikrobielles Wachstum zeigten, sind hier nur Daten im Duplikat vorhanden. In der Gasphase waren hauptsächlich N₂, CO₂, H₂ und O₂ vorhanden. Die Anteile an der Gasphase der drei letztgenannten Gase sind in Abbildung 9 zusammengefasst. N₂ machte jeweils den restlichen Anteil aus.

Bei Start der Kultivierung war in der Gasphase weniger als 1 % CO₂, etwa

7% O₂ und 3% H₂ vorhanden. Nach 65 Tagen Kultivierung und nachweislichem Wachstum von B_DKE-Zellen, konnte ein erhöhter Anteil an CO₂ in der Gasphase detektiert werden (5%), sowie eine gleichbleibende Menge O₂ und eine Abnahme an H₂ um ca. 1%. Da Wasserstoff ein sehr flüchtiges Gas ist und eine vergleichbare Abnahme des H₂-Anteils in der Gasphase der Kultur, die kein Wachstum zeigte, verzeichnet werden konnte, wird vermutet, dass die Abnahme nicht in Zusammenhang mit mikrobiellem Wachstum steht. Die Zunahme am CO₂-Anteil konnte jedoch nicht in der unbewachsenen Kultur beobachtet und demnach auf mikrobielles Wachstum zurückgeführt werden.

Während des Wachstums scheint B_DKE demnach CO₂ zu produzieren. Dies wurde in weiteren Versuchen auch unter Standardbedingungen bestätigt (nicht gezeigt). Mögliche, von B_DKE zur CO₂-Produktion verwendete Stoffwechselwege, werden in Kapitel 3.1.3 diskutiert. Außerdem bestätigte sich durch die Gasanalysen die Beobachtung, dass B_DKE auf Fe³⁺ angewiesen ist und somit keinen Sauerstoff aus der Gasphase als Elektronenakzeptor verwenden kann.

3.1.2 Temperaturoptimum

In Kapitel 3.1.1 konnte B_DKE-Wachstum in einem Temperaturbereich von 18 bis 37°C gezeigt werden. Die Bestimmung des Temperaturoptimums erwies sich jedoch als schwierig, da das Wachstumsverhalten des Thermoplasmales-Vertreters bei den untersuchten Temperaturen sehr unterschiedlich ausfiel. In diesem Kapitel soll das Wachstum bei 22°C und 37°C genauer diskutiert und verglichen werden.

Dazu wurde in Abbildung 10 die DNA-Menge, ebenso wie die Fe²⁺-Konzentration über die Zeit während der Kultivierung bei 22 bzw. 37°C zusammengefasst. Außerdem wurde die Fe³⁺-Reduktionsrate der Kulturen berechnet, ebenso wie ihre Verdopplungszeit anhand der DNA-Menge.

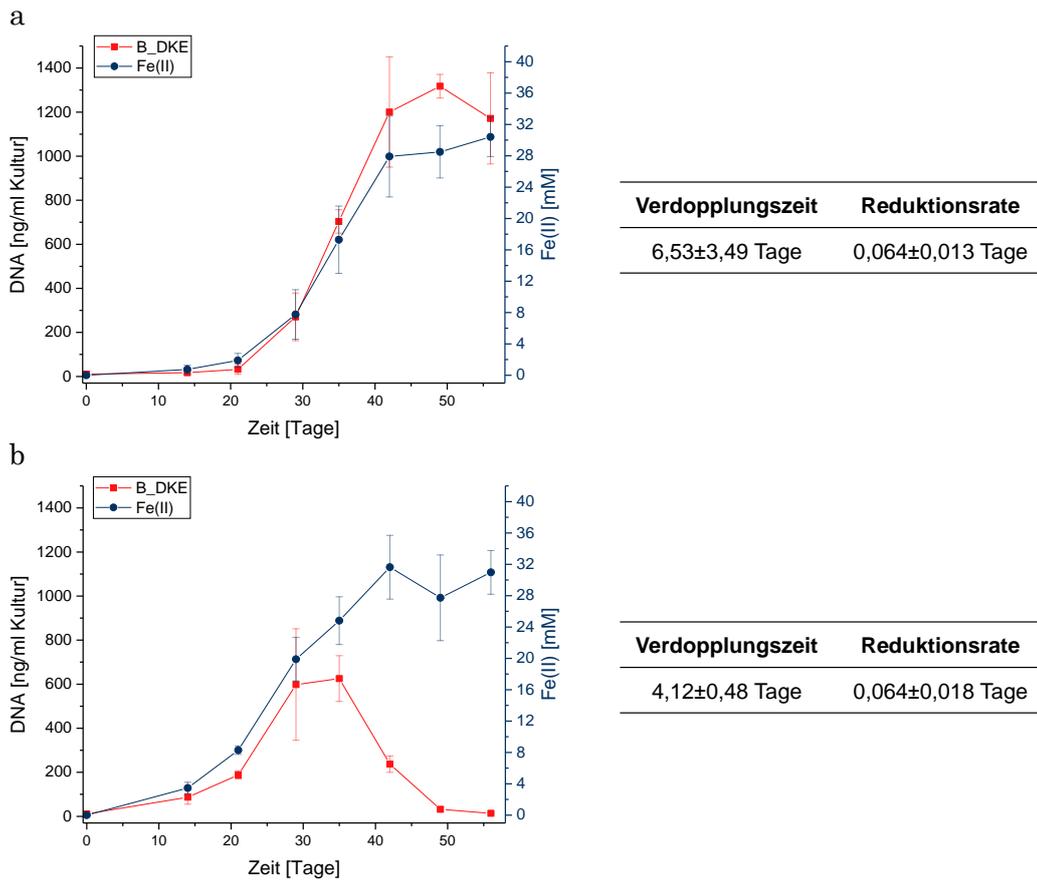


Abbildung 10: Vergleich der B_DKE-Wachstumsversuche bei 22 °C und 37 °C. Zu sehen sind die Ergebnisse der Messung der DNA- und Fe²⁺-Konzentration, sowie die Verdopplungszeit und die Reduktionsrate (jeweils in Tagen) über den Zeitraum eines B_DKE-Wachstumsversuchs bei 22 °C (a) und 37 °C (b). Kultivierung erfolgte stehend nach Inokulation (1:5) unter oxidischen Bedingungen und einem pH-Wert von 2,0. Die Werte entsprechen jeweils den Mittelwerten eines biologischen Triplikats, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Wie schon in Kapitel 3.1.1 beschrieben, zeigen Kulturen, die bei 22 °C kultiviert wurden eine lag-Phase, während dies bei Kulturen, die bei 37 °C kultiviert wurden nicht der Fall ist. Dies kann auch bei den Kurven der Fe²⁺-Konzentration beobachtet werden. Im weiteren Verlauf gleichen sich die Fe²⁺-Konzentrationskurven unter beiden Kultivierungsbedingungen; eine Wachstumsphase von 21 Tagen wird gefolgt von einer stationären Phase, die etwa 42 Tage nach Start der Kultivierung beginnt. Die Kurven, welche die DNA-Menge in den Kulturen beschreiben, unterscheiden sich jedoch zwischen den zwei Kultivierungstemperaturen. Während die DNA-Kurve bei 22 °C der Fe²⁺-Konzentrationskurve ähnelt, nimmt die DNA-Menge bei 37 °C-Kulturen nach 35 Tagen Kultivierung ab, obwohl noch nicht das gesamte Fe³⁺ reduziert wurde. Die Zellen nutzen dabei weiter den Elektronenakzeptor, so dass nach 42 Tagen eine vergleichbare Fe²⁺-Konzentration erreicht wird,

wie bei Kultivierung bei 22 °C, obgleich keine DNA mehr detektiert werden kann. Die DNA-Menge in 22 °C-Kulturen erreicht stattdessen nach 42 Tagen Kultivierung ihr Maximum.

Die Verdopplungszeit bei 37 °C ist mit 4,12 geringer als die 6,53 Tage, die B_DKE-Zellen bei 22 °C benötigen. Jedoch sind die Zeiten nicht signifikant verschieden, was hauptsächlich an der hohen Standardabweichung der Kulturen der 22 °C-Kultivierung liegt. Die Reduktionsrate unter beiden Kultivierungsbedingungen ist ähnlich, wobei 22 °C-Kulturen geringfügig schneller Fe³⁺ reduzieren, als 37 °C-Kulturen.

In vorherigen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die Zellzahl in einer Kultur mit B_DKE-Zellen mit der Fe³⁺-Reduktion korreliert (Krause *et al.*, 2017; Krause, 2017). Der Nachweis von Wachstum in den Wachstumsversuchen bei 18, 30, 37 °C und Raumtemperatur erfolgte daher über die Fe²⁺-Konzentration (Krause, 2017). Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls eine kürzere lag-Phase der Fe³⁺-Reduktion mit steigender Kultivierungstemperatur, stimmen folglich mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Die Versuche wurden allerdings mit einer Kultur durchgeführt, die neben B_DKE einen Micrarchaeota-Vertreter und einen Pilz enthielt. Außerdem wurde die Zellzahl nur bei Kulturen, die bei 22 °C oder Raumtemperatur kultiviert wurden, bestimmt. Deshalb kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Mischkultur in diesen Versuchen ebenfalls eine frühe Absterbephase bei Temperaturen über 22 °C zeigte.

Neben der fehlenden lag-Phase ist es diese frühe Absterbephase, die die 37 °C-Kurve von der 22 °C-Kurve unterscheidet. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte eine Veränderung im Metabolismus sein, der eine für den Organismus toxische Substanz akkumuliert und so für das Absterben der Zellen trotz vorhandener Elektronenakzeptoren sorgt. Da keine Metabolom- oder Transkriptomdaten für B_DKE-Kulturen existieren, die bei Temperaturen über 22 °C kultiviert wurden, kann hier über die genauen Ursachen nur spekuliert werden. Diese Experimente können auch die Ursachen hinter der Beobachtung beleuchten, dass Zellen, die sich in der Absterbephase befinden weiter Fe³⁺ reduzieren. Die Fe²⁺-Konzentration steigt in der Absterbephase immer noch in linearer Weise.

Auffällig ist außerdem die geringe Gesamt-DNA-Menge, die aus 37 °C-Kulturen extrahiert werden konnte. Eine Erklärung könnte in einer Veränderung der Zellen liegen, die den Zellaufschluss für die DNA-Isolation negativ beeinflusst. So ist beschrieben, dass *T. acidophilum*-Zellen die Lipid-Zusammensetzung ihrer Membran abhängig von der Wachstumstemperatur

ändern (Uda *et al.*, 2001). Eine andere Erklärung ist, dass B_DKE tatsächlich bei 37 °C zu einer geringeren Zelldichte heranwächst, als bei geringeren Kultivierungstemperaturen. Auch hier kann über die zu Grunde liegenden Mechanismen nur spekuliert werden.

Die nicht signifikant geringere Verdopplungszeit, die geringere insgesamt DNA-Menge, sowie die Beobachtung, dass die Zellen trotz ausreichend vorhandener Reduktionsäquivalente bei Kultivierung bei 37 °C sterben, führt zur Schlussfolgerung, dass 37 °C nicht die optimale Wachstumstemperatur für B_DKE ist. Kultivierung bei 30 °C führte zwar zu keiner geringeren Gesamt-DNA-Menge, die Kulturen zeigten jedoch dieselbe frühe Absterbephase wie die 37 °C-Kulturen (Abbildung 8). Deshalb scheint es sich, trotz der längeren lag-Phase, im Vergleich zu den höheren Temperaturen, nicht bei 30 °C, sondern bei 22 °C, um das Temperaturoptimum von B_DKE zu handeln.

3.1.3 Metabolisches Potential

Um das metabolische Potential B_DKEs zu erforschen, wurde dessen Genom sequenziert. Mit Hilfe einer Kombination der beiden Sequenzierungsmethoden PacBio und Illumina konnte das Genom von B_DKE vollständig sequenziert und geschlossen werden (Kapitel 2.2.2). Demnach besitzt B_DKE ein zirkuläres Chromosom mit einer Größe von 1.959.588 bp und einem GC-Gehalt von 44,4 %. Es wurde kein Hinweis auf Plasmide gefunden. Die Annotation des Genoms mit PROKKA 1.8 (Seemann, 2014) offenbarte 2044 proteinkodierende Gene.

B_DKE besitzt somit das größte Genom aller bisher beschriebenen Thermoplasmatales-Arten. Der GC-Gehalt ist ebenfalls relativ hoch im Vergleich zu den restlichen Vertretern.

Die annotierten Gene wurden mit Hilfe der *PathoLogic*-Anwendung (Caspi *et al.*, 2017) möglichen Stoffwechselwegen zugeordnet (Kapitel 2.2.4). Diese Erkenntnisse wurden mit Analysen auf Transkriptom- und Metabolom-Ebene überprüft und abgeglichen (Kapitel 2.2.2 und 2.2.1).

Ein System zur **Energiegewinnung**, das B_DKE nutzen kann, wurde in Vorarbeiten bereits postuliert (Krause *et al.*, 2017). In dieser Publikation wurde allerdings das zum damaligen Zeitpunkt vorliegende, unvollständige B_DKE-Genom, statt dem vollständig sequenzierten, das in dieser Arbeit diskutiert wird, verwendet. Deshalb sollten die Hypothesen überprüft werden.

Als zentraler Stoffwechselweg zur Energiegewinnung wurde der Citratzyklus postuliert. Auch im geschlossenen B_DKE-Genom konnten alle Gene für die entsprechenden Enzyme identifiziert werden. Des Weiteren finden

sich Gene zur Produktion von Pyruvat über den nicht-oxidativen Pentose-Phosphat-Weg, genauso wie über die Glykolyse. Die Kohlenhydrate für diese beiden Stoffwechselwege, könnte B_DKE aus dem Medium akquirieren. So wurden 35 B_DKE-Gene identifiziert, die für potentielle **Transporter** kodieren. Neben Ionentransportern wurden dabei vor allem Transporter für Kohlenhydrate gefunden. Ein Abgleich mit Transkriptom-Daten zeigte, dass Maltose/Trehalose-Importer die am höchsten exprimierten Kohlenhydrat-Transporter darstellen. Maltose kann von der Alpha-Glucosidase in zwei Glucoseuntereinheiten gespalten werden, was als Substrat in der Glykolyse dient. Das entsprechende Gen konnte ebenfalls identifiziert werden. Gene, die Enzyme des Stoffwechselwegs zur Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA kodieren, wurden ebenfalls im Genom des Thermoplasmatales-Vertreterers gefunden. Acetyl-CoA kann im Citratzyklus genutzt werden. In diesem wird das eingesetzte Acetyl-CoA unter Freisetzung von Reduktionsäquivalenten und einem ATP/GTP in CO₂ umgewandelt.

Die Hypothese, dass B_DKE Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg und Citratzyklus verbindet, um ATP und Reduktionsäquivalente herzustellen, kann somit durch die Analyse des geschlossenen Genoms bestätigt werden. Ein Kandidat für die verwendete Kohlenstoffquelle ist dabei Maltose, die B_DKE über Transporter aus der Umgebung aufnehmen kann.

Im B_DKE-Genom wurden außerdem Gene gefunden, die für Komponenten einer **Atmungskette** kodieren. Neben den Untereinheiten einer NADH-Chinon-Oxidoreduktase, wurden auch Gene zur Chinonsynthese und Untereinheiten einer Cytochrom-bd-II-Oxidase identifiziert. Eine Untersuchung der Reinkultur zur Identifikation der Chinone (nicht veröffentlicht) zeigte, dass es sich beim B_DKE-Chinon zu 95 % um Menachinon 7 und zu 5 % um Menachinon 6 handelt. Es wurden ebenfalls alle Gene für die Untereinheiten einer V-Typ-ATP-Synthase identifiziert.

Die Reduktionsäquivalente, die im Citratzyklus generiert werden, können demnach als treibende Kraft genutzt werden, um über die Atmungskette einen Protonengradienten herzustellen, der wiederum die ATP-Generation durch die ATP-Synthase antreibt. Beim terminalen Elektronenakzeptor muss es sich dabei, nach den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.1 um Fe³⁺ handeln.

Ein Abgleich der Expressionsraten aller Gene, die an Stoffwechselwegen zur Energiegewinnung beteiligt sind, zeigte die höchste Expression für Gene des Citratzyklus (Abbildung 11). Die mittlere Expressionsrate dieser Gene ist deutlich höher, als die der Gene, die am Pentose-Phosphat-Weg oder der Ausbildung der Atmungskette, sowie der ATP-Synthase beteiligt sind. Die

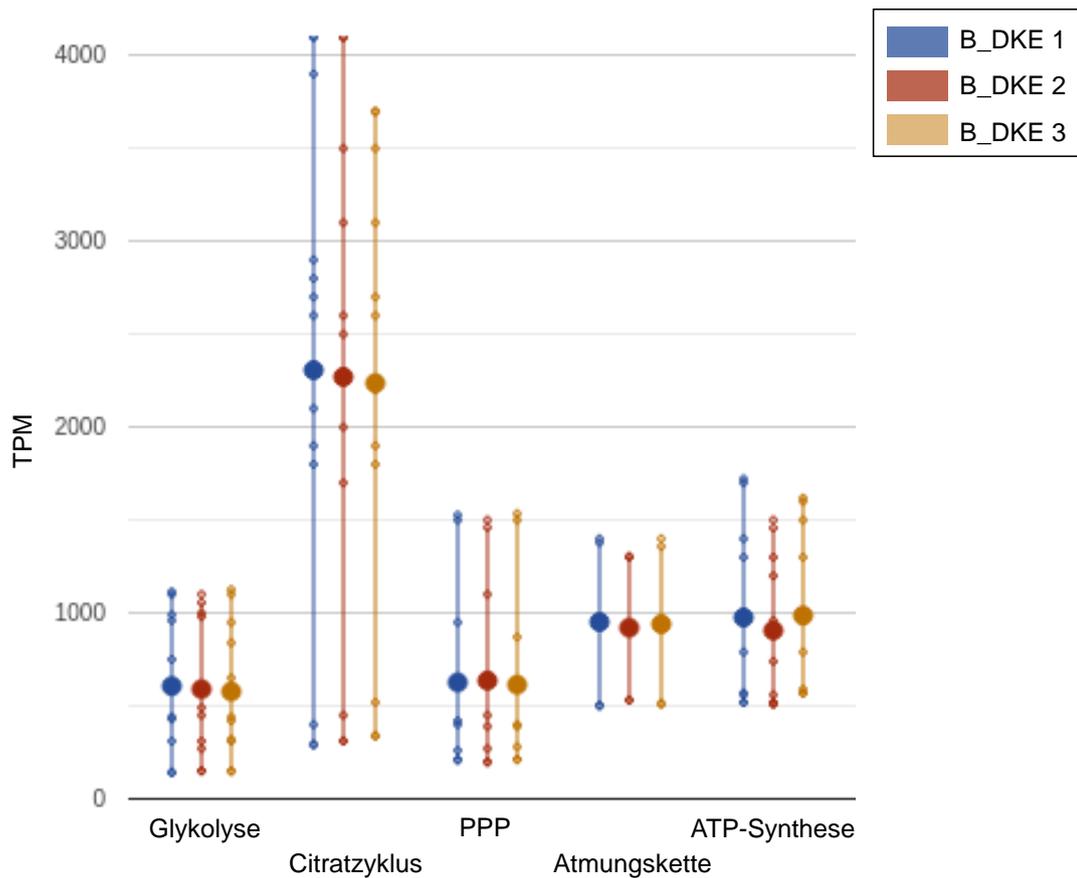


Abbildung 11: Genexpressionsraten von Genen für Proteine verschiedener Stoffwechselwege zur Energiegewinnung in B_DKE. Abgebildet sind jeweils die mittlere Expressionsrate aller Gene des Stoffwechselwegs (großer Punkt) und die Expressionsraten der einzelnen Gene (kleine Punkte) in drei B_DKE-Kulturen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden. PPP: Pentose-Phosphat-Weg. Eine Auflistung aller Gene und Expressionsraten ist im Anhang Tabelle 24 zu entnehmen.

niedrigste mittlere Expressionsrate besitzen Gene der Glykolyse.

Im **Anabolismus** besitzt B_DKE das genomische Potential, um Aminosäuren, DNA-Bausteine, Kohlenhydrate und Lipide herzustellen. Zur Synthese seiner Membranlipide nutzt B_DKE dabei Variante III des Mevalonat-Stoffwechselwegs, die bisher nur in Vertretern der Thermoplasmatales beschrieben ist (Vinokur *et al.*, 2016). Die Variante des Mevalonatwegs, bei dem Isoprenoid-Bausteine aus Acetyl-CoA über Mevalonat synthetisiert werden, unterscheidet sich in drei Enzymen zu anderen Varianten (Jain *et al.*, 2014).

Im **katabolen Stoffwechsel** sind im B_DKE-Genom alle Gene vorhanden, um Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Fettsäuren und Lipide, Kohlenhydrate und Carbonsäuren, sowie Alkohole abzubauen. Ein Vergleich der Expressionsrate der an diesen Stoffwechseln beteiligten Gene in Abbildung

12 zeigt deutlich, dass der Aminosäureabbau unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen bevorzugt wird. Die mittlere Expressionsrate übersteigt die der Gene, deren Genprodukte an den anderen Abbauwegen beteiligt sind deutlich, ebenso wie die Summe der Expressionsraten der Gene. Der Nukleotid- und Nukleosidabbau scheint zusammen mit dem Kohlenhydrat- und Carbonsäureabbau vor dem Abbau von Fettsäuren, anderen Lipiden und Alkoholen priorisiert zu sein. Im Kohlehydratabbau sind dabei vor allem Gene hoch exprimiert, deren Produkte den Abbau von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysieren.

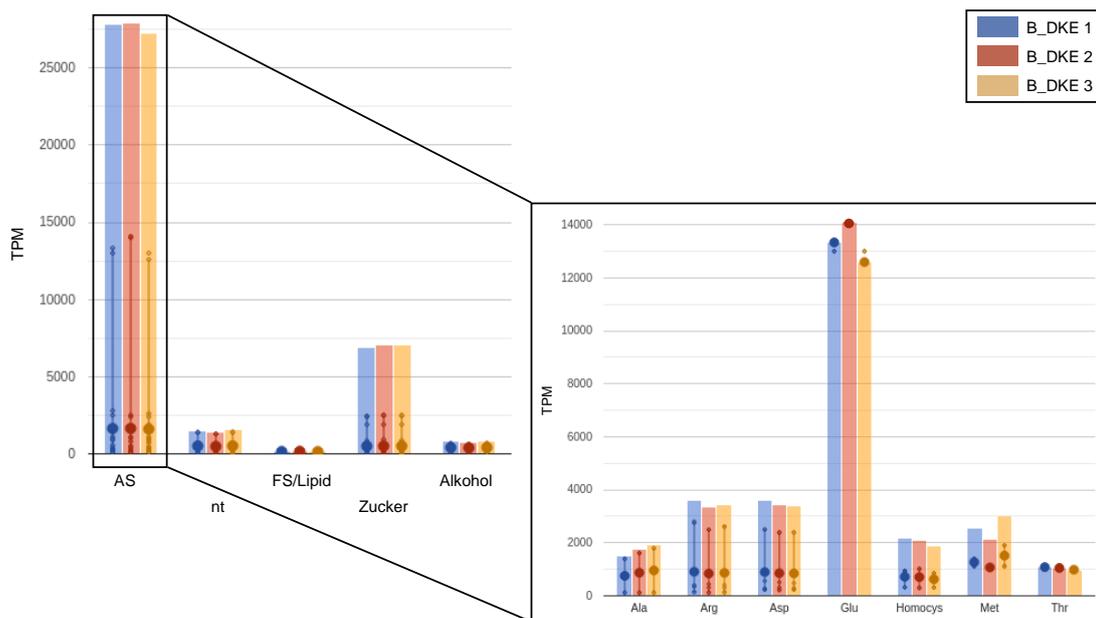


Abbildung 12: Genexpressionsraten von Genen für Proteine verschiedener kataboler Stoffwechselwege in B_DKE. Abgebildet sind jeweils die mittlere Expressionsrate aller Gene des Stoffwechselwegs (großer Punkt) und die Expressionsraten der einzelnen Gene (kleine Punkte) in drei B_DKE-Kulturen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Die Höhe der Balken entspricht dabei der Summe der Expressionsraten. Mit AS: Aminosäureabbau, nt: Nukleotid- und Nukleosidabbau, FS/Lipid: Abbau von Fettsäuren und anderen Lipiden, Zucker: Kohlenhydrat- und Carbonsäureabbau, Alkohol: Abbau von Alkoholen. Eine Auflistung aller Gene und Expressionsraten ist im Anhang Tabelle 25 zu entnehmen.

Die folgenden Aminosäuren und Aminosäurederivate können anhand der Genom-Analyse von B_DKE abgebaut werden: Alanin, Arginin, Asparagin, Glutamat, Homocystein, Methionin und Threonin. Ein Abgleich mit Transkriptomdaten zeigte, dass Gene für den Abbau von Glutamat bevorzugt exprimiert werden (Abbildung 12). Der Glutamatabbau zu 2-Oxoglutarat wird dabei von nur einem Enzym - der Glutamatdehydrogenase - katalysiert. 2-Oxoglutarat kann dabei als Intermediat in den Citratzyklus eingeschleust

und somit zur Gewinnung von Triphospho-Nukleotiden und Reduktionsäquivalenten genutzt werden. Die Rückreaktion des Glutamatabbaus kann ebenfalls durch Glutamatdehydrogenase katalysiert werden. Am Glutamat-Aufbau sind jedoch weitere Gene beteiligt, die im Vergleich eine weitaus geringere Expressionsrate besitzen. Deshalb wird vermutet, dass unter diesen Kultivierungsbedingungen der Glutamatabbau bevorzugt wird.

Ein Abgleich mit den Ergebnissen des in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Versuchs, in dem die Konzentration verschiedener Metabolite über die Dauer einer B_DKE-Wachstumskurve bestimmt wurden, unterstützt diese Beobachtungen. Die Konzentration vieler Aminosäuren - darunter Glutamat - sinkt mit vermehrtem B_DKE-Wachstum (nicht gezeigt). B_DKE scheint somit in der Lage zu sein, durch den Abbau von Aminosäuren Energie zu gewinnen. In seiner natürlichen Umgebung kann diese Stoffwechseleigenschaft B_DKE von Nutzen sein. Im inneren, anoxischen Teil eines Konsortiums von Mikroorganismen lebend, ist der Thermoplasmatales-Vertreter auf Aminosäuren und Zucker angewiesen, die durch das Absterben anderer Organismen frei werden (Ziegler, 2012). Da Aminosäuren und Hefeextrakt die einzige Kohlenstoffquelle im Kulturmedium ausmachen, ist die Nutzung dieses Stoffwechselweges auch unter Laborbedingungen nachvollziehbar.

3.1.4 Sauerstoffeinfluss

Der Thermoplasmatales-Vertreter B_DKE ist in der Lage, aerob, mikroaerob, sowie anaerob zu wachsen. Um den Einfluss von Sauerstoff auf das Wachstum von B_DKE genauer zu untersuchen, sollen hier die Wachstumskurven bei der aeroben und aneroben Kulturen genauer diskutiert werden. Die Kultivierung unter anoxischen Bedingungen ist nicht perfekt vergleichbar mit der oxischen und mikrooxischen Kultivierung, da unter anoxischen Bedingungen die Temperatur nicht kontrolliert werden kann und die Kulturen bei Raumtemperatur, statt 22 °C kultiviert wurden. Da gezeigt werden konnte, dass die Temperatur einen Einfluss auf das B_DKE-Wachstum besitzt (Kapitel 3.1.2), wurden die anaeroben Kulturen in diesem Kapitel nicht weiter betrachtet.

Die Wachstumskurven mit den unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen unterscheiden sich vor allem in der Länge ihrer lag-Phase (Abbildung 8). Während aerobe Kulturen nach 21 Tagen in die Wachstumsphase übergangen, war das bei mikroaeroben Kulturen erst nach 28 Tagen der Fall. Mikroaerob und aerob kultivierte B_DKE-Zellen zeigten dennoch beide ein exponentielles Wachstum.

Aus den Daten wurden die Verdopplungszeiten von B_DKE unter den beiden Sauerstoffkonzentrationen berechnet. Die Verdopplungszeit nahm dabei mit steigender Sauerstoffkonzentration zu. Während sie bei mikroaeroben Kulturen $5,39 \pm 0,48$ Tagen dauerte, sind es bei aeroben Kulturen $6,53 \pm 3,45$ Tage. Aerobe Kulturen zeigten dabei eine höhere Variabilität in ihrer Verdopplungszeit innerhalb des biologischen Triplikats.

Ausgehend von der Verdopplungszeit ist die optimalere Sauerstoffkonzentration für B_DKE-Wachstum folglich 7%. Da die Kultivierung ohne Schütteln und mit sichtbar weniger Wachstum an der Gas-Flüssigkeits-Grenze vonstattengeht, ist ein Einfluss der Sauerstoffkonzentration in der Gasphase auf das Wachstum fraglich.

Um dies genauer zu untersuchen, wurde eine vergleichende Transkriptomanalyse durchgeführt. Im biologischen Triplikat wurde das Transkriptom von B_DKE-Kulturen unter Standard-Kultivierungsbedingungen mit aerob kultivierten Kulturen verglichen (Kapitel 2.2.4).

Dabei wurden 12 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert (Tabelle 13). Diese sind alle unter aeroben Wachstumsbedingungen höher exprimiert. Mehr als der Hälfte der Gene konnte keine Funktion zugeordnet werden. Ein Gen ist an der Chinonbiosynthese beteiligt, während zwei weitere der höher exprimierten B_DKE-Gene eine Rolle in der Synthese von Molybdän-Cofaktoren spielen.

Die geringe Anzahl an differentiell exprimierten Genen und die Abwesenheit von Genen, die Enzyme zur Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffspezies kodieren, deuten auf eine geringe Auswirkung der Sauerstoffkonzentration auf das Wachstum hin.

Tabelle 16: Differentiell exprimierte B_DKE-Gene. Die Gene wurden nach einem *log fold change* > 2 oder < -2, sowie einem p-Wert von < 0,01 gefiltert.

Gen	Produkt	TPM mikro- O ₂	TPM O ₂	<i>fold change</i>	<i>log fold change</i>	p-Wert
Thermo_01996	Molybdopterin- Synthese-Protein MoeB	7,38	510,29	34,67	5,12	7,93E ⁻⁰⁹
Thermo_02038	Methylthioribulose- 1-Phosphate- Dehydratase	22,31	555,93	12,94	3,69	1,95E ⁻⁰⁷
Thermo_01432	Hypothetisches Protein	5,87	134,07	11,76	3,56	1,76E ⁻⁰⁶
Thermo_00421	Pyrroloquinoline- Quinone-Synthese- Protein C	50,17	883,05	9,29	3,22	3,00E ⁻⁰⁶
Thermo_01530	Hypothetisches Protein	24,56	233,24	5,25	2,39	1,72E ⁻⁰⁵
Thermo_00888	Hypothetisches Protein	6,78	61,95	5,02	2,33	1,87E ⁻⁰⁴
Thermo_00059	Molybdän-Cofaktor- Synthese-Protein A	785,10	6721,59	4,79	2,26	1,48E ⁻⁰⁵
Thermo_00865	Hypothetisches Protein	441,88	3773,25	4,78	2,26	1,99E ⁻⁰⁵
Thermo_00359	Hypothetisches Protein	5,37	43,52	4,50	2,17	3,53E ⁻⁰⁴
Thermo_01320	Hypothetisches Protein	34,82	265,73	4,31	2,11	7,12E ⁻⁰⁵
Thermo_02036	2,3-diketo- 5-Methylthio-1- Phosphopentan- Phosphatase	46,94	338,24	4,10	2,04	5,49E ⁻⁰⁵
Thermo_02037	Glucose-6- Phosphate- Isomerase	42,92	304,55	4,05	2,02	8,02E ⁻⁰⁵

3.1.5 Zellhülle

Thermoplasmatales-Vertreter sind dafür bekannt, bis auf die Mitglieder einer Familie, keine Zellwand zu besitzen (Reysenbach, 2001). Stattdessen werden sie von einer Glykokalyx-Schicht umgeben, die auch auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar ist (Yasuda *et al.*, 1995; Golyshina *et al.*, 2009; Golyshina *et al.*, 2016). Mitglieder der Picrophilaceae besitzen stattdessen einen S-Layer als Zellhülle (Schleper *et al.*, 1995).

Hier sollte mit Hilfe einer Genomanalyse und elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Beschaffenheit der Zellhülle von B_DKE untersucht werden.

Dazu wurde zunächst das B_DKE-Genom auf Gene durchsucht, die für Proteine mit Funktion beim Aufbau der Zellhülle kodieren. Dabei wurde nach Genen für S-Layer-Proteine gesucht, genauso wie nach Genen für Membranproteine, inklusive für Typ-IV-Pili und Genen für Enzyme, die bei der Glykosylierung beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Zur Ermittlung der Anzahl an Membranproteinkodierenden Genen, wurde das annotierte Proteom nach Proteinen mit putativen Transmembrandomänen (mit TMHMM; Sonnhammer *et al.*, 1998; Krogh *et al.*, 2001) und Signalpeptiden (mit SignalP 5.0; Almagro Armenteros *et al.*, 2019) durchsucht.

Im Genom von B_DKE konnte kein Gen, das ein Protein mit Homologie zu S-Layer-Domänen kodiert, gefunden werden. Während keine Gene für Präpilin-Peptidasen (*pibD/eppA*) gefunden wurden, die Pilin-Proteine prozessieren, konnte ein Gen identifiziert werden, das für eine ATPase kodiert, die die nötige Energie für diese Prozessierung liefert (PilB). Gene für Homologe von PilC, einem Membranprotein, das Typ-IV-Pili in der Zellmembran verankert, fanden sich ebenfalls nicht im B_DKE-Genom. Ein vollständiges Gen-cluster eines Archaeellums, inklusive zweier Gene für ein 41 kDa Archaeelin wurden im B_DKE-Genom entdeckt. Außerdem besitzt B_DKE Gene eines N-Glykosylierungssystems. Neben mehreren Genen für Glykosyltransferasen wurde ein Gen für eine Oligosaccharyltransferase (*aglB*) identifiziert. Außerdem enthält das Genom des Thermoplasmatales-Vertreter Genen, die die Synthese von Nukleotid-aktivierter Galactose, Glucose, N-Acetyl-Galactosamin, N-Acetyl-Glucosamin und Mannose ermöglichen.

Die Ergebnisse der Genomanalyse deuten somit darauf hin, dass der Thermoplasmatales-Vertreter von einer Cytoplasmamembran mit glykosylierten Membranproteinen und keiner weiteren Zellwand umgeben ist. Trotz der Existenz eines Gen-clusters, das alle Komponenten eines Archaeellums exprimieren kann, lässt sich durch diese Analyse nicht vollständig klären, ob B_DKE

Tabelle 17: Zellwand-Komponenten von B_DKE.

Komponente	B_DKE	Komponente	B_DKE
Membranproteine		N-Glykosylierung	
SignalP	66	<i>aglA</i>	-
TMHMM	437	<i>aglB</i>	+
S-Layer	-	<i>aglC</i>	-
Typ-IV-Pili		<i>aglD</i>	+
<i>pibD</i>	-	<i>aglE</i>	+
<i>pilB</i>	+	<i>aglF</i>	+
<i>pilC</i>	-	<i>aglG</i>	-
Archaellum		<i>aglH</i>	-
<i>arlA</i>	-	<i>aglI</i>	+
<i>arlB</i>	+	<i>aglJ</i>	+
<i>arlC</i>	+	<i>aglK</i>	-
<i>arlD/E</i>	+	<i>aglL</i>	-
<i>arlF</i>	+	<i>aglM</i>	-
<i>arlG</i>	+	<i>aglN</i>	-
<i>arlH</i>	+	<i>aglO</i>	-
<i>arlI</i>	+	<i>aglP</i>	+
<i>arlJ</i>	+	<i>aglQ</i>	-
		<i>aglR</i>	-

in der Lage ist ein Archaellum auszubilden, da kein Gen für eine Präpilin-Peptidase gefunden werden konnte. Diese ist für die Assemblierung der Pili-Struktur zuständig.

Diese Beobachtungen sollten durch **elektronenmikroskopische Aufnahmen** der B_DKE-Kultur überprüft werden.

Dabei wurden sowohl Ultradünnschnitte der Zellen, als auch gefriergeätzte, metallschattierte B_DKE-Zellen analysiert (Abbildung 13). In Ultradünnschnitten fiel zunächst der pleomorphe Charakter der Zellen auf. Dies konnte auch bei gefriergeätzten Zellen beobachtet werden. Geschnittene Zellen ermöglichten es, den Aufbau der Zellhülle im Querschnitt zu betrachten (Abbildung 13a). Hierbei konnte nur eine, die Zelle umgebende Schicht beobachtet werden. Durch Nachkontrastierung der Proben konnte dabei eine raue Schicht auf der Oberfläche der Zellen sichtbar gemacht werden (Abbildung 13b). Bei gefriergeätzten Zellen wurde durch die Metallschattierung eine unregelmäßige Oberfläche, jedoch kein S-Layer sichtbar (Abbildung 13c). Außerdem konnten vereinzelt Archaella mit Verankerungspunkt an B_DKE-Zellen ausgemacht werden.

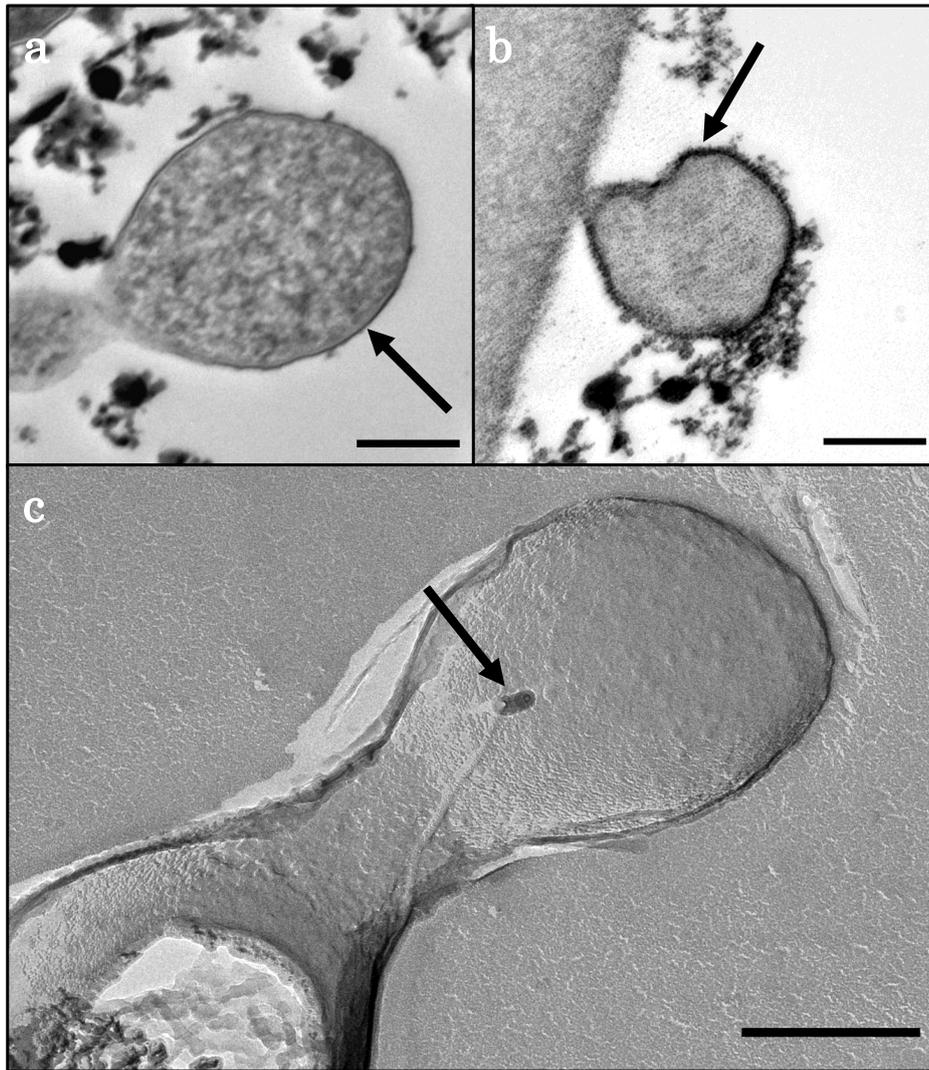


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Thermoplasmatales-Vertreters B_DKE. Zu sehen sind Ultradünnschnitte einer unkontrastierten (a) und einer nachkontrastierten (b) B_DKE-Zelle, sowie eine sich teilende gefriergeätzte, metallschattierte Zelle. Pfeile zeigen jeweils die Zellmembran (a), die Glykokalyx (b) und den Verankerungspunkt eines Archaellums (c). Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 250 nm.

Durch einen Vergleich mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen anderer Thermoplasmatales-Arten konnte die Zellhülle von B_DKE als eine cytoplasmatische Membran, die von einer Glykokalyx bedeckt ist, identifiziert werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Genom-Analyse überein. Der Thermoplasmatales-Vertreter ist ebenfalls dazu in der Lage ein Archaellum auszubilden. Eine Möglichkeit, wie dies trotz dem Fehlen einer Präpilin-Peptidase erreicht werden kann, ist eine bisher unbekannte Peptidase, welche deren Aufgabe übernimmt. Dafür spricht auch, dass für keines der annotierten Archaellum-Proteine mit Hilfe des FlaFind-Programms (Szabó *et al.*, 2007) eine Präpilin-Peptidase-Erkennungssequenz identifiziert werden konnte (nicht gezeigt).

3.1.6 Einordnung innerhalb der Thermoplasmatales

Der bisher nicht kultivierte Vertreter B_DKE soll phylogenetisch in die Ordnung der Thermoplasmatales eingeordnet werden. Dazu sollten zunächst die phänotypischen und genotypischen Eigenschaften zusammengefasst werden.

Die pleomorphe Zellform von B_DKE ist charakteristisch für Thermoplasmatales-Vertreter (Reysenbach, 2001), ebenso wie das Fehlen einer weiteren Zellhülle, abgesehen von der Cytoplasmamembran und einer Glykokalyx. Die Abwesenheit eines S-Layers unterscheidet B_DKE von Mitgliedern der Picrophilaceae (Schleper *et al.*, 1995). Wie alle Thermoplasmatales handelt es sich um einen acidophilen Organismus (Reysenbach, 2001). Da das pH-Optimum von B_DKE jedoch nicht genauer bestimmt wurde, ist der Vergleich mit anderen Vertretern schwierig. Der in dieser Arbeit charakterisierte Organismus besitzt das bisher größte beschriebene Genom mit einem relativ hohen GC-Gehalt im Vergleich zu anderen Thermoplasmatales-Arten (Reysenbach, 2001; Golyshina *et al.*, 2016). Bei B_DKE handelt es sich um einen mesophilen Organismus. Diese Eigenschaft grenzt ihn von Mitgliedern der Thermoplasmaceae, der Picrophilaceae und von *Thermogymnomonas acidicola* ab (Darland *et al.*, 1970; Schleper *et al.*, 1995; Itoh *et al.*, 2007). Das Temperaturoptimum ist dabei das bisher niedrigste der bekannten Arten (Golyshina *et al.*, 2016). B_DKE ist allerdings nicht wie Vertreter der *Ferroplasmaceae* zur Fe^{2+} -Oxidation befähigt (Golyshina *et al.*, 2000). Den physiologischen Eigenschaften nach zu urteilen ist B_DKE am nächsten mit *Cuniculiplasma divulgatum* verwandt. Ausbildung von Archaella, wie sie bei B_DKE vorkommt, ist bei diesem Vertreter jedoch nicht beschrieben.

Tabelle 18 ist eine um B_DKE ergänzte Tabelle, die die wichtigsten physiologischen Eigenschaften aller beschriebener Thermoplasmatales-Gattungen zusammenfasst.

Ein Abgleich der 16S-rRNA-Gene aller offiziell benannten Thermoplasmatales-Arten inklusive des hier beschriebenen Organismus bestätigte die Ergebnisse des Abgleichs der physiologischen Eigenschaften (Abbildung 14). Mit einer Übereinstimmung (*identity*) der 16S-rRNA-Gene von 92,05% ist *C. divulgatum* der nächste Verwandte von B_DKE. Damit handelt es sich um eine Art einer neuen Gattung innerhalb der Cuniculiplasmaceae (Yarza *et al.*, 2014).

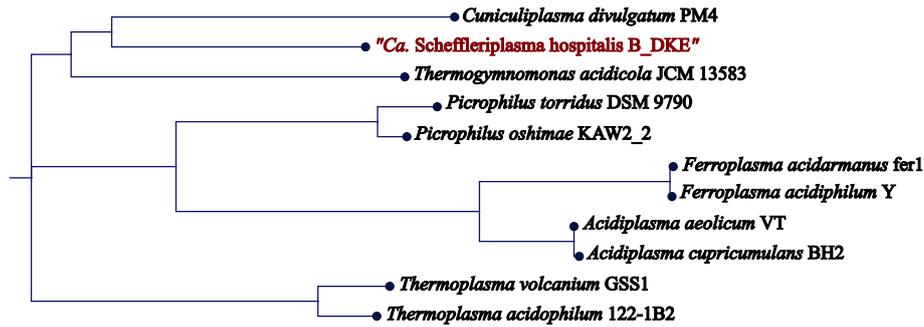


Abbildung 14: Phylogenetischer Stammbaum offiziell benannter Thermoplasmatales-Arten inklusive „*Candidatus Scheffleriplasma hospitalis B_DKE*“ (rot) auf Basis ihrer 16S-rDNA.

Tabelle 18: Physiologische Eigenschaften von Vertretern der Ordnung Thermoplasmatales. (1) *Thermoplasma*, (2) *Picrophilus*, (3) *Ferroplasma*, (4) *Acidiplasma*, (5) *Thermogymnomonas* (6) *Cuniculiplasma* (7) *Scheffleriplasma*. Genomgrößen aus NCBI-Datenbank.

	1	2	3	4	5	6	7
S-Layer	-	+	-	-	-	-	-
Wachstumstemperatur [°C]							
Bereich	33-67 /45-63	47-65	15-45	15/22- 65	38-68	10-48	18-37
Optimum	60	60	35/42	45/53,6	60	37-40	22
pH-Wert							
Bereich	0,5-4	0-3,5	1,3-2,2	0-4 /0,4- 1,8	1,8-4	0,5-4	2-2,5
Optimum	1-2	0,7	1,7	1-1,6	3	1-1,2	nb
Fähigkeit zu Wachstum							
Fe ²⁺ -							
Oxidation	-	-	+	+	-	-	-
anaerob	+	-	-/+	+	-	+	+
heterotroph	+	+	+	-/+	+	+	+
mixotroph	-	-	-/+	-/+	-	-	-
Genom							
Größe [Mb]	1,56 /1,58	1,53 /1,55	1,83 /1,94	1,73 /1,78	1,73	1,88	1,96
GC-Gehalt [mol%]	38-46	36	37	34-37	56	37	44
Morphologie	pleo- morph Kok- ken	unre- gelmä- ßige Kok- ken	pleo- morph /Kok- ken	pleo- morph /Kok- ken	unre- gelmä- ßige Kok- ken	pleo- morph	pleo- morph

Anhand der hier gewonnenen Erkenntnisse über die physiologischen Eigenschaften des bisher nicht kultivierten Organismus und der vollständigen Sequenzierung seines Genom wird hiermit der Name „Schefflerioplasma hospitalis“ vorgeschlagen.

Beschreibung von „*Candidatus Schefflerioplasma hospitalis*“

Schefflerioplasma hospitalis gen. nov. sp. nov. (Scheffler.i.plas'ma. N.L. gen. masc. n. *scheffleri* von Scheffler, benannt nach Dr. Horst Scheffler, in Anerkennung an seine Arbeit in der Geologie von Minen und seinem Engagement bei unserer Arbeit; *plasma* Gr. neut. n. eine Form; hos.pi.talis. L. masc. adj. *hospitalis* sich beziehend auf Gastfreundlichkeit, da dieser Organismus der Wirt von „*Candidatus Micrarchaeum harzensis*“ ist)

Zusätzlich zu den Eigenschaften, die die Familie Cuniculiplasmaceae ausmachen, besitzt dieses Genus, im Gegensatz zu *Cuniculiplasma*-Arten, neben Menachinonen keine weiteren Chinone.

Die Wachstumstemperatur des Stamms ist 18-27 °C, optimales Wachstum tritt bei 22 °C auf. Wachstum ist bei pH-Werten zwischen 2,0-2,5 möglich.

3.2 A_DKE

Neben der B_DKE-Reinkultur wurde eine Cokultur aus dem sauren *snot-tite*-Biofilm generiert. Diese enthält neben „*Candidatus* Scheffleriplasma hospitalis“ einen Vertreter der Micrarchaeota: A_DKE. Verschiedene Versuche, eine Reinkultur des Micrarchaeota-Vertreterers zu generieren, waren nicht erfolgreich (Krause, 2017). Deshalb wird spekuliert, dass A_DKE, wie andere DPANN-Archaea auch, auf Interaktionen mit anderen Organismen - in diesem Fall B_DKE - angewiesen ist.

Hier soll der Organismus benannt, die physiologischen Eigenschaften von A_DKE genauer untersucht und anhand dieser neue Strategien zur Isolation definiert werden.

3.2.1 Allgemeine Wachstumsbedingungen

Die Cokultur aus A_DKE und B_DKE wurde unter Standardbedingungen, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, und damit analog zur B_DKE-Reinkultur kultiviert. Auch hier standen Fe^{3+} als Elektronenakzeptor, sowie Hefeextrakt und Caseinhydrolysat als Kohlenstoffquelle zur Verfügung. Die Diversität der Kultur wurde regelmäßig über PCR und qPCR (Kapitel 2.2.2), sowie über CARD-FISH-Analysen (Kapitel 2.2.1) bestimmt. Alle diese Methoden unterscheiden die beiden Organismen dabei anhand ihrer 16S- bzw. 23S-rRNA-Gene, da im Lichtmikroskop keine morphologischen Unterschiede zwischen A_DKE und B_DKE ausgemacht werden konnten.

Eine Schwierigkeit bei der Charakterisierung des Micrarchaeons stellt die Tatsache dar, dass durch die Cokultivierung keine direkten Rückschlüsse von Veränderungen im Wachstum auf A_DKE gezogen werden können. Der unbekannte Einfluss des Thermoplasmatales-Vertreterers muss immer berücksichtigt werden. Dennoch kann aus Vorarbeiten geschlossen werden, dass das Micrarchaeon in der Lage ist, bei Temperaturen von 18 bis 37 °C und pH-Werten in einem Bereich von 2,0 bis 2,5 zu wachsen (Krause, 2017).

Um zu Überprüfen ob die Cokultur im Vergleich zur B_DKE-Reinkultur andere physiologische Eigenschaften zeigt, wurde ein Wachstumsversuch unter Standardbedingungen durchgeführt und dabei die Veränderung verschiedener Parameter überwacht. Neben der Fe^{2+} -Konzentration im Medium wurde in regelmäßigen Abständen die Zusammensetzung der Gasphase in biologischen Duplikaten analysiert. Das Wachstum beider Organismen wurde über PCR- und CARD-FISH-Analysen bestätigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 zusammengefasst.

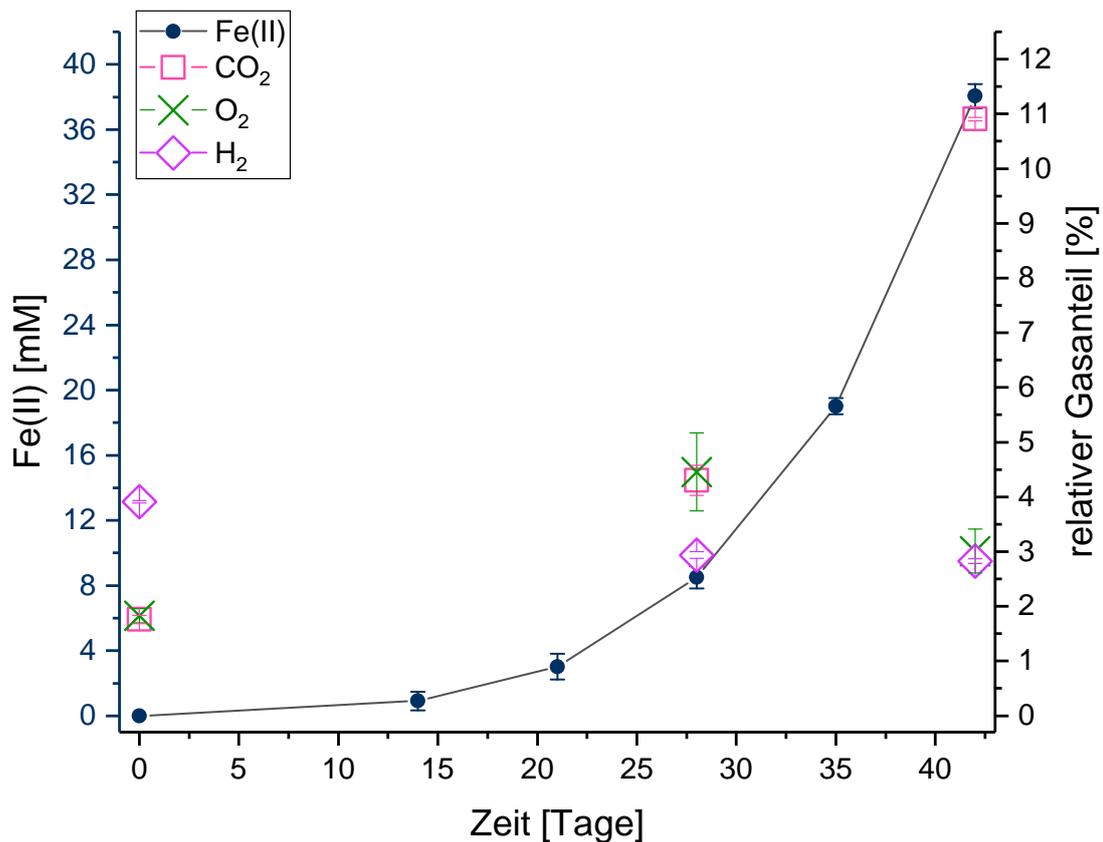


Abbildung 15: Veränderung verschiedener Parameter im Verlauf einer A_DKE-B_DKE-Kultivierung. Abgebildet sind die Fe^{2+} -Konzentration und der Prozentanteil von CO_2 , O_2 und H_2 in der Gasphase über die Zeit. Die Werte entsprechen jeweils den Mittelwerten eines biologischen Duplikats, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Wie auch die B_DKE-Reinkultur zeigt die Cokultur, bestehend aus A_DKE und B_DKE, eine Fe^{3+} -Reduktion über die Zeit. Dabei steigt die Fe^{2+} -Konzentration nach einer lag-Phase von etwa 21 Tagen exponentiell an, bis nach etwa 42 Tagen fast 40 mM Fe^{3+} reduziert sind. Der Anteil, den H_2 an der Gasphase ausmacht, sinkt im Laufe der Kultivierung von 4 % auf etwa 3 %, während der Anteil an O_2 in der Gasphase nach 28 Tagen von unter 2 % auf 4,5 % steigt, um nach 42 Tagen wieder auf unter 3 % zu fallen. Der Anteil, den CO_2 in der Gasphase von Cokulturen ausmacht, steigt mit der Kultivierungszeit von unter 2 % auf etwa 11 %.

Im Lauf der Kultivierung reduziert die Cokultur aus den beiden acidophilen Organismen demnach Fe^{3+} und produziert CO_2 , zeigt also keinen Unterschied zur B_DKE-Reinkultur. Daher ist es nicht möglich, auf physiologische Eigenschaften von A_DKE zu schließen. Der im Vergleich zur CO_2 -Produktion während der Reinkulturrkultivierung doppelt so hohe CO_2 -Anteil (Abbildung 9) kann ein Hinweis darauf sein, dass A_DKE ebenfalls an der

Produktion beteiligt ist. Für eine konkrete Aussage werden jedoch weiterführende Versuche benötigt, da in beiden Versuchen nicht die genaue Zellzahl bestimmt wurde, weshalb keine Aussage über die Vergleichbarkeit der Probennahme getroffen werden kann. Die Abnahme an H₂ in den Kulturen, kann wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, durch die Flüchtigkeit des Gases erklärt werden und hat demnach vermutlich keine biologische Bewandnis. Auch die Schwankungen im Sauerstoffanteil der Gasphase können durch abiotische Mechanismen erklärt werden. So generiert eine vermehrte Analyse der Gasphase Unterdruck, der zu einer Kontamination der Messung durch Atmosphärgas führen kann.

3.2.2 Temperaturoptimum

Ergebnisse aus Vorarbeiten deuteten darauf hin, dass das Micrarchaeon bei 37 °C besser wächst, als bei niedrigeren Temperaturen (Krause, 2017). So wurden bei einer Anreicherung, die neben A_DKE, den Thermoplasmales-Vertreter B_DKE und einen Pilz enthielt, ein großer Anteil an CARD-FISH-markierten A_DKE-Zellen während der Kultivierung bei 37 °C beobachtet. Der Anteil an markierten A_DKE-Zellen in dieser Anreicherung war bei niedrigeren Temperaturen geringer. Hier sollen die Ergebnisse, die bei der Kultivierung der Anreicherungskultur beobachtet wurden, mit der Cokultur überprüft werden.

Dazu wurden zwei biologische Triplikate an Cokulturen inokuliert und unter mikrooxygenen Bedingungen bei 22 bzw. 37 °C kultiviert. Neben der Fe²⁺-Konzentration wurde alle zwei bis drei Tage die Zellzahl bestimmt. Letztere wurde wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben mittels qPCR bestimmt, da so zwischen den beiden Organismen unterschieden werden konnte. Anhand der Zellzahl wurde die Verdopplungszeit der Kulturen berechnet. Neben dem Vergleich der beiden Kultivierungstemperaturen, sollte auch das Wachstumsverhalten der beiden cokultivierten Organismen näher betrachtet werden. Alle Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

Innerhalb des Triplikats bei 22 °C zeigten die Kulturen eine unterschiedlich lange lag-Phase, danach aber denselben Kurvenverlauf (Abbildung 26). Dieser wird auch aus dem Diagramm der Mittelwerte ersichtlich, obwohl sich durch die unterschiedlichen lag-Phasen hohe Standardabweichungen ergeben.

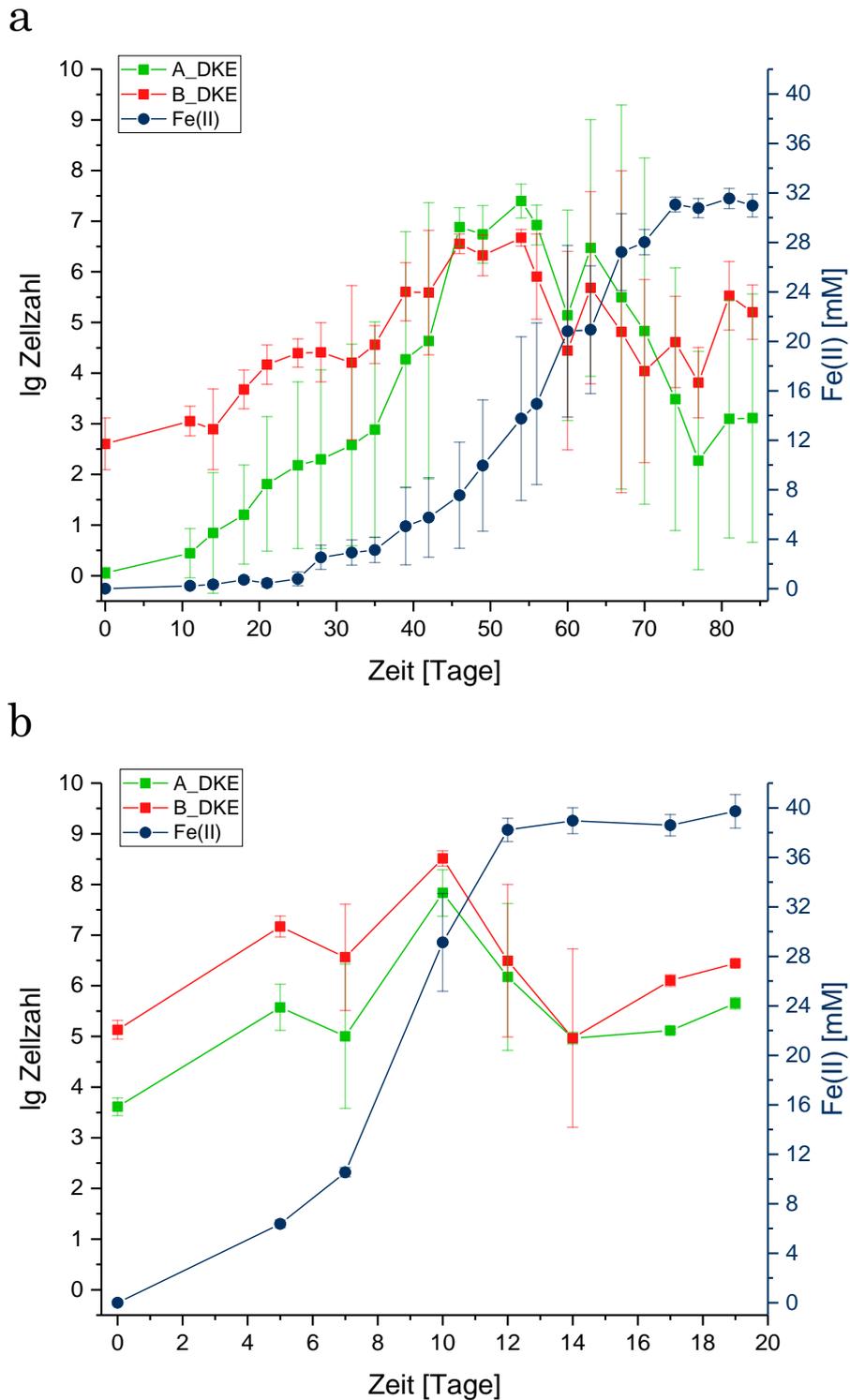


Abbildung 16: Vergleich der Cokultur-Wachstumsversuche bei 22 °C und 37 °C. Zu sehen sind die Anzahl an A_DKE- (grün) und B_DKE-Zellen (rot), sowie die Fe²⁺-Konzentration (blau) bei 22 °C (a) und 37 °C (b). Die Werte entsprechen jeweils den Mittelwerten eines biologischen Triplikats, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die Zellzahl zum Zeitpunkt der Inokulation unterscheidet sich bei diesem Versuch stark zwischen A_DKE- und B_DKE-Zellen. Während so gut wie

keine Micrarchaeota-Zellen vorhanden sind, sind zu Beginn der Wachstumskurve fast 1000 B_DKE-Zellen quantifizierbar. Beide Organismen zeigen ab dem ersten Tag stetiges Wachstum, wobei das Micrarchaeon schneller wächst als der Thermoplasmatales-Vertreter, so dass von Letzterem nach etwa 46 Tagen Kultivierung eine, im Vergleich geringere Zellzahl, nachgewiesen werden kann. Im Laufe der darauf folgenden 28 Tage schwankte die Zellzahl beider Organismen. Dabei blieb die A_DKE-Zellzahl höher, als die von B_DKE, bevor sie 74 Tage nach Inokulation wieder unter die von B_DKE fiel. Die Fe^{2+} -Konzentration zeigte nach einer lag-Phase von 28 Tagen einen exponentiellen Anstieg, bevor sie nach 74 Tagen Kultivierung stagniert.

Die Fe^{2+} -Konzentrationskurve bei 37 °C-Kulturen zeigt denselben Verlauf, jedoch ohne lag-Phase. Außerdem dauerte es hier nur 12 Tage, bis der Fe^{2+} -Konzentrationsanstieg stagniert. Die Zellzahl zu Beginn der Kultivierung bei 37 °C ist mit fast 10 000 A_DKE-Zellen und etwa 100 000 B_DKE-Zellen höher als zu Beginn der 22 °C-Kulturen. Beide Organismen zeigen ein unregelmäßiges Wachstum, welches nach 10 Tagen die höchste Zellzahl erreicht. Anders als bei den 22 °C-Kurven übersteigt die A_DKE-Zellzahl während der Kultivierung zu keinem Zeitpunkt die Zellzahl des Thermoplasmatales-Vertreterers. Die maximale Zellzahl bei 37 °C ist dabei vergleichbar mit der bei 22 °C.

Während sich Verdopplungszeit von A_DKE bei 22 °C und 37 °C ähneln, ist die Verdopplungszeit von B_DKE bei 37 °C um 0,5 Tage länger.

Wie erwartet, korreliert die Fe^{3+} -Reduktion mit dem Wachstum. Die Verdopplungszeit von A_DKE ist bei beiden Kultivierungstemperaturen ähnlich, obwohl die 37 °C-Kultur über 5 mal so schnell ihre maximale Zelldichte erreicht. Dies ist teilweise auf langsames Wachstum zu Beginn der 22 °C-Wachstumskurve, sowie die geringere Ausgangszellzahl zurückzuführen. Auch die B_DKE-Verdopplungszeiten gleichen sich während der Cokultivierung. Eine Kultivierung von B_DKE alleine bei 37 °C zeigte stattdessen eine geringere Verdopplungszeit im Vergleich zur 22 °C-Kultivierung. Da die Versuche, die in Kapitel 3.1.2 diskutiert werden unter oxischen Bedingungen durchgeführt wurden, kann die höhere Verdopplungszeit nicht mit Sicherheit auf die Cokultivierung mit A_DKE zurückgeführt werden. Dennoch ist es denkbar, dass A_DKE das Wachstum von B_DKE abbremst. Unter Standardkultivierungsbedingungen konnte beobachtet werden, dass A_DKE bei Inokulation in geringerer Zelldichte vorlag und Kultivierungszeit benötigte um ähnliche Zellzahlen zu erreichen wie B_DKE. Bei der Verzögerung des B_DKE-Wachstums könnte es sich somit um einen Mechanismus von A_DKE zum Schutz vor Überwachsen durch B_DKE handeln.

Das Micrarchaeon A_DKE scheint unter Standardbedingungen (22 °C, mikrooxygen) jedoch keinen positiven oder negativen Effekt auf das Wachstum von B_DKE zu besitzen. So zeigt der Thermoplasmatales-Vertreter kein verbessertes oder verschlechtertes Wachstum, auch wenn A_DKE in höherer Anzahl vorliegt, wie es bei Standardbedingungen zeitweise der Fall ist. Die Wachstumskurven beider Organismen zeigen jedoch bei 37 °C durchgehend und bei 22 °C, sobald die A_DKE-Zellzahl die Zellzahl von B_DKE übersteigt, denselben Verlauf. Dies deutet darauf hin, dass das Wachstum der beiden Archaea miteinander gekoppelt ist oder von denselben Faktoren abhängt. Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen beiden Organismen wird in Kapitel 3.3 ausführlich diskutiert.

Eine höhere Zellzahl des Micrarchaeons während der 37 °C-Kultivierung im Vergleich zur Kultivierung bei 22 °C, wie sie bei den Anreicherungskulturen beobachtet wurde, konnte in diesen Versuchen mit der Cokultur nicht bestätigt werden. Während die Zellen bei 37 °C-Kultivierung das vorhandene Fe³⁺ schneller reduzierten und auch früher die maximale Zellzahl erreichten, konnte kein signifikanter Unterschied in der Verdopplungszeit ermittelt werden.

3.2.3 Metabolisches Potential

Das metabolische Potential von A_DKE sollte durch Sequenzierung seines Genoms bestimmt werden. Wie schon bei der Sequenzierung des B_DKE-Genoms wurden die zwei Sequenzierungsmethoden Pacbio und Illumina kombiniert (Kapitel 2.2.2). Auch das A_DKE-Genom konnte dadurch vollständig sequenziert und geschlossen werden, bevor es ebenfalls mit PROKKA 1.8 (Seemann, 2014) annotiert wurde. Das Micrarchaeon besitzt demnach ein 989 838 bp großes Genom mit einem GC-Gehalt von 45,8 % und 1025 proteinkodierenden Genen.

Damit sind Größe, GC-Gehalt und Gendichte des A_DKE-Genoms vergleichbar mit denen anderer Micrarchaeaceae-Stämme wie ARMAN-1 (1,01 Mb, 46 %, 1035 proteinkodierende Gene; Burstein *et al.*, 2017), ARMAN-2 (1,01 Mb, 47,3 %, 1025 proteinkodierende Gene; Baker *et al.*, 2010) oder Mia14 (0,95 Mb, 39,4 %, 968 proteinkodierende Gene; Golyshina *et al.*, 2017b). Das einzige geschlossene Genom eines Vertreters der Fermentimicrarchaeaceae ist mit 1,18 Mb und 1312 proteinkodierenden Genen größer (Kadnikov *et al.*, 2020), was für eine nähere Verwandtschaft von A_DKE mit den Micrarchaeaceae spricht. Des Weiteren wurden bei der Sequenzierung des A_DKE-Genoms keine Hinweise auf Plasmide entdeckt, während ein Plasmid für das

Fermentimicrarchaeon beschrieben wurde.

Auch das annotierte A_DKE-Genom wurde mit der MetaCyc-Datenbank (Caspi *et al.*, 2017) abgeglichen, um mögliche Stoffwechselwege zu identifizieren. Korreliert wurden diese Ergebnisse mit Transkriptom- und Metabolomdaten der Cokultur (Kapitel 2.2.2 und 2.2.1).

Wie schon bei der Analyse eines unvollständigen A_DKE-Genoms (Krause *et al.*, 2017) fiel bei dieser Untersuchung auf, dass das genomische Potential des Micrarchaeons im **anabolen Stoffwechsel** extrem limitiert ist. So ist der Organismus nicht in der Lage, Nukleotide, Nukleoside oder die meisten Aminosäuren herzustellen. Lediglich Enzyme, die die Synthese von Glutamat, Asparagin aus Oxalacetat und Phenylalanin aus Phenylpyruvat katalysieren, konnten identifiziert werden. Außerdem wurden überraschenderweise Gene, deren Genprodukte als Teil des Mevalonat-Stoffwechselwegs (Variante III) Isoprenoid-Bausteine synthetisieren, im A_DKE-Genom lokalisiert. Dieser Stoffwechselweg wurde bis jetzt nur in Vertretern der Ordnung Thermoplasmatales beschrieben (Vinokur *et al.*, 2014). Trotz seines genomischen Potentials Isoprenoid-Bausteine zu synthetisieren, ist A_DKE vermutlich nicht in der Lage, vollständige Lipide zum Aufbau seiner Zellwand herzustellen, da im Genom kein Gen für eine Glycerol-1-Phosphat-Dehydrogenase gefunden wurde. Dieses Enzym katalysiert die Synthese von Glycerol-1-Phosphat, über welches die Isoprenoid-Bausteine verbunden sind. In Kapitel 3.3.5 wird die Lipidsynthese in A_DKE genauer diskutiert. Für die Kohlenhydratbiosynthese wurden auf genomischer Ebene keine vollständigen Stoffwechselwege gefunden.

Als zentraler Stoffwechselweg zur **Energiegewinnung** wurde in A_DKE in vorherigen Publikationen der Citratzyklus identifiziert (Krause *et al.*, 2017). Dies konnte durch die Analyse des geschlossenen Genoms bestätigt werden. Es wurden fast alle entsprechenden Gene identifiziert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der B_DKE-Genom-Analyse konnte im A_DKE-Genom nur ein Gen des Pentose-Phosphat-Stoffwechselwegs lokalisiert werden. Für die Umwandlung von Glucose zu Glycerat - einem Teil des nicht phosphorylierten Entner-Doudoroff-Stoffwechselwegs - wurden jedoch Gene im A_DKE-Genom identifiziert. Auch die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA ist laut den Genomdaten möglich. Für die fehlenden Schritte der Umwandlung von Glycerat zu Pyruvat wurden jedoch keine Gene gefunden. Des Weiteren wurden Teile einer **Elektronentransportkette** im A_DKE-Genom identifiziert. Während von einem Cytochrom-*bc1*-Komplex und einer Cytochrom-*c*-Oxidase nur Gene für eine bzw. zwei Untereinheiten im Genom lokalisiert zu

sein schienen, wurden Gene, die alle Untereinheiten einer NADH-Dehydrogenase und einer V-Typ-ATP-Synthase kodieren, identifiziert.

A_DKEs Strategie zur Energiegewinnung beruht somit sehr wahrscheinlich auf der Generierung von Reduktionsäquivalenten durch den Citratzyklus, die genutzt werden, um ein elektrochemisches Potential über die Membran aufzubauen, welches wiederum eine ATP-Synthase antreibt.

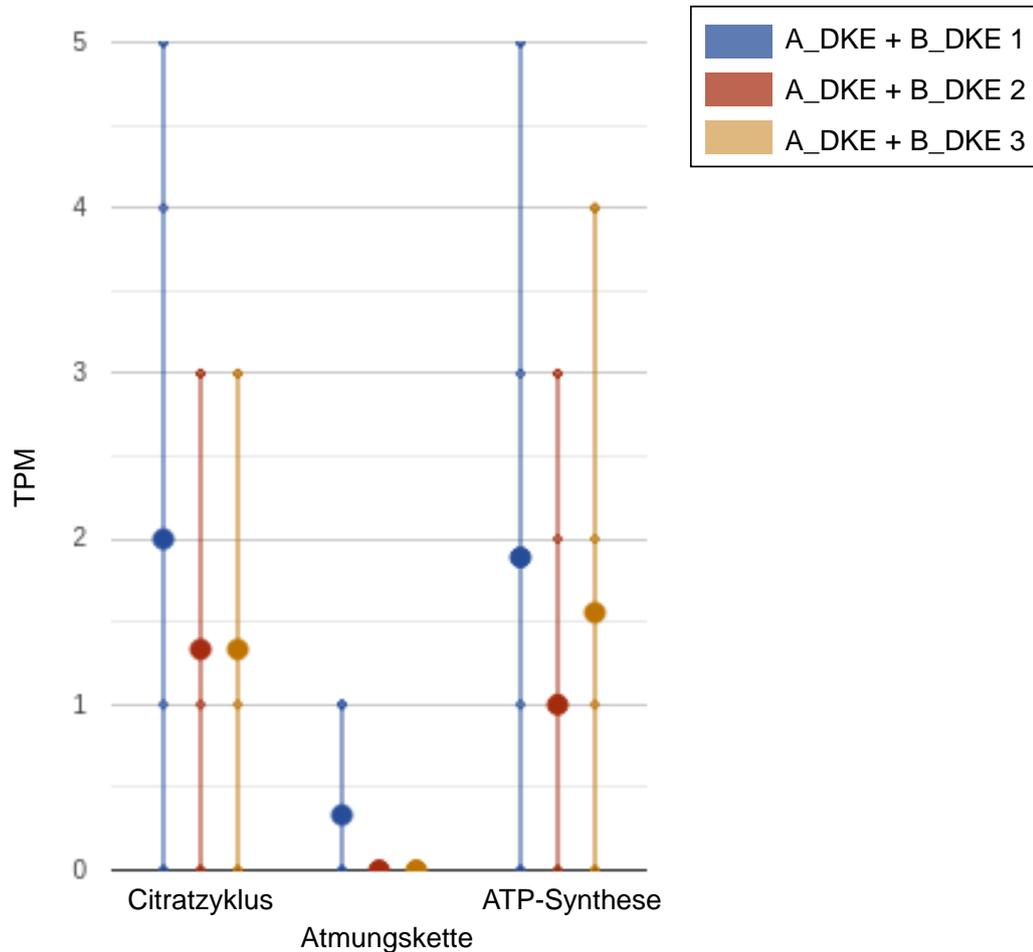


Abbildung 17: Genexpressionsraten von Genen verschiedener Stoffwechselwege zur Energiegewinnung in A_DKE. Abgebildet sind jeweils die mittlere Expressionsrate aller Gene des Stoffwechselwegs (großer Punkt) und die Expressionsraten der einzelnen Gene (kleine Punkte) in drei Kokulturen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Eine Auflistung aller Gene und Expressionsraten ist im Anhang Tabelle 26 zu entnehmen.

Die Analyse des Transkriptoms bestätigte diese Theorie. Ein Vergleich der Expressionsraten von Genen verschiedener Energiestoffwechselwege zeigte, dass Gene des Citratzyklus ähnlich hoch exprimiert werden, wie Gene der ATP-Synthase (Abbildung 17). Gene der Atmungskette sind in einer der untersuchten Kulturen schwach, in den beiden anderen nicht detektierbar

exprimiert. Erstere zeigte im Vergleich zu den restlichen Kulturen allgemein eine höhere Expressionsrate der Gene.

Die hohe Expressionsrate der Gene des Citratzyklus und der ATP-Synthese im Vergleich mit Genen anderer Stoffwechselwege, bestätigt, dass diese die wichtigsten A_DKE-Stoffwechselwege zur Energiegewinnung darstellen.

Beim terminalen Elektronenakzeptor der Atmungskette könnte es sich wie beim B_DKE-Metabolismus um Fe^{3+} handeln, da dieses in ausreichender Menge im Medium vorhanden ist und mit Cokultur-Wachstum reduziert wird. Da B_DKE jedoch auch in der Lage ist, Fe^{3+} zu reduzieren (Kapitel 3.1.1), ist es nicht auszuschließen, dass die Fe^{3+} -Reduktion nur auf den Thermoplasmatales-Vertreter zurückzuführen ist und A_DKE einen anderen Elektronenakzeptor nutzt.

Im Gegensatz zum sehr limitierten aufbauenden Stoffwechsel, deuten die Genom-Daten darauf hin, dass der **katabole Stoffwechsel** in A_DKE stärker ausgeprägt ist. Gene, die für Enzyme kodieren, die beim Abbau verschiedener Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin und Glutamat, Isoleucin, Leucin, Methionin, Prolin, Threonin und Valin) und Nukleotide beteiligt sind, wurden im A_DKE-Genom identifiziert. Dabei zeigte der Vergleich mit Transkriptomdaten, dass Gene zum Abbau von Nukleotiden und Nukleosiden vergleichbar hoch exprimiert sind, wie Gene zum Aminosäureabbau (Abbildung 18). Der Abbau von Kohlenhydraten und Carbonsäuren scheint eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Bei den höchstexprimierten Genen des letztgenannten Abbauwegs handelt es sich um Gene, deren Produkte an der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA beteiligt sind.

Unter den Genen zum Aminosäureabbau sind vor allem Gene, die für eine Glutamat- bzw. eine Prolindehydrogenase kodieren, hoch exprimiert. Während die Glutamatdehydrogenase den Abbau von Glutamat zu 2-Oxoglutarat katalysiert, ist die Prolindehydrogenase für den ersten Schritt des Prolinabbaus, der Umwandlung von Prolin zu L-Glutamat-5-Semialdehyd zu Glutamat, zuständig. Ein Gen für das Enzym, das den zweiten Reaktionsschritt zu Glutamat katalysiert, konnte nicht im A_DKE-Genom identifiziert werden. Für einige Bakterienarten ist jedoch eine Prolindehydrogenase beschrieben, die in der Lage ist, beide Reaktionsschritte zu katalysieren (Menzel *et al.*, 1981a; Menzel *et al.*, 1981b; Straub *et al.*, 1996).

Genom- und Transkriptomdaten deuten darauf hin, dass Nukleotide, Nukleoside und Aminosäuren die Hauptkohlenstoffquelle von A_DKE darstellen. Dies wird auch durch Metabolom-Daten der Cokultur bestätigt, die eine Abnahme der Aminosäuremenge über den Verlauf einer Wachstumskurve zeigte (nicht gezeigt).

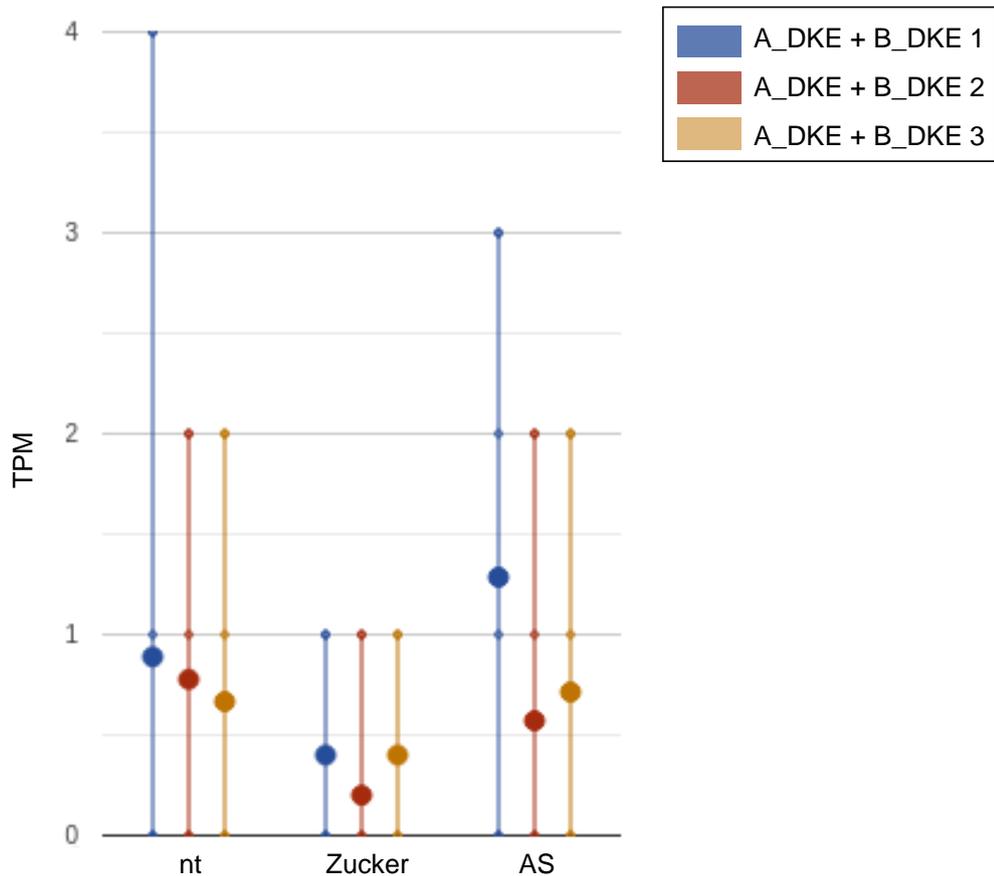


Abbildung 18: Genexpressionsraten von Genen verschiedener kataboler Stoffwechselwege in A_DKE. Abgebildet sind jeweils die mittlere Expressionsrate aller Gene des Stoffwechselwegs (großer Punkt) und die Expressionsraten der einzelnen Gene (kleine Punkte) in drei Cokulturen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Mit AS: Aminosäureabbau, nt: Nukleotid- und Nukleosidabbau, Zucker: Kohlenhydrat- und Carbonsäureabbau. Eine Auflistung aller Gene und Expressionsraten ist im Anhang Tabelle 27 zu entnehmen.

Das genomische Potential von A_DKE ist insgesamt sehr gering. Die Genom-Analyse deutet darauf hin, dass der Organismus nicht in der Lage ist, wichtige Metabolite, wie Lipide, Kohlenhydrate oder DNA-Bausteine zu synthetisieren. Das Micrarchaeon ist somit auf die Aufnahme von Metaboliten und Zwischenprodukten wichtiger Stoffwechselwege - wie Pyruvat - angewiesen.

Dabei kann A_DKE entweder durch sterbende Zellen freiwerdende Stoffe aus der Umgebung über **Transporter** aufnehmen oder durch spezifische Interaktion mit anderen Organismen Metabolite akquirieren. Da im A_DKE-Genom nur 14 Gene gefunden wurden, die für potentielle Transporter kodieren, ist die zweite Hypothese wahrscheinlicher. Ein Abgleich mit Transkriptomdaten zeigte, dass es sich bei den höchstexprimierten Transportern in A_DKE, genau wie in B_DKE um Maltose/Trehalose-Transporter handelt.

Für Ionentransport, zu dem A_DKE auch befähigt ist, konnte nur geringe Expression festgestellt werden. A_DKE könnte demnach ähnlich wie B_DKE Maltose aus der Umgebung aufnehmen und aufspalten, um es als Substrat im Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg zu nutzen. Ein Enzym, das die Spaltung von Maltose in die Glucose-Untereinheiten katalysiert, ist im A_DKE-Genom kodiert.

3.2.4 Sauerstoffeinfluss

Micrarchaeota wurden zunächst als aerobe Organismen beschrieben (Baker *et al.*, 2010). Ihre Entdeckung im anoxischen Teil eines sauren Biofilms, änderte diese Annahme jedoch (Ziegler *et al.*, 2013). Anreicherungsversuche bestätigten, dass Micrarchaeota in der Lage sind, unter mikrooxygenen Bedingungen zu wachsen (Chen *et al.*, 2017). Auch die hier beschriebene Cokultur aus einem Micrarchaeon und einem Thermoplasmatales-Vertreter wird unter mikrooxygenen Bedingungen kultiviert (Kapitel 2.2.1). Hier soll nun der Einfluss von Sauerstoff auf das Wachstum des Micrarchaeons A_DKE untersucht werden.

In vorherigen Arbeiten konnte Wachstum der Cokultur bereits unter anoxischen Bedingungen gezeigt werden (Krause, 2017). Daraus kann geschlossen werden, dass A_DKE nicht auf Sauerstoff angewiesen ist. Wachstumsversuche sollen nun zeigen, ob A_DKE-Wachstum durch Sauerstoff beeinflusst wird.

Dazu wurden je drei Cokulturen in einem Verhältnis von 1 zu 5 inokuliert und unter oxischen bzw. mikrooxygenen Standardbedingungen kultiviert. Während in allen drei Kulturen, die unter mikrooxygenen Bedingungen kultiviert wurden, archaeelles Wachstum durch Fe^{3+} -Reduktion und CO_2 -Produktion, sowie A_DKE- und B_DKE-Wachstum im Speziellen über CARD-FISH- und PCR-Analysen, nachgewiesen werden konnte, wurde nach 55 Tagen kein Wachstum in aerob kultivierten Kulturen beobachtet.

Die aerobe Kultivierung scheint das Wachstum der Cokultur demnach zu hemmen. Diese Beobachtung war überraschend, da aerobes Wachstum für B_DKE beschrieben ist und somit zumindest der Thermoplasmatales-Vertreter unter den ausgesuchten Kultivierungsbedingungen in der Lage sein sollte, zu wachsen. Die Cokultur wurde vor diesem Experiment noch nie oxisch kultiviert. Eine aerobe Kultivierung einer Anreicherungskultur, die neben A_DKE und B_DKE einen acidophilen Pilz enthielt, resultierte in der Isolierung der B_DKE-Reinkultur. Jedoch wurde B_DKE-Wachstum erst nach fünf Monaten

Inkubation nachgewiesen (Krause, 2017). Ein zu kurzer Kultivierungszeitraum ist somit eine mögliche Erklärung für das fehlende Wachstum unter oxischen Bedingungen im hier beschriebenen Versuch.

Um den Einfluss von Sauerstoff auf das Wachstum von A_DKE ohne lange Kultivierungszeit zu untersuchen, wurde ein veränderter Versuchsansatz gewählt. Ein biologisches Triplikate der Cokultur wurde zunächst unter mikrobischen Standardbedingungen kultiviert. Nachdem A_DKE- und B_DKE-Wachstum durch Fe^{2+} -Reduktion und CARD-FISH-Analysen bestätigt werden konnte, wurde die anoxische Gasphase der Kulturen ausgetauscht. Dazu wurden mit einer Spritze 100 ml sterile Luft in die Kultivierungsgefäße gebracht. Mit einer Ausgleichskanüle wurde darauf geachtet, dass nach dem Gasaustausch kein Überdruck in den Gefäßen herrschte. Der Anteil von Sauerstoff in der Gasphase wurde danach, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, bestimmt. Nach dem Austausch der Gasphase wurde das Wachstum der beiden Organismen die folgenden vier Tage mittels CARD-FISH und PCR-Analysen beobachtet. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Ergebnisse des Versuchs zur Untersuchung des Sauerstoffeinflusses auf A_DKE. Aufgeführt sind die Menge an B_DKE- und A_DKE-Signalen in einer CARD-FISH-Analyse, sowie die Fe^{2+} - und die O_2 -Konzentration im Medium bzw. der Gasphase. Es sind jeweils die Mittelwerte eines Triplikats mit Standardabweichung angegeben. Die Anzahl an + verdeutlicht dabei die Menge an Signalen in der CARD-FISH-Analyse, (+) bedeutet, dass nicht in allen Triplikaten Signale detektiert wurden.

Kultivierung [Tage]	B_DKE	A_DKE	Fe^{2+} [mM]	O_2 [%]
0	++	(+)	0 ± 0	-
17	++++	+	$27,61 \pm 3,38$	$0,55 \pm 0,22$
17	++++	+	$20,46 \pm 3,85$	$17,89 \pm 0,12$
18	++++(+)	+	-	-
19	+++++	++	-	-
20	++++(+)	(+)	-	-
21	++++	(+)	-	-

Nach 17 Tagen Inkubation konnte eine Erhöhung der Fe^{2+} -Konzentration und der Zellzahl beider Organismen detektiert werden. Sauerstoff machte zu diesem Zeitpunkt einen Anteil von unter 1 % in der Gasphase aus. Nach Austausch der Gasphase konnte ein mittlerer Sauerstoffanteil von etwa 18 % gemessen werden, die Fe^{2+} -Konzentration sank um etwa 7 mM. In den darauffolgenden zwei Tagen stieg die Anzahl der detektierten CARD-FISH-Signale

beider Organismen zunächst. Drei Tage nach dem Austausch wurde ein Rückgang der Anzahl der A_DKE-Signale beobachtet, ein Rückgang der B_DKE-Signale nach vier Tagen. Die Ergebnisse der PCR-Analysen zum Nachweis von A_DKE und B_DKE stimmten dabei mit den Ergebnissen der CARD-FISH-Analyse überein. Es wurde in den CARD-FISH-Aufnahmen keine Veränderung in der Zellmorphologie nach dem Gasaustausch beobachtet.

Die Erhöhung der aktiven A_DKE-Zellen zwei Tage nach Austausch der Gasphase zeigt, dass das Micrarchaeon in der Lage ist, in Anwesenheit von Sauerstoff zu wachsen. Die abnehmende Anzahl an aktiven A_DKE-Zellen im weiteren Verlauf kann darauf hindeuten, dass Sauerstoff dennoch einen negativen Einfluss auf das A_DKE-Wachstum besitzt. Da zum Zeitpunkt des Gasaustauschs jedoch bereits eine große Menge des Elektronenakzeptors Fe^{3+} reduziert war, ist es wahrscheinlich, dass vier Tage danach limitierende Bedingungen vorlagen, die das Zellwachstum verminderten.

Sauerstoffradikale sind sehr reaktionsfreudig und wegen ihrer Fähigkeit, Proteine und DNA zu schädigen, toxisch für viele Mikroorganismen. Zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) exprimieren Organismen deshalb verschiedene Enzyme, wie Superoxiddismutasen oder Peroxidasen. Die Genome von A_DKE und B_DKE wurden nach Genen für diese Enzyme durchsucht. Während im Genom von B_DKE acht Gene gefunden wurden, deren Genprodukte eine Rolle beim Schutz der Zelle vor Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid spielen, konnten im A_DKE-Genom nur zwei derartige Gene identifiziert werden. Die beiden Gene kodieren für eine Superoxiddismutase und eine Peroxidase. Beide Organismen sind demnach in der Lage, sich vor ROS zu schützen. Da das B_DKE-Genom mehr Enzyme gegen Sauerstoffstress kodiert und B_DKE-Wachstum in Anwesenheit von Sauerstoff dokumentiert wurde, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der Thermoplasmatales-Vertreter in Cokultur unter mikrooxygenen Bedingungen A_DKE-Wachstum durch Abbau von ROS begünstigt. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte eine vergleichende Transkriptom-Analyse durchgeführt werden, die die exprimierten Gene einer Cokultur vor und nach dem Austausch einer anoxischen Gasphase durch eine oxische, quantifiziert und mit denen einer B_DKE-Reinkultur vergleicht.

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche deuten zusammen mit dem Fund von Genen, die ROS-neutralisierenden Enzyme kodieren, darauf hin, dass es sich bei A_DKE um einen anaeroben Organismus handelt, der jedoch in der Lage ist unter mikrooxygenen Bedingungen zu überleben. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit vorherigen Studien zu Micrarchaeota (Ziegler *et al.*,

2013; Chen *et al.*, 2017).

3.2.5 Zellhülle

In der einzigen Studie zur Zellhülle von Micrarchaeota wurden Umweltproben analysiert, die Micrarchaeota und Parvarchaeota - damals zur Gruppe ARMAN zusammengefasst - enthielten (Comolli *et al.*, 2009). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Studie zeigten kleine Zellen, die von zwei Schichten unbekannter Zusammensetzung umgeben waren. Diese Zellen wurden anhand ihrer Größe und der unterschiedlichen Morphologie im Vergleich zu Thermoplasmatales-Zellen, die ebenfalls in den Proben nachgewiesen wurden, als ARMAN-Zellen identifiziert.

Die Generierung einer Cokultur, die neben dem Micrarchaeon A_DKE einen Organismus mit bekannter Zellhüllenbeschaffenheit enthält, ermöglichte die genauere Untersuchung der Zellhülle eines Vertreters der Micrarchaeota.

Wie schon bei der Analyse der B_DKE-Zellhülle wurde zunächst das **Genom** von A_DKE auf Gene, die für Zellwand-Komponenten kodieren, untersucht. Auch hier wurden putative Membranproteine mittels SignalP (Almagro Armenteros *et al.*, 2019) und TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998; Krogh *et al.*, 2001) identifiziert. Tabelle 17 wurde um die Ergebnisse für das A_DKE-Genom ergänzt (jetzt Tabelle 20).

Im A_DKE-Genom wurden 274 Gene, die Proteine mit putativen Transmembrandomänen kodieren gefunden, ebenso wie 50 Gene, deren Produkt ein mögliches Signalpeptid enthält. Dabei wurden im annotierten Proteom nur Signalpeptide des Sec-Sekretionssystems identifiziert. Ein weiterer Abgleich mit dem Genom zeigte, dass A_DKE die Komponenten des Sec-Sekretionssystems, aber keine des anderen universellen Sekretionssystems - des *twin arginine translocation*(Tat)-Systems - exprimieren kann. Das Micrarchaeon ist demnach in der Lage, Membranproteine zu sekretieren und in die Membran einzubauen.

Während keine Gene identifiziert wurden, die Komponenten zur Assemblierung von Typ-IV-Pili kodieren, wurde ein Gen gefunden, das ein Protein mit Homologie zu einer S-Layer-Domäne kodiert. Außerdem wurden mehrere Glykosyltransferasen-kodierende Gene identifiziert, jedoch kein Homolog zum Gen der Oligosaccharyltransferase AglB.

Das Auffinden eines Teils des N-Glykosylierungssystems im A_DKE-Genom ist überraschend, da der Organismus nicht das genomische Potential

Tabelle 20: Zellwand-Komponenten von B_DKE und A_DKE.

	B_DKE	A_DKE		B_DKE	A_DKE
Membranproteine			N-Glykosylierung		
SignalP	66	50	<i>aglA</i>	-	-
TMHMM	437	274	<i>aglB</i>	+	-
S-Layer	-	+	<i>aglC</i>	-	-
Typ-IV-Pili			<i>aglD</i>	+	+
<i>pibD</i>	-	-	<i>aglE</i>	+	+
<i>pilB</i>	+	-	<i>aglF</i>	+	+
<i>pilC</i>	-	-	<i>aglG</i>	-	+
Archaellum			<i>aglH</i>	-	-
<i>arlA</i>	-	-	<i>aglI</i>	+	-
<i>arlB</i>	+	-	<i>aglJ</i>	+	+
<i>arlC</i>	+	-	<i>aglK</i>	-	-
<i>arlD/E</i>	+	-	<i>aglL</i>	-	-
<i>arlF</i>	+	-	<i>aglM</i>	-	-
<i>arlG</i>	+	-	<i>aglN</i>	-	-
<i>arlH</i>	+	-	<i>aglO</i>	-	-
<i>arlI</i>	+	-	<i>aglP</i>	+	-
<i>arlJ</i>	+	-	<i>aglQ</i>	-	-
			<i>aglR</i>	-	-

besitzt, um aktivierte Kohlenhydrate herzustellen, die das Substrat der Glykosyltransferasen darstellen. Außerdem wurde im Genom kein Gen gefunden, das für AglB kodiert. Dieses Enzym überträgt die Kohlenhydratkette auf das zu modifizierende Membranprotein. Allerdings wurden zwei Kopien von *aglJ* identifiziert, dessen Produkt ebenfalls Kohlenhydrate auf Proteine übertragen kann (Kaminski *et al.*, 2010) und somit in der Lage ist, die Aufgabe von AglB zu übernehmen. Die Funktionalität des N-Glykosylierungssystems von A_DKE ist, aufgrund der fehlenden Fähigkeit aktivierte Kohlenhydrate herzustellen, jedoch fraglich.

Insgesamt deutet die Analyse des A_DKE-Genoms folglich darauf hin, dass das Micrarchaeon von einem möglicherweise glykosylierten **S-Layer** umgeben ist und keine Pili besitzt. Diese Hypothese sollte weiter untersucht werden. Dazu wurde zunächst das potentielle S-Layer-Protein (SLP) bioinformatisch untersucht.

Die molekulare Masse und der isoelektrische Punkt des Proteins wurden mit der CLC Main Workbench (QIAGEN, Aarhus, Dänemark) bestimmt. Außerdem wurde die Aminosäuresequenz mit verschiedenen Datenbanken für

Proteindomänen verglichen. Alle Ergebnisse wurden in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Eigenschaften des potentiellen S-Layer-Proteins SLP_{A_DKE}.

Name (Gen)	Micr_00292
Name (Protein)	QRF73773
Länge [bp]	2937
Länge [AS]	978
Molekulare Masse [kDa]	101
Isoelektrischer Punkt	5,55
Transkriptom (Rang)	3
Proteom (Rang)	1
Domänen	
arcogs-Kennung	arCOG03418
Beschreibung	S-layer-like_protein
e-Wert	1,8E ⁻¹⁸
PFAM-Kennung	PF05123
Beschreibung	S-layer_like_family,_N-terminal_region
e-Wert	1,7E ⁻¹³
TIGR-Kennung	TIGR01564
Beschreibung	S-layer_protein
e-Wert	2,6E ⁻¹²
InterPro-Kennung	IPR022650; IPR006454
Beschreibung	S-layer_protein,_N-terminal; S-layer_protein

S-Layer-Proteine besitzen auf Ebene ihrer Primärstruktur nur wenige Gemeinsamkeiten (König *et al.*, 2007; Sleytr *et al.*, 2014). Die molekulare Masse von 101 kDa und der isoelektrische Punkt von 5,55 des potentiellen A_DKE-SLPs sind dennoch vergleichbar mit anderen S-Layer-Proteinen. Da diese Proteine die Schicht bilden, die die gesamte Zelle umhüllt, gehören SLPs zu den am häufigsten vorkommenden Biopolymeren (Sára *et al.*, 2000). Ein Vergleich mit Transkriptomdaten zeigte, dass Micr_00292 das am drittstärksten exprimierte proteinkodierende A_DKE-Gen darstellt.

Um die Produktion des Proteins nachzuweisen, wurde das Gesamtproteom der Cokultur quantifiziert (Kapitel 2.2.3). Die Ergebnisse sind Tabelle A1 aus dem digitalen Anhang zu entnehmen und zeigen, dass es sich beim potentiellen SLP (Micr_00292) um das am häufigsten auftretende A_DKE-Protein handelt.

Die hohe Expressionsrate des Gens deutet zusammen mit dem Ergebnis des Domänenabgleichs (es wurden Homologien zu S-Layer-Domänen in vier Datenbanken gefunden) darauf hin, dass es sich bei dem untersuchten Protein tatsächlich um ein SLP mit einer N-terminalen S-Layer-Domäne handelt.

Zur weiteren Untersuchung und zum Nachweis des Proteins (im Folgenden SLP_{A_DKE} genannt) wurden zwei polyklonale **Antikörper** generiert (Kapitel 2.1.5). Ein 14 Aminosäuren-langes Peptid von SLP_{A_DKE} diente dabei jeweils als Antigen. Die beiden Antikörper werden nach den jeweiligen Positionen dieser Peptide AK_{SLP133–146} und AK_{SLP326–339} genannt.

Zunächst sollte das Protein im Zelllysats der Cokultur nachgewiesen und die Funktionalität der Antikörper damit verifiziert werden. Dazu wurden die Proteine des Zelllysats über eine SDS-PAGE getrennt (Kapitel 2.2.3), bevor sie entweder einer Coomassie-Färbung unterzogen oder per Western Blot auf eine Membran übertragen wurden, um SLP_{A_DKE} mittels Immunodetektion nachzuweisen (Kapitel 2.2.3). Als Kontrollen diente dabei Zelllysats der B_DKE-Reinkultur und Zelllysats eines gentechnisch veränderten *Escherichia coli*-Stamms (Stamm 1512, siehe Kapitel 2.1.1). Dieser exprimiert das SLP_{A_DKE}-Gen unter einem induzierbaren Promotor (Hoang, 2018). Das Gen wurde dabei um einen His-Tag am C-Terminus des Proteins ergänzt.

In Abbildung 19 sind sowohl das Coomassie-gefärbte Gel, als auch die Membranen nach Immunodetektion mit AK_{SLP133–146} bzw. AK_{SLP326–339} zu sehen. Während beim Coomassie-gefärbten Gel wie erwartet viele Banden zu sehen sind, werden durch Immunofärbung keine (B_DKE), eine (A_DKE + B_DKE) oder nur wenige Banden (*E.coli*) detektiert. Die Bande, die nach Immunofärbung des Cokultur-Zelllysats mit AK_{SLP133–146} und AK_{SLP326–339} sichtbar wird, entspricht dabei etwa 130 kDa. Eine Bande, die einer Masse von 130 kDa entspricht, ist ebenfalls im Coomassie-gefärbten Gel im Cokulturlysats sichtbar, jedoch nicht beim Zelllysats der B_DKE-Reinkultur. Bei *E. coli*-Zelllysats wurden nach Immunofärbung jedoch neben einer starken Bande, deren Masse etwa 100 kDa entspricht, weitere, schwächere Banden beobachtet. Zwischen den Bandenmustern der beiden Antikörper konnte kein Unterschied beobachtet werden. Das Signal nach Immunofärbung mit AK_{SLP326–339} war jedoch deutlich schwächer, als das nach Immunofärbung mit AK_{SLP133–146}. Deshalb wurden SDS-PAGE, Western Blot und Immunofärbung mit dem erstgenannten Antikörper noch einmal mit der doppelten Menge an Zelllysats wiederholt.

Der Test der beiden Antikörper bestätigte ihre Funktionalität und Spezifität für SLP_{A_DKE}, da nach Immunofärbung nur eine Bande im Zelllysats

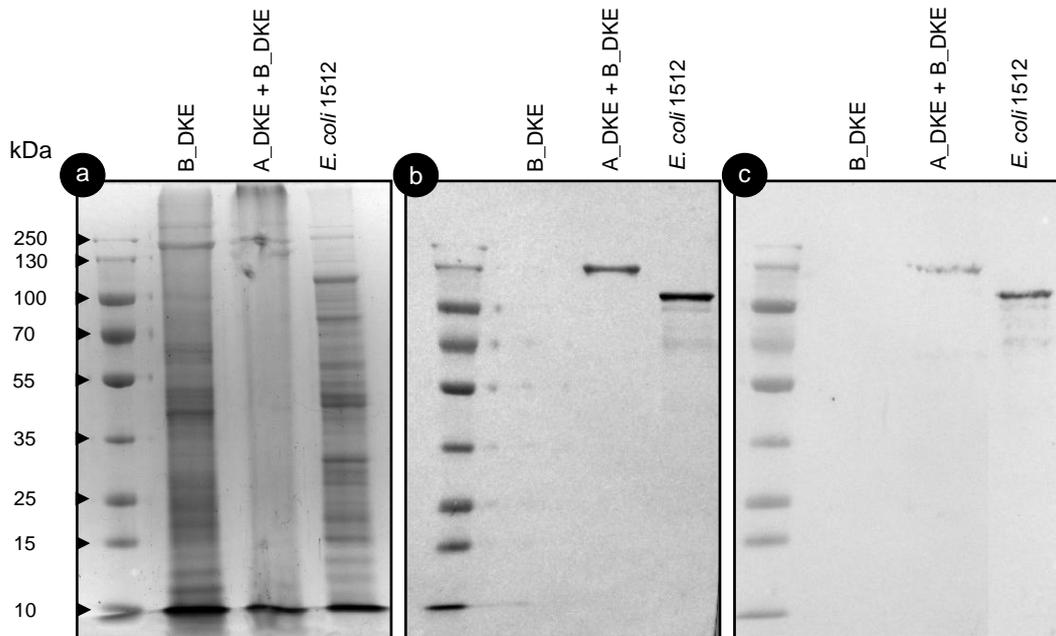


Abbildung 19: Prüfung der Funktionalität der beiden Antikörper gegen SLP_{A_DKE} . Zu sehen sind das Coomassie-gefärbte SDS-Gel (a) und die entwickelten Western Blots nach Immunodetektion mit $AK_{SLP133-146}$ (b) und $AK_{SLP326-339}$ (c). Geladen wurden jeweils 10 μ l (a,b) bzw. 20 μ l (c) eines Cokultur- und Reinkultur-Zellysats, sowie 7,5 μ l eines Zellysats des *E. coli*-Stamms 1512. Die *E. coli*-Zellen wurden 20 h induziert.

der A_DKE enthaltenden Cokultur und keine im B_DKE-Zellysats detektiert werden konnte. Da das Signal beim Markieren mit $AK_{SLP133-146}$ deutlich stärker war, als das bei Nutzung von $AK_{SLP326-339}$, scheint die Affinität von $AK_{SLP133-146}$ höher, als die des zweiten Antikörpers zu sein. Die Detektion mehrerer, schwacher Banden im *E. coli*-Zellysats kann durch unspezifische Bindungen an andere *E. coli*-spezifische Proteine erklärt werden. Eine andere Erklärung für die Banden ist, dass das heterolog exprimierte Protein von seinem Expressionswirt mit der Zeit abgebaut wird. Die Banden geringerer molarer Masse entsprechen dann dem teilweise abgebauten SLP_{A_DKE} . Die zweite Erklärung ist wahrscheinlich, da mit SLP_{A_DKE} ein Protein exprimiert wird, für das keine verwandten Proteine im Gram-negativen Expressionswirt existieren. Sollte es sich bei SLP_{A_DKE} tatsächlich um ein S-Layer-Protein handeln, ist es möglich, dass es - funktionell exprimiert - Aggregate ausbildet. Dies erleichtert die Erkennung und den Abbau durch *E. coli*.

Auffällig ist außerdem der Unterschied im apparenten Molekulargewicht der SLP_{A_DKE} -Bande von Cokulturzellysats im Vergleich zur Bande, die bei der Analyse des *E. coli*-Zellysats sichtbar ist. Während die Höhe der Letzteren der theoretischen molaren Masse von SLP_{A_DKE} entspricht, deutet die

Höhe der Ersteren auf ein Protein mit etwa 30 kDa größerer molarer Masse hin. Mögliche Ursachen für eine größere tatsächliche Masse im Vergleich zur theoretischen Masse von Proteinen sind posttranslationale Modifikationen. Häufig beschriebene posttranslationale Modifikationen von S-Layer-Proteinen sind Glykosylierungen (Sumper *et al.*, 1990; Kandiba *et al.*, 2014; Albers *et al.*, 2011). Dass im A_DKE-Genom Teile eines **N-Glykolysierungssystems** gefunden wurden, während für *E. coli* kein Glykosylierungssystem beschrieben ist, spricht ebenfalls dafür, dass es sich bei der Ursache für die höhere molare Masse bei nativem SLP_{A_DKE} um Glykosylierungen handelt. Eine Färbung durch Schiffs-Reagenz im Anschluss an eine Oxidation durch Periodsäure (PAS-Reaktion), bei der spezifisch Glykoproteine angefärbt werden, konnte den Beweis für die Glykosylierung von SLP_{A_DKE}, das in der Cokultur detektiert wurde, liefern (Winkler, 2021; Gfrerer *et al.*, 2021). Die Analyse zeigte zudem, dass das von *E. coli* heterolog exprimierte SLP_{A_DKE} wie erwartet keine Glykosylierungen enthält.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das im A_DKE-Genom identifizierte N-Glykosylierungssystem funktionell ist und A_DKE mindestens ein glykosyliertes Protein synthetisiert. Mögliche Strategien zur Glykosylierung von Proteinen, trotz der fehlenden Fähigkeit von A_DKE aktivierte Kohlenhydrate herzustellen, werden in Kapitel 3.3.2 genauer diskutiert.

Zur Visualisierung der A_DKE-Zellhülle wurden **elektronenmikroskopische Analysen** mit Zellen der Cokultur durchgeführt. Die vorherigen Untersuchungen der B_DKE-Reinkultur über Elektronenmikroskopie ermöglichten dabei, die Identifikation von A_DKE-Zellen durch Unterscheidung von B_DKE-Zellen. Auch hier wurden Ultradünnschnitte, ebenso wie metallschattierte, gefriergeätzte Zellen untersucht.

In Cryo-EM-Aufnahmen konnte das Micrarcheon als runde Zelle mit einem mittleren Durchmesser von 400 nm identifiziert werden (Abbildung 20a). Diese Zellen werden von zwei Schichten umhüllt, die einen konstanten Abstand von 20-25 nm zueinander aufrechterhalten und ähneln damit den Zellen, die von Comolli *et al.* (2009) beschrieben wurden. Falls die Theorie eines A_DKE-S-Layers zutrifft, handelt es sich bei der inneren Schicht um die Cytoplasmamembran, während die äußere den S-Layer darstellt, der Raum zwischen beiden Schichten wird Pseudoperiplasma genannt. Eine konstante Breite des pseudoperiplasmatischen Raums ist ein Merkmal von S-Layern (König *et al.*, 2007). Ein weiteres auffälliges Merkmal aller untersuchten A_DKE-Zellen ist ein runder, dunklerer Bereich im Cytoplasma, der etwa ein Drittel der cytoplasmatischen Fläche ausmacht. Ein Unterschied in der Färbung

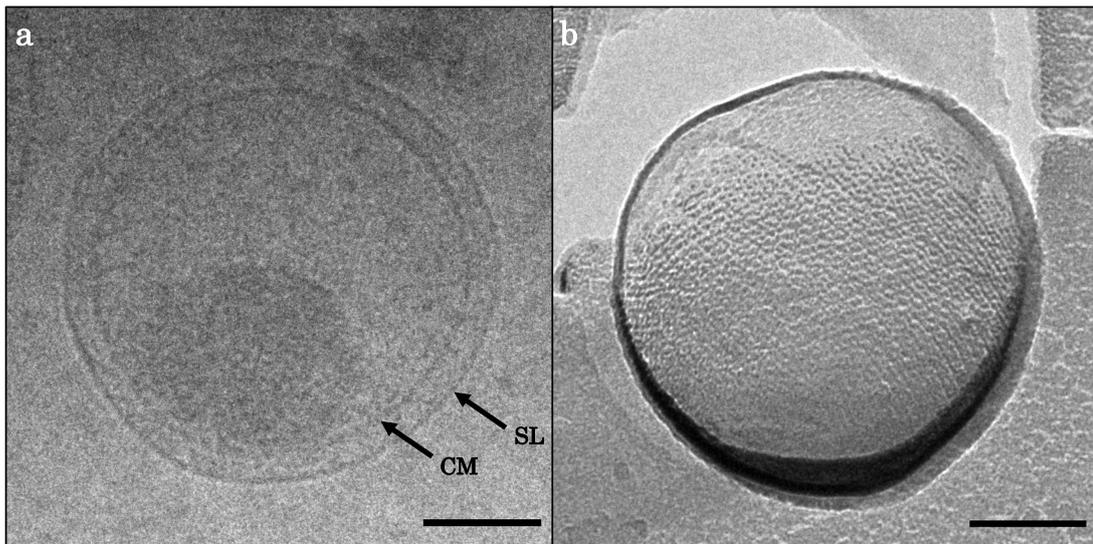


Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Micrarchaeons A_DKE. Zu sehen ist eine einzelne A_DKE-Zelle in einer Cryo-EM-Aufnahme (a) und eine gefriergeätzte, metallschattierte A_DKE-Zelle (b). Im Querschnitt sind die Cytoplasmamembran (CM) und der S-Layer (SL) gut zu erkennen. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 100 nm.

in elektronenmikroskopischen Aufnahmen deutet auf eine unterschiedliche Dichte hin. In diesem Bereich könnte beispielweise das A_DKE-Genom oder andere dicht gepackte Moleküle lokalisiert sein.

Aufnahmen metallschattierter, gefriergeätzter A_DKE-Zellen zeigten die charakteristische Ultrastruktur eines S-Layer-Gitters auf ihrer Oberfläche (Abbildung 20b) und bestätigten somit endgültig die Existenz eines S-Layers auf der Oberfläche von A_DKE-Zellen. Die Bestimmung des Gitterabstands erwies sich als kompliziert, da das Gitter durch die geringe Größe der A_DKE-Zellen stark gekrümmt ist. Dennoch konnten einige Zellen analysiert und ein Gitterabstand von 16 ± 1 nm ermittelt werden.

Entgegen der Ergebnisse der Genom-Analyse wurden Pili-ähnliche Strukturen an A_DKE-Zellen beobachtet. Es konnten jedoch keine Verankerungspunkte dieser Strukturen an der Oberfläche von A_DKE-Zellen ausgemacht werden. Es lässt sich also nicht beurteilen, ob die beobachteten Pili von A_DKE- oder B_DKE-Zellen stammen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Micrarchaeon A_DKE zusätzlich zur Cytoplasmamembran von einem S-Layer umgeben ist. Dieser bildet ein Pseudoperiplasma von 20-25 nm Breite aus und besitzt einen Gitterabstand von 16 ± 1 nm.

Beim Abgleich dieser Parameter mit denen bekannter S-Layer-Proteine wurde eine Übereinstimmung beider Parameter mit dem S-Layer-Protein von *Nanoarchaeum equitans* (Neq300) festgestellt (Huber *et al.*, 2003; König *et al.*,

2007). *N. equitans* ist der einzige Vertreter der DPANN-Archaea - und damit der nächste A_DKE-Verwandte - für den ein S-Layer beschrieben ist (Huber *et al.*, 2003). Die Übereinstimmung könnte auf eine ähnliche Struktur und einen gemeinsamen Verankerungsmechanismus hindeuten.

Das SLP aus *N. equitans*; Neq300 bildet eine Gitterstruktur mit p6-Symmetrie aus. Auch das auf metallschattierten, gefriergeätzten A_DKE-Zellen beobachtete Gitter ähnelt S-Layer-Gittern mit p6-Symmetrie, eine p3- oder p2-Symmetrie kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Das SLP des Nanoarchaeons wird über ein weiteres Protein (Neq236) in der Cytoplasmamembran verankert. Diese beiden Proteine sind die am häufigsten vorkommenden Zellwandkomponenten einer Proteom-Analyse von *N. equitans* (Giannone *et al.*, 2011). Neq236 besitzt neben Transmembrandomänen keine konservierten Bereiche, was die Identifikation eines Neq236-Homologs im A_DKE-Genom erschwert. Das am höchsten exprimierte A_DKE-Gen, das für ein Protein mit einer Transmembrandomäne kodiert, besitzt jedoch eine weit niedrigere Expressionsrate als SLP_{A_DKE}. Auch die Daten des A_DKE-Proteoms deuten auf kein weiteres, häufig vorkommendes Protein neben dem S-Layer-Protein hin. Da keine Hinweise auf ein Homolog von Neq236 gefunden werden konnten, ist der Verankerungsmechanismus des S-Layer-Proteins von A_DKE trotz der ähnlichen Pseudoperiplasmabreite vermutlich unterschiedlich zu Neq300.

Weiterführende elektronenmikroskopische Untersuchungen in Kombination mit *subtomogram averaging* könnten genutzt werden um den Verankerungsmechanismus und die genaue Struktur von SLP_{A_DKE} zu bestimmen. Mit dieser Technik kann das SLP auf struktureller Ebene untersucht werden, wie es beispielsweise in einer Studie von von Kűgelgen *et al.* (2020) gezeigt werden konnte.

3.2.6 Phylogenetische Einordnung und Strategien zur Generierung einer Reinkultur

Zur genaueren **Einordnung** des in dieser Arbeit beschriebenen, bisher nicht kultivierten Vertreters in das Phylum der Micrarchaeota, sollen die physiologischen Eigenschaften zusammengefasst werden. Analysen auf Genom-, Transkriptom- und Proteom-Ebene, sowie verschiedene Wachstumsversuche und elektronenmikroskopische Aufnahmen lieferten eine Vielzahl an Erkenntnissen über die Lebensweise des Micrarchaeons A_DKE, die sich teilweise auch auf andere Micrarchaeota-Vertreter übertragen lassen.

So konnte in dieser Arbeit ein S-Layer als Zellhülle von A_DKE nachgewiesen werden. Ein Abgleich mit Genomen anderer Micrarchaeota offenbarte Homologe zu SLP_{A_DKE} in allen fast vollständigen und vollständigen Micrarchaeota-Genomen (Gfrerer *et al.*, 2021). Ein Alignment der ersten 200 Positionen aller identifizierter, potentieller SLPs zeigte einen konservierten Bereich am N-Terminus, der die S-Layer-Domäne abdeckt. Dies deutet darauf hin, dass der S-Layer ein gemeinsames Merkmal aller Vertreter dieses Phylums ist. Dieses Ergebnis stellt eine Neuheit dar, da bis dahin nur über zwei Schichten als Zellhülle von Micrarchaeota spekuliert wurde.

Da sehr wenig bis keine Informationen zu physiologischen Eigenschaften von Micrarchaeota-Vertretern vorliegen, ist der Vergleich von A_DKE mit seinen nächsten Verwandten schwer. Die geringe Genomgröße und das limitierte metabolische Potential deuten jedoch darauf hin, dass es sich bei A_DKE um einen Vertreter der Micrarchaeaceae, anstatt der Fermentimicrarchaeaceae handelt.

Ein Abgleich der 16S-rRNA-Gene der vier am besten beschriebenen Micrarchaeota-Arten mit dem entsprechenden A_DKE-Gen offenbarte eine 100 % Übereinstimmung (*identity*) der 16S-rRNA-Gene von A_DKE und ARMAN-1. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den Organismen um dieselbe Art handelt (Stackebrandt *et al.*, 2006). Da sich Genomgröße, GC-Gehalt und Genanzahl jedoch unterscheiden (Burstein *et al.*, 2017), kann von zwei unterschiedlichen Stämmen ausgegangen werden. Ein phylogenetischer Stammbaum der 16S-rDNA ist in Abbildung 21 zu sehen.

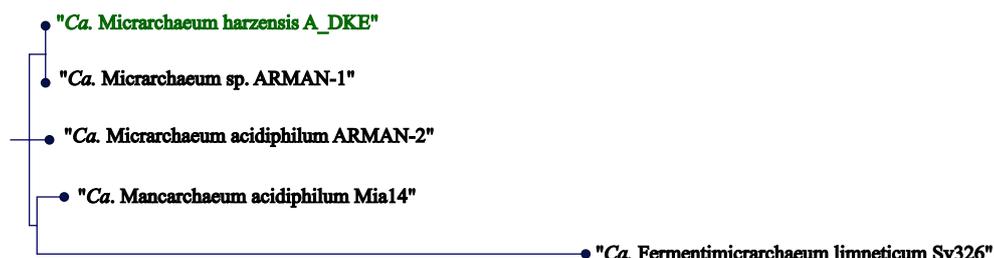


Abbildung 21: Phylogenetischer Stammbaum der bekanntesten Micrarchaeota-Vertreter auf Basis ihrer 16S-rDNA, inklusive der hier beschriebenen Art „*Candidatus* Micrarchaeum harzensis A_DKE“ (grün). Das Intron, das in den 16S-rDNA-Genen aller Vertreter vorkommt, wurde vor dem Alignment manuell entfernt.

Die physiologischen Eigenschaften A_DKEs gleichen denen seines möglichen Interaktionspartners B_DKE. Das Fehlen einer A_DKE-Reinkultur erschwerte die Zuordnung einiger physiologischer Eigenschaften. So zeigte die Cokultur aus A_DKE und B_DKE Fe³⁺-Reduktion und CO₂-Produktion. Beide Eigenschaften konnten jedoch ebenfalls bei Kultivierung einer B_DKE-Reinkultur beobachtet werden. Der Anteil, den A_DKE daran ausmacht, kann also nicht klar bestimmt werden. Das Micrarchaeon besitzt jedoch das genomische Potential für CO₂-Produktion (über den Citratzyklus oder Aminosäureabbau) und es wurden Teile einer Atmungskette im Genom identifiziert.

Die vollständige Charakterisierung des Organismus macht die Generierung einer A_DKE-Reinkultur notwendig. Um dies zu ermöglichen, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein; die genaue Form der Interaktion beider Organismen muss identifiziert und substituierbar sein und es müssen physiologische Eigenschaften bekannt sein, die die Trennung von A_DKE und B_DKE ermöglichen. Anhand der in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse über die physiologischen Eigenschaften der zwei Organismen, sollen hier **Strategien zur Generierung einer A_DKE-Reinkultur** diskutiert werden.

Die Unterscheidung von A_DKE und B_DKE über ihre 16S- und 23S-rRNA-Gene funktioniert gut und zuverlässig. Der Nachteil dieses Unterscheidungsmerkmals ist, dass es in den meisten Fällen nicht bei lebendigen Zellen angewandt werden kann. Kürzlich wurde jedoch von Zellen berichtet, die nach einer modifizierten FISH-Analyse zu Wachstum fähig waren (Batani *et al.*, 2019). Auf dieser Grundlage sollten lebendige Zellen über CARD-FISH fluoreszent markiert werden, um sie anschließend anhand dieser Markierung zu sortieren. Die Markierung von lebendigen Zellen in Flüssigkultur über FISH war erfolgreich. Die anschließende Sortierung erfolgte über einen *single-cell printer* bzw. einen *cell sorter*. In beiden Fällen stellte sich die Sortierung jedoch als problematisch heraus, da die Zellsuspension wegen der geringen Größe der Zellen für den Sortierungsprozess stark verdünnt werden musste. Zusätzlich zur Verdünnung konnten nur wenige Zellen erfolgreich sortiert werden. Die Zellmenge war zu gering, um eine erfolgreiche Sortierung nachweisen zu können.

Vergleiche der Wachstumstemperatur und des pH-Optimums von A_DKE mit anderen Vertretern der Micrarchaeaceae zeigte, dass A_DKE bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen und hohen pH-Werten wächst. So wurden ARMAN-1 und ARMAN-2 ursprünglich in Biofilmen bei 38 °C und pH-Werten von 0,5-1,5 beschrieben (Baker *et al.*, 2006). Durch das limitierte genomische Potential wird vermutet, dass A_DKE auf B_DKE angewiesen ist. Diese

Abhängigkeit könnte der Grund für das veränderte Wachstumsverhalten von A_DKE sein. So könnte die optimale Wachstumstemperatur von A_DKE mit einem anderen Wirt viel höher sein, als die des Thermoplasmatales-Vertreterers. Eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur könnte somit zur Eliminierung von B_DKE aus der Kultur führen. Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Thermophilie des Micrarchaeons stellt die überraschend hohe Schmelztemperatur eines A_DKE-Proteins dar (Winkler, 2021). Eine Wachstumskurve der Cokultur bei 55 °C zeigte jedoch keinerlei Wachstum (nicht gezeigt).

Das Hauptunterscheidungsmerkmal der beiden Organismen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen stellt die Zellhülle dar. A_DKE besitzt im Gegensatz zu B_DKE einen S-Layer. SLP_{A_DKE}-spezifische Antikörper können zur Markierung von A_DKE-Zellen genutzt werden. Die markierten Zellen können dann über einen Sekundärantikörper und *magnetic beads* aus der Cokultur isoliert werden. Leider zeigten beide Antikörper in Versuchen mit nativen A_DKE- und B_DKE-Proteinen keine spezifische SLP_{A_DKE}-Bindung (nicht gezeigt). Der Grund dafür ist vermutlich die Unzugänglichkeit der Antigen-Peptide im gefalteten Protein. Die bereits generierten Antikörper können demnach nicht zur Markierung von lebenden A_DKE-Zellen genutzt werden.

Die vollständige Sequenzierung des Genoms, sowie die Generierung der Cokultur mit „*Ca. Scheffleriplasma hospitalis* B_DKE“ sollen zum Anlass genommen werden, um das Micrarchaeon A_DKE zu benennen. Es wird der Name „*Micrarchaeum harzensis*“ vorgeschlagen.

Beschreibung von „*Candidatus Micrarchaeum harzensis*“

„*Candidatus Micrarchaeum harzensis*“ sp. nov. (N.L. masc./fem. adj. *harzensis*, sich beziehend auf das Harzgebirge (Deutschland), dem Standort des Habitats, aus dem der Organismus isoliert wurde.

Acidophiler, anaerober, vermutlich heterotropher Organismus, der den Citratzyklus und eine ATP-Synthase als zentralen Energiestoffwechsel nutzt. Umgeben von einem S-Layer.

Typstamm ist „*Candidatus Micrarchaeum harzensis* A_DKE“:

Angereichert in Cokultur mit „*Ca. Scheffleriplasma hospitalis* B_DKE“. Wachstum ist bei Temperaturen von 18-37 °C möglich, die optimale Wachstumstemperatur ist 22 °C.

3.3 Interaktion

Die Ergebnisse der Genom-Analyse von A_DKE deuten auf ein limitiertes metabolisches Potential des Micrarchaeons und damit auf die Abhängigkeit von Metabolitakquirierung aus der Umgebung oder von anderen Organismen hin. Da bisher trotz mehrerer Versuche keine A_DKE-Reinkultur generiert werden konnte (Krause, 2017) und Micrarchaeota in Habitaten oft mit Vertretern der Thermoplasmatales assoziiert sind, wird vermutet, dass A_DKE für Wachstum auf B_DKE angewiesen ist. Die genaue Form dieser Interaktion soll hier bestimmt werden. Dazu wurden vergleichende Analysen der Cokultur aus A_DKE und B_DKE mit der B_DKE-Reinkultur genutzt um den Einfluss der Cokultivierung mit A_DKE auf den Thermoplasmatales-Vertreter zu bestimmen.

3.3.1 Veränderte Wachstumsmorphologie

Zunächst wurde das Wachstum von B_DKE-Zellen in Reinkultur und in Cokultur mit A_DKE verglichen. Aus bereits diskutierten Versuchen ist bekannt, dass sowohl bei Kultivierung in Rein-, als auch in Cokultur Fe^{3+} -Reduktion und CO_2 -Produktion nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.1.1 und 3.2.1). Dies deutet darauf hin, dass B_DKE unter beiden Bedingungen ähnliche Stoffwechselwege verwendet. Auch die Kultivierungszeit bis die Fe^{3+} -Reduktion stagnierte, unterschied sich nicht zwischen beiden Kulturen. So zeigte die Überwachung des Wachstumsverhaltens von Kulturen über drei Jahre hinweg keine signifikanten Unterschiede zwischen der Reinkultur und der Cokultur (nicht gezeigt).

Bei der Überprüfung der Kulturen-Diversität mit Hilfe von CARD-FISH-Analysen fiel jedoch eine veränderte Wachstumsmorphologie von B_DKE-Zellen in Cokultivierung mit A_DKE im Vergleich zur Kultivierung in Reinkultur auf. Abbildung 22 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen einer Reinkultur und einer Cokultur. Es ist deutlich zu erkennen, dass B_DKE-Zellen (rot markiert) in Cokultur zusammen mit A_DKE-Zellen (grün markiert) Aggregate bilden, während sie in Reinkultur planktonisch wachsen. Auch in Reinkultur können Zellaggregate beobachtet werden, jedoch keine in vergleichbarer Größe mit den Aggregaten, die während der Cokultivierung ausgebildet werden. A_DKE-Zellen sind dabei vermehrt in Zellaggregaten lokalisiert, auch wenn einige freie A_DKE-Zellen beobachtet wurden.

Die Ausbildung von Aggregaten oder Biofilmen in der Cokultur ist nicht sehr überraschend, da beide Organismen aus einem Biofilm isoliert wurden

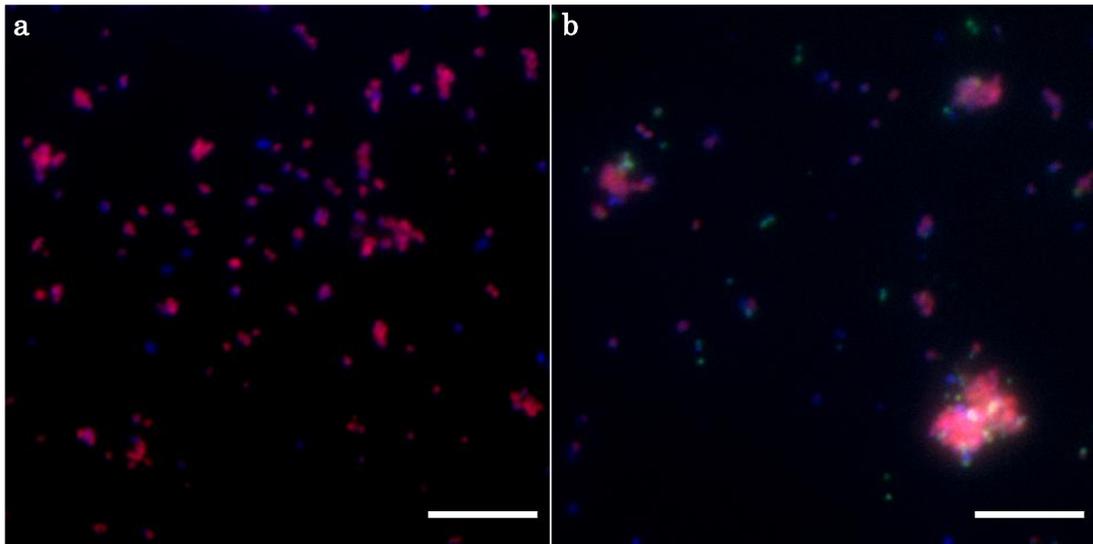


Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahmen einer CARD-FISH-gefärbten B_DKE-Reinkultur (a) und einer Cokultur, die A_DKE und B_DKE beinhaltet (b). Beide Kulturen wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Grün: ARMAN980-Sonde, rot: Arch915-Sonde, blau: DAPI, die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10 µm.

(Krause *et al.*, 2017). Da Aggregatbildung nur in Anwesenheit von A_DKE-Zellen beobachtet wurde und Zellen des Micrarchaeons häufiger in Biofilmen lokalisiert wurden, als freilebend, kann vermutet werden, dass A_DKE die Biofilmbildung fördert.

Die Ausbildung von Zellaggregaten mit ihren Wirtsorganismen, wurde auch für andere DPANN-Archaea beschrieben (Huber *et al.*, 2002; Golyshina *et al.*, 2017b; Hamm *et al.*, 2019; Schwank *et al.*, 2019).

Die meisten Prokaryoten auf der Erde leben in Biofilmen (Flemming *et al.*, 2019). Dabei macht die Zellmasse häufig nur einen geringen Teil des Biofilms aus. Ein Großteil des Biofilms wird von der Biofilmmatrix gebildet, in der die Zellen eingebettet sind und die aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) besteht. In der Biofilmmatrix von Prokaryoten wurden neben Polysacchariden auch Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und andere Biopolymere nachgewiesen (Flemming *et al.*, 2007). EPS haben eine Vielzahl von Funktionen inne (Flemming *et al.*, 2010). Neben einer stabilisierenden und schützenden Funktion ermöglichen sie auch den Austausch zwischen Zellen und sind an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt (Flemming *et al.*, 2010). Da die EPS auch im Falle der A_DKE-B_DKE-Cokultur eine Rolle in der Interaktion der beiden Archaea spielen könnte, sollten sie genauer untersucht werden.

3.3.2 Glykosylierung

Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte geschlossen werden, dass B_DKE von einer Glykokalyx umgeben ist (Kapitel 3.1.5). Da auch A_DKE ein Glykoprotein an seiner Oberfläche exprimiert (Kapitel 3.2.5), wurde vermutet, dass die Biofilmmatrix der Cokultur hauptsächlich aus Polysacchariden besteht. Die Zusammensetzung dieser Polysaccharide sollte mit Hilfe einer Lektin-Färbung bestimmt und mit der Zusammensetzung der Glykokalyx der B_DKE-Reinkultur verglichen werden. Es wurden 70 verschiedene Lektine getestet, 12 davon zeigten eine Bindung an die Glykokalyx der B_DKE-Reinkultur oder der Cokultur. Eine Auflistung dieser Lektine ist Tabelle 22 zu entnehmen. Die aufgelisteten Lektine wurden in einer vertiefenden Analyse in Kombination mit CARD-FISH-gefärbten Zellen (Kapitel 2.2.1) verwendet, die die Ergebnisse des ersten Screenings bestätigen sollte. Durch die Färbung der Zellen über CARD-FISH konnte zwischen A_DKE- und B_DKE-Zellen unterschieden werden.

Tabelle 22: Ergebnisse einer Lektin-Analyse der Glykokalyx der Rein- und Cokultur. Aufgeführt sind Lektine, die an die Glykokalyx der untersuchten Kulturen binden, sowie deren Bindespezifität. Die Stärke des Signals ist durch ++ (Bindung), + (schwache Bindung) und - (keine Bindung) gekennzeichnet.

Lektin	Bindespezifität	Reinkultur	Cokultur	
			B_DKE	A_DKE
AAL	α -Fucose Lactose>N-Acetyl-	+	+	-
CA	Galactosamin>Galactose und verwandte Kohlenhydrate	++	++	-
GNA	Mannose	+	++	+
GS-I	Galactose, N-Acetyl-Galctosamin	+	+	-
HHA	Mannose	++	-	+
HPA	N-Acetyl-Galactosamin	++	+	+
IAA	Nicht bestimmt	++	++	-
PTA	Galactose, N-Acetyl-Galactosamin	+	-	-
RCA	β -Galactose, Lactose	+	+	+
RPA	N-Acetyl-Galactosamin	++	++	-
SSA	α -N-Acetyl-Galactosamin	+	++	+
TKA	Galactose	-	++	-

Mikroskopische Aufnahmen zeigten eine Colokalisation des Lektinsignals mit dem CARD-FISH-Signal der Zellen und bestätigten die Beobachtungen

des ersten Screenings (Abbildung 23). Anhand der Form des Lektinsignals konnte davon ausgegangen werden, dass die Biofilmmatrix sowohl in Reinkultur als auch Cokultur nicht so stark ausgeprägt ist, wie es beispielsweise für *Staphylococcus*-Arten beschrieben ist (Loza-Correa *et al.*, 2019).

Acht der bindenden Lektine waren spezifisch für Galactose oder N-Acetyl-Galactosamin, zwei banden spezifisch an Mannose, eines an α -Fucose und von einem Weiteren ist die Bindespezifität nicht bekannt. Die meisten Lektine banden sowohl an die Glykokalyx der Reinkultur, als auch die der Cokultur. Lediglich die Lektine HHA und PTA banden in Reinkultur die B_DKE-Glykokalyx, während in Cokultur keine Bindung beobachtet werden konnte. Das Lektin TKA zeigte das gegenteilige Verhalten, band also an B_DKE-Zellen in Cokultur, jedoch nicht an B_DKE in Reinkultur. Da A_DKE vermehrt in Biofilmflocken vorlag und nur selten einzelne A_DKE-Zellen beobachtet wurden, konnte nur schlecht beurteilt werden, ob die getesteten Lektine die A_DKE-Glykokalyx binden. Bei Färbung mit GNA, HHA, HPA, RCA und SSA wurde jedoch Lektin-Signal an A_DKE-Zellen detektiert.

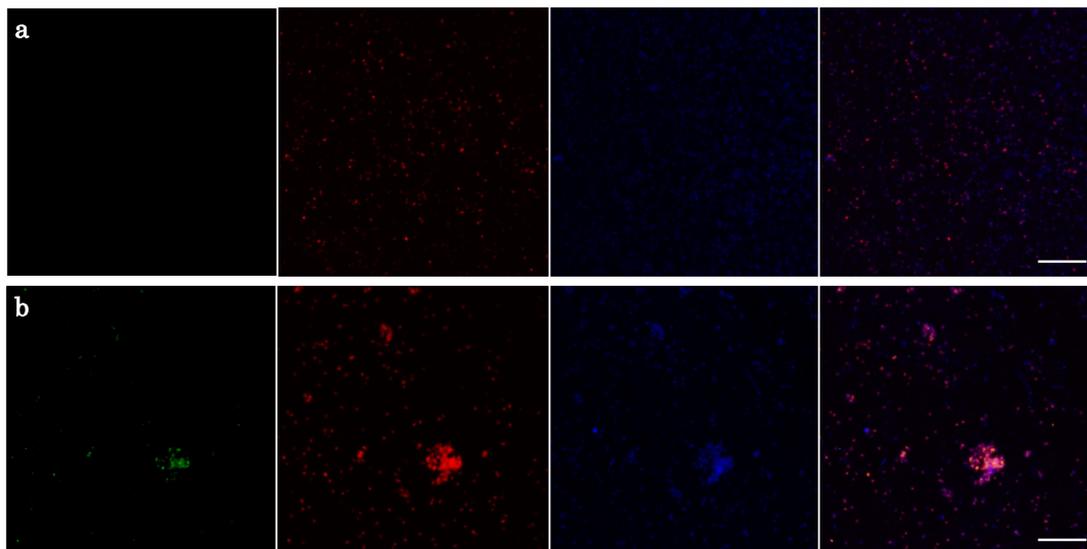


Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahmen einer Lektin- und CARD-FISH-gefärbten Reinkultur (a) bzw. Cokultur (b). Beide Kulturen wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Grün: ARMAN980-Sonde, rot: Arch915-Sonde, blau: Lektinfärbung, die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 20 μ m.

Die Lektinfärbung deutet daraufhin, dass die Glykokalyx von B_DKE und A_DKE-Zellen ähnlich aufgebaut ist. Hauptbestandteile sind demnach Galactose, N-Acetyl-Galactosamin, Mannose, α -Fucose und ein unbekannter Zucker. Die Glykokalyx der Reinkultur und der Cokultur unterscheiden sich vermutlich nicht in der Zusammensetzung der Kohlenhydrate, sondern in

der Art ihrer Verknüpfung. Zwar unterscheiden einige Lektine in ihrem Bindeverhalten zwischen der Reinkultur und der Cokultur, jedoch unterscheidet sich die Kohlenhydrat-Spezifität dieser Lektine nicht von denen, die keinen Unterschied im Bindeverhalten zeigen.

Bei der Untersuchung der Glykosylierung eines Membranproteins von *Thermoplasma acidophilum* - einem B_DKE-Verwandten - konnte gezeigt werden, dass diese aus Mannose-Bausteinen aufgebaut und über N-Acetyl-Glucosamin an das Protein gebunden ist (Yang *et al.*, 1979).

Im B_DKE-Genom wurde die genetische Information zur Synthese von Nukleotid-aktivierter Galactose, Glucose, N-Acetyl-Galactosamin, N-Acetyl-Glucosamin und Mannose identifiziert, während A_DKE keine Nukleotid-aktivierten Kohlenhydrate herstellen kann (Kapitel 3.1.5 und 3.2.5). Trotzdem exprimieren beide Organismen unter Kultivierungsbedingungen Gene für ein funktionelles N-Glykosylierungssystem. Die im A_DKE-Genom kodierten Glykosyltransferasen zeigen dabei Ähnlichkeit zu Glykosyltransferasen, die UDP-Glucose, UDP-N-Acetyl-Galactosamine, GDP-Mannose oder CDP-Abelose als Substrat nutzen. Dass B_DKE diese Kohlenhydrate - mit Ausnahme des letztgenannten - herstellen kann, führt zur Hypothese, dass das Micrarchaeon aktivierte Kohlenhydrate von B_DKE erwirbt um sie mit Hilfe des eigenen N-Glykosylierungssystems zu verwenden.

Wie der Kohlenhydrataustausch in diesem Fall vonstattengeht, ist unbekannt. Im Genom von B_DKE wurden keine Kohlenhydrat-Exporter identifiziert, jedoch einige putative Transporter mit unbekanntem Substrat. Die räumliche Nähe, die durch die Ausbildung von Aggregaten (Kapitel 3.3.1) geschaffen wird, erleichtert vermutlich den Austausch von Substanzen zwischen A_DKE und B_DKE.

Auch in anderen DPANN-Archaea ist der Austausch von Metaboliten zwischen Symbiont und Wirt beschrieben (Jahn *et al.*, 2004; Heimerl *et al.*, 2017) oder vermutet (Schwank *et al.*, 2019).

3.3.3 Vergleichendes Transkriptom

Um den Einfluss einer Cokultivierung mit A_DKE auf B_DKE auf RNA-Ebene zu untersuchen, wurde eine vergleichende Transkriptom-Analyse durchgeführt. Das Transkriptom dreier B_DKE-Reinkulturen wurde dabei mit dem Transkriptom dreier Cokulturen, bestehend aus A_DKE und B_DKE, verglichen (Kapitel 2.2.4).

Tabelle 23: Differentiell exprimierte B_DKE-Gene in Reinkultur und Cokultur. Die Gene wurden nach einem *log fold change* > 2 oder < -2, sowie einem p-Wert von < 0,01 gefiltert.

Gen	Produkt	TPM ReinK	TPM CoK	<i>fold change</i>	<i>log fold change</i>	p-Wert
Thermo_01860	Hypothetisches Protein	63,28	1,31	48,50	5,60	7,32E ⁻²⁰¹
Thermo_01798	Hypothetisches Protein	21,97	0,53	41,36	5,37	6,10E ⁻⁹⁷
Thermo_00025	Hypothetisches Protein	503,62	15,21	33,13	5,05	0,00E ⁺⁰⁰
Thermo_00444	41 kDa Archaeallin	2751,00	114,79	23,92	4,58	0,00E ⁺⁰⁰
Thermo_01859	42 kDa Archaeallin	28,92	1,26	22,94	4,52	3,06E ⁻⁸⁷
Thermo_01877	Hypothetisches Protein	80,17	4,11	19,43	4,28	5,16E ⁻⁹³
Thermo_00680	Putative Aminopeptidase 1 Archaeallin-	59,63	3,17	18,77	4,23	1,29E ⁻²⁹²
Thermo_00445	verwandtes Protein ArlC	3116,20	169,91	18,38	4,20	0,00E ⁺⁰⁰
Thermo_00502	Methyltransferase AgIP Archaeallin-	80,13	4,97	16,11	4,01	1,04E ⁻²³²
Thermo_00446	verwandtes Protein ArlD/E	2597,30	188,80	13,74	3,78	0,00E ⁺⁰⁰
Thermo_01799	Hypothetisches Protein	79,67	7,34	10,85	3,44	9,13E ⁻⁸⁰
Thermo_01144	Pinkes FeS-Protein Maltose\Trehalos-	39,01	4,59	8,51	3,09	2,75E ⁻²⁷
Thermo_01181	Importer-ATP-Bindeprotein MalK Maltose\Trehalos-	29,48	5,44	5,43	2,44	1,73E ⁻⁶⁰
Thermo_00581	Importer-ATP-Bindeprotein MalK	494,88	92,95	5,31	2,41	2,51E ⁻⁷⁷
Thermo_00582	ABC-Transporter	358,73	72,06	4,99	2,32	9,45E ⁻⁷⁰

Überraschenderweise wurden nur 15 signifikant differentiell exprimierte B_DKE-Gene identifiziert (Tabelle 23). Alle diese Gene waren in Reinkultur

höher exprimiert, im Vergleich zur Cokultur. Die Proteine mit unbekannter Funktion und die Transporter wurden auf Ebene ihrer Primärstruktur auf Transmembrandomänen (TMHMM; Sonnhammer *et al.*, 1998; Krogh *et al.*, 2001) und Homologie zu bekannten Proteindomänen (NCBI BlastP; Marchler-Bauer *et al.*, 2015) überprüft.

Fünf der in Cokultur schwächer exprimierten B_DKE-Gene sind am Aufbau des Archaeliums beteiligt. Weniger stark exprimierte Archaelin-Gene deuten auf eine geringere Motilität der B_DKE-Zellen in Cokultur hin. Damit bestätigt die Transkriptom-Analyse die Beobachtungen der CARD-FISH-Analyse, nach der B_DKE-Zellen in Cokultur Aggregate bilden, während sie in Reinkultur planktonisch leben.

Während drei weitere Gene für putative Transporter kodieren, ist ein Gen mit Homologie zur Methyltransferase AglP ebenfalls signifikant schwächer exprimiert in Cokultur.

AglP ist Teil des N-Glykosylierungssystems in Archaea. Es konnte gezeigt werden, dass das AglP-Homolog in *Haloferax volcanii* eine Methylgruppe auf eine Hexuronsäure überträgt, wobei ein Methylester entsteht (Magidovich *et al.*, 2010). Die B_DKE-Glykokalyx enthielt zwar laut Lektin-Analyse keine Hexuronsäuren, jedoch aber Hexosen. Als Teil des N-Glykosylierungssystems könnte die veränderte *aglP*-Expression das unterschiedliche Bindungsverhalten einiger Lektine in Cokultur im Vergleich zur Reinkultur erklären.

In der Primärstruktur von zwei der differentiell exprimierten Transporter (Thermo_00582, Thermo_01181) wurden Ähnlichkeiten zu ATP-Bindestellen und ABC-Transportermotiven von Maltose/Trehalose-Importern, jedoch keine Transmembrandomäne identifiziert. In der Primärstruktur des dritten Transporters (Thermo_00582) wurden mehrere Transmembrandomänen und Ähnlichkeit zu ABC-Transportern gefunden. Auf die Substratspezifität gibt es keine Hinweise. Bei ABC-Transportern handelt es sich um Transportproteine, die unter ATP-Verbrauch aktiv eine große Bandbreite an Substanzen über die Membran transportieren (Higgins, 2001). Dazu sind eine ATP-Bindedomäne und eine Transmembrandomäne nötig, die entweder auf einem oder auf zwei Proteinen zu finden sind. Laut Primärstrukturanalyse ist bei den drei differentiell exprimierten Transportern zweiteres der Fall. Während der Mechanismus, der zur geringeren Expression der B_DKE-Transporter in Cokultur führt, nicht bekannt ist, könnte die dadurch bedingte, verringerte Aufnahme zu einer höheren Nährstoffkonzentration im Medium führen. Dies kann einen Wachstumsvorteil für A_DKE darstellen.

Die restlichen differentiell exprimierten Gene kodieren für Proteine unbekannter Funktion, wie eine Aminopeptidase, ein Protein mit FeS-*cluster* und mehrere hypothetische Proteine.

Aminopeptidasen katalysieren die Abspaltung einer Aminosäure am N-Terminus von Polypeptiden und können somit eine Vielzahl von biologischen Funktionen übernehmen (Rawlings *et al.*, 1995).

FeS-*cluster* kommen in Cytochromen, Oxygenasen und Ferredoxinen vor (Schmidt *et al.*, 2001), können also auch an vielen unterschiedlichen Stoffwechselwegen beteiligt sein.

Die Analyse der Primärstruktur der hypothetischen Proteine offenbarte Homologien zu Transposasen (Thermo_01860), DNA-bindenden Domänen (Thermo_00025), Domänen unbekannter Funktion (Thermo_01798) und keinerlei Homologien (Thermo_01799). Die Domäne, zu der Thermo_01798 ähnlich ist, wurde dabei nur in Thermoplasmatales-Vertretern in einem Homopentamer-Proteinkomplex unbekannter Funktion gefunden. Thermo_01877 offenbarte sich als Homolog zum Archaellin-verwandten Protein ArIF/G. Laut der Domänenanalyse spielt die verringerte Expression von Thermo_01877 damit ebenfalls eine Rolle bei der geringeren Motilität von B_DKE-Zellen in Cokultur mit A_DKE.

Die vergleichende Transkriptom-Analyse bestätigte die Ergebnisse der CARD-FISH- und Lektin-Analysen und weist auf bisher uncharakterisierte Proteine hin, die eine mögliche Rolle bei der Interaktion von A_DKE und B_DKE spielen.

3.3.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die vorherigen Analysen deuteten bereits darauf hin, dass die Interaktion des Micrarchaeons A_DKE mit dem Thermoplasmatales-Vertreter B_DKE auf räumliche Nähe der beiden Organismen in Aggregaten angewiesen ist. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Cokultur soll dies näher untersucht werden. Dabei wurden metallschattierte, gefriergeätzte Zellen analysiert. Als Identifizierungskriterien der beiden Organismen wurden dabei die Zellform und -größe, sowie die Oberflächenmorphologie der Zellen genutzt. Während die runden A_DKE-Zellen von einem S-Layer umhüllt sind und einen Durchmesser von etwa 400 nm besitzen, sind die pleomorphen B_DKE-Zellen größer (600 nm-1 µm) und besitzen keinen S-Layer.

Wie schon in CARD-FISH-Analysen wurden in den elektronenmikroskopischen Analysen sowohl freilebende, als auch assoziierte A_DKE-Zellen beobachtet. Micrarchaeota-Zellen bilden dabei sowohl mit B_DKE, als auch mit

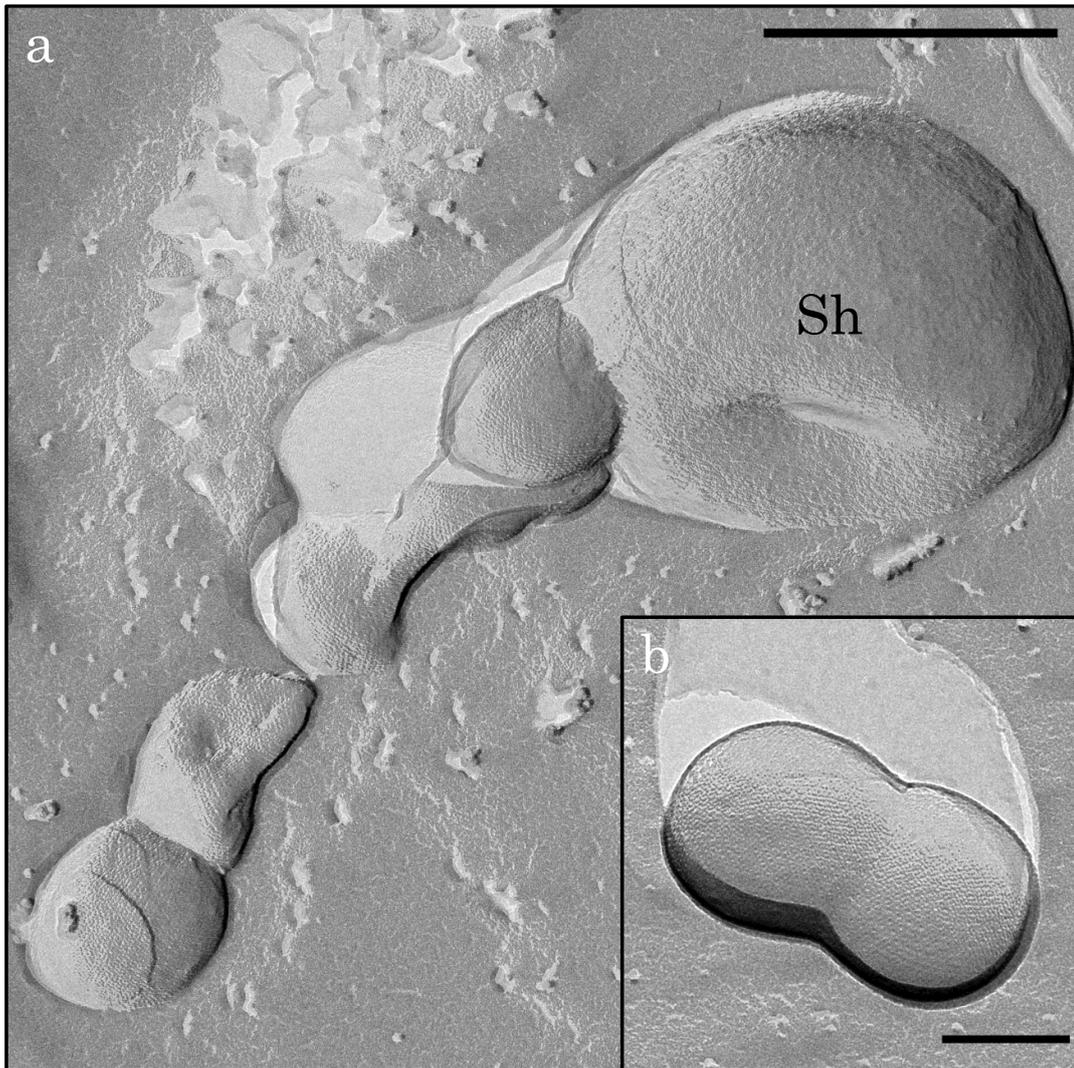


Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der A_DKE-B_DKE-Cokultur. Zu sehen sind metallschattierte, gefriergeätzte A_DKE-Zellen in Interaktion mit einer B_DKE-Zelle (Sh) (a) und freilebende A_DKE-Zellen in Teilung (b). Die Maßstabsbalken entsprechen 500 nm (a) und 200 nm (b).

anderen A_DKE-Zellen direkten Zellkontakt aus (Abbildung 24a). Die Art der Assoziation erinnert dabei an die Interaktion zwischen *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus hospitalis*. Das kleinere Archaeon *N. equitans* interagiert über direkten Zellkontakt mit seinem deutlich größeren Wirtsorganismus *I. hospitalis* (Huber *et al.*, 2002). Zur Zellteilung ist das Nanoarchaeon dabei auf den direkten Kontakt zu seinem Wirt angewiesen (Jahn *et al.*, 2008). Von A_DKE konnten dagegen auch freilebende Zellen in Teilung beobachtet werden (Abbildung 24b). In einer umfassenden elektronenmikroskopischen Studie konnten Heimerl *et al.* (2017) kürzlich zeigen, dass *N. equitans* in der Lage ist, einen cytoplasmatischen Kontakt mit seinem Wirt auszubilden, der einen Austausch von Metaboliten ermöglicht. Da im A_DKE- und B_DKE-Genom

vergleichsweise wenige Transporter kodiert sind, ist es wahrscheinlich, dass Metabolitaustausch zwischen den beiden Organismen ebenfalls durch direkten cytoplasmatischen Kontakt ermöglicht wird. Anhand von Aufnahmen gefriergeätzter Zellen lässt sich darüber jedoch keine Aussage machen. Weiterführende Untersuchungen von Cokultur-Zellen über Elektronentomographie werden dafür benötigt.

3.3.5 Möglicher Mechanismus der Interaktion

Anhand der Ergebnisse der vorherigen Kapitel, wird hier ein Mechanismus der Interaktion zwischen „*Candidatus* Micrarchaeum harzensis A_DKE“ und „*Ca.* Scheffleriplasma hospitalis B_DKE“ postuliert (Abbildung 25). Dieser ähnelt der Interaktion zwischen *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus hospitalis*.

Der Thermoplasmatales-Vertreter B_DKE ist ein freilebender Organismus. Zur Energiegewinnung nutzt er Fermentation von Aminosäuren, sowie die Generierung von Reduktionsäquivalenten über den Citratzyklus, die genutzt werden um über eine Atmungskette ein elektrochemisches Potential zu erzeugen, das wiederum eine ATP-Synthase antreibt (Kapitel 3.1.3).

B_DKE-Zellen sind von einer Cytoplasmamembran umgeben und motil, sie bilden mindestens ein Archaeum aus (Kapitel 3.1.5). Eine Analyse der intakten polaren Lipide (IPL) einer B_DKE-Reinkultur offenbarte dabei, dass sie Cytoplasmamembran zu 97% aus Glycerol-Dibiphytanyl-Glycerol-Tetraethern ohne Cyclopentanringe (GDGT-0) aufgebaut ist (Krause *et al.*, 2021). Archaeol (2,3-di-O-Phytanyl-Glycerol-Diether) machte den Rest der IPLs aus. Die Isoprenoid-Bausteine für die Lipide werden dabei von B_DKE über die Variante III des Mevalonat-Stoffwechselwegs hergestellt (Kapitel 3.1.3).

Wie viele Thermoplasmatales-Vertreter ist B_DKE von einer Glykokalyx umgeben. Diese besteht hauptsächlich aus Hexosen und wird vom N-Glykosylierungssystem von B_DKE aufgebaut (Kapitel 3.3.2).

Das Micrarchaeon A_DKE hingegen besitzt ein reduziertes Genom, das viele unvollständige Stoffwechselwege codiert (Kapitel 3.2.3). Das Genom ist mit 0,99 Mb jedoch fast doppelt so groß wie das *N. equitans*-Genom, welches nur 0,5 Mb umfasst (Waters *et al.*, 2003). *N. equitans* besitzt somit eines der kleinsten bisher beschriebenen Genome und ein drastisch limitiertes genomisches Potential. Dadurch ist der Organismus auf die Synthese und den Transfer einer Vielzahl von Metaboliten, inklusive ATP durch *I. hospitalis* angewiesen (Giannone *et al.*, 2011; Hamerly *et al.*, 2015).

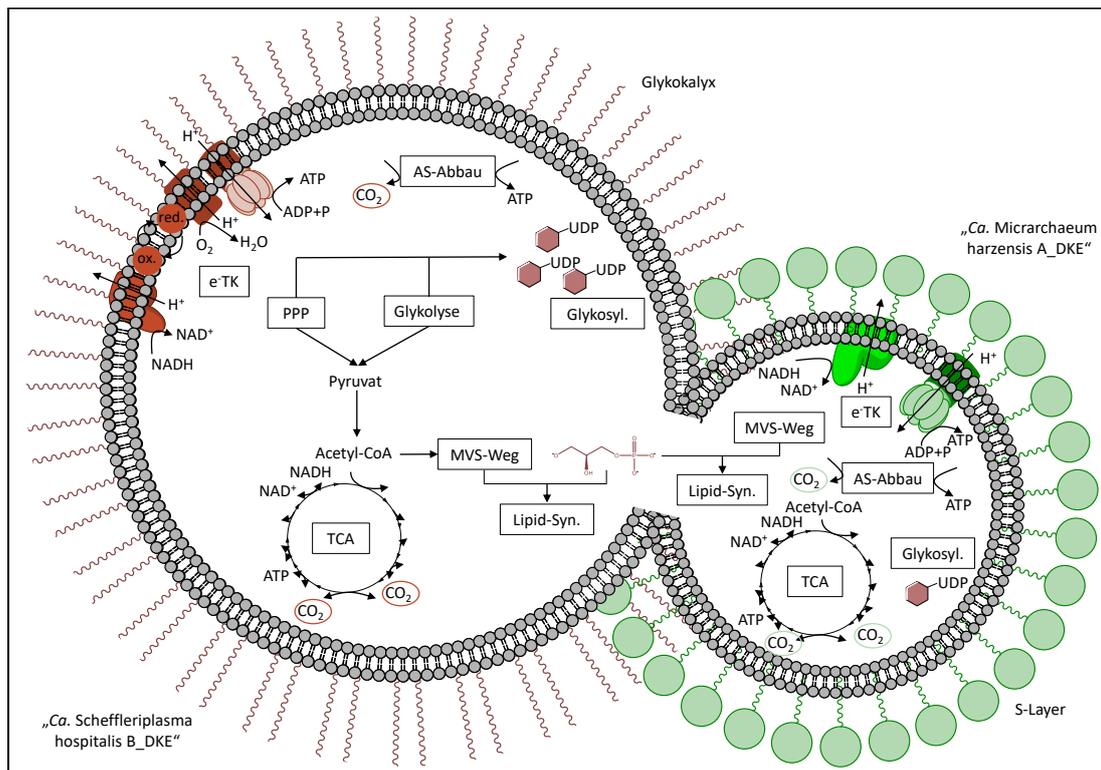


Abbildung 25: Schematische Darstellung des möglichen Interaktionsmechanismus von A_DKE und B_DKE. Dargestellt sind eine B_DKE- (rot) und eine A_DKE-Zelle (grün) in Interaktion. Wichtige Stoffwechselwege und die Zellhülle beider Organismen sind angedeutet. Mit AS-Abbau: Aminosäureabbau, e⁻TK: Elektronentransportkette, Glykolyse: Glykolyse/Gluconeogenese, Glykosyl.: N-Glykosylierungssystem, Lipid-Syn.: Lipid-Biosynthese, MVS-Weg: Mevalonat-Stoffwechselweg, PPP: Pentose-Phosphat-Stoffwechselweg, TCA: Citratzyklus.

A_DKE ist jedoch - ähnlich wie B_DKE - in der Lage, über Nukleotid- und Aminosäurefermentation und der Generierung von Reduktionsäquivalenten über den Citratzyklus Energie zu gewinnen (Kapitel 3.2.3). Die Reduktionsäquivalente können wiederum genutzt werden um einen Protonengradienten auszubilden, der eine ATP-Synthase antreibt.

Außerdem ist ein vollständiger Mevalonat-Stoffwechselweg der Variante III im A_DKE-Genom codiert (Kapitel 3.2.3). Diese Variante des Mevalonat-Stoffwechselwegs, wurde bisher nur in Thermoplasmatales-Vertretern gefunden (Vinokur *et al.*, 2014). Ein Vergleich von A_DKE- und B_DKE-Homologen der drei Enzyme, die diesen Stoffwechselweg definieren, offenbarte eine starke Ähnlichkeit, die auf horizontalen Gentransfer zwischen den beiden Organismen hindeutet (Krause *et al.*, 2021). Horizontaler Gentransfer zwischen DPANN-Archaea und ihren jeweiligen Wirtsorganismen scheint weitverbreitet zu sein (Podar *et al.*, 2008; Golyshina *et al.*, 2017b; Dombrowski *et al.*, 2020). Da A_DKE kein Glycerol-1-Phosphat herstellen kann, ist das Micrarchaeon

vermutlich nicht in der Lage Membranlipide zu synthetisieren. Eine Analyse der Membranlipide einer Cokultur aus A_DKE und B_DKE zeigte keine Unterschiede zur Zusammensetzung der B_DKE-Reinkultur-IPLs (Krause *et al.*, 2021). *N. equitans* besitzt ebenfalls dieselbe Membranlipidzusammensetzung wie sein Wirtsorganismus (Jahn *et al.*, 2004). Das Nanoarchaeum, das nicht zur Lipidsynthese fähig ist, erhält seine Membranlipide von *I. hospitalis*. Da A_DKE Gene der Lipidsynthese unter Wachstumsbedingungen exprimiert, erhält das Archaeon vermutlich keine Membranlipide, aber Glycerol-1-Phosphat zur Lipidsynthese von B_DKE.

A_DKE ist genau wie *N. equitans* von einem S-Layer umgeben (Kapitel 3.2.5 und Huber *et al.*, 2002). Die Glycosylierung des S-Layer-Proteins deutet darauf hin, dass A_DKE Nukleotid-aktivierte Kohlenhydrate von B_DKE erlangt. A_DKE ist nicht in der Lage, diese aktivierten Kohlenhydrate selbst herzustellen, exprimiert aber Komponenten eines N-Glykosylierungssystems.

Die Interaktion und der Austausch von Substanzen zwischen *N. equitans* und *I. hospitalis* findet über direkten Zellkontakt beider Organismen statt (Heimerl *et al.*, 2017). Während der Interaktion kommt es zu einer Verschmelzung der Cytoplasmen der beiden Organismen. Direkter Zellkontakt wurde auch zwischen A_DKE und B_DKE beobachtet (Kapitel 3.3.1 und 3.3.4), eine Verschmelzung der Cytoplasmen wird hiermit postuliert. Hinweise darauf sind die Notwendigkeit des Austauschs von Metaboliten durch das reduzierte metabolische Potential A_DKEs und die geringe Anzahl von Genen für putative Transporter im A_DKE- und B_DKE-Genom. Da der Thermoplasmatales-Vertreter nur von einer Cytoplasmamembran und einer Glykokalyx umgeben ist, sollte die Ausbildung einer Cytoplasmabrücke erleichtert sein. Im Vergleich dazu ist *I. hospitalis* von zwei Membranen und einem Periplasma variabler Größe umgeben (Näther *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2012; Heimerl *et al.*, 2017). Über diese Verbindung ist A_DKE in der Lage, verschiedene Metabolite - wie Glycerol-1-Phosphat und Nukleotid-aktivierte Kohlenhydrate -, die das Archaeon zur Vervollständigung von Stoffwechselwegen benötigt, von B_DKE zu akquirieren.

4 Ausblick

In dieser Arbeit konnten wichtige Aspekte der Lebensweise zweier bisher nicht charakterisierter Archaea identifiziert und charakterisiert werden. Dies gilt sowohl im Hinblick auf die einzelnen Organismen als auch auf die Interaktion zwischen dem Micrarchaeon und dem Thermoplasmatales-Vertreter. Die Interaktion stellt dabei die zweite näher charakterisierte Beziehung eines archaeellen Symbionten mit seinem Wirt dar.

Die erlangten Erkenntnisse über das Interaktionssystem könnten auf andere Vertreter der DPANN-Archaea, wie Nanohaloarchaeota, übertragen werden. Diese Organismen besitzen im Vergleich zu den meisten DPANN-Vertretern ein relativ großes Genom, weshalb vermutet wurde, dass es sich um freilebende Archaea handelt (Narasingarao *et al.*, 2012). Neuste Erkenntnisse zeigten jedoch, dass sie ebenfalls abhängig von anderen Mikroorganismen sind (Hamm *et al.*, 2019). A_DKE-Zellen besitzen ein Genom mit vergleichbarer Größe und ähneln Nanohaloarchaeota auch hinsichtlich ihrer Lebensweise. So sind sie nicht so stark auf ihren Wirt angewiesen, wie beispielsweise *Nanoarchaeum equitans* (Huber *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2003).

Um den Stoffaustausch und damit die Interaktion der beiden Organismen näher zu beleuchten, könnten Versuche mit C^{13} -markiertem Hefeextrakt durchgeführt werden. Anhand dieser ließe sich genauer klären, welche Substanzen A_DKE von B_DKE akquiriert. Hier wäre es zumindest vorteilhaft, wenn nicht sogar unabdingbar, die zwei Organismen voneinander trennen zu können.

Allerdings könnte das Wissen über den genauen Interaktionsmechanismus zur Generierung einer A_DKE-Reinkultur genutzt werden, sofern die Auxotrophie von A_DKE substituierbar ist. Ein Unterscheidungsmerkmal der beiden Organismen, das zur Trennung genutzt werden kann, stellt der S-Layer auf der Oberfläche von A_DKE dar. Ein Antikörper, der das native SLP bindet, ließe sich in Kombination mit *magnetic beads* nutzen, um A_DKE-Zellen aus der Cokultur zu isolieren.

Zur Erleichterung der Auswahl eines geeigneten Antigens, ist es unerlässlich, die Struktur und den bisher unbekanntem Verankerungsmechanismus des SLPs in der Cytoplasmamembran aufzuklären. Dies kann durch heterologe Expression von *slp*_{A_DKE} und Kristallisation des Proteins mit Hilfe des in dieser Arbeit beschriebenen *E. coli*-Stamms oder *in vivo* über Elektronenmikroskopie erreicht werden. Aufgrund fehlender Vorlagen ist eine Vorhersage der Proteinstruktur allein auf bioinformatischer Grundlage nicht verlässlich.

Außerdem könnten weiterführende Studien zur Struktur des S-Layer-Proteins klären, in wie weit das Protein bei der Erkennung und der Interaktion von A_DKE mit B_DKE eine Rolle spielt. Von *N. equitans* ist beispielsweise bekannt, dass dessen S-Layer spezifisch an der Kontaktstelle mit seinem Wirt abgebaut wird (Heimerl *et al.*, 2017).

Sowohl A_DKE als auch B_DKE codieren eine große Anzahl an Proteinen unbekannter Funktion in ihren Genomen. Die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse weisen darauf hin, dass einige dieser Proteine eine wichtige Rolle bei der Interaktion spielen. In der Charakterisierung dieser Proteine liegt folglich das Potential, den Interaktionsmechanismus des Micrarchaeons mit B_DKE vollständig zu verstehen.

Die zweifache Sequenzierung der Genome von A_DKE und B_DKE im Abstand von vier Jahren ermöglicht außerdem die Untersuchung und Identifikation von Anpassungen der Organismen an die Laborbedingungen. Dabei sind vor allem Veränderungen im B_DKE-Genom interessant, da für den B_DKE-Verwandten *Ferroplasma acidiphilum* die bisher höchste bekannte Mutationsrate beobachtet wurde (Golyshina *et al.*, 2017a).

Literatur

- Abu-Qarn, Mehtap *et al.* (2007). „*Haloferax volcanii* AglB and AglD are involved in N-glycosylation of the S-layer glycoprotein and proper assembly of the surface layer“. In: *Journal of molecular biology* 374.5, S. 1224–1236.
- Albers, Sonja-Verena und Benjamin H Meyer (2011). „The Archaeal cell envelope“. In: *Nature Reviews Microbiology* 9.6, S. 414–426.
- Almagro Armenteros, José Juan *et al.* (2019). „SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks“. In: *Nature Biotechnology* 37, S. 420–423.
- Baker, Brett J *et al.* (2006). „Lineages of acidophilic Archaea revealed by community genomic analysis.“ In: *Science (New York, N.Y.)* 314.5807, S. 1933–1935.
- Baker, Brett J *et al.* (2010). „Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107.19, S. 8806–8811.
- Baker-Austin, Craig und Mark Dopson (2007). „Life in acid: pH homeostasis in acidophiles“. In: *Trends in Microbiology* 15.4, S. 165–171.
- Batani, Giampiero *et al.* (2019). „Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and cell sorting of living Bacteria“. In: *Scientific reports* 9.1, S. 1–13.
- Baumeister, Wolfgang, Susanne Volker und Ute Santarius (1991). „The three-dimensional structure of the surface protein of *Acidianus brierleyi* determined by electron crystallography“. In: *Systematic and Applied Microbiology* 14.2, S. 103–110.
- Baym, Michael *et al.* (2015). „Inexpensive multiplexed library preparation for megabase-sized genomes“. In: *PLOS ONE* 10.5, S. 1–15.
- Bennke, Christin M. *et al.* (2013). „Mapping glycoconjugate-mediated interactions of marine Bacteroidetes with diatoms“. In: *Systematic and Applied Microbiology* 36.6, S. 417–425.
- Bond, Philip L und Jillian F Banfield (2001). „Design and performance of rRNA targeted oligonucleotide probes for *in situ* detection and phylogenetic identification of microorganisms inhabiting acid mine drainage environments“. In: *Microbial Ecology* 41.2, S. 149–161.
- Bouyssié, David *et al.* (2020). „Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics“. In: *Bioinformatics* 36.10, S. 3148–3155.
- Bradford, Marion M (1976). „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding“. In: *Analytical Biochemistry* 72.1, S. 248–254.

- Brochier-Armanet, Céline *et al.* (2008). „Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third Archaeal phylum, the Thaumarchaeota“. In: *Nature Reviews Microbiology* 6.3, S. 245–252.
- Brock, Thomas D *et al.* (1972). „*Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing Bacteria living at low pH and high temperature“. In: *Archiv für Mikrobiologie* 84.1, S. 54–68.
- Burstein, David *et al.* (2017). „New CRISPR–Cas systems from uncultivated microbes“. In: *Nature* 542.7640, S. 237–241.
- Cai, Mingwei *et al.* (2020). „Diverse Asgard Archaea including the novel phylum Gerdarchaeota participate in organic matter degradation“. In: *Science China Life Sciences*, S. 1–12.
- Cai, Mingwei *et al.* (2021). „Ecological features and global distribution of Asgard Archaea“. In: *Science of The Total Environment* 758, S. 143581.
- Casabona, Maria G *et al.* (2013). „Proteomic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane“. In: *Proteomics* 13.16, S. 2419–2423.
- Caspi, Ron, Kate Dreher und Peter D Karp (2013). „The challenge of constructing, classifying, and representing metabolic pathways“. In: *FEMS microbiology letters* 345.2, S. 85–93.
- Caspi, Ron *et al.* (2017). „The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes“. In: *Nucleic Acids Research* 46.D1, S. D633–D639.
- Caspi, Ron *et al.* (2020). „The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes—a 2019 update“. In: *Nucleic acids research* 48.D1, S. D445–D453.
- Castelle, Cindy *et al.* (2018a). „Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations“. In: *Nature Reviews Microbiology* 16, S. 1.
- Castelle, Cindy C und Jillian F Banfield (2018b). „Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the Tree of Life“. In: *Cell* 172.6, S. 1181–1197.
- Castelle, Cindy J *et al.* (2015). „Genomic expansion of domain Archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling“. In: *Current Biology* 25.6, S. 690–701.
- Castelle, Cindy J *et al.* (2021). „Protein family content uncovers lineage relationships and Bacterial pathway maintenance mechanisms in DPANN Archaea“. In: *bioRxiv*.
- Cavicchioli, Ricardo (2011). „Archaea—timeline of the third domain“. In: *Nature Reviews Microbiology* 9.1, S. 51–61.
- Chen, Lin-Xing *et al.* (2017). „Metabolic versatility of small Archaea Micrarchaeota and Parvarchaeota“. In: *The ISME Journal*, S. 1.

- Comolli, Luis R und Jill F Banfield (2014). „Inter-species interconnections in acid mine drainage microbial communities“. In: *Frontiers in Microbiology* 5, S. 367.
- Comolli, Luis R *et al.* (2009). „Three-dimensional analysis of the structure and ecology of a novel, ultra-small archaeon“. In: *The ISME Journal* 3.2, S. 159–167.
- Darland, Gary *et al.* (1970). „A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile“. In: *Science* 170.3965, S. 1416–1418.
- DeLong, Edward F (1992). „Archaea in coastal marine environments.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.12, S. 5685–5689.
- DeLong, Edward F und Norman R Pace (2001). „Environmental diversity of Bacteria and Archaea“. In: *Systematic Biology* 50.4, S. 470–478.
- Dombrowski, Nina *et al.* (2019). „Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN Archaea“. In: *FEMS Microbiology Letters* 366.2.
- Dombrowski, Nina *et al.* (2020). „Undinarchaeota illuminate DPANN phylogeny and the impact of gene transfer on Archaeal evolution“. In: *Nature Communications* 11.1, S. 3939.
- Dopson, Mark *et al.* (2004). „Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from Acid Mine Drainage and industrial bioleaching environments“. In: *Applied and Environmental Microbiology* 70.4, S. 2079–2088.
- Edwards, Katrina J. *et al.* (2000). „An Archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in Acid Mine Drainage“. In: *Science* 287.5459, S. 1796–1799.
- Elkins, James G. *et al.* (2008). „A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.23, S. 8102–8107.
- Engelhardt, Harald (2007). „Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited“. In: *Journal of Structural Biology* 160.2, S. 115–124.
- Evans, Paul N. *et al.* (2015). „Methane metabolism in the Archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics“. In: *Science* 350.6259, S. 434–438.
- Flemming, Hans-Curt, Thomas R Neu und Daniel J Wozniak (2007). „The EPS matrix: the “house of biofilm cells”“. In: *Journal of bacteriology* 189.22, S. 7945.
- Flemming, Hans-Curt und Jost Wingender (2010). „The Biofilm Matrix“. In: *Nature reviews. Microbiology* 8, S. 623–33.

- Flemming, Hans-Curt und Stefan Wuertz (2019). „Bacteria and Archaea on Earth and their abundance in biofilms“. In: *Nature Reviews Microbiology* 17.4, S. 247–260.
- Fuhrman, Jed A, Kirk McCallum und Alison A Davis (1992). „Novel major Archaeobacterial group from marine plankton“. In: *Nature* 356.6365, S. 148–149.
- Fütterer, Ole *et al.* (2004). „Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.24, S. 9091–9096.
- Garrity, George M. *et al.* (2001). „Phylum All. Euryarchaeota phy. nov.“ In: *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. New York, NY: Springer New York, S. 211–355. ISBN: 978-0-387-21609-6.
- Gfrerer, Sabrina (2018). *Charakterisierung der Interaktion eines Nanoorganismus mit einem neuen Mitglied der Thermoplasmatales*.
- Gfrerer, Sabrina *et al.* (2021). „Micrarchaeota are covered by a proteinaceous S-Layer“. In: *bioRxiv*.
- Ghuneim, Lydia-Ann J *et al.* (2018). „Nano-sized and filterable Bacteria and Archaea: Biodiversity and function“. eng. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 1971.
- Giannone, Richard J *et al.* (2011). „Proteomic characterization of cellular and molecular processes that enable the *Nanoarchaeum equitans*-*Ignicoccus hospitalis* relationship“. In: *PLOS ONE* 6.8, e22942.
- Golyshina, Olga V (2011). „Environmental, biogeographic, and biochemical patterns of Archaea of the Family Ferroplasmaceae“. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77.15, S. 5071–5078.
- Golyshina, Olga V *et al.* (2000). „*Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the Ferroplasmaceae fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50.3, S. 997–1006.
- Golyshina, Olga V *et al.* (2009). „*Acidiplasma aeolicum* gen. nov., sp. nov., a Euryarchaeon of the family Ferroplasmaceae isolated from a hydrothermal pool, and transfer of *Ferroplasma cupricumulans* to *Acidiplasma cupricumulans* comb. nov“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Golyshina, Olga V *et al.* (2016). „The novel extremely acidophilic, cell-wall-deficient archaeon *Cuniculiplasma divulgatum* gen. nov., sp. nov. represents

- a new family, Cuniculiplasmataceae fam. nov., of the order Thermoplasmatales". In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66.Pt 1, S. 332.
- Golyshina, Olga V *et al.* (2017a). „Metabolic and evolutionary patterns in the extremely acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum* YT". In: *Scientific reports* 7.1, S. 1–12.
- Golyshina, Olga V *et al.* (2017b). „Mysterious “ARMAN” Archaea depend on association with Euryarchaeal host in culture *in situ*". In: *Nature Communications*, S. 1–11.
- Golyshina, Olga V *et al.* (2019). „Diversity of “Ca. Micrarchaeota” in two distinct types of acidic environments and their associations with Thermoplasmatales". In: *genes* 10, S. 1–11.
- Guy, Lionel und Thijs J.G. Ettema (2011). „The Archaeal ‘TACK’ superphylum and the origin of eukaryotes". In: *Trends in Microbiology* 19.12, S. 580–587.
- Guy, Lionel *et al.* (2014). „‘Geoarchaeote NAG1’ is a deeply rooting lineage of the Archaeal order Thermoproteales rather than a new phylum". In: *The ISME journal* 8.7, S. 1353–1357.
- Hamerly, Timothy *et al.* (2015). „Untargeted metabolomics studies employing NMR and LC–MS reveal metabolic coupling between *Nanoarchaeum equitans* and its Archaeal host *Ignicoccus hospitalis*". In: *Metabolomics* 11.4, S. 895–907.
- Hamm, Joshua N *et al.* (2019). „Unexpected host dependency of Antarctic Nanohaloarchaeota". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.29, 14661 LP –14670.
- Hawkes, Rebecca B *et al.* (2006). „*Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaeon isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap". In: *Extremophiles* 10.6, S. 525–530.
- Heimerl, Thomas *et al.* (2017). „A complex endomembrane system in the Archaeon *Ignicoccus hospitalis* tapped by *Nanoarchaeum equitans*". In: *Frontiers in Microbiology* 8.June, S. 1072.
- Higgins, Christopher F (2001). „ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview". In: *Research in Microbiology* 152.3, S. 205–210.
- Hoang, Helena (2018). *Funktionelle Expression archaeeller Gene in Escherichia coli*.
- Huber, Harald und Karl O Stetter (2006). „Thermoplasmatales". In: *The prokaryotes* 3, S. 101–112.
- Huber, Harald *et al.* (2002). „A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont." In: *Nature* 417.6884, S. 63–67.

- Huber, Harald *et al.* (2003). „The phylum Nanoarchaeota: Present knowledge and future perspectives of a unique form of life“. In: *Research in Microbiology* 154.3, S. 165–171.
- Huber, Harald *et al.* (2012). „The unusual cell biology of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*“. In: *Antonie Van Leeuwenhoek* 102.2, S. 203–219.
- Imachi, Hiroyuki *et al.* (2020). „Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface“. In: *Nature* 577.7791, S. 519–525.
- Itoh, Takashi, Naoto Yoshikawa und Tomonori Takashina (2007). „*Thermogymnomonas acidicola* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in the order Thermoplasmatales, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57.11, S. 2557–2561.
- Jahn, Ulrike *et al.* (2004). „Composition of the lipids of *Nanoarchaeum equitans* and their origin from its host *Ignicoccus sp.* strain KIN4/I“. In: *Archives of Microbiology* 182.5, S. 404–413.
- Jahn, Ulrike *et al.* (2008). „*Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: New insights into a unique, intimate association of two Archaea“. In: *Journal of Bacteriology* 190.5, 1743 LP –1750.
- Jain, Samta, Antonella Caforio und Arnold Driessen (2014). „Biosynthesis of Archaeal membrane ether lipids“. In: *Frontiers in microbiology* 5, S. 641.
- Kadnikov, Vitaly V. *et al.* (2020). „Metabolic diversity and evolutionary history of the Archaeal phylum “Candidatus Micrarchaeota” uncovered from a freshwater lake metagenome“. In: *Applied and Environmental Microbiology* 86.23. Hrsg. von Haruyuki Atomi.
- Kaminski, Lina *et al.* (2010). „AgIJ adds the first sugar of the N-linked pentasaccharide decorating the *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein“. In: *Journal of Bacteriology* 192.21, S. 5572–5579.
- Kandiba, Lina und Jerry Eichler (2014). „Archaeal S-layer glycoproteins: Post-translational modification in the face of extremes“. eng TS - PubMed. In: *Frontiers in microbiology* 5, S. 661.
- Kandler, Otto und Hans Hippe (1977). „Lack of peptidoglycan in the cell walls of *Methanosarcina barkeri*“. In: *Archives of Microbiology* 113.1, S. 57–60.
- Kandler, Otto und Helmut König (1978). „Chemical composition of the peptidoglycan-free cell walls of methanogenic Bacteria“. In: *Archives of Microbiology* 118.2, S. 141–152.
- Karp, Peter D. *et al.* (2020). *Pathway Tools version 24.0: Integrated Software for Pathway/Genome Informatics and Systems Biology.*

- Kates, Morris (1992). „Archaeobacterial lipids: Structure, biosynthesis and function.“ In: *Biochemical Society Symposium*. Bd. 58, S. 51–72.
- Kawashima, Tsuyoshi *et al.* (2000). „Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.26, S. 14257–14262.
- Kelly, John *et al.* (2009). „A novel N-linked flagellar glycan from *Methanococcus maripaludis*“. In: *Carbohydrate research* 344.5, S. 648–653.
- Koga, Yosuke und Hiroyuki Morii (2007). „Biosynthesis of ether-type polar lipids in Archaea and evolutionary considerations“. eng. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 71.1, S. 97–120.
- Kozubal, Mark A *et al.* (2013). „Geoarchaeota: A new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park“. In: *The ISME Journal* 7.3, S. 622–634.
- Krause, Susanne (2017). „Isolierung und Charakterisierung neuartiger acidophiler Archaea“. Diss. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 171 S.
- Krause, Susanne *et al.* (2017). „Characterisation of a stable laboratory co-culture of acidophilic nanoorganisms“. In: *Scientific Reports* 7.3289, S. 1–13.
- Krause, Susanne *et al.* (2021). „Unraveling the critical growth factors for stable cultivation of (nano-sized) Micrarchaeota“. In: *bioRxiv*.
- Krogh, Anders *et al.* (2001). „Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes“. In: *Journal of Molecular Biology* 305.3, S. 567–580.
- Kügelgen, Andriko von *et al.* (2020). „*In situ* structure of an intact lipopolysaccharide-bound bacterial surface layer“. In: *Cell* 180.2, S. 348–358.
- König, Helmut, Reinhard Rachel und Harald Claus (2007). „Proteinaceous surface layers of Archaea: Ultrastructure and biochemistry“. In: *Archaea*. John Wiley & Sons, Ltd. Kap. 14, S. 315–340. ISBN: 9781683671688.
- La Cono, Violetta *et al.* (2020). „Symbiosis between Nanohaloarchaeon and Haloarchaeon is based on utilization of different polysaccharides“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117.33, 20223 LP –20234.
- Laemmli, Ulrich Karl (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4“. In: *Nature* 227.5259, S. 680–685.
- Li, Heng und Richard Durbin (2010). „Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform“. In: *Bioinformatics* 26.5, S. 589–595.
- liu, Yang *et al.* (2021). „Expanded diversity of Asgard Archaea and their relationships with eukaryotes“. In: *Nature*.
- Lo, Ian *et al.* (2007). „Strain-resolved community proteomics reveals recombining genomes of acidophilic Bacteria“. In: *Nature* 446.7135, S. 537–541.

- Loza-Correa, Maria *et al.* (2019). „The peptidoglycan and biofilm matrix of *Staphylococcus epidermidis* undergo structural changes when exposed to human platelets“. In: *PLOS ONE* 14.1, e0211132.
- López-García, Purificación und David Moreira (2020). „Cultured Asgard Archaea shed light on eukaryogenesis“. In: *Cell* 181.2, S. 232–235.
- Magidovich, Hilla *et al.* (2010). „AglP is a S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase that participates in the N-glycosylation pathway of *Haloflex volcanii*“. In: *Molecular microbiology* 76.1, S. 190–199.
- Marchler-Bauer, Aron *et al.* (2015). „CDD: NCBI’s conserved domain database“. In: *Nucleic acids research* 43.D1, S. D222–D226.
- Mastrorarde, David N (2005). „Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements“. In: *Journal of Structural Biology* 152.1, S. 36–51.
- Menzel, Rolf und John Roth (1981a). „Enzymatic properties of the purified putA protein from *Salmonella typhimurium*.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 256.18, S. 9762–9766.
- (1981b). „Purification of the putA gene product. A bifunctional membrane-bound protein from *Salmonella typhimurium* responsible for the two-step oxidation of proline to glutamate.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 256.18, S. 9755–9761.
- Narasingarao, Priya *et al.* (2012). „De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities“. In: *The ISME journal* 6.1, S. 81–93.
- Näther, Daniela J und Reinhard Rachel (2004). *The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon Ignicoccus: dynamics, ultrastructure and composition.*
- Nunoura, Takuro *et al.* (2010). „ Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel Archaeal group “. In: *Nucleic Acids Research* 39.8, S. 3204–3223.
- Oren, Aharon (2019). „Euryarchaeota“. In: *eLS*. American Cancer Society, S. 1–17. ISBN: 9780470015902.
- Pace, Norman R. (2009). „Mapping the Tree of Life: Progress and prospects“. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73.4, S. 565–576.
- Paper, Walter *et al.* (2007). „*Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of ‘Nanoarchaeum equitans’“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57.4, S. 803–808.
- Podar, Mircea *et al.* (2008). „A genomic analysis of the Archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*“. In: *Genome biology* 9.11, S. 1–18.

- Probst, Alexander J *et al.* (2014). „Biology of a widespread uncultivated archaeon that contributes to carbon fixation in the subsurface“. In: *Nature Communications* 5.1, S. 5497.
- Probst, Alexander J *et al.* (2018). „Differential depth distribution of microbial function and putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface“. In: *Nature Microbiology* 3.3, S. 328–336.
- Rainey, Paul B, Catherine L Brodey und Keith Johnstone (1992). *Biology of Pseudomonas tolaasii, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom.*
- Rawlings, Neil D und Alan J Barrett (1995). „Evolutionary families of metalloproteases“. In: *Methods in enzymology* 248, S. 183–228.
- Reysenbach, Anna-Louise (2001). „Order I. Thermoplasmatales ord. nov.“. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1, S. 335.
- Reysenbach, Anna-Louise und Kristen Brileya (2014). „The family Thermoplasmataceae“. In: *The prokaryotes*, S. 385–387.
- Rinke, Christian *et al.* (2013). „Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter“. In: *Nature* 499.7459, S. 431–437.
- Ruepp, Andreas *et al.* (2000). „The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*“. In: *Nature* 407.6803, S. 508–513.
- Sára, Margit *et al.* (2000). „S-Layer Proteins“. In: *Journal of Bacteriology* 182.4, 859 LP –868.
- Schleper, C *et al.* (1995). „*Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising Archaea capable of growth around pH 0.“ In: *Journal of Bacteriology* 177.24, S. 7050–7059.
- Schleper, Christa *et al.* (1996). „*Picrophilus oshimae* and *Picrophilus torridus* fam. nov., gen. nov., sp. nov., two species of hyperacidophilic, thermophilic, heterotrophic, aerobic Archaea“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46.3, S. 814–816.
- Schmidt, Christian L und Lee Shaw (2001). „A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins“. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 33.1, S. 9–26.
- Schwanhäusser, Björn *et al.* (2011). „Global quantification of mammalian gene expression control“. In: *Nature* 473.7347, S. 337–342.
- Schwank, Katrin *et al.* (2019). „An Archaeal symbiont-host association from the deep terrestrial subsurface“. In: *The ISME journal* 13.8, S. 2135–2139.
- Seemann, Torsten (2014). „Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation“. In: *Bioinformatics* 30.14, S. 2068–2069.

- Segerer, Andreas, Thomas A. Langworthy und Karl O. Stetter (1988). „*Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from Solfatarata fields“. In: *Systematic and Applied Microbiology* 10.2, S. 161–171.
- Seitz, Kiley W *et al.* (2019). „Asgard Archaea capable of anaerobic hydrocarbon cycling“. In: *Nature communications* 10.1, S. 1–11.
- Shalev, Yarden *et al.* (2018). „Comparative analysis of surface layer glycoproteins and genes involved in protein glycosylation in the genus *Haloferax*“. eng. In: *Genes* 9.3, S. 172.
- Sleytr, Uwe B *et al.* (2014). „S-layers: principles and applications“. In: *FEMS Microbiology Reviews* 38.5, S. 823–864.
- Sonnhammer, Erik L, Gunnar von Heijne und Anders Krogh (1998). „A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences“. In: *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* 6, S. 175–182.
- Spang, Anja, Eva F Caceres und Thijs J G. Ettema (2017). „Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the Archaeal domain of life“. In: *Science* 357.6351.
- Spang, Anja *et al.* (2010). „Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing Archaea supports the phylum Thaumarchaeota“. In: *Trends in Microbiology* 18.8, S. 331–340.
- Spang, Anja *et al.* (2015). „Complex Archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes“. In: *Nature* 521.7551, S. 173–179.
- St. John, Emily *et al.* (2018). „A new symbiotic nanoarchaeote (*Candidatus Nanoclepta minutus*) and its host (*Zestosphaera tikiterensis* gen. nov., sp. nov.) from a New Zealand hot spring“. In: *Systematic and Applied Microbiology* 42.1, S. 94–106.
- Stackebrandt, Erko und J. Ebers (2006). „Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards“. In: *Microbiol Today* 8, S. 6–9.
- Stahl, David A (1991). „Development and application of nucleic acid probes“. In: *Nucleic acid techniques in Bacterial systematics*, S. 205–248.
- Stookey, Lawrence L (1970). „Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron“. In: *Analytical Chemistry* 42.7, S. 779–781.
- Straub, Peter F *et al.* (1996). „Isolation, DNA sequence analysis, and mutagenesis of a proline dehydrogenase gene (*putA*) from *Bradyrhizobium japonicum*.“ In: *Applied and Environmental Microbiology* 62.1, S. 221.
- Sumper, M *et al.* (1990). „Primary structure and glycosylation of the S-layer protein of *Haloferax volcanii*“. eng TS - PubMed. In: *Journal of bacteriology* 172.12, S. 7111–7118.

- Szabó, Zalán *et al.* (2007). „Identification of diverse Archaeal proteins with class III signal peptides cleaved by distinct Archaeal prepilin peptidases“. In: *Journal of bacteriology* 189.3, S. 772–778.
- Taylor, K A, J F Deatherage und L A Amos (1982). „Structure of the S-layer of *Sulfolobus acidocaldarius*“. In: *Nature* 299.5886, S. 840–842.
- Uda, Ikuko *et al.* (2001). „Variation in molecular species of polar lipids from *Thermoplasma acidophilum* depends on growth temperature“. In: *Lipids* 36.1, S. 103–105.
- VanDyke, David J *et al.* (2008). „Identification of a putative acetyltransferase gene, MMP0350, which affects proper assembly of both flagella and pili in the archaeon *Methanococcus maripaludis*“. In: *Journal of bacteriology* 190.15, S. 5300–5307.
- Vanwonterghem, Inka *et al.* (2016). „Methylotrophic methanogenesis discovered in the Archaeal phylum Verstraetearchaeota“. In: *Nature microbiology* 1.12, S. 1–9.
- Vinogradov, Evgeny *et al.* (2012). „Cell surface glycoproteins from *Thermoplasma acidophilum* are modified with an N-linked glycan containing 6-C-sulfofucose“. In: *Glycobiology* 22.9, S. 1256–1267.
- Vinokur, Jeffrey M. *et al.* (2014). „Evidence of a novel mevalonate pathway in Archaea“. In: *Biochemistry* 53.25, S. 4161–4168.
- Vinokur, Jeffrey M. *et al.* (2016). „An adaptation to life in acid through A novel mevalonate pathway“. In: *Scientific Reports* 6.December, S. 1–11.
- Vossenbergh, Jack LCM van de *et al.* (1998). „Bioenergetics and cytoplasmic membrane stability of the extremely acidophilic, thermophilic archaeon *Picrophilus oshimae*“. In: *Extremophiles* 2.2, S. 67–74.
- Waters, Elizabeth *et al.* (2003). „The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early Archaeal evolution and derived parasitism“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.22, 12984 LP –12988.
- Wendeberg, Annelie, Jakob Pernthaler und Rudolf Amann (2008). „Sensitive multi-color fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms“. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, S. 711–726.
- Williams, Tom A und T Martin Embley (2014). „Archaeal “dark matter” and the origin of eukaryotes“. In: *Genome Biology and Evolution* 6.3, S. 474–481.
- Williams, Tom A *et al.* (2013). „An Archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life“. In: *Nature* 504.7479, S. 231–236.

- Wilson, Richard K *et al.* (2012). „VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing“. In: *Genome Research* 22, S. 568–576.
- Winkler, Dennis (2021). *Biochemische Charakterisierung von Proteinen eines neuartigen, acidophilen Nanoorganismus*.
- Woese, Carl R und George E Fox (1977). „Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74.11, S. 5088–5090.
- Woese, Carl R, Otto Kandler und Mark L Wheelis (1990). „Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87.12, S. 4576–4579.
- Wurch, Louie *et al.* (2016). „Genomics-informed isolation and characterization of a symbiotic Nanoarchaeota system from a terrestrial geothermal environment“. In: *Nature Communications* 7, S. 1–10.
- Yang, Li L und Alfred Haug (1979). „Purification and partial characterization of a procaryotic glycoprotein from the plasma membrane of *Thermoplasma acidophilum*“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 556.2, S. 265–277.
- Yarza, Pablo *et al.* (2014). „Uniting the classification of cultured and uncultured Bacteria and Archaea using 16S rRNA gene sequences“. In: *Nature Reviews Microbiology* 12.9, S. 635–645.
- Yasuda, Moriyoshi *et al.* (1995). „Morphological variation of new *Thermoplasma acidophilum* isolates from Japanese hot springs.“ In: *Applied and environmental microbiology* 61.9, S. 3482–3485.
- Yurist-Doutsch, Sophie *et al.* (2010). „N-glycosylation in Archaea: on the coordinated actions of *Haloferax volcanii* AgIF and AgIM“. In: *Molecular microbiology* 75.4, S. 1047–1058.
- Zaremba-Niedzwiedzka, Katarzyna *et al.* (2017). „Asgard Archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity“. In: *Nature* 541.7637, S. 353–358.
- Ziegler, Sibylle (2012). „Bekämpfung von Acid Mine Drainage durch Anreicherung säuretoleranter alkalisierender Mikroorganismen“. Diss. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau. 179 S.
- Ziegler, Sibylle *et al.* (2009). „Matrix composition and community structure analysis of a novel Bacterial pyrite leaching community“. In: *Environmental Microbiology* 11.9, S. 2329–2338.

Ziegler, Sibylle *et al.* (2013). „Oxygen-dependent niche formation of a pyrite-dependent acidophilic consortium built by Archaea and Bacteria“. In: *The ISME journal* 7.9, S. 1725–1737.

Anhang

Tabelle 24: Auflistung der Gene und Expressionsraten von Abbildung 11. Aufgeführt sind Gennummer, das mit PROKKA prognostizierte Genprodukt, das für die Zuordnung zu Stoffwechselwegen genutzt wurde, sowie die TPM-Werte der drei untersuchten Kulturen. Die Gene sind nach Stoffwechselwegen geordnet.

Gen	Produkt	TPM B_DKE 1	TPM B_DKE 2	TPM B_DKE 3
Glykolyse				
Thermo_00810	<i>Pyruvate kinase</i>	313	307	315
Thermo_00018	<i>Enolase</i>	443	489	440
Thermo_00395	<i>2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase</i>	957	1.056	842
Thermo_01080	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	432	448	416
Thermo_00658	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1.114	1.017	1.126
Thermo_01480	<i>hypothetical protein</i>	313	270	314
Thermo_00154	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	144	150	148
Thermo_00313	<i>Phosphoenolpyruvate synthase</i>	753	593	650
Thermo_00171	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase</i>	989	985	951
Citratzyklus				
Thermo_01904	<i>Citrate synthase</i>	1.884	1.972	1.925
Thermo_00969	<i>Fumarate hydratase class II</i>	2.313	2.293	2.203
Thermo_01206	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i>	1.771	1.715	1.826
Thermo_00972	<i>2-oxoglutarate synthase subunit KorB</i>	2.913	3.104	3.061
Thermo_00971	<i>2-oxoglutarate synthase subunit KorA</i>	2.629	2.649	2.593
Thermo_00178	<i>2-oxoglutarate synthase subunit KorB</i>	4.098	4.095	3.696
Thermo_00177	<i>2-oxoglutarate synthase subunit KorA</i>	3.871	3.548	3.507
Thermo_01548	<i>Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha</i>	294	313	338
Thermo_00209	<i>Ornithine carbamoyltransferase</i>	2.752	2.491	2.623
Thermo_00210	<i>succinyl-CoA synthetase subunit beta</i>	2.677	2.586	2.651
Thermo_00989	<i>succinyl-CoA synthetase subunit alpha</i>	403	451	524
Thermo_01841	<i>Malate dehydrogenase</i>	2.079	2.025	1.900

Gen	Produkt	TPM B_DKE 1	TPM B_DKE 2	TPM B_DKE 3
Glykolyse				
Pentose-Phosphat-Weg				
Thermo_01915	<i>putative transaldolase</i>	947	1.051	872
Thermo_01917	<i>transketolase</i>	398	394	388
Thermo_01916	<i>transketolase</i>	418	446	401
Thermo_00895	<i>transketolase</i>	1.527	1.461	1.535
Thermo_01262	<i>ribulose-phosphate 3-epimerase</i>	209	196	214
Thermo_01955	<i>Ribose-5-phosphate isomerase A</i>	263	272	278
Elektronentransportkette				
Thermo_00227	<i>NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D</i>	1.379	1.305	1.358
Thermo_00228	<i>NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D</i>	972	925	951
Thermo_00780	<i>cytochrome bd-II oxidase subunit 1</i>	504	533	513
ATP-Synthese				
Thermo_00710	<i>V-type ATP synthase alpha chain</i>	955	878	962
Thermo_00715	<i>V-type ATP synthase subunit I</i>	561	524	593
Thermo_00714	<i>V-type ATP synthase subunit H</i>	1.394	1.334	1.467
Thermo_00712	<i>V-ATPase subunit D</i>	787	735	794
Thermo_00711	<i>V-ATPase subunit B</i>	1.004	959	1.026
Thermo_00709	<i>V-type ATP synthase subunit F</i>	517	512	568
Thermo_00708	<i>V-type ATP synthase subunit C</i>	566	559	591
Thermo_00707	<i>V-type ATP synthase subunit E</i>	1.276	1.200	1.253
Thermo_00706	<i>V-type ATP synthase subunit K</i>	1.721	1.457	1.619

Tabelle 25: Auflistung der Gene und Expressionsraten von Abbildung 12. Aufgeführt sind Gennummer, das mit PROKKA prognostizierte Genprodukt das für die Zuordnung zu Stoffwechselwegen genutzt wurde, sowie die TPM-Werte der drei untersuchten Kulturen. Die Gene sind nach Stoffwechselwegen geordnet.

Gen	Produkt	TPM - B_DKE 1	TPM - B_DKE 2	TPM - B_DKE 3
Nucleosid- und Nucleotidabbau				
Thermo_00996	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	37	38	45
Thermo_01465	<i>Non-canonical purine NTP pyrophosphatase</i>	111	98	115
Thermo_01075	<i>S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase</i>	1.377	1.287	1.398
Kohlenhydrat- und Carbonsäureabbau				
Thermo_01920	<i>Acetyl-coenzyme A synthetase</i>	842	916	857
Thermo_01376	<i>Acetyl-coenzyme A synthetase</i>	91	104	101
Thermo_01166	<i>Acetyl-coenzyme A synthetase</i>	339	318	345
Thermo_01143	<i>Acetyl-coenzyme A synthetase</i>	218	206	216
Thermo_02023	<i>dihydrolipoamide dehydrogenase</i>	81	74	111
Thermo_00892	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i>	1.883	1.855	1.944
Thermo_00949	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i>	59	56	63
Thermo_00555	<i>pyruvate dehydrogenase</i>	32	34	32
Thermo_01964	<i>pyruvate dehydrogenase</i>	96	88	127
Thermo_00894	<i>pyruvate dehydrogenase subunit beta</i>	2.450	2.487	2.464
Thermo_01374	<i>galactonate dehydratase</i>	37	43	44
Thermo_01363	<i>galactonate dehydratase</i>	438	527	448
Thermo_01030	<i>galactonate dehydratase</i>	264	291	274
Thermo_00833	<i>galactonate dehydratase</i>	68	80	58
Aminosäureabbau				
Alaninabbau				
Thermo_01390	<i>Alanine dehydrogenase</i>	119	116	123
Thermo_01139	<i>Alanine dehydrogenase</i>	1.386	1.625	1.789
Argininabbau				
Thermo_00209	<i>Ornithine carbamoyltransferase</i>	2.752	2.491	2.623
Thermo_01219	<i>Carbamate kinase</i>	395	439	407
Thermo_02021	<i>carbamoyl phosphate synthase large subunit</i>	142	123	129
Thermo_01737	<i>arginine deiminase</i>	337	313	298

Gen	Produkt	TPM - B_DKE 1	TPM - B_DKE 2	TPM - B_DKE 3
Nucleosid- und Nucleotidabbau				
Aspartatabbau				
Thermo_01012	<i>putative aspartate aminotransferase 2</i>	233	215	236
Thermo_00897	<i>Aspartate aminotransferase</i>	284	315	293
Thermo_00733	<i>Aspartate aminotransferase</i>	2.507	2.378	2.384
Thermo_00567	<i>putative aspartate aminotransferase 2</i>	563	512	476
Glutamatabbau				
Thermo_02020	<i>Glutamate dehydrogenase</i>	13.332	14.089	12.593
Homocysteinabbau				
Thermo_02089	<i>Cystathionine beta-synthase</i>	321	296	308
Thermo_01712	<i>Cystathionine beta-synthase</i>	943	1.030	859
Thermo_00566	<i>Cystathionine beta-synthase</i>	898	788	712
Mehioninabbau				
Thermo_01272	<i>S-adenosylmethionine synthase</i>	1.403	998	1.903
Thermo_00393	<i>S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase</i>	1.138	1.143	1.133
Threoninabbau				
Thermo_00328	<i>2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase</i>	1.082	1.052	985
Fettsäure- und Lipidabbau				
Thermo_01321	<i>Glycerol kinase</i>	142	154	139
Alkoholabbau				
Thermo_00961	<i>cytoplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase</i>	658	613	669
Thermo_01321	<i>Glycerol kinase</i>	142	154	139

Tabelle 26: Auflistung der Gene und Expressionsraten von Abbildung 17. Aufgeführt sind Gennummer, das mit PROKKA prognostizierte Genprodukt, das für die Zuordnung zu Stoffwechselwegen genutzt wurde, sowie die TPM-Werte der drei untersuchten Kulturen. Die Gene sind nach Stoffwechselwegen geordnet.

Gen	Produkt	TPM	TPM	TPM
		A_DKE +	A_DKE +	A_DKE +
		B_DKE 1	B_DKE 2	B_DKE 3
Citratzyklus				
Micr_00026	<i>Citrate synthase</i>	1	1	1
Micr_00325	<i>Fumarate hydratase class II</i>	0	0	0
Micr_00902	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i>	2	1	1
Micr_00474	<i>2-oxoglutarate synthase subunit KorA</i>	5	3	3
Micr_00473	<i>2-oxoglutarate synthase subunit KorB</i>	4	3	3
Micr_00998	<i>succinyl-CoA synthetase subunit alpha</i>	0	0	0
Elektronentransportkette				
Micr_00050	<i>NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D</i>	1	0	0
Micr_00051	<i>NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D</i>	0	0	0
Micr_00706	<i>cytochrome bd-II oxidase subunit 1</i>	0	0	0
ATP-Synthese				
Micr_00406	<i>V-type ATP synthase alpha chain</i>	1	1	1
Micr_00411	<i>V-type ATP synthase subunit I</i>	1	0	0
Micr_00410	<i>V-type ATP synthase subunit E</i>	3	1	2
Micr_00408	<i>V-ATPase subunit D</i>	1	1	1
Micr_00407	<i>V-ATPase subunit B</i>	3	2	2
Micr_00405	<i>V-type ATP synthase subunit F</i>	0	0	0
Micr_00404	<i>V-type ATP synthase subunit C</i>	0	0	0
Micr_00403	<i>V-ATPase subunit E</i>	3	1	4
Micr_00402	<i>V-type ATP synthase subunit K</i>	5	3	4

Tabelle 27: Auflistung der Gene und Expressionsraten von Abbildung 18. Aufgeführt sind Gennummer, das mit PROKKA prognostizierte Genprodukt, das für die Zuordnung zu Stoffwechselwegen genutzt wurde, sowie die TPM-Werte der drei untersuchten Kulturen. Die Gene sind nach Stoffwechselwegen geordnet.

Gen	Produkt	TPM	TPM	TPM
		A_DKE +	A_DKE +	A_DKE +
		B_DKE ₁	B_DKE ₂	B_DKE ₃
Nucleosid- und Nucleotidabbau				
Micr_00690	<i>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i>	4	2	2
Micr_00462	<i>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i>	0	0	0
Micr_00598	<i>5'-nucleotidase</i>	1	1	1
Micr_00487	<i>xanthine dehydrogenase subunit XdhA</i>	1	1	1
Micr_00486	<i>xanthine dehydrogenase subunit XdhC</i>	0	1	0
Micr_00485	<i>xanthine dehydrogenase subunit XdhB</i>	0	0	0
Micr_00524	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	0	0	0
Micr_01029	<i>CTP synthase</i>	1	1	1
Micr_00895	<i>S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase</i>	1	1	1
Kohlenhydrat- und Carbonsäureabbau				
Micr_00941	<i>dihydrolipoamide dehydrogenase</i>	1	1	1
Micr_00220	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i>	0	0	0
Micr_00703	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i>	0	0	0
Micr_00701	<i>pyruvate dehydrogenase subunit beta</i>	1	0	1
Micr_00459	<i>galactonate dehydratase</i>	0	0	0
Aminosäureabbau				
Micr_00929	<i>Ornithine carbamoyltransferase, catabolic (00928)</i>	2	1	2
Micr_00604	<i>Carbamate kinase</i>	0	0	0
Micr_00605	<i>arginine deiminase</i>	0	0	0
Micr_00964	<i>putative aspartate aminotransferase 2</i>	1	0	0
Micr_00537	<i>putative aspartate aminotransferase 2</i>	0	0	0
Micr_00896	<i>Glutamate dehydrogenase</i>	3	2	2
Micr_00715	<i>Proline dehydrogenase</i>	3	1	1

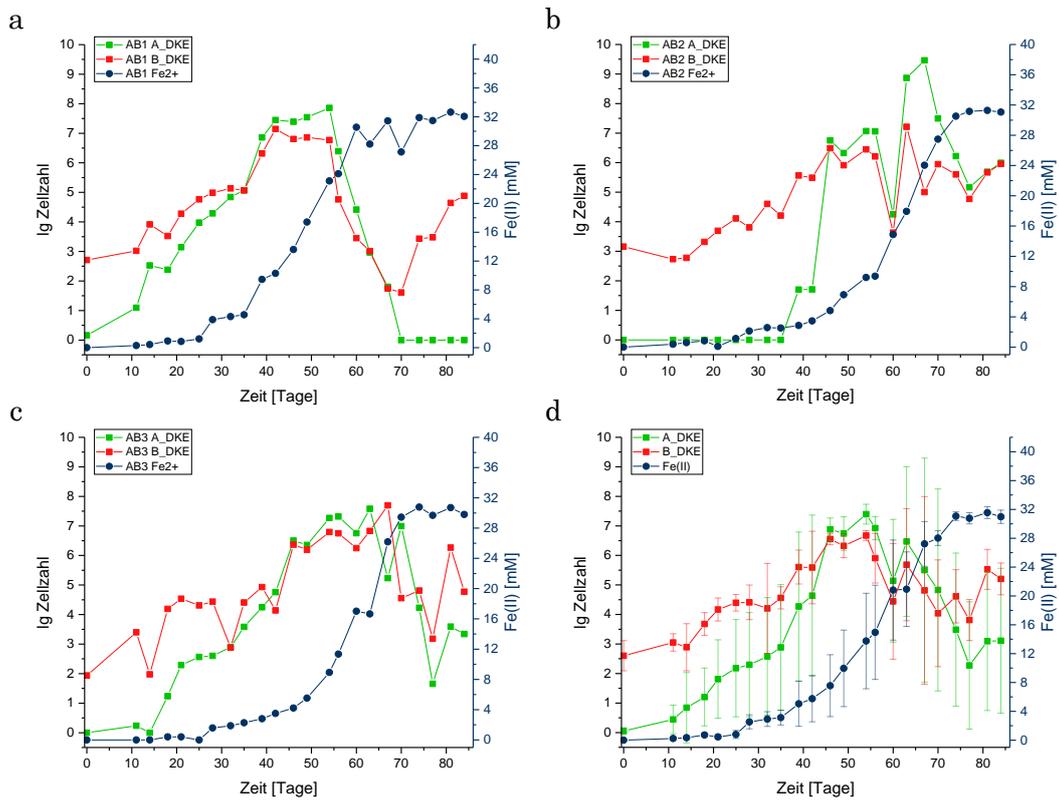


Abbildung 26: Cokultur-Wachstumsversuche bei 22 °C. Zu sehen sind die Anzahl an A_DKE- (grün) und B_DKE-Zellen (rot), sowie die Fe²⁺-Konzentration (blau) der drei biologischen Triplikate (a-c) und der Mittelwerte (d). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Digitaler Anhang

Im digitalen Anhang dieser Arbeit befindet sich die in Kapitel 2.2.3 und 3.2.5 erwähnte Tabelle.

Tabelle A1 Tabelle, die Informationen über Proteom-Analysen von A_DKE und B_DKE zusammenfasst. Aufgeführt sind die Gennummern, das von PROKKA 1.8 (Seemann, 2014) vorhergesagte Genprodukt und Mittelwerte von iBAQ-Werten in Cokultur und Reinkultur. Die Mittelwerte sind jeweils aus biologischen Duplikaten.

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Veröffentlichungen

Krause S., **Gfrerer S.**, Reuse C., Dombrowski N., Villanueva L., Bunk B. *et al.* (2021) „Unraveling the critical growth factors for stable cultivation of (nano-sized) Micrarchaeota“. In: *bioRxiv*

Gfrerer S., Winkler D., Novion Ducassou J., Couté Y., Gescher J. (2021) „Micrarchaeota are covered by a proteinaceous S-Layer“. In: *bioRxiv*.

Winkler D., **Gfrerer S.**, Gescher J. (2021) „Acidophilic Micrarchaeon Seems to Maintain a Slightly Alkaline Cytosolic pH“. In: *bioRxiv*.

Konferenzbeiträge

Vortrag auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Leipzig, Deutschland, März 2020.
„The DPANN way of life – insights into the interaction of a Micrarchaeon and a novel member of the Thermoplasmatales“