
**Untersuchung der Stressantwort von
Picrophilus torridus
mittels 2D-Gelelektrophorese und
Charakterisierung ausgewählter
Dehydrogenasen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Andrea Thürmer

aus
Rostock

Göttingen 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. <i>Archaea</i>	1
1.2. <i>Picrophilus torridus</i>	3
1.3. Dehydrogenasen aus <i>Picrophilus torridus</i>	4
1.4. Stressanpassung	7
1.5. Proteom und Proteomics	12
1.6. Proteomanalysen	14
1.7. Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Organismen und Plasmide	20
2.2. Zellbiologische Methoden	23
2.2.1. Zellanzucht von <i>E. coli</i>	23
2.2.2. Zellanzucht von <i>Picrophilus torridus</i>	24
2.2.3. Kryolagerung von Zellen	25
2.2.4. Bestimmung der optischen Dichte	26
2.3. Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1. Herstellung kompetenter Zellen	26
2.3.2. Transformation kompetenter Bakterien	27
2.3.3. Arbeiten mit DNA	28
2.3.4. Bestimmung der DNA Konzentration	33
2.3.5. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	33
2.3.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.3.7. Kolonie-PCR	36
2.3.8. Aufreinigung von PCR Produkten mit dem QIAquick PCR- Purification Kit von QIAGEN	37
2.3.9. Agarosegelelektrophorese	37
2.3.10. Gelelution von DNA Fragmenten mit dem QIAquick Gelextraction-Kit von Qiagen	39
2.3.11. Dephosphorylierung von DNA-Enden	39
2.3.12. Ligation von DNA-Fragmenten	40
2.3.13. Klonierung mit dem Gateway-System	41
2.3.14. Konstruktion einer Fosmidgenbank	41
2.4. Proteinbiochemische Methoden	44
2.4.1. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	44
2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.4.3. Nativ-PAGE	47
2.4.4. 2D-Gelelektrophorese	50
2.4.5. Umpufferung durch Dialyse	54
2.4.6. Konzentration von Proteinlösungen	54
2.4.7. Zellernte und Rohextraktgewinnung	54
2.4.8. Renaturierung von <i>inclusion bodies</i>	56
2.4.9. Coexpression von Chaperonen und Fremdproteinen in <i>E. coli</i> mit TakaRa Chaperone Plasmid Set [®]	57
2.4.10. Proteinreinigung	58
2.4.11. Nachweis von Dehydrogenase-Enzymaktivitäten	61
2.4.12. Proteinsequenzierung	65

2.5.	Immunbiologische Methoden	66
2.5.1.	Western Blot (Towbin <i>et al.</i> , 1979)	66
3.	Ergebnisse	69
3.1.	Klonierung und Charakterisierungsversuch verschiedener Dehydrogenasegene aus <i>P. torridus</i>	69
3.1.1.	Klonierung der Dehydrogenasegene in pBADmyc-HisA	69
3.1.2.	Klonierung der Dehydrogenasegene in pEX22b	71
3.1.3.	Klonierung der Dehydrogenasegene in pMALc2x	71
3.2.	Expressionsversuche und Aktivitätstests mit den <i>P. torridus</i> Dehydrogenasen in <i>E. coli</i>	72
3.2.1.	Expression in <i>E. coli</i> Ros2(DE3)	72
3.2.2.	Coexpression mit Chaperongenomen	77
3.2.3.	Expressionsversuche und Aktivitätstests mit <i>E. coli</i> ECL 707 pEX::201 C1-5	87
3.3.	Aufreinigungsversuche	90
3.3.1.	Aufreinigung der <i>P. torridus</i> Glycerol-Dehydrogenase (RPT00201) aus <i>E. coli</i> BL21 RS pEX::201 C1 mit Source 15S	90
3.3.2.	Aufreinigung des Fusionsproteins MBP-201 aus <i>E. coli</i> Ros2(DE3) pMALc2x::201 über Amylose-Resin	91
3.3.3.	Zusammenfassung der Expressionsversuche und Aktivitätsbestimmungen der <i>P. torridus</i> Dehydrogenasen	94
3.4.	Identifizierung aktiver <i>P. torridus</i> Dehydrogenasen mittels Fosmidgenbank	95
3.4.1.	Konstruktion einer <i>P. torridus</i> Fosmidgenbank	95
3.4.2.	Aktivitätsscreening der Fosmidgenbank mittels Carbonylindikator-Test	96
3.4.3.	Aktivitätsbestimmung ausgewählter Fosmidklone über native Gelelektrophorese	98
3.4.4.	Kartierung der Sequenzbereiche von Fosmidklonen mit Dehydrogenase-Aktivität	99
3.5.	Proteomanalysen von <i>Picrophilus torridus</i> unter verschiedenen Stressbedingungen mittels 2D-Gelelektrophorese	100
3.5.1.	Etablierung der 2DE-Gelelektrophorese für <i>P. torridus</i>	100
3.5.2.	Versuch der Auftrennung der Membranfraktion von <i>P. torridus</i>	103
3.5.3.	Erstellen eines Mastergels	104
3.5.4.	Erstellen einer <i>P. torridus</i> Protein-Datenbank in Delta 2D (Decodon)	106
3.5.5.	Vergleich von identifizierten Proteinen auf dem 2D-Gel mit den Genomdaten	108
3.5.6.	Stationäre Phase vs exponentielle Phase	110
3.5.7.	Analyse der Adaptation von <i>P. torridus</i> an verschiedene Stressbedingungen unter Verwendung vergleichender 2D- Gelelektrophorese	112
4.	Diskussion	137
4.1.	Heterologe Expression ausgewählter <i>P. torridus</i> Dehydrogenasen unter verschiedenen Expressionsbedingungen	137
4.1.1.	Promotorwahl und Variation der Anzuchtbedingungen	137
4.1.2.	Coexpression mit Chaperonen	139

4.1.3.	Expression von Fusionsproteinen	144
4.1.4.	Aufreinigung	145
4.2.	Screening nach Dehydrogenasegenen über eine Fosmidgenbank	146
4.3.	Proteomanalysen von <i>P. torridus</i>	148
4.3.1.	Mastergel	149
4.3.2.	Untersuchung der Stressadaptation	153
5.	Zusammenfassung	167
6.	Anhang	169
6.1.	Literatur	169
6.2.	Abbildungsverzeichnis	182
6.3.	Tabellenverzeichnis	186
6.4.	Sequenzen ORFs	187
6.5.	Vektorkarten	189
6.6.	Sequenzen Fosmidbank	190
6.7.	Sequenzen MS/MS	197
6.8.	Überexprimierte Spots aus den Stress-Experimenten	213

Abkürzungsverzeichnis

AA/Bis	Acrylamid/ N,N'-Methylenbisacrylamid
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure (rest)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Cm	Chloramphenicol
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Da	Dalton
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzyme Commission
ED	Entner-Doudoroff Weg
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GAP	Glyceraldehyde-3-phosphat
GDH	Glucose-1-dehydrogenase
h	Stunde
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kBp	Kilo-Basenpaare
LB	Medium Luria-Bertani Medium
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MBP	Maltose-Binde-Protein
MCS	Multiple cloning site

Mr	relative molekulare Masse
mRNA	<i>messenger</i> (=Boten) RNA
NAD(H)	β-Nicotinamid - Adenin - Dinukleotid (reduziert)
NADP(H)	β-Nicotinamid - Adenin - Dinukleotid Phosphat (reduziert)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ORF	open reading frame (= offener Leserahmen)
OriR	origin of replication (= Startpunkt der Replikation)
OD	optische Dichte
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase -Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEP	Phosphoenolpyruvat
pI	Isoelektrischer Punkt
PMS	5-Methyl-Phenazonium Methylsulfat
PPi	Pyrophosphat Anion ($P_2O_7^{4-}$)
RT	Raumtemperatur
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TCA	Tricarboxylic acid cycle (= Tricarbonsäurezyklus)
TE	Tris-EDTA Puffer
Tm	Schmelztemperatur
ü.N.	über Nacht
Upm/rpm	Umdrehungen pro Minute/rounds per minute
U	Unit (Einheit der Enzym-Aktivität)
UV	ultraviolett (radiation)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D- galactopyranosid

1. EINLEITUNG

1.1. *ARCHAEA*

Archaeen sind einzellige Mikroorganismen, die als eine stammesgeschichtlich alte Organismengruppe zu den „einfachsten“ Formen des Lebens zählen. Sie wurden vorwiegend in extremen Habitaten nachgewiesen, wobei die Zahl der gefundenen Spezies in den letzten Jahren sehr stark gestiegen ist.

Früher wurde angenommen, dass Umgebungen mit extremen Bedingungen nicht kompatibel sind mit lebenden Organismen, doch unter nahezu allen extremen Bedingungen zeigten sich Nischen für Mikroorganismen: solche in extrem sauren oder alkalischen Umgebungen (Acidophile oder Akaliphile), welche, die unter sehr hohen Salzkonzentration leben (Halophile), unter sehr hohem Druck (Barophile) und welche, die bei sehr hohen oder extrem niedrigen Temperaturen (Hyperthermophile, Psychrophile) leben. Derartige Biotope erinnern an Bedingungen auf der Erde in der frühen Phase der biologischen Evolution, eine Situation, die sich in der Namensgebung durch Carl Woese widerspiegelt (gr. *archaios* für „ursprünglich“) (Woese and Olsen, 1986).

Zudem ist es nicht ungewöhnlich Organismen zu finden, die in einer Umgebung leben, die mehrere extreme Bedingungen kombiniert beherbergt. So z.B. solche, die bei hoher Temperatur und niedrigem pH-Wert leben und somit thermoacidophil sind (Johnson, 1998).

Moderne Methoden der Mikro- und Molekularbiologie (v.a. Analysen der 16S rRNA) ermöglichten die Entwicklung eines phylogenetischen Stammbaums (s. Abb. 1), der eine Dreiteilung in die Domänen *Eukarya*, *Archaea* und den *Bacteria* erlaubte (Woese, 1987; Woese et al., 1990). So konnte nachgewiesen werden, dass die *Bacteria* als erste von der gemeinsamen evolutionären Linie abzweigten und damit die Archaeen zu den Eukaryoten näher verwandt sind als zu den Bakterien, der zweiten Domäne der Prokaryoten. Die Eigenständigkeit der *Archaea* als Domäne spiegelt sich auch in der einzigartigen Kombination biochemischer Merkmale wider. So unterscheiden sich Archaeen von den Eubakterien durch einen, den Eukaryoten ähnlichen, Transkriptions- und Translationsapparat (Thomm, 1996). Ihre einzigartigen Membranlipide aus Glycerinethern mit verzweigten Ketten (Isoprenoidlipide) (Hanford and Peeples,

2002; Shinoda et al., 2005) stehen im Gegensatz zu den weit verbreiteten Fettsäureglycerinestern. Mureinhaltige Zellwände (Peptidoglykan) wie bei den *Bacteria* konnten bisher bei *Archaea* nicht nachgewiesen werden, ihre Zellwände sind sehr heterogen gestaltet (z. B. Pseudomurein, Glykoproteine) (Kandler and König, 1998).

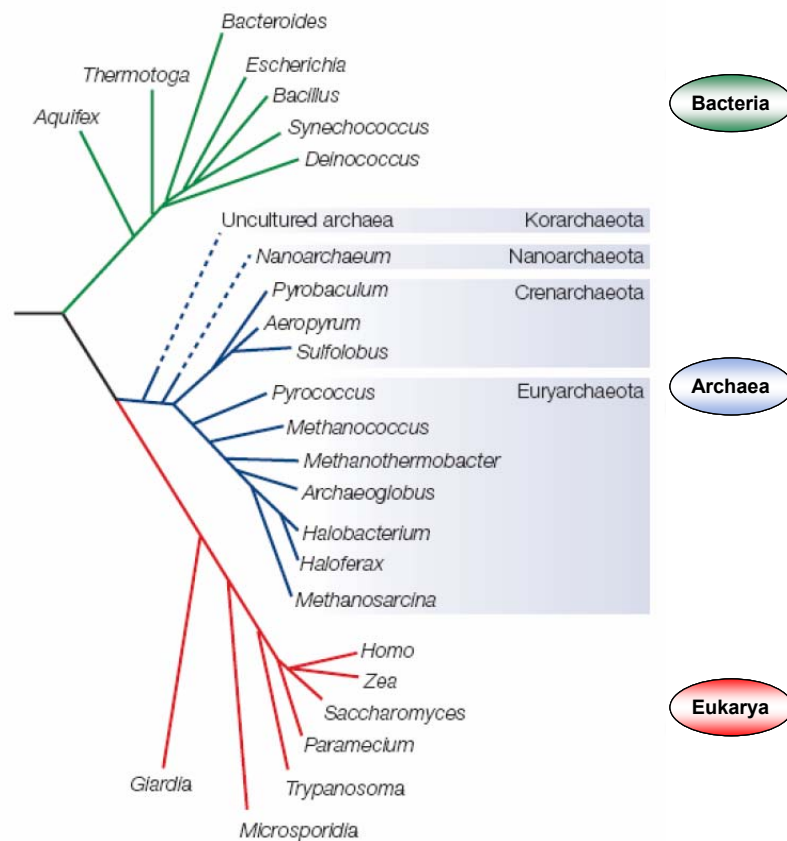


Abb. 1 Phylogenetischer Stammbaum modifiziert nach (Allers and Mevarech, 2005)

Die Domäne der *Archaea* wurde zunächst, basierend auf kultivierten Organismen, in zwei Hauptäste, *Crenarchaeota* und *Euryarchaeota*, eingeteilt (Woese et al., 1990). *Crenarchaeota* sind phänotypisch relativ homogen und zum großen Teil hyperthermophil (Woese, 1987). Die *Euryarchaeota* weisen in Bezug auf Lebensraum und Physiologie eine große Diversität auf. Neben mesophilen Organismen, innerhalb derer die methanogenen dominieren (Burggraf et al., 1991), sind thermophile und die extrem halophilen Organismen zu finden (Woese, 1987; Woese and Olsen, 1986). Das Forschungsfeld der *Archaea* hat sich in den letzten Jahren als sehr dynamisch erwiesen, so wurde in besonders heißen Quellen im Yellowstone National Park erstmals eine neue Gruppe der *Archaea*, die *Korarchaeota* entdeckt (Barns et al., 1996). Bisher ist es jedoch nicht gelungen diese zu kultivieren, und ihre Existenz ist nur aufgrund

von 16S rDNA Analysen von Umweltproben nachgewiesen worden. Darüber hinaus wurden hyperthermophile Symbionten gefunden, die den *Archaea* zugeordnet werden (Huber et al., 2002). Die phylogenetische Einteilung dieser *Nanoarchaeota* innerhalb der *Archaea* ist jedoch noch nicht endgültig geklärt (Allers and Mevarech, 2005). *Archaea* werden heute ubiquitär gefunden (Robertson et al., 2005), so wiesen z.B. Karner und Kollegen einen erstaunlich hohen Anteil an Archaeen im Ozean nach (Karner et al., 2001). Die zunehmende Vielfalt und Verbreitung zeigt, dass *Archaea* offensichtlich nicht nur auf extreme Nischenhabitate beschränkt sind. Damit gewinnen sie auch ökologisch immer mehr an Bedeutung als bisher angenommen.

Durch ihre Verwandtschaft zu den Eukaryoten wird ihre Etablierung als Modell zur Untersuchung von biologischen Prozessen, die bei höheren Organismen relevant sind, immer bedeutungsvoller.

Das Leben in extremen Umgebungen schafft auch die Möglichkeit die Mechanismen zu untersuchen, die eine Anpassung an diese Bedingungen möglich machen. Zudem sind solche Extremophile eine mögliche Quelle für biotechnologisch wichtige Enzyme und Makromoleküle (Herbert, 1992; Madigan and Mairs, 1997; van den Burg, 2003).

1.2. *PICROPHILUS TORRIDUS*

Picrophilus torridus bietet als thermoacidophiles Archeaon ein potentielles Modell zur Untersuchung verschiedener Mechanismen oder biotechnologisch relevanter Enzyme.

Thermoacidophile Archaeen werden in die Ordnungen *Sulfolobales* und *Thermoplasmatales* eingeteilt. Organismen der Ordnung *Sulfolobales*, zu der die Gattungen *Acidianus*, *Desulfurolobus*, *Metallosphaera*, *Stygiolobus*, *Sulfolobus*, *Sulfurisphaera* und *Sulforococcus* gehören, wachsen bei pH-Werten von 1-5 mit einem Wachstumsoptimum um pH 3. Angehörige dieser Ordnung wachsen autotroph, heterotroph oder fakultativ heterotroph und sind dazu strikt aerob (Tu and Zillig, 1982). *Picrophilaceae*, *Thermoplasmaceae* und *Ferropasmaceae* gehören zu den *Thermoplasmatales*. Sie wachsen aerob oder fakultativ anaerob und mit Ausnahme von *Ferroplasma acidophilum*, das

autotroph wächst, sind alle Organismen heterotroph (C. Bertoldo, 2004). Die pH-Optima der *Thermoplasmatales* liegen noch unter denen der *Sulfolobales*. *P. torridus* mit einem pH-Optimum von 0,7 ist derzeit der acidophilste bekannte Mikroorganismus. Der Stamm wurde aus einem trockenen sulfathaltigen Boden in Nord-Japan isoliert. Dieser Organismus ist in der Lage bei negativen pH-Werten zu wachsen (Schleper et al., 1995b). Mit einem außergewöhnlich niedrigen intrazellulärem pH-Wert von pH 4.6 unterscheidet sich *P. torridus* von anderen thermoacidophilen Organismen, deren cytoplasmatische pH-Werte um 7 liegen (She et al., 2001; van de et al., 1998). Die Zellen von *P. torridus* sind kokkenförmig mit einem Durchmesser von 1.0–1.5 μm (s. Abb. 2). *P. torridus* wächst heterotroph und unter aeroben Bedingungen bei Temperaturen von 45–65 °C, wobei das Temperaturoptimum bei 60 °C liegt.

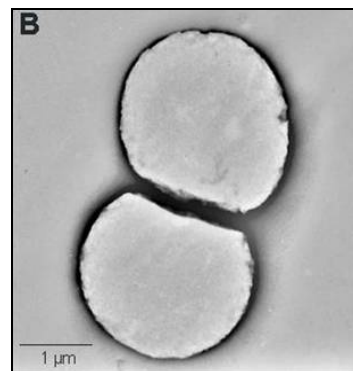


Abb. 2 Elektronenmikroskopisches Bild von *Picrophilus torridus* (von Michael Hoppert, Göttingen)

Die ungewöhnliche tetragonale Symmetrie des auf die Zellmembran aufgelagerten S-Layers wurde sonst nur bei Vertretern der Gattungen *Desulfurococcus* und *Staphylothermus* gefunden (Schleper et al., 1995a). Das Genom von *P. torridus* ist mit 1.55 Mb das kleinste Genom eines nicht parasitären aeroben Mikroorganismus und weist die höchste Kodierungsdichte aller thermophilen Mikroorganismen auf (Futterer et al., 2004).

1.3. DEHYDROGENASEN AUS *PICROPHILUS TORRIDUS*

Die Umwandlung von Alkoholen, Aldehyden und Ketonen ist von großer Bedeutung für viele metabolische Prozesse. Diese Redoxreaktionen werden durch Oxidoreduktasen katalysiert, zu denen auch die Dehydrogenasen gehören, deren Gene in dieser Arbeit kloniert wurden. Die meisten dieser

Enzyme benötigen Kofaktoren wie Flavin Adenin Dinukleotid (FAD), Pyrroquinolin Quinon (PQQ) und NAD(P)⁺ (Hummel, 1997). Diese sind in drei Gruppen eingeteilt (Reid and Fewson, 1994):

1. NAD(P)⁺-abhängige Dehydrogenasen (DH): Unterschieden wird zwischen langkettigen, Zink-abhängigen Dehydrogenasen (Typ I, z.B. die Alkohol-DH I aus *Zymomonas mobilis*), kurzkettigen und Zink-unabhängigen Dehydrogenasen (Typ II, z.B. die Ribitol-DH aus *Enterobacter aerogenes*) und die Eisen-aktivierten Enzymen (Typ III, z.B. die 1,3-Propandiol-DH aus *C. freundii*).

2. NAP(P)⁺-unabhängige Dehydrogenasen: Merkmal der Enzyme dieser Gruppe sind Kofaktoren wie FAD, PQQ oder F420 (z.B. die Alkohol-DH aus *Acetobacter acetii*) anstelle von NAD(P)⁺.

3. Oxidasen: Durch diese Enzyme werden Alkohole irreversibel oxidiert (z.B. die Alkohol-Oxidase 1 aus *Candida boidinii*).

Aufgrund seiner Angepasstheit an außergewöhnliche Lebensumstände, kann erwartet werden, dass *P. torridus* auch Biokatalysatoren besitzt, die robust und für biotechnologische Anwendungen geeignet sind. Eine besondere biotechnologische Relevanz haben die Nikotinamid-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen. Aufgrund ihrer meist hohen Enantioselektivität werden sie in der Industrie für die Produktion von Carbonylverbindungen, Hydroxysäuren, Aminosäuren und chiralen Alkoholen eingesetzt, die chemisch nur schwer zu synthetisieren sind (Hummel, 1997; Reid and Fewson, 1994). Ein typisches Reaktionsschema zur Synthese von chiralen Verbindungen durch Dehydrogenasen ist in Abb. 3 gezeigt. Zudem finden sie Anwendung in der Herstellung von Deuterium- oder Tritium-markierten Substanzen, der Produktion von Dihydroxyaceton und der enzymatischen Analyse von Serumlipiden (YAMADA et al., 1982; FANG et al., 1995). Da die Kosten für die Nikotinamid-Komponenten sehr hoch sind, ist für eine Anwendung der Alkohol-Dehydrogenasen im industriellen Maßstab eine Regeneration des Kofaktors durch effiziente Systeme notwendig. Häufig verwendet man Systeme, die auf der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase- oder der Formiat-Dehydrogenase-Reaktion basieren (Chenault and Whitesides, 1987). Dadurch können zum einen die Produktionskosten gering gehalten werden und zum anderen

thermodynamisch ungünstige Reaktionsgleichgewichte in Richtung des gewünschten Produktes verschoben werden (Hummel, 1999).

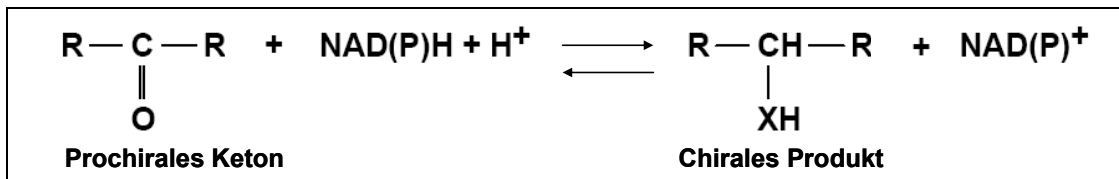


Abb. 3 Reaktionsschema zur Bildung von chiralen Verbindungen durch NAD(P)H-abhängige Dehydrogenasen. Es entsteht als Produkt ein Alkohol wenn für das X ein Sauerstoffatom, steht und ein Amin, wenn es für NH steht.

Glycerol-Dehydrogenasen wurden bereits aus einer Vielzahl von Organismen isoliert: Bakterien, Hefen und Säugetieren (Ruzheinikov et al., 2001). Unter anaeroben Bedingungen verwerten viele Mikroorganismen Glycerol als Kohlenstoffquelle während gekoppelten oxidativen- und reduzierenden Stoffwechselwegen (Lin, 1976). Dabei wird die Verwertung von Glycerol durch eine Glycerol-Dehydrogenase (GlyDH) (Glycerol: NAD⁺ 2-oxidoreductase, EC 1.1.1.6) katalysiert und resultiert in der Bildung von Dihydroxyaceton (1,3-dehydroxypropanon) bei der gleichzeitigen Reduktion von NAD⁺ zu NADH (s. Abb. 4) (Ruzheinikov et al., 2001). Das Dihydroxyaceton wird durch eine Dihydroxyaceton-Kinase phosphoryliert und für die weitere Verwertung in den glykolytischen Stoffwechselweg eingeschleust. Basierend auf den Genomdaten von *P. torridus* wurden die in dem beschriebenen Stoffwechselweg vorkommenden Enzyme annotiert.

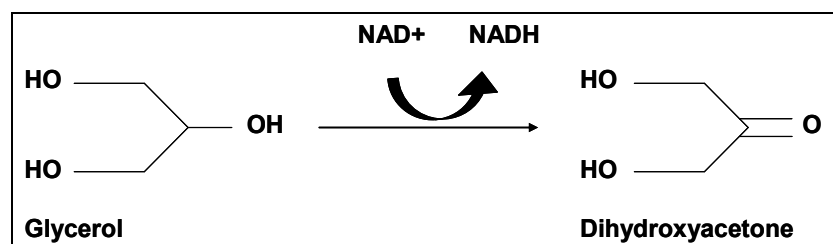


Abb. 4 Schema der Glycerol Oxidation

1.4. STRESSANPASSUNG

Die Fähigkeit sich an Stress anzupassen ist essentiell für alle Mikroorganismen, die unter extremen Bedingungen leben (Aertsen and Michiels, 2004; Pedone et al., 2004; Tachdjian and Kelly, 2006).

Thermoacidophile Organismen jeden Typs unterliegen ständig Temperatur- und pH-Stress in ihrer natürlichen Umgebung. Es wurde gezeigt, dass sich die zellulären Prozesse einer jeden Zelle, die in irgendeiner Form externen Stress ausgesetzt ist, verändern (Matin, 1992). Die Produktion von Proteinen als Stress-Antwort (stress response), die die zelluläre Stabilität gewährleisten, wurde auch für Acidophile beschrieben (Macario et al., 1999; Matin, 1992; Tachdjian and Kelly, 2006). So konnte z.B. für die acidophilen Bakterien *Leptospirillum ferrooxidans* and *Thiobacillus ferrooxidans* gezeigt werden, dass sie bei einem Temperaturanstieg um 11 °C mehrere Hitze Schock Proteine (heat shock proteins, Hsp) produzieren, ebenso bei einer pH-Wert Änderung von pH 3.5 auf 1.5. Die Untersuchungen des thermoacidophilen Archaeons *Sulfolobus solfataricus* zeigte u.a. auch einen Anstieg von Hitzeschockproteinen (HSPs) als Hitzeschock-Antwort (Tachdjian and Kelly, 2006). Diese HSPs gehören zur Familie der „molekularen Chaperone“. Sie sind wichtig für viele zelluläre Funktionen.

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass Proteinfaltung generell spontan, in einem Energie-unabhängigen Prozess, abläuft. Doch die Entdeckung von molekularen Chaperonen, die ubiquitär in Eubakterien, Archaeen und in eukaryotischen Zellen vorkommen, hat diese Meinung in den letzten 15 Jahren verändert (Ellis, 1987; Martin and Hartl, 1994). Diese molekularen Chaperone helfen bei der *de novo* Proteinfaltung, stabilisieren Proteine unter Stressbedingungen und halten Polypeptidketten, die erst locker gefaltet für den Transport in andere Zellkompartimente in der Zelle vorliegen, in einem Transport-kompetenten Zustand (Ellis, 1994; Martin and Hartl, 1994). Da die meisten Vertreter bei der Stabilisierung nicht an bestimmte Konsensussequenzen gebunden sind, können sie die inkorrekte intra- und intermolekulare Faltung von vielen verschiedenen Proteinen gewährleisten.

Die zellulär verfügbaren Chaperone werden bezogen auf ihr Molekulargewicht in 100, 90, 70, 60, 40 und 30 kDa Familien eingeteilt und bilden ein

leistungsfähiges Netzwerk zur Qualitätskontrolle von Proteinen und zur Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen (s. Abb. 5.).

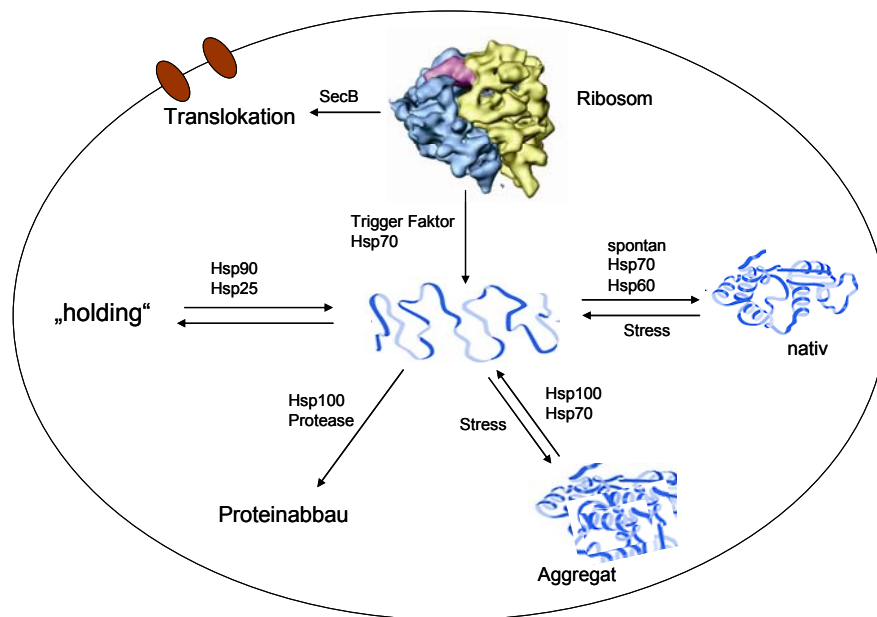


Abb. 5 Die Aufgaben von Chaperonen in der Zelle. Nach der Synthetisierung von Proteinen am Ribosom werden diese entweder sekretiert, oder falten sich nach dem Loslösen vom Ribosom in ihre native Struktur. Stress, z.B. Hitzeschock macht die Proteine anfällig für Aggregatbildung, was ein Auflösen ihrer nativen Struktur bedeutet. Die Wechselwirkung mit Chaperonen kann die Bildung von Aggregation reduzieren. Durch das Zusammenspiel der Chaperone Hsp70 und Hsp100 können solche Aggregate zum Teil wieder aufgelöst werden. Dabei vermitteln die Chaperone Hsp70 und Hsp60 aktiv die Rückfaltung in die native Struktur. ATP-unabhängige Chaperone (Hsp90, Hsp25) binden entfaltete Proteine und halten sie so unterstützend in Lösung. Ist es nicht mehr möglich den nativen Zustand des Proteins zu erzielen werden sie durch Proteasen, die oft mit Hsp100 Chaperonen assoziiert sind, abgebaut.

In *E. coli* werden bei einem Temperaturanstieg 24 Proteine induziert. Verantwortlich für die Induktion von 20 dieser Proteine ist ein einziges Protein, der Sigma Faktor 32 (σ^{32}). Dieser wird durch das Gen *htpR* (oder *rpoH*) kodiert, welches als Antwort auf Hitze vermehrt transkribiert wird. Sigma 32 interagiert mit der RNA-Polymerase und stimuliert spezifisch die Transkription an Hitzeschockpromotoren. Es konnte gezeigt werden, dass der zelluläre Anstieg von σ^{32} in direktem Zusammenhang mit der Transkription vom Hitzeschockpromotor steht und somit σ^{32} eine zentrale Rolle während der Hitzeschock-Antwort in *E. coli* spielt. Diese Studien zeigten auch, dass einige Proteine wie GroEL; GroES, DnaK, DnaJ und GrpE essentiell für das Wachstum bei allen Temperaturen sind, während anderen (Lon, LysU und HtpG) unter normalen Wachstumsbedingungen keine große Bedeutung zukommt (Yura et al., 1990).

Da molekulare Chaperone eine essentielle Rolle in einer jeden Zelle spielen, würde man annehmen, dass diese auch hoch konserviert in allen drei Domänen des Lebens vorkommen. Im Unterschied zu den *Bacteria* und den *Eukarya* wurden nur die kleinen HSPs, die Chaperonine, AAA ATPses und NAC ubiquitär in allen sequenzierten *Archaea* gefunden. Bei der Sequenzierung des Genoms von *P. torridus* wurden eine Reihe von ORFs gefunden, die putativ für Chaperone kodieren: das Hsp60 System, ein VAT Protein, eine Lon-2- ATPase, zwei Hsp20 Proteine und das komplette Hsp70 System DnaK, DnaJ und GrpE (Futterer et al., 2004). Dieses System wurde im euarchealen Zweig der Thermoacidophilen und der Methanogenen gefunden, ist aber bei den meisten anderen Archaeen nicht vorhanden (Futterer et al., 2004).

Da die Diversität innerhalb der *Archaea* sehr groß ist, erwartet man auch Unterschiede in der Hitzeschockantwort. Mesophile Archaeen, wie z.B. *Methanococcus voltae* und *Methanosarcina mazei* reagieren einerseits mit der Abnahme der Aktivität vieler Gene, aber auch mit dem Anstieg vieler Gene, den Hitzeschockgenen (Clarens et al., 1995; Hebert et al., 1991; Macario et al., 1999).

Die Hitzeschockantwort von Extremophilen ist faszinierend, wenn man bedenkt, dass diese Organismen bei Temperaturen leben, bei denen andere Zellen bereits die Grenze zur Lebensfähigkeit überschritten haben. So konnte z.B. für das hyperthermophile Archaeon ES4, einem heterotrophen Sulfat-Reduzierer, gezeigt werden, dass die Menge an Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 90 und 150 kDa mit steigender Temperatur deutlich abnimmt, während ein 98 kDa Protein, welches bei normalen Temperaturen (76 bis 99°C) sehr gering exprimiert wird, durch einen Temperaturanstieg auf 102°C zu einer deutlichen Überexpression führt (Holden and Baross, 1993). Das hyperthermophilste, bis jetzt bekannte, Archaeon *Pyrodictium occultum* synthetisiert bei einem Temperaturanstieg von 102°C auf 108°C vermehrt einen ATPase-Komplex, später als Thermosom bekannt (Phipps et al., 1991). Dieser Komplex zeigte eine sehr extreme thermostabile ATPase-Aktivität mit einem Temperaturoptimum von 100°C. Thermosomen des gleichen Typs wurden auch bei den hyperthermophilen *Methanopyrus kandleri* und *Thermoplasma acidophilum* identifiziert (Andra et al., 1996; Waldmann et al., 1995a; Waldmann et al., 1995b).

Für die Stress-Antwort auf osmotischen Stress, der mit hohen Salzkonzentrationen einhergeht, sind bei Archaeen zwei Mechanismen bekannt. Halobakterien besitzen den so genannten „Salz im Zytoplasma“-Mechanismus, bei dem anorganische Ionen, hauptsächlich K^+ und Cl^- , im Zytoplasma angesammelt werden, bis die intrazelluläre Salzkonzentration der der Konzentration der äußeren salzhaltigen Umgebung entspricht (Oren, 1999; Oren et al., 2002). Diese Strategie benötigt aber eine weit reichende Anpassung der intrazellulären Maschinerie an die hohen Salzkonzentrationen, und ist somit auf bestimmte Konzentrationen begrenzt (Muller et al., 2005). Eine zweite Strategie ist die Akkumulation von kompatiblen Soluten in der Zelle. Kompatible Solute enthalten kleine, lösliche organische Moleküle, die in hoher Konzentration in der Zelle angesammelt werden. Sie stören bzw. interagieren dabei aber nicht mit zellulären Funktionen (de Macario and Macario, 2000). Die Mechanismen, die für die Generierung von kompatiblen Soluten verantwortlich sind, schließen den metabolischen Stoffwechsel ein und sind sehr komplex. Bakterien und Hefezellen häufen in der Zelle als Antwort auf steigende $NaCl$ -Konzentrationen Solute wie Glycerol und Glycin Betain an. Dabei erfolgt eine Induktion der Gene der Glycerol-Dissimilation und ein Umsatz von Trehalose (Blomberg, 2000). Archaeen synthetisieren eher ungewöhnliche Moleküle wie β -Aminosäure, N^ϵ -Acetyl- β -Lysin, Mannosylglycerat und di-myo-inositol-Phosphat. Eine mögliche Erklärung für die Bevorzugung von anionischen Soluten ist, dass damit die hohe intrazelluläre Konzentration an anorganischen Kationen, wie K^+ (in den meisten Archaeen), ausgeglichen wird (Muller et al., 2005). Die Aufnahme von Substanzen wie Glycin wird bevorzugt über *de novo* Synthese vollzogen.

Ein weiteres kompatibles Solut ist die Trehalose. Sie ist ein nicht-reduzierendes Dissaccharid, welches in der Zelle als Reaktion auf Hitze, Kälte oder osmotischen Stress eingelagert wird (Avonce et al., 2006).

Die Anhäufung von Trehalose als Stress-Antwort gegen einen sinkenden pH-Wert konnte bis jetzt noch nicht gezeigt werden. Interessanterweise besitzt *P. torridus* in seinem Genom alle Gene für die Synthese von Trehalose (Cardoso et al., 2007). Es ist daher vorstellbar, dass Trehalose eine Rolle in der Stabilisierung von Zellmembranen spielt, die das Überleben bei sehr niedrigen pH-Werten ermöglicht.

Pathogene Bakterien, die wir z.B. über die Nahrung aufnehmen, müssen, um sich zu vermehren oder ihre Pathogenität zu entfalten, zuerst durch den Magen. Der Magen mit einem pH-Wert von 2 ist eine große Barriere für solche Organismen (Smith, 2003). *E. coli*, der bevorzugt in neutralem Medium angesiedelt ist, ist in der Lage, mehrere Stunden bei einem pH-Wert von 2 zu überleben. Mit dieser Eigenschaft kommt er fast einem *Helicobacter pylori* gleich, der ein Überlebenskünstler ist, wenn es um saures Milieu geht (Gorden and Small, 1993; Small et al., 1994). Im Jahre 1995 wurden erstmals die drei grundlegenden Systeme der Säureresistenz (acid resistance, AR) in *E. coli* beschrieben (Lin et al., 1995). Das am wenigsten bis jetzt verstandene ist AR1. Dieses kommt zum Tragen, wenn Zellen bis zur stationären Phase im LB-Medium angezogen werden, welches auf pH 5.5 eingestellt ist. Diese Säure-adaptierten Zellen können dann im Minimalmedium bei pH 2.5 überleben, in dem Zellen, die vorher in LB Medium pH 8 gewachsen sind, sofort sterben. Für diese Säuretoleranz werden der Sigma-Faktor σ^S und das globale regulatorische Protein CRP (cAMP Rezeptor Protein) benötigt (Castanie-Cornet et al., 1999). Wie aufgrund der Beteiligung von CRP vorhergesagt werden kann, wird AR1 durch Glucose reprimiert. Durch diese Repression konnten die beiden anderen, Aminosäure abhängigen, Systeme aufgedeckt werden. Zellen, die in glucosehaltigem LB-Medium angezogen wurden, konnten nur in Medium pH 2.5 überleben, wenn Glutamat (AR2 s. Abb. 6a) oder Arginin (AR3, s. Abb. 6b) dazugegeben wurde (Foster, 2004). Diesen Systemen zugehörig sind die entsprechenden Aminosäure-Decarboxylasen und Antiporter (GadC und AdiC), die die decarboxylierten Produkte gegen neue Aminosäuren als Substrat austauschen (Fang et al., 2007; Iyer et al., 2002; Richard and Foster, 2004).

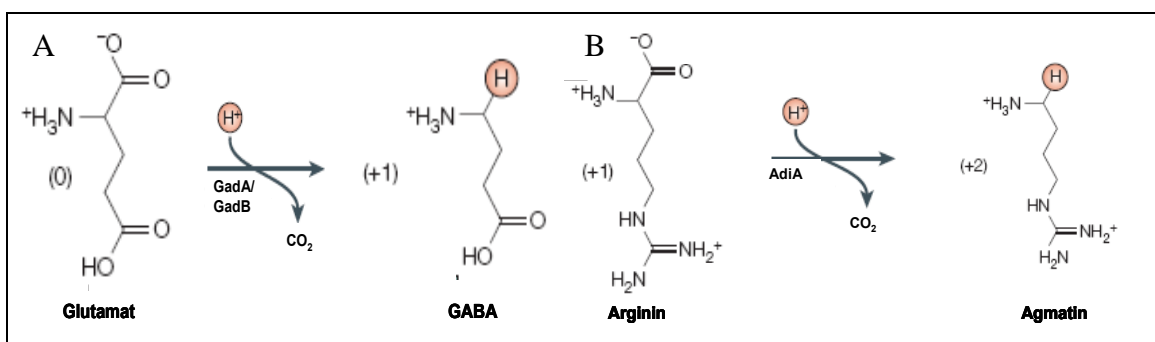


Abb. 6 Verbrauch der Protonen während der Decarboxylierung von Glutamat (a) und Arginin (b). Die Zahlen in Klammern geben die Ladung während des Prozesses an. Die roten Kreise markieren die Zugabe eines Protons. GABA = γ -amino Butyrat. Modifiziert nach (Foster, 2004).

Zusätzlich zu diesen Systemen wurde angenommen, dass der prokaryotische Chlorid-Transporter auch eine Rolle spielt bei der Säureresistenz von *E. coli*. Es konnte dann gezeigt werden, dass diese Proteine als H⁺/Cl Antiporter arbeiten (Accardi and Miller, 2004). Interessanterweise kodieren die Genome von Acidophilen einen Überschuss an Aminosäure-Transportern und Cl⁻ Chlorid-Kanäle. Die Orthologe der *E. coli* Proteine GadA/GadC sind auch in den Genomen verschiedener acidophiler Archaeen kodiert. Auch *P. torridus* verfügt über diese Gene (Angelov and Liebl, 2006). Vossenbergh *et.al* konnten anhand von *P. oshimae* zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen der L-Glutamat-Aufnahme und einer pH-Erniedrigung gibt. Sie konnten zeigen, dass die Glutamat-Aufnahme in der Zelle zunimmt, wenn der extrazelluläre pH-Wert sinkt (van de et al., 1998).

Während *E. coli* nur für kurze Zeitperioden Säure-Stress überleben muss, müssen acidophile Archaeen ständig mit diesen extremen Bedingungen umgehen und ihren Stoffwechsel darauf einstellen. Daher sind auch verschiedene physiologische Mechanismen für die Säure-Toleranz anzunehmen.

1.5. PROTEOM UND PROTEOMICS

Der Begriff „Proteom“ wurde erstmals 1994 von Marc Wilkins eingeführt. Er beschreibt die Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder Organismus, die zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert werden. So sind Proteine, deren Zusammenspiel und Zusammensetzung Spiegel der Diversität des Lebens (Wilkins et al., 1996a; Wilkins et al., 1996b).

Im Gegensatz zu dem relativ statischen System des Genoms, welches in jeder Zelle und in jedem Entwicklungszustand des Organismus unverändert vorliegt, ist das Proteom einer Zelle hochgradig dynamisch. Einerseits ist die Proteinbiosynthese zell- und gewebespezifisch und andererseits kann die qualitative und quantitative Zusammensetzung durch sekundäre, sich verändernde Bedingungen wie z.B. Umweltfaktoren, Temperatur oder Wirkstoffgabe variieren. Posttranslationale Modifikationen wie z.B. Methylierung oder Phosphorylierungen von Proteinen, die in der Signaltransduktion eine sehr wichtige Rolle spielen, erhöhen diese Variabilität zusätzlich um ein Vielfaches (Pawson and Scott, 2005).

Die Proteomic umfasst in ihrem Forschungsgebiet die Untersuchung, Identifizierung und Katalogisierung ganzer Proteome oder Subproteome. Proteom-Analysen liefern daher Momentaufnahmen vom jeweiligen aktuellen „Zustand“ der Zellen in Abhängigkeit von ihrer Umgebung. Die großen Datenansammlungen, die durch Genomsequenzierungsprojekte erzeugt wurden, müssen nun in biologische Informationen umgewandelt werden, durch die Zuordnung zu den einzelnen Genen. Der Rückschluss vom Gen zum erzeugten Protein ist dabei nicht sehr einfach, da aus einem einzelnen Gen durch eine hohe kombinatorische Vielfalt wie z.B. alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen verschiedene Proteinprodukte entstehen können (Gygi et al., 1999b). Im Unterschied zu den Genen verschlüsseln Proteine mehrdimensionale Informationen, welche vielmehr die tatsächlichen als die potentiellen Funktionen darstellen. Darin enthalten sind u.a. die Menge, der Status der Modifikation, die subzelluläre Lokalisation, die dreidimensionale Struktur und Interaktionen mit anderen Molekülen. Die „Ein-Gen-Ein-Protein-Eine-Funktion-Hypothese“ ist somit hinfällig. Strohmman schreibt 1994: „Only two percent of our total disease load is related to monogenic causality, and even here the final phenotype is modulated by many factors.“ (Strohman, 1994). Quantität und Qualität des Transkriptoms, welches mit Hilfe der DNA-Chip Technologien, einer im Verhältnis zum Proteom einfacheren Detektion, zugänglich ist, lässt keine Aussagen über Abbau- und Transportphänomene, Prozessierungen und andere Modifikationen zu. Eine Funktionsanalyse, welche Rückschlüsse auf beteiligte Reaktions- und Regulationsnetzwerke sowie deren Relation zum Phänotyp zulässt, erfordert eine Verknüpfung des Proteoms mit den Analysen des Genoms, Transkriptoms und Metaboloms. Daher ist eine Untersuchung von Proteinen auf Proteinebene unerlässlich.

Die Verwendung des Begriffs Proteomics wurde mittlerweile erweitert. Man spricht z.B. von funktioneller Proteomics (Godovac-Zimmermann and Brown, 2001) oder struktureller Proteomics (Norin and Sundstrom, 2002).

Funktionelle Proteomics beschreibt die globale Analyse von Interaktionen, posttranslationale Modifikationen und molekularen Netzwerken. Dabei verwendet man nicht nur die 2D-Elektrophorese-Technik, sondern auch das Two-Hybrid-System (Uetz and Hughes, 2000), die Tandemaffinitätsaufreinigung (Gavin et al., 2002), die Immunopräzipitation (Ho et al., 2002), die

Oberflächenplasmonresonanz (Nedelkov and Nelson, 2001), die Immunopräzipitation mit Anti-Phosphotyrosin (Kaufmann et al., 2001; Stancato and Petricoin, 2001), die Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA, (Moll et al., 2006)) oder die Phosphorprotein-Isotopenkodierte Affinitätsmarkierung (Goshe et al., 2001) für Phosphorproteomics.

Das Feld der Proteomics ist ursprünglich aus der Technik der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE-PAGE) entstanden (Klose and Spielmann, 1975; O'Farrell, 1975). Mit dieser Technik wird versucht, die in den erzeugten Proteinmustern enthaltenen Informationen zur Lösung biologischer und medizinischer Fragestellungen zu nutzen. Der Vergleich von Proteinmustern aus verschiedenen definierten Zuständen mittels subtraktiver Analyse ermöglicht die Charakterisierung der Zustände durch Veränderungen im Proteinmuster. Die 2D-PAGE hat eine sehr große Anwendungsbreite:

- Zum Nachweis von bestimmten Mechanismen und Netzwerken, an denen Proteine beteiligt sind.
- Als Grundlagenforschung für Regulations- und Transportvorgänge, Metabolic Engineering oder Drug Targeting.
- Als Ausdruck des Phänotyps und deren genetische Mutationen (Klose, 1999).
- Zum Nachweis des Einflusses von externen Substanzen (z.B. Toxine, Medikamente) auf das Proteom und die daraus resultierenden Folgen.
- In der Medizin zum Erkennen von diagnostischen Markern (Liberatori et al., 1997; Posch et al., 1997).

Durch die Weiterentwicklung der Proteomanalyse ist damit zu rechnen, dass diese als schnelle und parallele Methode, verglichen mit der klassischen Proteinchemie, in wenigen Jahren standardmäßig in der biologischen Grundlagenforschung, der Biotechnologie und der medizinischen Forschung etabliert sein wird (Wilkins et al., 2006).

1.6. PROTEOMANALYSEN

Eine Voraussetzung für jede Proteomanalyse sind reproduzierbare Bedingungen für alle relevanten Parameter während der Probennahme, der Probenvorbereitung und der Durchführung (Hunt et al., 2005).

Die klassische Proteomanalyse beinhaltet folgende Schritte: die Probenvorbereitung, die Trennung der Proteine mit 2D-Elektrophorese (2DE), die Analyse der Gele, die Proteinidentifizierung und der Aufbau von 2DE-Datenbanken.

Die 2DE ist seit 1975 immer noch die wichtigste analytische Separationstechnik zur Trennung von Proteingemischen (Rabilloud, 2002), da sie die Technik mit der höchsten Auflösung zur Trennung von Proteinen ist (Klose and Kobalz, 1995). In der ersten Dimension erfolgt dabei die isoelektrische Fokussierung (IEF), wobei die Proteine als zwitterionische Moleküle im pH Gradienten zu dem Ort wandern, an dem ihre Nettoladung null ist. Daher ist die IEF eine Endpunktmethode. Die Entwicklung immobilisierter pH Gradienten (IPG) zur isoelektrischen Fokussierung ermöglichte ab Ende der achtziger Jahre reproduzierbares Arbeiten (Gorg et al., 1988). Für komplexe Proteingemische von Organismen ist es möglich, über chromatographische Trennmethode (Butt et al., 2001; Fountoulakis et al., 1999a; Fountoulakis et al., 1999b) die Proben vorzufractionieren und damit die Auflösung der IEF zu erhöhen. In der zweiten Dimension werden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese aufgrund ihrer Molekularmasse aufgetrennt (Gorg and Weiss, 1999; Walsh and Herbert, 1999).

Die Verwendung einer Technik zur Visualisierung der Proteine im 2DE-Gel hängt von der jeweiligen Aufgabenstellung ab. Die klassische Silberfärbung ist relativ sensitiv aber nur linear im Bereich von 0,5 – 20 ng. Hinzu kommt, dass sie aufgrund der Verwendung von Glutaraldehyd nicht für eine massenspektrometrische Analyse verwendet werden kann. Durch eine Färbung mit kolloidalem Coomassie lässt sich dieses umgehen (Houen et al., 1997; Matsui et al., 1999; Rabilloud, 1999), allerdings ist diese Färbemethode weniger sensitiv (linearer Bereich zwischen 50 ng – 1 µg). Neuartige fluoreszierende Proteinfarbstoffe wie z.B. SYPRO Ruby (Berggren et al., 2002; Patton, 2000) und Ruthenium(II)-tris-(bathophenanthrolindisulfonat) (Rabilloud et al., 2001) zeigen eine dem Silber ähnliche Sensitivität und haben auch eine sehr gute Kompatibilität gegenüber der Massenspektrometrie (Alban et al., 2003; Karp and Lilley, 2005; Lopez et al., 2000).

Die anschließende Quantifizierung erfolgt nach dem Färben der Proteine densitometrisch. In jedem Fall ist für die bildliche Verarbeitung gefärbter Gele

ein Laser- bzw. Durchlichtscanner notwendig, da nur ein solches Gerät den notwendigen dynamischen Bereich abdecken kann. Die Auswertung wird in den letzten Jahren immer mehr unterstützt durch verschiedene Bildverarbeitungsprogramme, wie das in dieser Arbeit verwendete Programm von Decodon Delta 2D, die eine Korrelation der Proteinmuster aus verschiedenen Gelen erleichtern und damit eine Auswertung verbessern (Dowsey et al., 2003; Raman et al., 2002).

Dennoch sind solche Strategien anfällig für Gelartefakte und daher angewiesen auf reproduzierbare Gelsysteme. Das sogenannte „Multiplexing“ beruht auf der DIGE (Differenzielle GelElektrophorese) Technologie und ermöglicht durch die Markierung der Proteine mit verschiedenen CyDye™ Fluoreszenz Farbstoffen das Darstellen von Unterschieden zweier verschiedener Proteinproben in einem Gel (Tonge et al., 2001; Unlu et al., 1997), wodurch man eine nachgeschaltete Spotkorrelation umgeht (s. Abb. 1.8).

Diese Technologie beschränkt sich nicht nur auf die klassische 2D-Elektrophorese, sondern kann prinzipiell für alle zweidimensionalen Elektrophorese-Techniken angewendet werden wie z.B. Blue-Native-PAGE (Perales et al., 2005) oder der 16-BAC-PAGE (Macfarlane, 1983; Macfarlane, 1989).

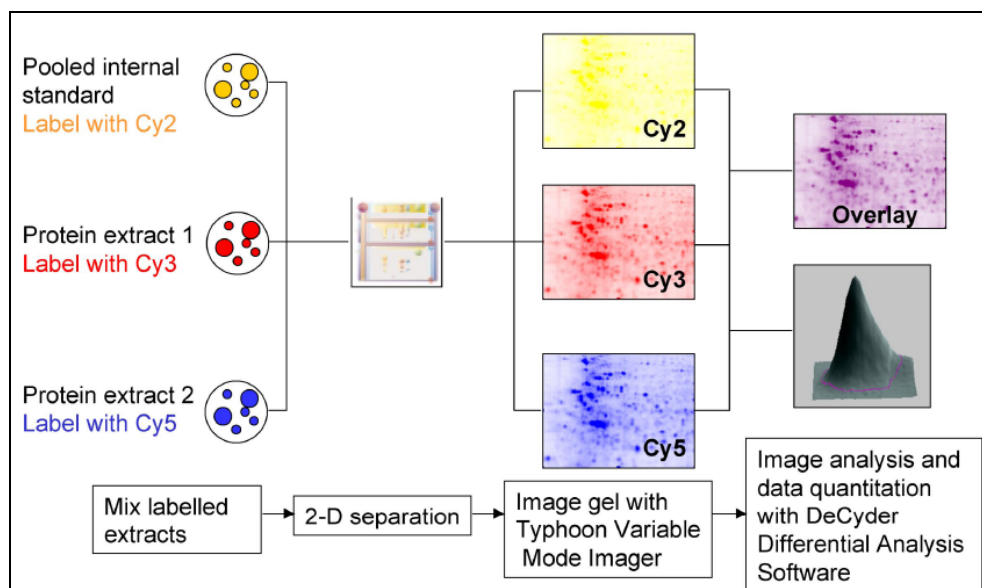


Abb. 7 DIGE System mit verschiedenen CyDye™ Fluoreszenz Farbstoffen (Ettan DIGE System Manuel, Amersham Biosciences)

Neben gelbasierten densitometrischen Strategien wurde eine Vielzahl Massenspektrometrie-basierender Techniken entwickelt.

Die rasante Entwicklung in den letzten 10 Jahren ermöglicht die Proteinidentifizierung mit PMF oder LC-MS/MS (Henzel et al., 1993; Mann and Wilm, 1994; Yates et al., 1995). Dadurch erfolgte ein Wechsel von der Ein-Protein-Analyse zum Analysieren von hoch komplexen Proteingemischen verschiedener Organismen (Wilkins et al., 2006).

Da in der Proteomanalytik sehr große Datenmengen anfallen, ist eine computergestützte Bearbeitung und Verwaltung nicht mehr wegzudenken. In Proteomdatenbanken werden 2DE-Gelbilder mit theoretischen und tatsächlichen Molekulargewichten, isoelektrischen Punkten, den Proteinamen, der Zugangsnummer (NCBI; Swiss-Prot) und der Identifizierungsmethode gesammelt. Biologisch relevante Informationen über die Diversität von Proteomen wurden bisher durch die Kombination von 2DE und Massenspektrometrie ermöglicht. Trotz ihrer Wichtigkeit in der Proteomanalyse hat die 2DE einige Einschränkungen:

- fehlende Automatisierung
- begrenzte Reproduzierbarkeit
- langsame und technisch schwierige Durchführung
- Gefahr von Proteinverlusten beim Transfer von der ersten zur zweiten Dimension
- Proteine mit extremen Eigenschaften (z.B. Membranproteine) sind unterrepräsentiert
- keine ausreichende Dynamik, d.h. sehr seltene Proteine können nicht gleichzeitig neben sehr häufigen Proteinen dargestellt werden (Gygi et al., 2000).

Mit der differentiellen Gelelektrophorese (DIGE) (Tonge et al., 2001; Unlu et al., 1997), dem molekularen Scanner (Bienvenut et al., 1999; Binz et al., 1999) und der Kombination der isotopencodierten Affinitätsmarkierung (ICAT, Isotope coded affinity tag) mit 2DE (Smolka et al., 2002) wurden in den letzten Jahren wichtige Entwicklungen zur Proteomanalyse geliefert.

Derzeit wird die multidimensionale Flüssigkeitschromatographie (Multidimensional liquid chromatography, MDLC) (Washburn et al., 2001) weiterentwickelt, was die Proteomanalyse ohne 2DE ermöglicht, ebenso wie die

isotopenkodierte Affinitätsmarkierung (Gygi et al., 1999a; Zhou et al., 2002), die mit der direkten Identifizierung und Quantifizierung der Proteine mit MS/MS kombiniert wird. Damit wurden auch stark unterexprimierte Proteine und solche mit extremen Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt identifiziert. Durch Entwicklung von Proteinchips erhofft man sich ebenfalls eine Verbesserung der klassischen Proteomanalyse hinsichtlich der Automatisierung, der Kosten, der Reproduzierbarkeit und des Durchsatzes (Figeys and Pinto, 2001; Wilkins et al., 2006).

1.7. ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollen ausgewählte Dehydrogenasen aus *P. torridus* heterolog exprimiert und anschließend biochemisch charakterisiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll die Stressantwort in *P. torridus* untersucht werden. Mittels vergleichender 2D-Gelelektrophorese sollen alle auf einem 2D-Gel sichtbaren Veränderungen bei verschiedenen Stresssituationen identifiziert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. ORGANISMEN UND PLASMIDE

In den Tabellen 1-3 sind die verwendeten Organismen, Plasmide und Oligonukleotide aufgeführt.

Organismen

Tab. 1 Verwendete Organismen

Stamm	Beschreibung ¹⁾	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
XL1 Blue	<i>recA thi hsdR1 supE44 relA1</i> <i>lacF proAB lacI^q lacZΔM15 Tn10[Tet]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
Ros2 (DE3)	F <i>ompT hsdS_B (r⁻_B m⁻_B) gal dcm</i> <i>lacY1 (DE3) pRARE⁶ (Cm^r)</i>	Novagen
BL21 (DE3)	F <i>ompT hsdS_B (r⁻_B m⁻_B)</i> <i>gal dcm (DE3)</i>	Novagen
CodonPlus(DE3)-RiPL	B F ⁻ <i>ompT hsdS (r⁻_B m⁻_B)</i> <i>dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA</i> Hte [<i>argU proL Cam^r</i>] [<i>argU ileY leuW Strep/Spec^r</i>]	Stratagene
BL21 RS	F <i>ompT hsdS_B (r⁻_B m⁻_B) gal dcm</i> (DE3) [<i>argU ileY leuW Strep/Spec^r</i>]	eigene Herstellg.
ECL 707	F <i>gld: : ΔTn10 gpK: : ΔTn10 ptsD: :</i> <i>ΔTn10 araD139 flb Δ(lacU169)</i> <i>ptsF25 relA rpsL thi</i>	Sprenger <i>et al.</i> 1989
EPI300-T1 [®]	F <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1</i> <i>endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU</i> <i>gaK λ rpsL nupG trfA tonA dhfr</i>	Epicentre

Picrophilus

<i>P. torridus</i>	DSM 9790	Schleper <i>et al.</i> ,1995
<i>P. oshimae</i>	DSM 9789	Schleper <i>et al.</i> ,1995

¹⁾Geno- und Phänotypbezeichnung: s. Bachmann (1987)

Plasmide**Tab. 2: verwendete Plasmide**

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBADmycHis A	4,1 kb, <i>araBAD</i> -Promotor Amp [®]	Invitrogen
pET22b	5,4 kb, T7 Promotor <i>lacI</i> Amp [®]	Novagen
pET24d	5,4 kb, T7 Promotor <i>lacI</i> Kan [®]	Novagen
pMAL c2x	6,6 kb, Tac Promotor <i>lacI</i> Amp [®]	NEB
pBAD::201	5,3 kb, <i>araBAD</i> -Promotor Amp [®]	eigene Herstellung
pBAD::605	5,1 kb, <i>araBAD</i> -Promotor Amp [®]	eigene Herstellung
pBAD::1123	4,9 kb, <i>araBAD</i> -Promotor Amp [®]	eigene Herstellung
pBAD::1538	5,2 kb, <i>araBAD</i> -Promotor Amp [®]	eigene Herstellung
pMALc2x::201	7,8 kb, T7 Promotor <i>lacI</i> Amp [®]	eigene Herstellung
pMALc2x::605	7,6 kb, T7 Promotor <i>lacI</i> Amp [®]	eigene Herstellung
pMALc2x::1123	7,5 kb, T7 Promotor <i>lacI</i> Amp [®]	eigene Herstellung
pMALc2x::1538	7,7 kb, T7 Promotor <i>lacI</i> Amp [®]	eigene Herstellung
pEX22b::201	6,8 kb, T7 Promotor <i>lacI</i> Amp [®]	eigene Herstellung

pEX22b::605	6,6 kb, T7 Promotor <i>lacI</i> Amp [®]	eigene Herstellung
pEX22b::1123	6,4 kb, T7 Promotor <i>lacI</i> Amp [®]	eigene Herstellung
pEX22b::1538	6,7 kb, T7 Promotor <i>lacI</i> Amp [®]	eigene Herstellung

Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG, Berlin synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 3 verwendete Oligonukleotide

Primername	Sequenz	Funktion
201 for	5' AATTTCAACAAGATAAAGAGCATG 3'	PTO0201
201 rev_ <i>Xho</i> I	5' GACTCGAGGAACTCCATACCTGCCTTT 3'	PTO0201
605 for	5' AAGGCAATGGTACTAGAAAAGGTAG 3'	PTO0605
605 rev_ <i>Xho</i> I	5' TACTCGAGATTAATACATCTTAAGAACGGC 3'	PTO0605
1123 for	5' CGGGGCCTTAAAAATAAAAATGT 3'	PTO1123
1123 rev_ <i>Xho</i> I	5' TACTCGAGTCCTCAAGATTGATTTTTTCCA 3'	PTO1123
1538 for	5' AAGGCAATAATAGTTCATCCTC 3'	PTO1538
1538 rev_ <i>Xho</i> I	5' AAGGCAATAATAGTTCATCCTC 3'	PTO1538
pCC1 TM for	5' GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG 3'	pEpiFOS TM
pCC1 TM rev	5' CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC 3'	pEpiFOS TM
<i>malE</i> for	5' GCGGTCGTCAGACTGTCGATG 3'	pMAL 2cx
M13 rev	5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'	pMAL 2cx
pBAD for	5' AGATTAGCGGATCCTACCTG 3'	pBAD
pBAD rev	5' ACCGCTTCTGCGTTCTGATT 3'	pBAD
T7 for	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	pET22b
T7 rev	5' CTAGTTATTGCTCAGCGG 3'	pET22b

2.2. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1. Zellanzucht von *E. coli*

Alle *E. coli*-Stämme wurden aerob bei 37 °C schwenkend auf einem Rundschüttler (Infors HT, Bottmingen, CH) in LB-Medium unter Selektionsdruck angezogen. Dabei wurden Reagenzgläser oder Erlenmeyerkolben verwendet, deren Volumina dem Zehnfachen des Kulturvolumens entsprachen. Vorkulturen wurden aus Stammkulturen angeimpft. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher vorsichtig in die Stammkultur gepickt und dieser dann in einem Reagenzglas mitgeschüttelt. Größere Volumina wurden dann daraus je 1%ig angeimpft. Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen auf LB-Agar-Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank (Brutschrank HT TR 225, Infors AG).

Die Kulturen wurden regelmäßig mikroskopisch (Olympus BX41) auf ihre Homogenität untersucht, um eine Kontamination auszuschließen.

LB-Medium:

- 10 % (w/v) Trypton
- 5 % (w/v) Hefeextrakt
- 5 % (w/v) NaCl
- autoklavieren

LB-Agar:

- LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar
- autoklavieren

In der folgenden Tabelle sind die jeweiligen Konzentrationen der verwendeten Medienzusätze dargestellt.

Tab. 4 Konzentration der verwendeten Medienzusätze

Substanz	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
		[mg/ml]	[µg/ml]
Ampicillin	H ₂ O _{bidest}	100	100
Streptomycin	H ₂ O _{bidest}	50	50
Kanamycin	H ₂ O _{bidest}	50	50
Chloramphenicol	H ₂ O _{bidest}	34	34
Tetrazyclin	Ethanol [50% v/v]	10	10
IPTG	H ₂ O _{bidest}	100	100
X-Gal	Dimethylformamid	50	50

2.2.2. Zellanzucht von *Picrophilus torridus*

P. torridus wurde in 30 ml Flüssigkulturen aerob bei 60°C im Brutschrank angezogen. Für Volumina ab 100 ml wurde der Organismus langsam schwenkend (50 rpm) auf einem Schüttelinkubator (InnovaTM4400, New Brunswick) kultiviert. Die Zellen wurden in Brock Medium (Schleper et al., 1995b) mit einem für den Organismus optimalen pH Wert von 1 angezogen.

Brock Medium

100 x Brock (für 1 Liter)

130 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

2 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

→ sterilfiltrieren

200 x Brock (für 1 Liter)

56 g KH_2PO_4

Spurenelemente Stammlösungen:

36 ml MnCl_2

(10 mg/ml)

4, 4 ml ZnSO_4

1 ml CuCl_2

0, 6 ml VOSO_4

0, 2 ml CoSO_4

90 μl $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$

0,6 ml Na_2MoO_4

5 % H_2SO_4

→ autoklavieren

1000 x Brock (für 200 ml)

14 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (= 0,5 M)

→ autoklavieren

1 Liter 1 x Brock Medium:

10 ml 100 x Brock

5 ml 200 x Brock

1 ml 1000 x Brock

5 ml 10 % Hefeextrakt

21 ml gesamt

Die für 1 Liter entsprechende Menge $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wird mit der, dem pH-Wert entsprechenden Menge H_2SO_4 aufgefüllt (gesamt: 979 ml autoklavieren).

Für die durchgeführten Experimente wurde der pH Wert des *P. torridus* Mediums entsprechend eingestellt (s. Tab. 5)

Tab. 5 pH Einstellung des Brock Mediums

pH-Wert	Molarität (H_2SO_4)	Menge (H_2SO_4)	Menge $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$
0	1 M	55 ml	919 ml
0,3	0,5 M	27,7 ml	946,3 ml
0,5	0,31 M	17 ml	957 ml
0,7	0,2 M	11 ml	963 ml
1	0,1 M	5,5 ml	968,5 ml
1,8	0,015 M	0,825 ml	978,17 ml
2	0,01 M	0,55 ml	978,45 ml
3	0,001 M	0,055 ml	978,99 ml

2.2.3. Kryolagerung von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden von den Organismen Stammkulturen angelegt, die bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ über Jahre hinweg gelagert werden können und bei Bedarf aufgetaut und erneut kultiviert werden können.

Einfrieren von *E. coli* Zellkulturen

Für die Stammhaltung von *E. coli* Zellkulturen wurden 750 μl einer ü.N. Vorkultur mit 750 μl vorgekühltem Glycerol (87%) vermischt und sofort in Schraubdeckelreagiergefäßen weggefroren.

Einfrieren von *P. torridus* Zellkulturen

Für die Konservierung von *P. torridus* Zellen wurde Brock Medium mit pH 3 hergestellt und dieses mit 20 % (v/v) Glycerol vermischt. Es wurden 10 ml Zellen abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, Eppendorfcentrifuge 5810, Eppendorf, Hamburg), der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und die Zellen sofort weggefroren.

Auftauen

Zur erneuten Kultivierung von Stammkulturen wurden diese auf Eis langsam aufgetaut und frisches Medium damit 1 %ig angeimpft.

2.2.4. Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte von Flüssigkulturen wurde in Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt (Pharmacia Biotec; Ultraspec 3000), wobei als Nullwert unbeimpftes Medium verwendet wurde.

2.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.3.1. Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Bakterien sind in der Lage fremde DNA aufzunehmen. Diesen Vorgang macht man sich bei der Plasmidamplifikation zur Nutzen. Je nach Art der Transformation werden die Zellen kompetent gemacht.

Herstellung elektrokompenter Zellen

Es wurde 1 ml einer *E. coli* Bakterienvorkultur in 500 ml LB-Medium gegeben. Die Kultur wurde bei 37 °C und 220 rpm (Infors HT, Bottmingen, CH) geschüttelt, bis diese auf eine OD_{600nm} von 0,6 – 0,8 angewachsen war. Die Zellen wurden 15 min bei 5000 rpm abzentrifugiert (Sorval[®] Instruments RC6, Bad Homburg). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 1 Volumen eiskaltem, autoklavierten Wasser gewaschen und 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit ½ Volumen Wasser wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem, filtrierten Glycerol (10%) aufgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde 10 min bei maximal 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl Glycerol (10%) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C gelagert.

Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Es wurden 2 ml einer *E. coli* Bakterienkultivorkultur in 100 ml LB-Medium gegeben. Diese wurde bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert (Infors HT, Bottmingen, CH). Die Zellen wurden 10 min bei 3500 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 100 ml eiskaltem CaCl_2 (50 mM) resuspendiert und für 15 – 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 3500 rpm abzentrifugiert (Sorval® Instruments RC6, Bad Homburg) und das Pellet in 18 ml CaCl_2 (50 mM) + 2,7 ml eiskaltem Glycerol (100 %) aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C gelagert.

2.3.2. Transformation kompetenter Bakterien

Plasmid-DNA wird zur Amplifikation in *E. coli* transformiert. Dieses wird entweder durch Elektroporation oder durch eine klassische Hitzeschock-Transformation durchgeführt. Der Vorteil der Elektroporation liegt in der höheren Effizienz, während man bei der klassischen Transformation größere DNA-Mengen einsetzen kann. Die erfolgreich transformierten Zellen werden anhand einer vom Plasmid codierten Antibiotikaresistenz selektiert.

Elektroporation

40 µl elektrokompente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 1 ng DNA oder 1,5 µl eines Ligationsansatzes wurden zu den Zellen dazupipettiert und mit der Pipettenspitze vorsichtig durchmischt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde der komplette Ansatz in eine bereits vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und in den Elektroporator (GENE Pulser® II, BioRAD) mit der Einstellung (2500 V, 25 µF, 200 Ω) gestellt. Die resultierenden Entladungszeiten sollten zwischen 4,5 und 5 ms liegen. Sofort nach dem Auslösen des Impulses wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Glucose-Medium dazugegeben und gut gemischt. Der Ansatz wurde in einem Eppendorf Reaktionsgefäß 30 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Volumina dieser Kultur (10 µl, 50 µl, 100 µl) auf eine LB-Agar-Platte, welche das dem Selektionsmarker entsprechende Antibiotikum enthielt,

500 µl) gewaschen, in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac[®] Plus SC110A, Savant) getrocknet und in 30-50 µl sterilem H₂O_{bideest} aufgenommen.

2.3.3.3. Plasmidpräparation

Mini-Präparation (TENS-Methode)

Diese Methode liefert schnell ausreichende Mengen an Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen. Dadurch wird ein effizientes Screening der aus der Transformation hervorgegangenen Einzelkolonien, die das gewünschte Konstrukt enthalten, gewährleistet.

Eine Einzelkolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, in 1 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler (Infors HT, Bottmingen, CH) inkubiert. Die Kultur wurde für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus instruments). Der Überstand wurde bis auf einen Rest von 50 -100 µl verworfen und das Pellet dann in dem restlichen Medium durch Vortexen (Vortex Genie V2, Scientific Industrie) resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl TENS-Puffer dazugegeben und die Lösung 2 - 5 s gevortext. Durch den daraus resultierenden Aufschluss der Zellen wird die Lösung viskos, da sich nun alle Zellbestandteile in Lösung befinden. Das Reaktionsgefäß wurde für 2 min auf Eis gestellt. Dann wurden 150 µl Natrium-Acetat (3 M, pH 5,2) dazugegeben, die Lösung gevortext und erneut auf Eis gestellt. Durch die hohe Ionenstärke fällt das im Aufschlusspuffer enthaltene SDS aus, wobei sowohl Zelltrümmer, als auch Proteine und die denaturierte chromosomale DNA in Salz-Detergens Komplexe eingeschlossen werden, während die viel kleinere Plasmid-DNA korrekt renaturiert und in Lösung bleibt. Nach fünfminütiger Zentrifugation wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben und 400 µl Isopropanol dazupipettiert. Die Lösung wurde erneut für 5 min zentrifugiert und somit die Plasmid-DNA und übrige RNA präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol bei 37 °C getrocknet und am Ende in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Für Restriktionsanalysen wurden 6-10 µl dieser DNA eingesetzt. Zusätzlich wurden noch 0,5 µl RNase A dazugeben, da beim Zellaufschluss nicht die komplette RNA gespalten wurde.

TENS-Puffer:	9, 2 ml TE
	0,5 ml 10 % SDS
	0,1 ml 10 M NaOH
	0,2 ml RNase A

Präparation mit dem QIAGEN Mini/Midi-Prep Kit

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen ($0,1-06 \mu\text{g ml}^{-1}$) zu gewinnen, wurde das Präparations-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die hier verwendete Aufreinigung über Ionenaustauscher-Chromatographie ermöglicht die Gewinnung von Plasmid-DNA in hoch reiner Form. Sehr „saubere“ DNA benötigt man zum Klonieren und Sequenzieren.

Für eine Midi-Präparation wurden 50 ml einer *E. coli* ü.N.-Kultur für 10 min bei $4000 \times g$ abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Bakterienzellen lysiert. Anschließend wurde das Lysat mit 4 ml Puffer P3 neutralisiert und 15 min auf Eis inkubiert, um ein leichteres Ausfällen von Proteinen und genomischer DNA zu ermöglichen. Es folgte eine 30 minütige Zentrifugation bei $20000 \times g$, nach der der Überstand auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte DEAE-Ionenaustauschersäule (Qiagen-tip 100) gegeben wurde. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen, um RNA und andere Verunreinigungen zu entfernen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 5 ml Puffer QF. Das Eluat wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und Zentrifugation bei $15000 \times g$ für 30 min gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde das DNA-Sediment luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (100-200 μl) resuspendiert. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Für Plasmid-Mini-Präparationen wurden alle Schritte in zehnfach geringeren Volumina durchgeführt, wobei die finale Präzipitation mit Isopropanol wegfiel und die DNA direkt nach der Elution von der Säule weiterverarbeitet wurde.

Puffer für Plasmidpräparation

P1:	50 mM Tris·Cl, pH 8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
P2 (Lyse):	0, 2 M NaOH 1 % SDS
P3 (Neutralisation):	3 M K-Acetat, pH 5, 5
QBT (Equilibrierung):	0, 75 M NaCl 50 mM MOPS pH 7 15 % Isopropanol 0, 15 % Triton X-100
QF (Elution):	1, 25 M NaCl 50 mM Tris/HCl pH, 8,5 15 % Isopropanol
Mops-Puffer, 10x:	200 mM 3(N-Morpholino)-Propansulfonsäure 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA mit 10M NaOH auf pH 7.0 einstellen, lichtgeschützt

2.3.3.4. Isolierung von genomischer DNA aus *P. torridus*

10 ml einer *P. torridus* Kultur wurden für 10 min bei 4000 rpm geerntet (Eppendorfcentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg). Das Pellet wurde in 250 µl TE-Saccharose Puffer und 250 µl Lysozym-Rnase-Lösung resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurden 250 µl N-Lauryl-Sarcosine-Proteinase K Lösung dazupipettiert. Es erfolgte eine erneute Inkubation für mindestens 1 h bei 37 °C. Nach erfolgreichem Zellaufschluss wurde die Lösung transparent und viskos. Die Lösung wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.3.3.1) unterzogen und anschließend die DNA mit Isopropanol gefällt (s.

2.3.3.2). Das getrocknete Pellet wurde ü.N. bei 4 °C in 50-100 µl H₂O_{bidest} oder TE-Puffer resuspendiert. Die Reinheit und Qualität der DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.3.9) überprüft.

TE-Saccharose: Saccharose 20 % (w/v)
in TE-Puffer,
steril filtrieren

Lysozym-RNase: Lysozym 100 mg/ml
RNase Lösung 1 % (v/v)
in TE-Puffer,
frisch ansetzen

N-Lauryl-Sarcosine-Proteinase K: N-Lauryl-Sarcosine 5 % (w/v)
Proteinase K ~ 1 mg/ml
in H₂O_{bidest},
frisch ansetzen

2.3.3.5. Isolierung genomischer DNA aus *P. torridus* mittels AquaPure Genomic DNA Kit BioRAD

Eine *P. torridus* Zellkultur (10 ml) wurde für 5 min bei 4000 rpm (Eppendorfcentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg) geerntet. Das Pellet wurde in 30 µl Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5) resuspendiert und danach 300 µl genomische DNA Lyse-Lösung dazupipettiert. Das Eppendorfreagiergefäß wurde vorsichtig geschwenkt, um ein Scheren der genomischen DNA zu vermeiden. Anschließend wurde die Probe so lange bei 37 °C inkubiert, bis die Lösung klar und homogen wurde. Danach wurden 1,5 µl RNase A Lösung (4 mg/ml) zu dem Zellysate dazupipettiert, vorsichtig geschwenkt und bis zu 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe wieder auf RT abgekühlt und 100 µl Protein-Präzipitations-Puffer dazugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Probe für 5 min bei 11000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus instruments) abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß gegossen und dann die DNA mit 300 µl

Isopropanol gefällt. Die gefällte DNA wurde anschließend gewaschen und ü.N. bei RT resuspendiert.

2.3.4. Bestimmung der DNA Konzentration

Die DNA Konzentration wurde mit dem NanoDrop® ND-1000 bestimmt. Durch die Nutzung dieses Gerätes entfallen der Gebrauch von Küvetten und die Herstellung großer Verdünnungen. Die Konzentration einer Probe mit einem Volumen von 1 µl kann ebenso wie deren Reinheit hiermit sofort bestimmt werden (s. ND-1000 Spektrophotometer V3.3 User's manual).

2.3.5. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

DNA lässt sich durch Restriktionsendonukleasen an definierten Stellen spalten. Man unterscheidet hierbei Typ1 und Typ2 Restriktionsendonukleasen. Jene vom Typ1 erkennen eine jeweils definierte Nukleotidsequenz, schneiden aber unspezifisch außerhalb dieser Erkennungssequenz, weshalb sie für die meisten molekularbiologischen Methoden ungeeignet sind. Typ2 Restriktionsendonukleasen schneiden an definierter Stelle innerhalb der Erkennungssequenz. Je nach verwendetem Enzym können Spaltprodukte mit glatten oder klebrigen Enden entstehen. Bei den Produkten mit klebrigen Enden muss man zudem zwischen solchen mit 3' Überhängen und solchen mit 5' Überhängen unterscheiden, da dies von entscheidender Bedeutung für die Verwendbarkeit von diesen Restriktionsendonukleasen für bestimmte Methoden ist. Die Spaltprodukte können dann gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, was eine Größenabschätzung und die Isolierung einzelner Fragmente ermöglicht. (s. 2.3.9) Unit (U) stellt die standardisierte Einheit für Restriktionsendonukleasen dar, wobei eine Unit die Menge Enzym ist, die ein µg λ-DNA in einer Stunde verdaut. Die eingesetzte Menge Restriktionsenzym sollte dementsprechend an die Anzahl der Schnittstellen pro DNA-Molekül und auf die Anzahl der zu schneidenden Moleküle angepasst werden. Für einen analytischen Verdau wurde standardmäßig meist 1 µl (i.d.R. 1 U) eingesetzt. Der Verdau erfolgte in einem vom Hersteller mitgelieferten und auf die entsprechenden Enzyme abgestimmten Puffer.

Analytischer Restriktionsverdau

x µl DNA (bis zu 1 µg)

2 µl 10 x Puffer

x µl Restriktionsenzym(e)

(5 µl RNase A, 1 mg/ml)

ad 20 µl H₂O_{bidest}

Präparativer Restriktionsverdau

x µl DNA (bis zu 10 µg)

5 µl 10 x Puffer

x µl Restriktionsenzym(e)

(5 µl RNase A, 1 mg/ml)

ad 50 µl H₂O_{bidest}

2.3.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Mitte der Achtziger Jahre entwickelte Polymerasekettenreaktion ist ein wichtiges und nicht mehr wegzudenkendes Hilfsmittel in der DNA-Analytik geworden. Mit der PCR ist es möglich, DNA Fragmente, von denen die Sequenz zumindest teilweise bekannt ist, zu amplifizieren. Dies ermöglicht einerseits den präparativen Einsatz der PCR zur Herstellung großer DNA-Mengen, die kloniert, sequenziert oder als Matrize für *in vitro* Transkriptionen verwendet werden können, andererseits kann die PCR-Methode auch für analytische Zwecke eingesetzt werden. Ihre hohe Sensitivität erlaubt die Detektion sehr geringer DNA Mengen.

Für die Automatisierung des Vorgangs bedient man sich hitzestabiler DNA-Polymerasen. Im ersten Schritt wird die als Matrize (=Template) fungierende DNA durch Erhitzen denaturiert, woraufhin sich im folgenden Schritt die Primer spezifisch an die DNA-Einzelstränge anlagern können (= Annealing). Auf die Hybridisierung der Oligonukleotide folgt die Synthesereaktion, in der die DNA-Polymerase ausgehend von den 3' OH-Enden der Primer die DNA-Stränge verlängert. Der Zyklus aus Denaturieren, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese wird 20-30 mal durchlaufen, wobei jeder neu synthetisierte Strang im folgenden Zyklus als Template dienen kann, so dass die gewünschte Sequenz theoretisch exponentiell vermehrt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR eingesetzt, um DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Damit das Fragment über die passenden Restriktionsschnittstellen für eine nachfolgende Klonierung verfügt, wurden die Primer so synthetisiert, dass das Amplifikat nach der Reaktion einen entsprechenden Restriktionsverdau erlaubte. Als DNA-Polymerase wurde entweder eine *Taq*-Polymerase oder *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Letztere besitzt aufgrund ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine geringere Fehlerrate beim Baseneinbau als die *Taq*-Polymerase.

Reaktionsansatz:

10–50 ng Template-DNA
0,5 µM je Primer
200 µM dNTPs
10 µl 10x *Taq*- bzw. *Pfu*-Reaktionspuffer
1 - 2,5 U der DNA-Polymerase
ad 50 µl H₂O_{bidest}

Die Reaktion wurde in einem programmierbaren Gradientencycler (PTC 200, MJ Research) durchgeführt.

PCR-Programm:

5 min 95 °C (Denaturierung)
25-30 Zyklen: 1 min 95 °C (Denaturierung)
30 s 50-60 °C (Primer Annealing)
45 s 72 °C (DNA-Synthese)
10 min 72 °C (finale Extension)

Das PCR-Programm wurde, entsprechend der Schmelztemperatur (T_m) von den verwendeten Primer, variiert. Dabei liegt die Annealing-Temperatur um 5 - 10 °C unter der T_m der Primer.

PCR-Produkte, die für Klonierungszwecke bestimmt waren, wurden im Anschluss an eine erfolgreiche Klonierung sequenziert, um eventuelle, durch die PCR entstandene Mutationen auszuschließen.

Primerdesign

Für optimale Amplifizierung eines Gens sollten Primer mit einer Länge von 18-30 Basenpaaren gewählt werden. Der GC-Gehalt sollte sich auf 40-60 % belaufen. Zudem sollten Dimere, Hairpins und Loops möglichst vermieden werden. Die Annealing-Temperatur sollte 5-10 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegen.

Die T_m , die bei beiden Primern ähnlich sein sollte, errechnet sich nach folgender Formel:

$$T_m = [2 \text{ °C} \times (\text{Anzahl A} + \text{T})] + [4 \text{ °C}(\text{Anzahl G} + \text{C})]$$

Mit entsprechenden Primerdesign Programmen können schnell und sicher optimale Primerbedingungen bestimmt werden.

2.3.7. Kolonie-PCR

Als schnelle Alternative zur herkömmlichen PCR, bei der als „Template“ isolierte DNA eingesetzt wurde, erfolgte die PCR-Überprüfung großer Zahlen rekombinanter *E. coli*-Klone durch Kolonie-PCR. Dabei wurden PCR-Ansätze im 35 µl Maßstab vorbereitet. Die gut gewachsenen Kolonien der zu testenden Klone wurden mit einem Zahnstocher von der Agar-Platte abgenommen und in die PCR-Reaktionsgefäße überführt. Dabei genügte ein leichtes Abstreifen der Zahnstocherspitze an der Wand, um genügend Zellmaterial für die PCR in den Ansatz zu bringen.

Mastermix für die Kolonie-PCR

<i>Taq</i> -Puffer (10 x)	100 µl
Vorwärts-Primer (100 pmol/µl)	10 µl
Rückwärts-Primer (100 pmol/µl)	10 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	10 µl
H ₂ O _{bidest}	870 µl

Σ = 1 ml, ausreichend für 28 Ansätze à 35 µl

pro Ansatz: 0,5 µl *Taq*-Polymerase

+1 Kolonie

2.3.8. Aufreinigung von PCR Produkten mit dem QIAquick PCR-Purification Kit von QIAGEN

PCR-Produkte, die für Klonierungen bestimmt waren, wurden mit dem PCR Reinigungs-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt, um die restlichen Primer, dNTPs, die Polymerase und den Puffer zu entfernen.

Fünf Volumen Puffer PB wurden zu 1 Volumen des PCR-Reaktionsansatzes gegeben und gemischt. Der Ansatz wurde auf eine „QIAquick-spin“ Säule, welche in ein 2 ml Sammelgefäß eingesetzt war, gegeben. Durch die anschließende Zentrifugation für 30-60 s (Biofuge fresco, Heraeus instruments) und 13000 rpm wurden die Primer bis zu 40 Nukleotide und alle restlichen Komponenten des PCR-Ansatzes als Säulendurchlauf gesammelt. Dieser wurde verworfen und die restlichen Salze wurden durch einen anschließenden Waschschrift mit dem Ethanol-haltigen Puffer PE entfernt. Dazu wurden 750 µl dieses Puffers auf die Säule pipettiert und diese wurde für 30s bei 13 000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Säulendurchlaufes wurde erneut für 1 min bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren wurde die Säule in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß gestellt. 30-50 µl EB Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) wurden in die Mitte der Säulenmembran pipettiert, die Säule für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Von dem gereinigten PCR-Produkt wurde die Konzentration (s. 2.3.4) bestimmt.

2.3.9. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese verwendet man zur DNA-Analyse, oder zur präparativen Gelelektion von DNA-Fragmenten. Die Auftrennung der DNA erfolgt durch ein elektrisches Feld. Man nutzt hierbei aus, dass die DNA negativ geladen ist und zur Anode wandert. Je nach gewünschter Auftrennung kann man die Porengröße des Agarosegels variieren. 1%ige Agarosegele ermöglichen eine gute Auftrennung im Bereich zwischen 750–8000 bp. Für kleinere Fragmente bedient man sich höherprozentiger Gele. Eine entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Kochen in einem Mikrowellenherd gelöst. Nach dem Aushärten in einer Gelelektrophoresekammer (HE33, Hoefer®) wurde das Gel mit 1 x TAE-

Laufpuffer überschichtet und die Proben, welche mit 5 x DNA-Probenpuffer versetzt wurden, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 10 V/cm Gellänge (Power Pac 300, BioRAD) für 45 min. Zur anschließenden Analyse der DNA wurde das Gel für 15 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) angefärbt und anschließend mit einer Geldokumentationsanlage (Image Quant 100) analysiert. Dabei wurde die DNA mittels UV-Licht durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert. Die Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten erfolgte an Hand eines mit aufgetrennten internen Größenstandards (1kb DNA Ladder, Fermentas).

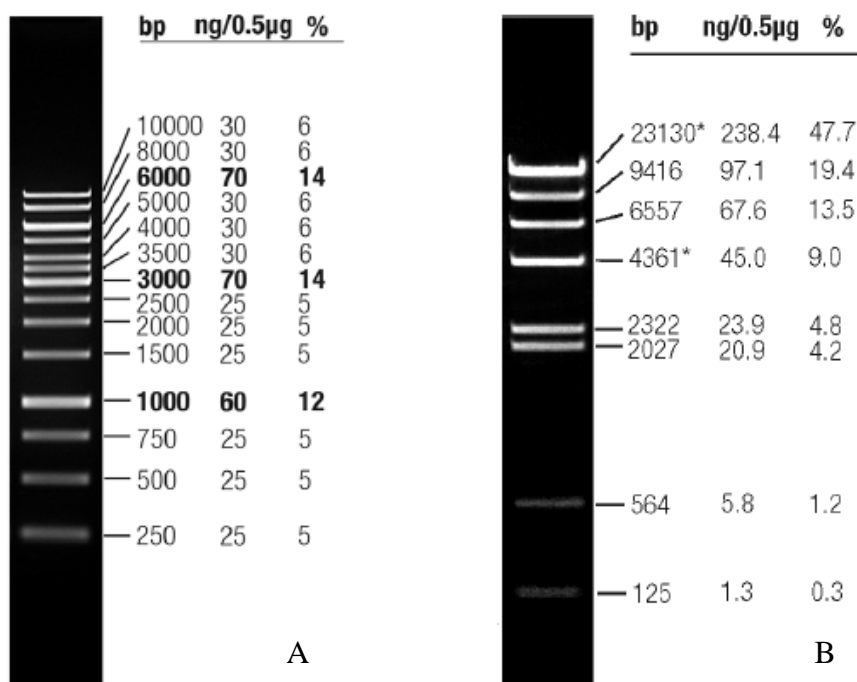


Abb. 8 A/B DNA-Ladder. A – 1 kb DNA Ladder, B – λ Hind III Ladder (Abb. aus <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/index.html>)

10 x DNA-Probenpuffer: 125 mg Bromphenolblau
 16, 5 ml Tris (150 mM, pH 7,6)
 30 ml Glycerol
 3, 5 ml H₂O_{bidest}

50 x TAE-Puffer: 2 M Tris
 50 mM Na₂EDTA
 5,71 % Essigsäure

2.3.10. Geelution von DNA Fragmenten mit dem QIAquick Gelextraction-Kit von Qiagen

DNA-Fragmente, die für Klonierung verwendet werden sollen und vorher durch ein Agarosegel aufgetrennt und analysiert wurden, können aus diesem mit dem QIAquick Gelextraction Kit der Firma Qiagen eluiert werden.

Die zu reinigende DNA-Bande wurde zuerst unter langwelligem UV-Licht (340 nm) ausgeschnitten. Durch Zugabe von 3 Volumen QG-Puffer zu 1 Volumen Gel (100 mg ~ 100 µl) und Inkubation für 10 min bei 50°C wurde die Agarose aufgelöst. Für die Bindung der DNA wurde die Lösung auf eine „QIAquick spin“ Säule, die in ein 2 ml Sammelgefäß eingesetzt wurde, gegeben und 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus instruments) zentrifugiert. Der Säulendurchlauf wurde verworfen und es erfolgte ein Waschschrift mit 750 µl PE-Puffer, um die restlichen Salze zu entfernen. Die Säule wurde für 30-60 s bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert. Nachdem der Säulendurchlauf verworfen wurde, erfolgte erneut eine Zentrifugation für 1 min. Um die DNA zu eluieren wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß eingesetzt, 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) auf die Mitte der Säulenmatrix pipettiert und die Säule für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Um die DNA Konzentration zu erhöhen, wurden nur 30 µl des EB-Puffers zugegeben und die Säule zusätzlich für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Elution erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der DNA (s. 2.3.4).

2.3.11. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Durch alkalische Phosphatase dephosphorylierte DNA-Enden können von Ligasen nicht ligiert werden. Dies unterbindet unerwünschte Religationen von geschnittenen Vektoren.

Reaktionsansatz:

x µl Vektor DNA

5 µl 10 x CIAP-Puffer

2 µl CIAP

ad 50 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem QIAquick PCR-Purification Kit der Firma Qiagen (s. 2.3.8) aufgereinigt.

2.3.12. Ligation von DNA-Fragmenten

Ligation mit T4 Ligase

DNA Fragmente werden durch T4-Ligase kovalent miteinander verbunden. Die einzusetzende Menge an Insert errechnet sich aus folgender Formel:

$$\frac{(\text{ng Vektor}) (\text{kb DNA Fragment}) \times 5}{(\text{kb Vektor}) \times 1} = \text{DNA Fragment}$$

Generell sollte das Insert in einem 3-5 fachen molaren Überschuss vorliegen, wobei bei sehr kleinen Inserts ein noch größerer Überschuss nötig ist.

Reaktionsansatz:

x µl geschnittene dephosphorylierte Vektor-DNA

x µl Insert in 3-5 fachem molaren Überschuss

1 µl 10 x T4-Ligase Puffer

1 µl T4-Ligase

ad 10 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

Ligation mit Quick Ligation™ Kit (NEB)

Die Ligation mit dem Quick Ligation Kit ermöglicht die Ligation kohäsiver- oder glatter DNA Enden innerhalb von 5 min bei RT.

Reaktionsansatz:

50 ng Vektor

3fach Überschuss Insert

10 µl 2x Quick Ligation Puffer

1 µl Quick T4 DNA Ligase

ad 20 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wird 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei -20 °C weggefroren, oder für die sofortige Weiterverwendung auf Eis gelagert.

2.3.13. Klonierung mit dem Gateway-System

Die in dieser Arbeit verwendeten pEX22b-Klone wurden mit dem Gateway-System von Jörn Voss (Diplomarbeit) in Jülich erstellt.

2.3.14. Konstruktion einer Fosmidgenbank

Für die Konstruktion einer Fosmidgenbank aus *P. torridus* DNA wurde das CopyControl™ Fosmid Library Production Kit von EPICENTRE® Biotechnologies verwendet.

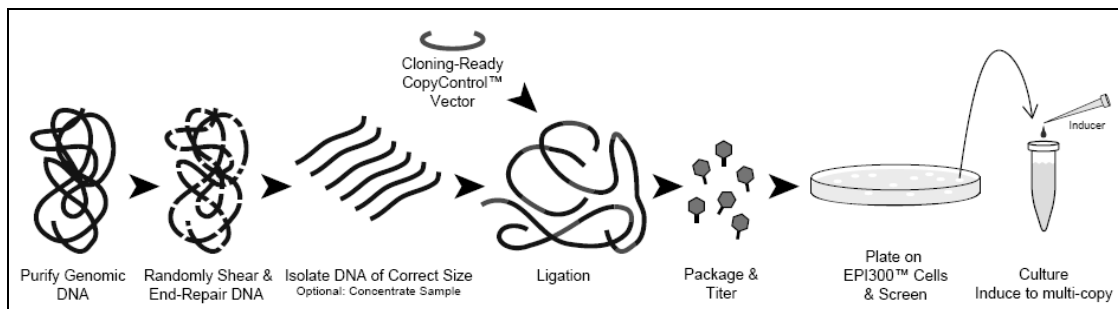


Abb. 9 Übersicht zur Konstruktion einer Fosmidgenbank (Abb. s. Copy Control Fosmid Kit Manual Epicentre®)

Zuerst wurde genomische DNA aus *P. torridus* isoliert (s. 2.3.3.4). Diese wurde nicht zusätzlich geschert, da die DNA während des Präparationsvorganges schon ausreichend geschert wurde. Die Größe wurde anhand eines 0,4%igem Agarosegels (s. 2.3.9) überprüft und die Konzentration mittels Nanodrop (s. 2.3.4) bestimmt. Anschließend erfolgte der „End Repair“, um die entstandenen 5`phosphorylierten DNA Enden zu glatten Enden aufzufüllen.

„End Repair“-Reaktion

x µl H₂O_{bidest}

8 µl 10 x End Repair Puffer

8 µl 2,5 mM dNTP Mix

8 µl 10 mM ATP

bis zu 20 µg gescherte Insert DNA (ungefähr 0,5 µg/µl)

4 µl End-Repair Enzym-Mix

80 µl Volumen_{total}

Die Reaktion wurde für 45-90 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Enzym-Mix für 10 min bei 70°C inaktiviert.

Die aufgefüllte DNA wurde dann mit einer Sure-Clean-Lösung (Bioline) gefällt. Dazu wurden 80 µl Bioline-Lösung zu den 80 µl Reaktionsansatz gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Fällung für 10 min bei 11000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus instruments). Das Pellet wurde dann 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen (8 min, 11000 rpm), getrocknet und mindestens 3 h in H₂O_{bidest} resuspendiert.

Von der DNA wurde dann mittels Nanodrop (s. 2.3.4) die Konzentration bestimmt und dann in eine Ligations-Reaktion eingesetzt.

Ligations-Reaktion

x µl H₂O_{bidest}
1 µl 10 x Fast-Link Ligations-Puffer
1 µl 10 mM ATP
1 µl CopyControl pCC1Fos Vektor
x µl konzentrierte Insert DNA (0,25 µg)
1 µl Fast-Link DNA Ligase
10 µl Volumen_{total}

Die Ligation erfolgte 2-3 h bei RT. Anschließend wurde die Fast-Link-Ligase bei 70 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde bei -20 °C gelagert, oder für die sofortige Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt.

Nach der Ligation wurden die CopyControl Fosmid Klone mittels MaxPlax Lambda Packaging Extracts in Phagen verpackt. Als Wirtstamm diente *E. coli* EPI300-T1®.

Dieser Stamm wurde als 5 ml Vorkultur ü.N. angezogen. Am Tag der Verpackungsreaktion wurden 50 ml LB – Medium + 10 mM MgSO₄ mit dieser Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,8–1 bei 37 °C und 150 rpm (Infors HT, Bottmingen, CH) inkubiert.

Währenddessen wurde 1 Reaktionsansatz des MaxPlax Lambda Packaging Extracts pro 10 µl Ligations-Reaktion auf Eis aufgetaut. Ein halber Phagenansatz (25 µl) wurde zur Ligations-Reaktion dazupipettiert, vorsichtig gemischt und die restlichen Phagen wurden sofort wieder bei -70 °C

weggefroren. Die Verpackungsreaktion wurde dann 90 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die restlichen 25 µl Phagenextrakt dazugeben und die Reaktion erneut für 90 min bei 30 °C inkubiert.

Nach der 3-stündigen Inkubation wurde der Ansatz auf ein Volumen von 1 ml mit Phagen Verdünnungspuffer (Phagen Dilution Buffer) aufgefüllt und 25 µl Chloroform dazupipettiert. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Reaktion bei 4 °C aufbewahrt.

Im darauffolgenden Schritt wurde der Phagentiter bestimmt. Dazu wurden folgende Verdünnungen aus der 1 ml Reaktion mit dem Phagen Dilution Buffer (PDB) hergestellt:

Tab. 6 Verdünnungen zur Bestimmung des Phagentiters

Verdünnung	Volumen	Verdünnungsstufe	PDB _{vol}
1:10 ²	10 µl	aus 1 ml Phagenreaktion	990 µl
1:10 ⁴	10 µl	aus 1:10 ²	990 µl
1:10 ⁵	100 µl	aus 1:10 ⁴	900 µl
1:10 ⁶	100 µl	aus 1:10 ⁵	900 µl

Aus den einzelnen Verdünnungen wurden je 10 µl Reaktionsansatz zu je 100 µl vorbereiteten EPI300-T1[®] Zellen pipettiert und diese 40 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die infizierten Zellen auf LB_{cm} (12,5 µg/ml) Platten ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C im Brutschrank (HT TR 225, Infors AG) inkubiert.

Anhand der Anzahl der Kolonien wurde nun der Phagentiter bestimmt:

$$\frac{(\# \text{ Kolonien}) (\text{Verdünnungsfaktor}) (1000 \mu\text{l/ml})}{(\text{Vol. ausplattierter Verdünnungsstufe } [\mu\text{l}])} = \text{cfu/ml}$$

Es wurde dann die Verdünnung komplett ausplattiert, bei der die Anzahl der Klone, der der erwünschten Genomabdeckung entsprach.

Die Anzahl der Klone, die für eine vierfache Abdeckung bei einer Wahrscheinlichkeit von 95 % für die Genomabdeckung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f)$$

N Anzahl der Klone

P Wahrscheinlichkeit, dass das Genom komplett abgedeckt ist

f der Faktor, der sich aus Insertgröße bezogen auf das Gesamtgenom ergibt

Daraus ergab sich für *P. torridus*:

$$f = 35 \text{ kb (Insertgröße)} / 1500 \text{ kb (Genom)} = 0,0233$$

$$P = 95 \%$$

$$N = \ln(1 - 0,95) / \ln(1 - 0,0233)$$

$$N = 127 \text{ Klone}$$

PDB (Phage Dilution Buffer): 10 mM Tris/HCl, pH 8,3
100 mM NaCl
10 mM MgCl₂

2.4. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.4.1. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford nutzt man die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine und die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximum der Farbe von 495 nm ohne Protein nach 595 nm mit Protein (Bradford, 1976). Dabei ist die Zunahme der Absorption bei 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Proteinkonzentrationen wurden anhand einer Eichgerade, die mittels BSA erstellt wurde, bestimmt. Dazu wurden 200 µl Bradford-Reagenz mit 799 µl H₂O_{bidest} und 1 µl unbekannter Probe in eine 1 ml Einmalküvette pipettiert und

für 15 min inkubiert. Die Probe wurde im Zweistrahlphotometer bei 595 nm vermessen. Je nach Bedarf wurde die unbekannte Probe verdünnt oder in größerem Volumen eingesetzt und dementsprechend die H_2O_{bidest} -Menge angepasst.

2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Gelelektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zur Anode. Die meisten Proteine binden SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/ g Protein in 1 % SDS-Lösungen). Durch SDS und vorherige Reduktion mit β - Mercaptoethanol werden die Proteine denaturiert und Protein-Protein-Wechselwirkungen aufgelöst. Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich damit nur noch in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix trennt so die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht (MG) auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet, bei dem ein Trenngel von einem Sammelgel überschichtet wird (Laemmli, 1970). Je nach Proteingröße wurde die Porengröße des Trenngels variiert. Für Proteine mit einem MG von 10-60 kDa wurden 15 %ige Trenngele, für Proteine vom MG 30-120 kDa 10 %ige Gele und für Proteine mit einem MG 50 – 200 kDa 8 %ige Gele verwendet.

In der folgenden Tabelle ist das Pipettierschema eines 10 %igen SDS-Gels dargestellt.

Tab. 7 Pipettierschema 10% SDS Gel

Lösung	10% Trenngel		3% Sammelgel	
AA (40% (w/v))	1	ml	0,2	ml
TG	1	ml	--	
SG	--		0,48	ml
APS	30	μ l	15	μ l
TEMED	3	μ l	2	μ l
H_2O_{Bidest}	2	ml	1,32	ml

Die zu analysierenden Proben wurden mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und durch 10-minütiges Erhitzen bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in einer mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllten Mini-Elektrophorese-Kammer von BioRad (Protean® Mini cell) durchgeführt. Zum Sammeln der Proben wurde für 10 min eine Stromstärke von 15 mA pro Gel angelegt (Power Pac 300, BioRAD). Anschließend wurden die Proben für 40 min bei 30 mA pro Gel aufgetrennt.

Die Bestimmung von Proteingrößen erfolgte im Vergleich zur Laufstrecke eines im gleichen Gel aufgetrennten Standards. Als Größenstandard diente dabei der „High Molecular Weight Standard“ (HMW, Sigma).

Die Molekularmassen des verwendeten Standards sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 8 HMW Marker

Markerproteine	Molekularmasse [Da]
Myosin, Kaninchemuskel	205000
β-Galactosidase, <i>E. coli</i>	116000
Phosphorylase b, Kaninchenmuskel	97400
Albumin, Rind	66000
Albumin, Hühnerei	45000
Carboanhydrase, Rinder-Erythrocyten	29000

Acrylamid-Stammlösung: Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (24:1)

40 % (w/v) (AA)

Sammelgelpuffer: 0, 5 M Tris/HCl

0, 4 % SDS

pH 6,8

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl

0,4 % SDS

pH 8,8

10 x SDS-Laufpuffer: 144,1 g Glycin

30, 4 g Tris

10 g SDS

ad 1 Liter H₂O_{bidest}

4 x SDS-Probenpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 6, 8
 1, 2 g SDS
 7, 5 ml Glycerol (87 %)
 0,001 % Bromphenolblau
 erst vor Gebrauch: 10 % β -ME

APS 10 % APS (w/v) in $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$

2.4.3. Nativ-PAGE

Bei dieser Methode erfolgt die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Ladung und Größe bei gegebenem pH-Wert des Elektrophorese-Puffers und gegebenem Vernetzungsgrad des Polyacrylamids. Die nativen Proteingele wurden auf dieselbe Weise wie die SDS-Gele angefertigt und bestehen ebenfalls aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Anstelle von SDS-haltigen Lösungen wurden die unter 2.4.2 aufgeführten Lösungen ohne SDS eingesetzt.

Die Proteinproben wurden 4:1 mit Probenpuffer versetzt und ohne vorherige Denaturierung in die Geltaschen gefüllt. Nach einem Vorlauf von 15 min bei 50 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei 100 V.

4 x Probenpuffer

für native Gele:	Glycerin (87 %)	7,5 ml
	Bromphenolblau (2 % (w/v))	0, 5 ml
	Tris-HCl	0, 4 g
	$\text{H}_2\text{O}_{bidest}$	ad 25 ml
	pH 6,8	

2.4.3.1. Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Coomassie-Blau-Färbung

Um die Proteine nach der Elektrophorese auf dem Gel sichtbar zu machen, wurde dieses mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Dazu wurde das Gel für 30 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend so lange in einer Entfärbelösung geschwenkt, bis der durch die Färbelösung entstandene

Hintergrund verschwunden war. Bei dieser Färbemethode liegt die Nachweisgrenze bei 300 ng Protein.

Coomassie Färbelösung: Coomassie-Brilliant-Blue R 250 1,5 g
Methanol 455 ml
Eisessig 80 ml
H₂O_{bidest} ad 1000 ml

Entfärbelösung Methanol 250 ml
Eisessig 350 ml
H₂O_{bidest} ad 1000 ml

Coomassie kollodial Färbung

Diese Färbemethode (Kang *et al.*) wird aufgrund ihrer sehr großen Nachweisgrenze von bis zu 10 ng Protein auch Coomassie-silver genannt. Hierbei wurde das Polyacrylamidgel für mindestens 2 h in der Färbelösung geschwenkt und anschließend mit deionisiertem Wasser für mindestens 30 min wieder entfärbt.

Coomassie (kollodial): 0,1 % (w/v) Coomassie Brillant BlueG
3 % (v/v) Phosphorsäure
20 % (v/v) Ethanol
10 % (w/v) Ammoniumsulfat

Silberfärbung

Anhand der Silberfärbung sind Proteinmengen von 2 ng nachweisbar.

Fixierlösung: 40 % EtOH, 10 % Eisessig
400 ml EtOH
100 ml Eisessig
ad 1000 ml H₂O_{bidest}

Waschlösung: 30 % EtOH
300 ml EtOH
ad 1000 ml H₂O_{bidest}

Thiosulfatlösung:	0, 02 % Natriumthiosulfat 200 mg Natriumthiosulfat <i>ad</i> 1000 ml H ₂ O _{bidest}
Silbernitratlösung:	0, 2 % Silbernitrat 2 g Silbernitrat <i>ad</i> 1000 ml H ₂ O _{bidest}
Entwicklerlösung:	3 % Natriumcarbonat, 0,05 % Formaldehyd (37 %ig), 0,0004 % Natriumthiosulfat 30 g Natriumcarbonat, 0,5 ml Formaldehyd (37 %ig) 4 mg Natriumsulfat <i>ad</i> 1000 ml H ₂ O _{bidest}
Stopplösung:	0, 5 % Glycin 5 g Glycin <i>ad</i> 1000 ml H ₂ O _{bidest}
Durchführung:	Fixierlösung: 2 h oder ü.N. Waschlösung: 3 x 20 min Thiosulfatlösung: 1 min H ₂ O _{bidest} : 2 x 20 sec Silbernitratlösung: 20 min H ₂ O _{bidest} : 2 x 20 sec Entwicklerlösung: 5 min (ggf. weniger, beobachten) H ₂ O _{bidest} : 2 x 1 min Stopplösung: 5 min H ₂ O _{bidest} : 30 min

Im Anschluss an jede Färbemethode wurden die SDS-Polyacrylamidgele in Folie eingeschweißt, um sie dann einzuscannen und weiter zu bearbeiten.

2.4.4. 2D-Gelelektrophorese

2.4.4.1. Chloroform Methanol Extraktion

Für die 2D-Gelelektrophorese benötigt man saubere und vor allem „salzfreie“ Proteine, da alle Verunreinigungen den Lauf der 1.Dimension stören. Dazu wurde eine Chloroform Methanol Extraktion durchgeführt (Wessel and Flugge, 1984).

Fünzig ml einer *P. torridus* Zellkultur wurden geerntet (6 min, 4000 rpm, Eppendorfzentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg), das Pellet in Waschpuffer aufgenommen (6 min, 4000 rpm) und anschließend wurden die Zellen durch einen Aufschlusspuffer lysiert. Hierbei macht man sich zu Nutze, das die *P. torridus* Membran bei pH-Werten über 5 sehr instabil wird und die Zellen aufgrund des alkalischen pH-Wertes lysieren (van Vossenberget al). Das Zelllysate wurde anschließend 1 h bei 42000 rpm ultrazentrifugiert (OPTIMA™MAX-E, Beckman Coulter). Der Überstand wurde nun in 200 µl Aliquots in frische 2 ml Reagiergefäße pipettiert. Dann wurden 800 µl Methanol dazugeben, die Probe kurz gevortext und 10 sec bei 10000 rpm zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus instruments). Danach wurden 200 µl Chloroform dazugeben, erneut kurz gevortext und 10 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurden 600 µl Wasser dazupipettiert, die Probe intensiv gevortext und 8 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Es wurden nun zwei Phasen sichtbar, wobei sich in der Interphase das Protein als weiße Schicht befand. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen. Dabei wurden jeweils ca. 10–20 µl zurückgelassen, um nicht die Interphase zu zerstören. Anschließend wurden 600 µl Methanol auf die Probe gegeben, um dann für 10 min bei 13000 rpm die Proteine zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei RT für 30 min getrocknet. Anschließend wurden die Pellets aus den verschiedenen Reagiergefäßen gepoolt und zur Lagerung bei -20 °C weggefroren.

Waschpuffer 50 mM NaAc
 pH 4,6

Aufschlusspuffer 50 mM Tris/HCl pH 8,5
 24,3 mg PMSF

2.4.4.2. 1. Dimension – Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die IEF wurde das Proteinpellet zunächst in 200 µl Probenpuffer ü.N. bei RT resuspendiert und eine Proteinbestimmung durchgeführt (s. 2.4.1).

für 10 ml

Probenpuffer:	8 M Harnstoff	4,8 g
	2 % (w/v) CHAPS	200 mg
	1 % (w/v) DTT*	100 mg
	35 mM Tris/HCl	42,4 mg
	0, 5 % (v/v) IPG Puffer*	50 µl
	<i>ad 10 ml H₂O_{bidest}</i>	

(* DTT und IPG Puffer wurden frisch dazugegeben und jeweils nur in den Volumina, welche für die Probe verwendet wurden. Der IPG Puffer wurde dem pH Gradienten des IPG-Streifens entsprechend ausgewählt)

Für IPG-Streifen (IPG Strips, ImmobilineTMDryStrip, GE Healthcare) mit einer Länge von 18 cm wurden 170 µl Probe mit 170 µl Rehydrierungspuffer vermischt. Dabei wurde die Konzentration der Probe so eingestellt, dass 350 µg Protein_{ges} je Streifen geladen wurden, damit das Gel final mit Coomassie kollodial (s. 2.4.3.1) gefärbt werden konnte. Für Silberfärbungen wurden 60-80 µg Protein_{ges} je Streifen geladen.

für 25 ml

Rehydrierungspuffer:	8 M Harnstoff	12 g
	2 % (w/v) CHAPS	0, 5 µl
	0, 5 % (v/v) IPG-Puffer*	125 µl
	Bromphenolblau	einige Körner
	<i>ad 25 ml H₂O_{bidest}</i>	

(*Der IPG Puffer wurde frisch dazugegeben; s.o.)

Der Probenmix wurde dann in einem Strip Holder (Amersham, Pharmacia) pipettiert und der Gelstreifen vorsichtig und ohne Luftblasen mit der Gelseite

nach unten darauf platziert. Anschließend wurde der Gelstreifen mit 1 ml DryStrip Cover Fluid (Amersham) vollständig überschichtet.

Der beladene Strip-Holder wurde dann auf dem IPGphor (Pharmacia, Biotek) so platziert, dass dessen Gold-Kontakte jeweils mit der Anode, bzw. Kathode in Berührung traten. Anschließend wurde die IEF mit folgendem Programm (s. Tab. 9) gestartet.

Programm:

(IPGphor Programm 1)

IEF Parameter: 20 °C, 50 µA / Strip

Tab. 9 IEF Programm

Schritt	Typ	Spannung	Zeit
0	Rehydration	20 V	16 h
1	step-n-hold	100 V	3 h
2	step-n-hold	200 V	1 h
3	step-n-hold	500 V	1 h
4	gradient	8000 V	1 h
5	step-n-hold	8000 V	6 h
6	end	0 V	<i>for ever</i>

Nach der IEF wurden die Gelstreifen bei -20°C zur Lagerung weggefroren.

2.4.4.3. 2. Dimension-(SDS)-PAGE

Vor dem Start der 2. Dimension wurden die IPG Streifen für 15 min erst in Equilibrierlösung A und anschließend in Equilibrierlösung B geschwenkt.

für 200 ml

Equilibrierlösung:

50 mM Tris/HCl, pH 8,8	6,7 ml (1,5 M Stammlsg.)
6 M Harnstoff	72,07 g
30 % (v/v) Glycerol	69 ml (87 % Stammlsg.)
2 % (w/v) SDS	4 g
Bromphenolblau	einige Körner
<i>ad 200 ml H₂O_{bidest}</i>	

Equilibrierlösung A: 10 ml Lösung + 100 mg DTT

Equilibrierlösung B: 10 ml Lösung + 250 mg Iodazidamid (Sigma)

Es wurde ein 12 %iges Polyacrylamidgel (PAG) ohne Sammelgel gegossen (Protean®II xi Cell IPG Conversion Kit, BioRAD). Dabei wurde in dem Gel auf die Zugabe von SDS verzichtet. Die Volumina der verwendeten Komponenten für ein 12 %iges PAG sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10 Pipettierschema 12% Polyacrylamidgel

Zusatz	Volumen
Trenngelpuffer	12,5 ml
AA (40%)	20 ml
H ₂ O _{bidest}	17,25 ml
APS (100 mg/ml)	0,2 ml
TEMED	0,05 ml

Trenngelpuffer (1,5 M), pH 8,8 18,2 g Tris
ad 100 ml H₂O_{bidest}

10 x SDS Laufpuffer 144,1 g Glycin
30,4 g Tris
10 g SDS
ad 1000 ml H₂O_{bidest}

Der IPG Streifen wurde horizontal auf dem Gel platziert. Um einen gleichmäßigen Kontakt zwischen IPG Streifen und Polyacrylamidgel zu gewährleisten, wurde der Streifen mit 0,8 % Agarose überschichtet. Zu Beginn wurde eine Stromstärke von 20 mA_{konst} pro Gel angelegt (Power Supplier, ECPS 3000/150, Pharmacia), bis die Probe 1cm in das Trenngel eingelaufen war. Anschließend erfolgte die Auftrennung für 4 – 6 h mit 80 mA_{konst} pro Gel. Die Gele wurden dann je nach Bedarf eingefärbt (s. 2.4.3.1).

2.4.5. Umpufferung durch Dialyse

Entsalzung und Umpufferung von Proteinlösungen wurden durch Dialyse in Dialyseschläuchen durchgeführt (VISKING® Dialysis Tubing, Serva, Heidelberg). Zunächst wurde ein angemessen großes Schlauchstück abgeschnitten, wobei 1 cm Dialyseschlauch ca. 2,5 ml Flüssigkeit aufnehmen kann. Der Schlauch wurde in H₂O_{bidest.} für 15 min ausgekocht, anschließend mit der Proteinlösung befüllt und an beiden Enden mit Dialyseklammern abgedichtet. Die Dialyse erfolgte über Nacht unter leichtem Rühren gegen 2-5 l Puffer bei 4 °C im Kühlraum.

2.4.6. Konzentration von Proteinlösungen

Um Proteinlösungen einzuengen, wurden Mikrokonzentratoren (Amicon Ultra, Millipore, Cork, Irland) mit einem Ausschlussgröße von 10 kDa bzw. 30 kDa verwendet. Dabei konnten Proteinlösungen von 14 ml auf 200 µl eingengt werden. Die Zentrifugation erfolgte in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5804, Eppendorf, Hamburg) bei 3000 Upm.

2.4.7. Zellernte und Rohextraktgewinnung

2.4.7.1. Zellernte

Zur Gewinnung von Rohextrakten wurden *E. coli*-, und *P. torridus* in Flüssigkultur angezogen (s. 2.2.1 u. 2.2.2) und geerntet (4000 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde danach 2 x in entsprechendem Puffer durch wiederholtes Resuspendieren und Zentrifugieren gewaschen. Nun wurde das Nassgewicht des Pellets bestimmt und die Zellen in 2-3 ml Puffer pro g Nassgewicht resuspendiert. Der Puffer richtete sich nach den weiteren Erfordernissen, i.d.R. 50 mM Natriumacetat pH 4,6.

2.4.7.2. Zellaufschluss mit der „French Pressure Cell“

Der Aufschluss von Zellen in der „French Pressure Cell“ (American Instrument Company, Silver Spring, USA) erfolgt dadurch, dass die Zellsuspension zunächst einem Druck von 6,9 MPa ausgesetzt wird, der absinkt, wenn ein

kleines Ventil geöffnet wird, und die Zellen hindurch gepresst werden. Der plötzliche Druckabfall bewirkt das Platzen und somit die Lyse der Zellen. Das zähflüssige Lysat wird aufgefangen und zentrifugiert, wobei Zelltrümmer sedimentieren und von dem zytoplasmatischen Überstand getrennt werden. Der Überstand mit löslichen, intrazellulären Proteinen wird als Rohextrakt bezeichnet. Diese Methode wurde ausschließlich bei größeren Kulturvolumina eingesetzt.

Durchführung:

Die Zellsuspension wurde durch zweimalige Passage durch die „French Pressure Cell“ aufgeschlossen. Das zähflüssige Lysat wurde in SS34-Röhrchen aufgefangen und 20 min zentrifugiert (SS34-Rotor, 15000 Upm, 4 °C).

2.4.7.3. Zellaufschluss durch Ultraschall

Kulturvolumina von ≤ 5 ml wurden durch Ultraschallaufschluss unter Verwendung einer Ultraschall-Sonde (Ultraschallprozessor UP 200S, 24 kHz, 200 W, Fa. Dr. Hielscher GmbH, Teltow; Sonotrode S2, 2 mm) lysiert. Diese Methode wurde nur angewendet, um kleine Mengen Proteinextrakt zu gewinnen, so dass rasch variable Parameter überprüft und optimiert werden konnten. Die Zellsuspension wurde in einem Eppendorf-Cup 5 min beschallt (35 %ige Amplitude, Cycle 0,5). Obwohl mit thermostabilen Enzymen gearbeitet wurde, wurden die Zellen beim Aufschluss mit Eis gekühlt. Das Abzentrifugieren der Zelltrümmer erfolgte bei 13000 Upm für 15 min in einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Kendro, Osterode). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reagiergefäß überführt.

**2.4.7.4. Abtrennung thermolabiler Proteine durch
Hitzedenaturierung**

Zur ersten Anreicherung eines thermophilen Enzyms aus dem Rohextrakt eines mesophilen Wirtes eignet sich besonders die Denaturierung der thermolabilen Wirtsproteine durch einen Hitzeschritt. Dazu wurde der aus dem Zellaufschluss gewonnene klare Überstand in einem SS34-Röhrchen im Wasserbad für 20 min bei dem rekombinanten Protein angemessener Temperatur inkubiert. Die durch

die Hitze denaturierten und präzipitierten Wirtsproteine wurden abzentrifugiert (13000 Upm, 15 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand abgenommen.

2.4.8. Renaturierung von *inclusion bodies*

Bei der Expression, insbesondere der Überexpression, von rekombinanten Proteinen kann es zur Bildung größerer Mengen missgefalteten Proteins kommen. Dieses formt in *E. coli* sogenannten *inclusion bodies*, d.h. unlöslichen Proteinagglomerate, die einen Großteil der Zellmasse ausmachen können. Die Renaturierung solcher missgefalteten Proteine ist oft schwierig. In den meisten Renaturierungsprotokollen wird zunächst das unlösliche Protein durch Zugabe von Harnstoff oder chaotropen Salzen entfaltet, um dann in einem großen Volumen bei geringer Proteinkonzentration die Zusätze zu entfernen und so die spontane Faltung der Polypeptidkette in eine native Konformation zu veranlassen. Gelegentlich wird auch versucht, den Faltungsschritt durch Chaperone zu beeinflussen. Die hier verwendete Methode beruht ausschließlich auf der Zugabe und langsamen Entfernung einer hohen Harnstoff-Konzentration.

Durchführung:

Nach einer Überexpression eines *P. torridus* Enzyms in *E. coli* BL21 (DE3) wurden die Zellen geerntet, im Renaturierungspuffer aufgenommen und mit der French Pressure Cell aufgeschlossen (s. 2.4.7.2). Um nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen, wurde der Rohextrakt bei 4000 Upm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut zentrifugiert (13000 Upm, 30 min, 4 °C). Das nun entstandene Pellet aus unlöslichen Zellbestandteilen wurde in 10 ml Puffer B resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur unter Schwenken wurde die Suspension 30 min bei 13000 Upm (4 °C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 10 ml Puffer B aufgenommen und der Inkubationsschritt und die folgende Zentrifugation wiederholt. Das Pellet wurde nun in 5-20 ml Renaturierungspuffer mit 8 M Harnstoff sorgfältig gelöst. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung 30 min bei 13000 Upm (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues SS-34 Röhrchen überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde dann 3 h bei Raumtemperatur gegen 0,5 l

Renaturierungspuffer mit 1 M Harnstoff dialysiert. In einem zweiten Dialyseschritt wurde der Überstand über Nacht gegen 1 l Renaturierungspuffer ohne Zusatz von Harnstoff dialysiert. Das Dialysat wurde bei 13000 Upm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Erfolg wurde gelelektrophoretisch überprüft.

Renaturierungspuffer:	Tris	20	mM
	K-Glutamat	125	mM
	Glycerin	5 %	(v/v)
	DTT	2	mM
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml	

Vor der Zugabe von DTT wurde der pH Wert mit KOH auf pH 8 eingestellt und der Puffer filtriert.

Puffer B	Lysozym (50 mg/ml Stammlösung)	126	µl
	Deoxycholat (100 mg/ml Stammlösung)	300	µl
	EDTA (0,5 M Stammlösung)	60	µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 30 ml	

2.4.9. Coexpression von Chaperonen und Fremdproteinen in *E. coli* mit TakaRa Chaperone Plasmid Set[®]

Die Bildung von *inclusion bodies* in *E. coli* konnte in einigen Fällen dadurch verhindert werden, dass neben dem Fremdprotein auch Chaperone überproduziert wurden. Chaperone helfen Proteinen sich in ihre native Konformation zu falten.

In Tab. 11 ist eine Übersicht über die im TakaRa Chaperone Plasmid Set[®] enthaltenen Plasmide, die darauf codierenden Chaperone und den zugehörigen Induktoren gezeigt.

Die Coexpressionsversuche wurden nach der vom Hersteller mitgelieferten Versuchsanleitung durchgeführt.

Tab. 11 Übersicht über das TakaRa Chaperon Plasmid Set®

Plasmid	Gene	Promotor	Induktor	Resistenzmarker
pG-KJE8	<i>dank-dnaJ-grpE</i> <i>groES-groEL</i>	<i>araB</i> <i>Pzt-1</i>	L-Arabinose Tetrazyklin	Chloramphenicol
pGro7	<i>groES-groEL</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Chloramphenicol
pKJE7	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Chloramphenicol
pG-Tf2	<i>groES-groEL-tig</i>	<i>Pzt-1</i>	Tetrazyklin	Chloramphenicol
pTf16	<i>tig</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Chloramphenicol

2.4.10. Proteinreinigung

2.4.10.1. Proteinreinigung über FPLC

Bei einer säulenchromatographischen Proteinreinigung mittels FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) wird das zu trennende Substanzgemisch in Lösung (mobile Phase) über eine Säule aus einer festen, porösen Matrix (stationäre Phase) geschickt. Die Wechselwirkungen der gelösten Bestandteile mit der stationären Phase verzögern die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Matrix in substanzspezifischer Weise. Auf diesem Wege wird im Idealfall z.B. der hitzegefällte Rohextrakt in separate Fraktionen reiner Proteine aufgetrennt.

Durchführung:

Alle Puffer und Proben wurden vor dem Auftragen filtriert, um eine Verunreinigung des Säulenmaterials mit Staubpartikeln zu vermeiden. Die Filtration der Proben erfolgte durch Einweg-Sterilfilter (Minisart 0,2 µm, Sartorius). Die Puffer wurden mit H₂O₂ bidest. hergestellt und anschließend mit einer Vakuumpumpe (Savant) durch Cellulosenitrat-Filter (0,45 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert. Um das Eindringen von Luftblasen in das Säulenmaterial zu verhindern, wurden alle Anschlüsse *drop to drop* verbunden. Die Säulen werden in 20 %igem (v/v) Ethanol gelagert. Direkte Umpufferung

der Säulen von Ethanol zu einem salzhaltigen Puffer oder umgekehrt sollte durch Spülen mit MilliQ-Wasser vermieden werden.

Die verwendete ÄKTA-FPLC-Anlage besteht aus folgenden Komponenten (alle Amersham Biosciences, Freiburg):

Geräte:	Monitor UPC-900
	Pumpe P-920
	In-line Mixer M-925
	Motor Valve INV-907
	Fraction Collector Frac-900
	10 ml und 50 ml Superloop, 1 ml und 250 µl Probenschleifen
Säulen:	SOURCE 30Q HR10/10
	SOURCE 15S

2.4.10.2. Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)

Das Trennprinzip der Ionenaustausch-Chromatographie beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den funktionellen Gruppen des Gelmaterials. Dabei treten geladene Gruppen auf der Oberfläche der Proteine mit entgegengesetzt geladenen Gruppen auf der Austauschermatrix in Interaktion und führen so zu einer Bindung an die Säule, wobei die Stärke dieser Bindung von den individuellen Ladungseigenschaften der einzelnen Polypeptide abhängt. Entscheidende Parameter sind die Ionenstärke (Salzkonzentration) und der pH-Wert. Die Elution erfolgt durch eine Erhöhung der Ionenstärke, wodurch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Protein und Gelmaterial geschwächt wird.

Für die IEC wurde in dieser Arbeit der starke Anionenaustauscher SOURCE 30Q in einer selbstgepackten HR10/10 Säule (8,25 ml Säulenvolumen) verwendet. Das Material besteht aus monodispersen Partikeln mit 30 µm Durchmesser und einer kontrollierten Porenstruktur, die hohe Stabilität und geringen Rückdruck gewährleisten. Die funktionelle Gruppe der SOURCE 30Q ist ein quartäres Amin, das über einen hydrophilen Spacer an die Säulenmatrix gebunden ist. Die Proteinbindungskapazität beträgt bis zu 25 mg Protein pro ml Gelbett. Die empfohlene Flussrate wird mit 300-990 cm/h (4-13 ml/ min) bei einem maximalen Rückdruck von 5 MPa angegeben.

Durchführung:

Die Säule wurde zur Vorbereitung zunächst mit 1 Säulenvolumen (SV) Puffer A (= Niedrigsalzpuffer) und anschließend mit 2 Säulenvolumina Puffer B (= Hochsalzpuffer) gespült, um die funktionellen Gruppen mit Gegenionen abzusättigen. Dann wurde das Medium mit mindestens 8 SV Auftragungspuffer A auf die Startbedingungen equilibriert. Die Probe (in Puffer A) wurde unter Niedrigsalzbedingungen auf die Säule aufgetragen und in einem ansteigenden Salzgradienten eluiert.

Puffer A: 20 mM Tris-HCl pH 8,0

Puffer B: 20 mM Tris-HCl pH 8,0 + 1000 mM NaCl

2.4.10.3. Proteinreinigung über MBP-Fusionsanteil

Proteine, die als Fusionsanteil MBP besaßen, wurden über ihre Affinität zu Maltose aufgereinigt.

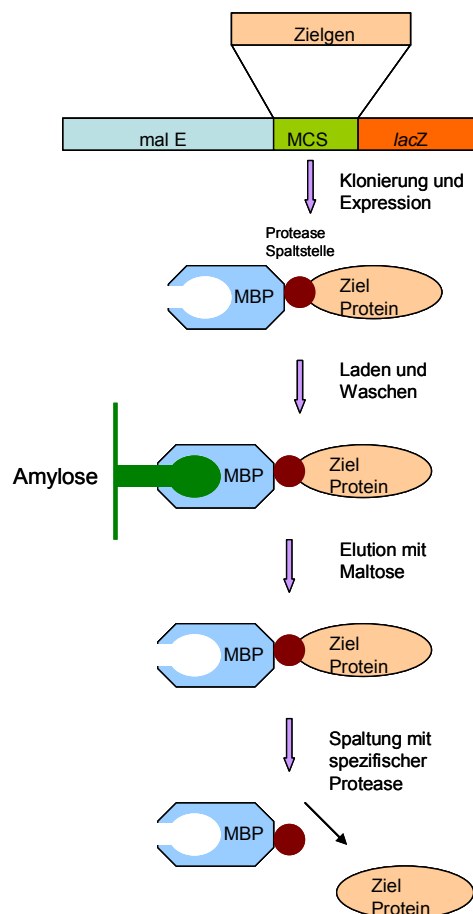


Abb. 10 Prinzip der Reinigung über MBP

MBP Puffer 100 mM Phosphat, pH 6.1
 200 mM NaCl
 1 mM EDTA

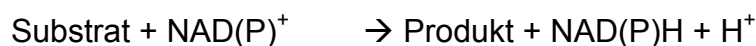
Maltose 10 % (w/v) in MBP Puffer

Amylose 10 % (w/v) in H₂O_{bidest}

Zuerst wurde die Amylose dicht in einer Gravitationssäule verpackt. Dabei hatte 1 cm Säulenvolumen eine Bindekapazität von 6 mg Protein. Die Säule wurde dann mit 15 Säulenvolumen (SV) MBP Puffer equilibriert. Anschließend wurde die Probe aufgetragen und der Durchlauf gesammelt. Dabei sind alle Proteine, die keine MBP Bindestelle haben nicht an der Säule haften geblieben. Danach wurde die Säule mit 10 SV gewaschen (MBP Puffer). Dadurch wurden alle restlichen un- oder schwachgebundene Proteine entfernt. Diese Fraktionen wurden ebenfalls gesammelt. Zuletzt wurde das Fusionsprotein durch Maltose eluiert. Der Erfolg der Aufreinigung wurde dann anhand eines SDS Gels (s. 2.4.2) überprüft. Um die Säule wieder zu regenerieren wurde diese zuerst mit 3 SV Wasser gewaschen, danach mit 3 SV 0,1 SDS, dann erneut mit 2 SV Wasser und zuletzt wieder mit 5 SV MBP Puffer equilibriert.

2.4.11. Nachweis von Dehydrogenase-Enzymaktivitäten

Die Aktivität der in dieser Arbeit klonierten Dehydrogenasen (*PTO0201*, *PTO0605*, *PTO1123*, *PTO1538*), wurde routinemäßig spektrophotometrisch gemessen, anhand der Zunahme von NAD(P)H bei 340 nm.



Die Standardreaktion wurde in einem Volumen von 1 ml und 55 °C durchgeführt.

Reaktion:

50 mM Puffer pH 4.6-8	880	µl
2 mM NAD(P) ⁺ (100 mM)	20	µl
50 mM Substrat (1 M)	50	µl
Enzym (Rohextrakt, 30 µg)	50	µl

Die Reaktionslösungen wurden für 10 min bei 55 °C vorgeheizt und dann mit Substrat gestartet.

Die Enzymaktivitäten wurden im Bereich der linearen Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinmenge bestimmt. Eine Enzymeinheit 1 U entspricht dabei dem Umsatz von 1 mol Substrat pro Minute. Das Lambert-Beer'sche Gesetz ermöglicht die Konzentrationsbestimmung von stark verdünnten Lösungen im Bereich zwischen 0,05 bis 1 Absorption.

Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$E = c_m \cdot d \cdot \epsilon_{340 \text{ nm}}$$

mit

E = gemessene Extinktion bei 340 nm

D = Länge der Messstrecke (Schichtdicke der Küvette)

$\epsilon_{340 \text{ nm}}$ = molarer Extinktionskoeffizient für NADH bei 340 nm
($6,28 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

c_m = NADH + H⁺ Konzentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Über dieses Gesetz lässt sich die Extinktionsänderung $\Delta E_{340 \text{ nm}}$ pro Minute in die spezifische Aktivität des Enzyms in umgesetzter Substratmenge (µmol) pro Minute und Enzymmenge (mg) bestimmen.

Spezifische Aktivität:

$$\frac{(\Delta E_{340 \text{ nm}} / \text{min}) \times V_{\text{total}}}{\epsilon_{340 \text{ nm}} \times V_{\text{Probe}} \times C \times d} = \frac{\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg}} = \frac{\mu\text{mol} \times 10^{-3}}{\text{min} \times \text{mg}} = \frac{U \times 10^{-3}}{\text{mg}}$$

mit

- $\Delta E_{340 \text{ nm}} / \text{min}$ = Steigung der Regression, Extinktion pro Zeit (min^{-1})
 D = Länge der Messstrecke (Schichtdicke der Küvette, 1cm)
 $\epsilon_{340 \text{ nm}}$ = molarer Extinktionskoeffizient für NADH bei 340 nm
 ($6,28 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 V_{total} = Gesamtvolumen [μl]
 V_{Probe} = eingesetztes Volumen der Enzymprobe [μl]
 C = Konzentration des Proteins [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]

2.4.11.1. Dehydrogenase-Aktivitätsfärbung nach Native-PAGE

Um potentielle Dehydrogenasen in der *P. torridus* Fosmidgenbank zu finden, wurden einzelne Klone zuerst über eine Native PAGE (s. 2.4.3) aufgetrennt und anschließend einer Dehydrogenase-Aktivitätsfärbung unterzogen. Bei diesem Screening wird die Dehydrogenase abhängige NAD^+ Reduktion an Nitro-Blue-Tetrazolium-Formazan (NBT) Produktion gekoppelt. 5- Methyl-Phenazonium-Methyl-Sulfate (PMS) diente dabei als Wasserstoff Überträger.

Die Fosmidklone wurden dazu ü.N. angezogen und dann für 5 h mit Fosmid-Induktions-Lösung (Epicentre) induziert. Anschließend wurden die Zellen über Ultraschall aufgeschlossen (s. 2.4.7.3) und eine Vorselektion über eine Hitzefällung für 15 min bei 50°C durchgeführt (s. 2.4.7.4). Anschließend wurden die Proben über das Nativ Gel aufgetrennt.

Für den Nachweis wurde das Gel ü.N. bei 50°C in einem vorgewärmten Screening Puffer inkubiert. Dehydrogenase Aktivität zeigte sich auf dem Gel als blaue Bande.

Screening Puffer	50 mM Phosphatpuffer, pH 6, 1
	50 mM NaAc Puffer, pH 4, 6
	2 mM NAD ⁺
	1 mM NBT
	0,025 mM PMS
	50 mM Substrat

Als Substrat wurden verschiedene Polyolverbindungen verwendet, i.d.R. Glycerol, 1,2-Propandiol und 2,3-Butandiol.

2.4.11.2. Agar-Plattenscreening auf die Verwertung von C2-C4 Polyolen

Die Überprüfung rekombinanter *E. coli*-Stämme auf die Verwertung von C2-C4-Polyolen wurde auf Carbonyl-Indikator-Medium durchgeführt. Als Basismedium diente hierbei LB-Medium (s. 2.2.1), welches das Wachstum aller *E. coli*-Klone erlaubt. Zusätzlich enthielt das Medium das zu testende Substrat (Glycerin, 1,2-Propandiol oder 2,3-Butandiol; 1 %ig) sowie den Farbstoff Pararosanilin und Natriumbisulfit. Der Farbstoff bildete zusammen mit dem Natriumbisulfit ein Schiff'sches Reagenz, das farblos ist. Wurden nun bei der Substrat-Verwertung Aldehyde bzw. Ketone gebildet, kam es zur Ausbildung einer Schiff'schen Base, die intensiv rot gefärbt war. Daher wiesen Kolonien von zur Polyol-Verwertung befähigten *E. coli*-Klonen in diesem Medium eine rote Farbe auf und färbten auch den Agar rot an; alle anderen Klone blieben hell.

Für das Screening wurde als Wirtstamm die Glycerin-negative *E. coli*-Mutante ECL707 (Sprenger et al., 1989) verwendet. Nach der Transformation von rekombinanten Plasmiden wurde auf den Indikatorplatten ausplattiert und für 16 bis 72 h bei 30 oder 37 °C inkubiert. In Abb. 11 ist das Prinzip des verwendeten Carbonylindikatortests dargestellt.

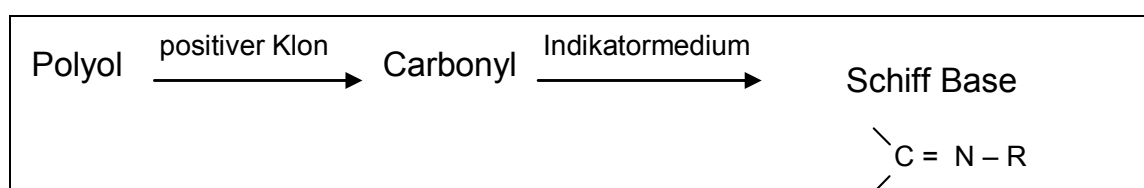


Abb. 11 Testprinzip der Aldehyd/Keton-Indikatorplatten.

Pararosanilin Indikatorplatten

20 mg Pararosanilin

100 mg Na₂S₂O₅

Die beiden Komponenten wurden in 30 ml H₂O_{bidest} gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf pH 6-7 eingestellt. Entsprechend der Reaktion wurde das Substrat (50 mM) dazugegeben (hier: Glycerol) und alle Komponenten zu 1 Liter autoklaviertem LB-Agar (s. 2.2.1) dazugeben.

2.4.11.3. Fosmidbank-Screening auf potentielle Dehydrogenase-Aktivitäten

Die *P. torridus* Fosmidgenbank wurde auf potentielle Dehydrogenasen untersucht. Dieses Screening beruhte auf der C2-C4 Polyol-Verwertung (s. 2.4.11.2). Dazu wurden die Fosmidklone in 96-well Titerplatten in einem Volumen von 150 µl angezogen und die OD_{600nm} mit einem Mikrotiterplattenleser bestimmt. Anschließend wurden 15 µl Substrat, i.d.R. Glycerol, 1,2-Propandiol, 2,3-Butandiol, zu den Klonen gegeben und die Platten ü.N. bei 55 °C inkubiert. Die entstandenen Carbonylverbindungen wurden über eine Schiff-Reagenz nachgewiesen. Fünfzehn µl dieses Reagenz wurden zu den Klonen dazupipettiert. Eine tief-rote Färbung deutete auf Dehydrogenase Aktivität.

2.4.12. Proteinsequenzierung

Die Sequenzierung von Proteinen wurde von dem Labor von Prof. Hecker, Universität Greifswald, übernommen.

Proteine zur Sequenzierung wurden aus dem Polyacrylamidgel mit der Spitze einer Pipettenspitze herausgelöst in eine Mikrotiterplatte überführt und mit 20 µl H₂O_{bidest} überschichtet.

Dann wurden die Proben in einem Verdauroboter (Ettan Spot Handling Workstation, Amersham Biosciences) verdaut. Dieses erfolgte nach einer vom Hersteller empfohlenen Methode.

Lösungen:

Waschlösung 1	50 % Methanol (v/v) 50 mM NH ₄ HCO ₃
Waschlösung 2	75 % Acetonitril (v/v)
Primern vor dem Enzym	20 mM NH ₄ HCO ₃
Trypsin	in 20 mM NH ₄ HCO ₃ (20 µg Trypsin pro ml, pro Platte 500 µl, 5000 U/ mg, Promega)
Extraktion	50 % Acetonitril (v/v) 0,1 % TFA (v/v)
Spotting	50 % Acetonitril (v/v) 0,5 % TFA (v/v)
Matrix	Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid 2,1 mg/ml (Bruker Daltronic GmbH)

Nach dem Verdau wurden die Proben mittels MS/MS im Labor von Prof. Hecker (Universität Greifswald) sequenziert.

2.5. IMMUNBIOLOGISCHE METHODEN

2.5.1. Western Blot (Towbin *et al.*, 1979)

Diese Methode ermöglicht die immunochemische Detektion geringer Proteinmengen. Dazu wurden die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Im Semi-Dry Verfahren wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Dies erfolgte in einer Trans-Blot-SD-Zelle der Firma BioRad. Zur Vorbereitung des Blots wurden sechs Lagen 3 MM Whatmann Papier und eine PVDF Membran auf Größe des Gels zugeschnitten und in Transfer-Puffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde zuvor

kurz in Isopropanol getaucht. Zuerst wurden drei Lagen des Whatmann Papiers auf die Anodenplatte des Gerätes platziert, danach folgten die Membran und das Gel. Zuletzt wurden drei weitere Lagen Whatmann Papier darüber geschichtet. Damit das Gel blasfrei auf der Membran lag, wurde mit einem Glasstab vorsichtig über den Blot gerollt. Der Transfer erfolgte für 30 min bei 2 mA pro cm² Gelfläche. Für größere Proteine wurde die Transferzeit erhöht.

Proteinfärbung auf PVDF-Membranen

Im Anschluss an den Transfer wurde die PVDF-Membran mit Ponceau-Rot angefärbt. Nach kurzem Schwenken in der Färbelösung wurde diese wieder entfernt und die Membran mit Wasser entfärbt. Durch die angefärbten Banden kann die Transfereffizienz überprüft werden. Gleichzeitig wurde der Proteinstandard auf der Membran markiert, um nach der Antikörperbehandlung die detektierten Banden ihrer Größe zuordnen zu können.

Immunodetektion

Die mit den für sie spezifischen Antikörpern erfolgte mit Hilfe einer gekoppelten alkalischen Phosphatase-Reaktion. Die Membran wurde dabei zur Vermeidung unspezifischer Bindungen für 2 h bei RT mit einer Blockierungslösung (TBST mit 3 % (w/v) BSA) abgesättigt. Dann erfolgte die Bindung der polyklonalen Antikörper an ihr Substrat (TBST + 1. Antikörper Kaninchen-Anti-MBP, Verhältnis 1:2500; Inkubation 1 h). Es folgten drei Waschschriffe zu je 5 min in TBST zur Entfernung ungebundener Antikörper. Im nächsten Schritt wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen-Antikörper, IgG, mit alkalischer Phosphatase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH); Verhältnis 1:5000 in TBST) an die bereits gebundenen primären Anti-MBP-Antikörper durch eine 30minütige Inkubation gekoppelt. Die Nitrocellulosemembran wurde 3 x in TBST (je 5 min) und 2 x in TBS (je 3 min) gewaschen. Anschließend erfolgte die Sichtbarmachung der Proteine durch Zugabe von 100 µl Detektionslösung (BCIP, ROCHE). Die Farbreaktion wurde mittels H₂O_{bidest} abgestoppt und die Membran im Dunkeln gelagert.

TBE-Puffer:	45 mM Tris Borat 1 mM EDTA
10 x TBS-Puffer:	200 mM Tris 1, 37 M NaCl pH 7,4
TBST-Puffer:	1 x TBS-Puffer 0, 15 % Tween 20 (v/v)
Transferpuffer (Blotto):	25 mM Tris 192 mM Glycin 1 % SDS (w/v) 20 % Methanol (v/v) pH 8,3 Lagerung bei 4 °C

3. ERGEBNISSE

3.1. KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNGSVERSUCH

VERSCHIEDENER DEHYDROGENASEGENE AUS *P. TORRIDUS*

In dem vollständig sequenzierten Genom von *P. torridus* wurden durch vergleichende Sequenzanalysen 67 ORFs für Dehydrogenasen identifiziert. Vier Dehydrogenasegene wurden aufgrund der möglichen industriellen Anwendbarkeit der Enzyme ausgewählt, kloniert und versucht rekombinant zu exprimieren.

ORF RPTO00201 Glycerol Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.6)
1050 bp, 37,58 kDa

Reaktion: $\text{Glycerol} + \text{NAD}^+ = \text{Glyceron} + \text{NADH} + \text{H}^+$

ORF RPTO00605 Alkohol Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.1)
1008 bp, 37,58 kDa

Reaktion: $\text{Alkohol} + \text{NAD}^+ = \text{Aldehyd/Keton} + \text{NADH} + \text{H}^+$

ORF RPTO01123 Glucose-1-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.47)
762 bp, 27, 3 kDa

Reaktion: $\beta\text{-D-Glucose} + \text{NAD (P)}^+ = \text{D-Glucono-1,5-lactone} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$

ORF RPTO1538 Glucose-1-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.47)
1056 bp, 37, 3 kDa

Reaktion: $\beta\text{-D-Glucose} + \text{NAD (P)}^+ = \text{D-Glucono-1,5-lactone} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$

3.1.1. Klonierung der Dehydrogenasegene in pBADmyc-HisA

Die Klonierung in den Vektor pBADmyc-HisA hatte zum Vorteil, dass die Dehydrogenasegene unter der Kontrolle des schwachen *araB*-Promotors stehen und die Expression sehr gut reguliert werden kann. Die Klonierung erfolgte nach dem in Abb. 12 dargestellten Schema. Dazu wurden zuerst die Gene mit den spezifischen Primern „Orf“_for und „Orf“_rev_XhoI mittels PCR

aus genomischer *P. torridus*-DNA amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass die PCR-Produkte am 5`-Ende mit dem zweiten Codon des Gens beginnen und am 3`-Ende eine *Xho*I Schnittstelle eingefügt wurde. Die PCR wurde wie unter 2.3.6 beschrieben durchgeführt. Anhand eines Agarosegels konnten die PCR-Produkte mit den entsprechenden Banden der richtigen Größe nachgewiesen werden. Die PCR-Produkte wurden wie unter 2.3.8 beschrieben aufgereinigt und mit *Xho*I für 6 Stunden geschnitten (s. 2.3.5). Im Anschluss erfolgte eine erneute Aufreinigung (s. 2.3.8). Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pBADmyc-His A ligiert (s. 2.3.12). Der Vektor wurde zunächst einer Restriktionsspaltung mit *Nco*I unterzogen und danach aus einem Agarosegel eluiert (s. 2.3.10). Die durch die Hydrolyse erhaltenen 5`-Überhänge wurden mit Hilfe von T4-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt (s. 2.3.12). Der linearisierte Vektor wurde anschließend mit *Xho*I geschnitten und erneut aus dem Gel eluiert.

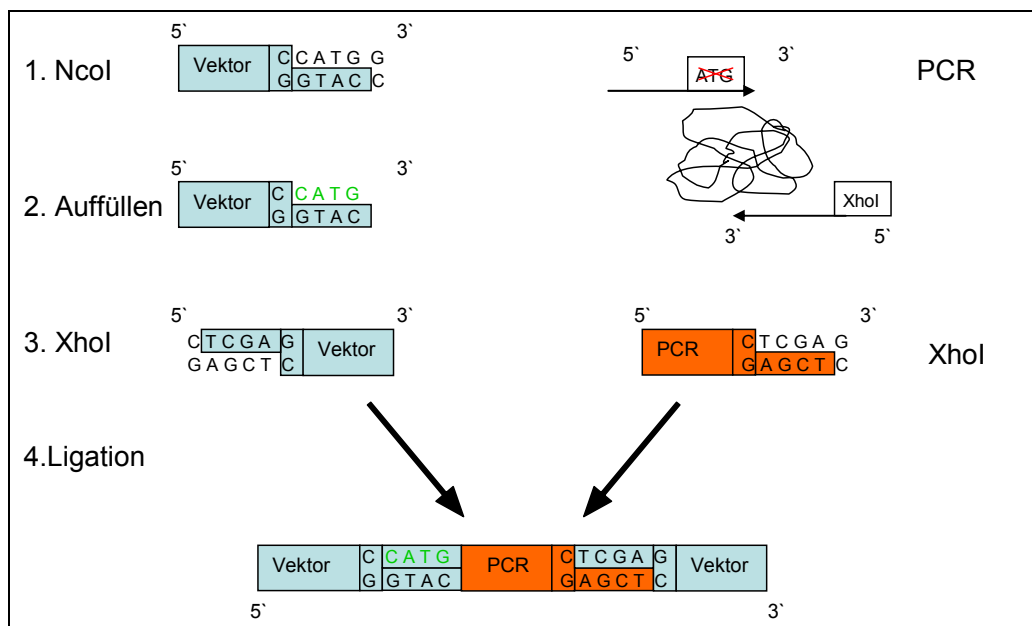


Abb. 12 Schema der Klonierung von verschiedenen Dehydrogenasen aus *P. torridus* in pBADmycHisA. 1. Restriktionsverdau des Vektors mit *Nco*I und PCR aus genomischer DNA mit den modifizierten Primern. 2. Auffüllen des Vektors zu glatten Enden 3. Restriktionsverdau von Vektor und PCR Fragmenten mit *Xho*I. 4. Ligation von Vektor und PCR Fragment.

Die Ligation der PCR-Produkte mit dem Vektor erfolgte ü.N. bei 16 °C (s. 2.3.12). Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* XL-1Blue transformiert (s. 2.3.2). Mittels Kolonie-PCR (s. 2.3.7) wurden anschließend positive Klone identifiziert.

Diese Klone wurden dann einer weiteren Überprüfung durch Restriktionsverdau unterzogen (Tab. 12).

Tab. 12 Übersicht über die erwarteten Fragmente des Kontroll-Restriktionsverdau. Die Zahlen 1-4 beschreiben das jeweilige verdaute Konstrukt. Rote Sterne zeigen positive Klone des jeweiligen Konstruktes an.

Klon	verwendete		erwartete	Ergebnisse
	Enzyme			
pBAD::201 (1)	<i>Hind</i> III		0,696 kbp	
			4,594 kbp	
pBAD::605 (2)	<i>Eco</i> RI		1,120 kbp	
		<i>Bam</i> HI	3,975 kbp	
pBAD::1123 (3)	<i>Eco</i> RI		0,938 kbp	
		<i>Bam</i> HI	3,975 kbp	
pBAD::1538 (4)	<i>Eco</i> RI		1,235 kbp	
		<i>Bam</i> HI	3,975 kbp	

Positive Klone wurden ausgewählt und die klonierten Fragmente in dem Konstrukt sequenziert, um eventuelle Mutationen auszuschließen. Die Sequenzierungen bestätigten mutationslose und korrekt integrierte Inserts.

Die Konstrukte pBAD::201, pBAD::605, pBAD::1123 und pBAD::1538 (Vektorkarten s. 6.5) wurden zur Überexpression in *E. coli* Ros2(DE3) transformiert.

3.1.2. Klonierung der Dehydrogenasegene in pEX22b

Die Klonierung der Dehydrogenase-ORFs (RPT00201, -605, -1123, -1538) in den Expressionsvektor pEX22b (Vektorkarten s. 6.5) wurde von Jörn Voss in Jülich übernommen (s. Diplomarbeit Jörn Voss). Eine Sequenzanalyse bestätigte die korrekt und mutationslos integrierten Inserts. Der Vorteil dieser Konstrukte ist der starke T7-Promotor, wodurch eine starke Überexpression der Dehydrogenasegene ermöglicht wird.

3.1.3. Klonierung der Dehydrogenasegene in pMALc2x

Durch die Fusion mit einem Maltose-Bindeprotein (MBP) kann die Löslichkeit von Proteinen erhöht werden. Zudem erleichtert diese Fusion die Aufreinigung

des gewünschten Proteins über die Bindung des MBPs an Amylose (s. 2.4.10.3). Zur Fusion des Glycerol-Dehydrogenase-ORFs (RPTO00201) mit MBP (MBP-201) wurde der Vektor pMALc2x verwendet, welcher die MCS downstream des *malE* Gens, das für MBP codiert, trägt. Die Überexpression des Zielgens erfolgt hierbei über den starken *tac* Promotor. Das pMALc2x System codiert zusätzlich für eine Faktor Xa Protease Erkennungssequenz. Diese Protease spaltet nach einer 4 Aminosäure-Erkennungsstelle zwischen dem MBP und dem Zielprotein, sodass dieses nach einer Aufreinigung wieder von dem Fusionsanteil abgespalten werden kann. (s. Abb. 13)

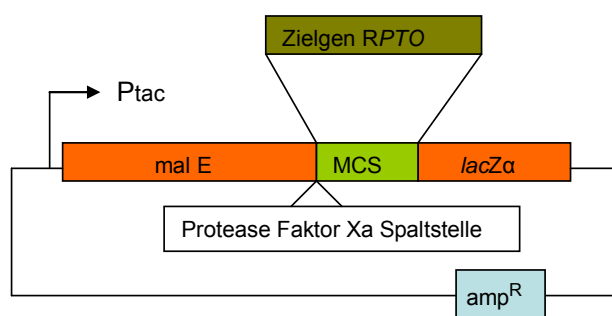


Abb. 13 Schema des pMalc2x-Konstruktes

Die ORFs wurden wie unter 3.1.1 beschrieben amplifiziert. Das mit *XhoI* hydrolysierte PCR-Produkt wurde in den mit *XmnI* und *SalI* geschnittenen Vektor ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* XL1-blue transformiert und positive Klone wurden nach Anzucht auf Selektionsmedium durch Blau-Weiß-Screening und Restriktionsanalyse identifiziert. Je ein positiver Klon wurde ausgewählt und das klonierte Fragment in dem Konstrukt sequenziert, um eventuelle Mutationen auszuschließen. Dafür wurden die Primer pMal_for und pBAD_rev (s. 2.1) verwendet. Die Sequenzierungen bestätigten mutationslose und korrekt integrierte Inserts (s. 6.5).

3.2. EXPRESSIONSVERSUCHE UND AKTIVITÄTSTESTS MIT DEN *P.*

TORRIDUS DEHYDROGENASEN IN *E. COLI*

3.2.1. Expression in *E. coli* Ros2(DE3)

Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die *P. torridus* Dehydrogenase-ORFs Codons aufweisen, die von *E. coli* selten verwendet werden. Diese

unterschiedliche „Codon Usage“ kann bei der heterologen Expression von *P. torridus* Genen in *E. coli* zu einer mangelhaften Expression des gewünschten Gens führen. Daher wurde versucht, die Überexpression in *E. coli* Ros2(DE3) zu erreichen. Dieser *E. coli* Stamm trägt ein zusätzliches pRARE Plasmid, das für sieben in *E. coli* selten vorkommende tRNAs codiert (s. Abb. 14).

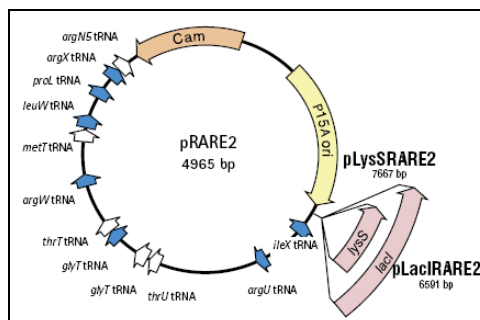


Abb. 14 Vektorkarte des pRARE Plasmids (Abb. s. Manual Competent cells, Novagen)

3.2.1.1. Expression und Aktivitätsmessungen in Zellextrakten von *E. coli* Ros2(DE3) pBAD::201, ::605, ::1123, ::1538

Für die Expression wurden die Konstrukte pBAD::201,::605,::1123,::1538 in *E. coli* Ros2(DE3) transformiert.

In Tab. 13 sind die Ergebnisse der Expressionsversuche zusammengefasst. Bis auf pBAD::1123 konnten bei allen Konstrukten Proteine mit den erwarteten Molekulargewichten von 37,58 kDa (*RPTO00201*), 38 kDa (*RPTO00605*) und 36 kDa (*RPTO01538*) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch befand sich das Protein dabei immer in der unlöslichen Fraktion. Eine Expression war erst nach 4 Stunden Induktion und zudem nur schwach sichtbar. Die löslichen Fraktionen wurden wie in 2.4.11 beschrieben auf ihre Dehydrogenase-Aktivität untersucht, um sicherzustellen, dass nicht doch ein geringer Teil an löslichem Protein vorliegt. Dabei konnte weder mit NAD^+ noch mit NADP^+ als Elektronenakzeptor Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden. Als Substrate wurden Glycerol (für *RPTO00201*), Ethanol (für *RPTO00605*) und D-Glucose (für *RPTO01123* und *RPTO01538*) eingesetzt.

Die fehlenden Dehydrogenase-Aktivitäten in den löslichen Fraktionen und die auf dem SDS-PAGE-Gel dem erwarteten Molekulargewicht entsprechenden sichtbaren Banden in der unlöslichen Fraktion lassen die Vermutung zu, dass es bei der Überproduktion der ORFs *RPTO00201*, *RPTO00605* und

RPTO01538 in dem Vektor pBADmycHisA zur Bildung von *inclusion bodies* kam.

Um eine bessere Löslichkeit der Proteine zu erhalten, wurden in Folgeexperimenten die Induktorkonzentration und die Inkubationstemperatur variiert. Dafür wurden die rekombinanten Expressionsstämme jeweils bei zwei verschiedenen Temperaturen (24 °C, 30 °C) und bei jeder Temperatur mit unterschiedlicher Induktorkonzentration induziert (0,2 % L-Arabinose, 0,4 % L-Arabinose). Diese Bedingungen bei der Expression der Gene hatten keinen Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins. Es konnte auch hier weder eine Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden, noch konnte Protein in den löslichen Fraktionen auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel gezeigt werden.

Blackwell und Horgan (Blackwell and Horgan, 1991) konnten zeigen, dass die Anzucht von Zellen unter Stressbedingungen die Bildung von löslichem, rekombinantem Protein fördert. In weiteren Experimenten wurde versucht, dies auf die Expression der *P. torridus* Dehydrogenasen zu übertragen. Dazu wurden 30 ml LB Medium mit einer ü.N. Kultur *E. coli* Ros2(DE3) mit dem jeweiligen Konstrukt 1 %ig angeimpft. Nach 1-stündiger Inkubation wurde den Kulturen Ethanol (3 % [v/v]) zugegeben. Bei einer OD_{600 nm} von 0,6 wurden die Kulturen mit 0,4 % L-Arabinose induziert und erneut Proben vor und 4 Stunden nach Induktion entnommen. Die Zellkulturen wuchsen durch die Zugabe von Ethanol deutlich langsamer, jedoch hatte dies keinen Einfluss auf die Löslichkeit bzw. Aktivität der Dehydrogenasen.

In weiteren Experimenten wurde versucht, wie unter 2.4.8 beschrieben, die Proteine der *inclusion bodies* zu renaturieren. Leider konnte auch hierdurch kein lösliches aktives Protein gewonnen werden.

Tab. 13 Übersicht über die Expression der pBADmycHisA-Dehydrogenase-Konstrukte

Stamm	Expression	Löslichkeit
<i>E. coli</i> Ros2(DE3)pBAD::201	ja	nein
<i>E. coli</i> Ros2(DE3)pBAD::605	ja	nein
<i>E. coli</i> Ros2(DE3)pBAD::1123	nein	nein
<i>E. coli</i> Ros2(DE3)pBAD::1538	ja	nein

3.2.1.2. Expression und Aktivitätsmessungen von *E. coli*Ros2(DE3) pEX22b::**201**, ::605, ::1123, ::1538

Die Konstrukte pEX22b::**201**, ::605, ::1123, ::1538 wurden zunächst in Ros2(DE3) transformiert. Im Anschluss folgten Expressionsversuche durch die Induktion mit 0,2 mM IPTG für 4 h. Auf ein SDS-Gel wurden davon jeweils der Überstand und das Pellet der Kultur aufgetragen. Als Kontrolle wurde das Rohextrakt von Ros2(DE3) mit dem jeweiligen Konstrukt, jedoch ohne Induktion aufgetragen. Nur das Konstrukt pEX22b::**201** zeigte in Ros2(DE3) eine eindeutige Überexpression (s. Abb. 15)

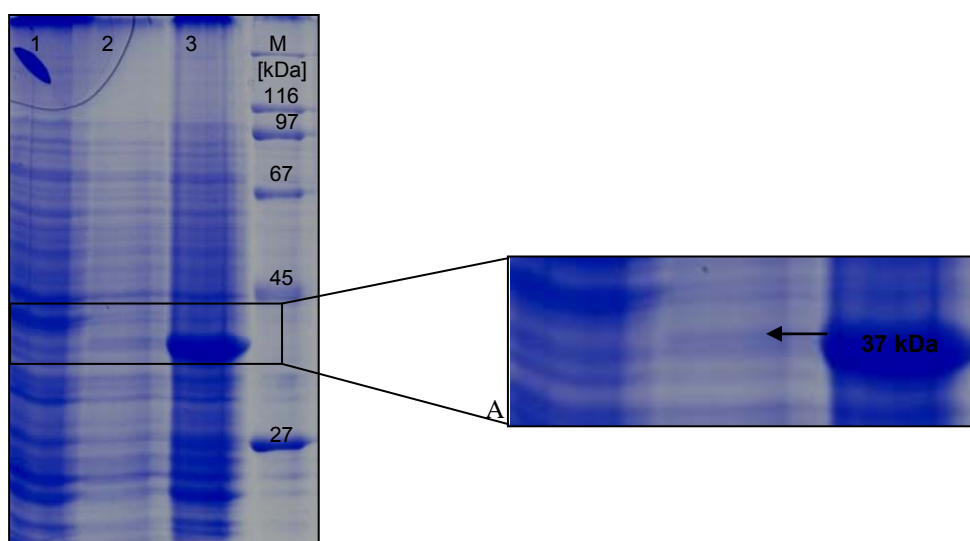


Abb. 15 SDS-PAGE-Gel von der Expression von ORF RPTO00201 in *E. coli* Ros2(DE3) (pEX22b::**201**). Induktion mit 0,2 mM IPTG für 4 h; Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel. Spur 1 – Kontrolle, *E. coli* Ros2(DE3) pEX22b::**201** ohne Induktion, Spur 2 – *E. coli* Ros2(DE3) pEX22b::**201** lösliche Fraktion (Überstand, ÜS), induziert mit 0,2 mM IPTG für 4 Stunden, Spur 3 – *E. coli* Ros2(DE3) pEX22b::**201** unlösliche Fraktion (Pellet) induziert mit 0,2 mM IPTG für 4 Stunden, Spur M – Molekularmassenstandard, A – Vergrößerung des Bereiches mit der Überexpression von RPTO00201 mit einem Molekulargewicht von 37 kDa nach Induktion mit 0,2 mM IPTG für 4 Stunden; der Pfeil markiert die lösliche Dehydrogenase im Überstand.

In Abb. 15 ist die Überexpression der potentiellen Glycerol-Dehydrogenase in *E. coli* Ros2(DE3) dargestellt. Im Überstand (Spur 2) ist nach der 4-stündigen Induktion eine Bande auf Höhe der erwarteten Größe von 37 kDa zu erkennen, die ohne Induktion (Spur 1) nicht erkennbar ist. Daher ist davon auszugehen, dass es sich dabei um die überproduzierte Glycerol-Dehydrogenase handelt. Wie in Spur 3 zu erkennen ist, befindet sich aber der größte Teil der rekombinant produzierten Dehydrogenase in der unlöslichen Fraktion, in den s.g. *inclusion bodies*. Von allen Fraktionen der jeweiligen Konstrukte wurden

anschließend Aktivitätstests durchgeführt (s. 2.4.11). Es konnte auch hier keine Aktivität bestimmt werden.

Da der Stamm mit dem Konstrukt pEX22b::201 der Einzige war, der eine deutliche Produktion des gewünschten Proteins in der löslichen Fraktion erkennen lies, wurde in den Folgeexperimenten versucht, die Expression der Glycerol-Dehydrogenase (RPTO00201) zu optimieren und aktives Protein zu erhalten. Dazu wurde in ersten Experimenten die IPTG-Konzentration bis auf 0,01 mM herabgesetzt, doch auch dies führte nicht zu einer Minimierung der *inclusion bodies*. Zudem wurden die Anzuchtbedingungen wie in 3.2.1.1 beschrieben variiert, wodurch ebenfalls die Löslichkeit des Proteins nicht gesteigert werden konnte. Daher wurde in weiteren Experimenten versucht, die Dehydrogenase mit Chaperonen cozuexprimieren (s. 3.2.2).

3.2.1.3. Expressionsversuche und Aktivitätsmessungen mit *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201

Durch die Expression des Fusionskonstruktes MBP-201 sollte versucht werden, mehr lösliches Protein zu gewinnen. Abb. 16 zeigt ein SDS-PAGE-Gel mit den Ergebnissen des Expressionsversuches mit *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201. Im Bereich von der erwarteten Größe des Fusionsproteins von 79 kDa ist eine deutliche Überexpressionsbande zu sehen (gerahmter Bereich), die auch in der löslichen Fraktion (Spur 4) deutlich zu erkennen ist.

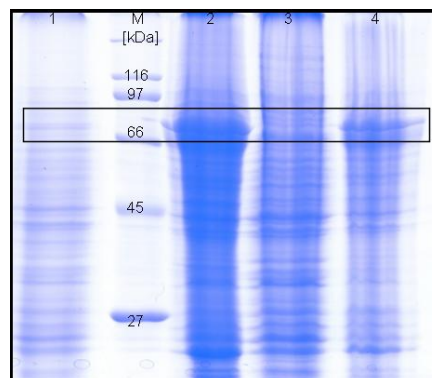


Abb. 16 SDS-PAGE-Gel des Expressionsversuches von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 bei 37 °C mit 0,2 mM IPTG induziert. Das Gel ist Coomassie-gefärbt. Spur 1 – Rohextrakt von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 vor Induktion; Spur 2 - Rohextrakt von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 nach 4 Stunden Induktion mit 0,2 mM IPTG; Spur 3 – Überstand (lösliche Fraktion) von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 vor Induktion, Spur 4 – Überstand (lösliche Fraktion) von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 nach 4 Stunden Induktion; M – Molekularmassenstandard

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Bande in der löslichen Fraktion tatsächlich um das Fusionsprotein MBP-201 handelt wurde ein Western Blot mit Anti-MBP-Antikörper (NEB) durchgeführt.

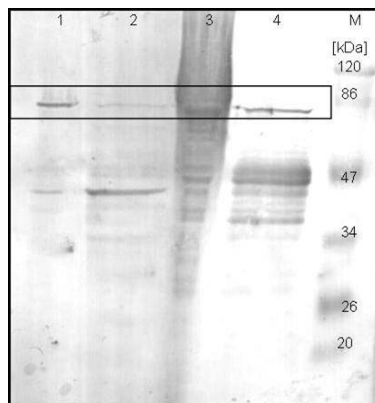


Abb. 17 Western Blot von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201. Spur 1 – lösliche Fraktion von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 nach 4 Stunden Induktion mit 0, 2 mM IPTG, Spur 2 - lösliche Fraktion von *E. coli* Ros 2(DE3) pMALc2x::201 ohne Induktion, Spur 3 - Rohextrakt von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 ohne Induktion, Spur 4 – Rohextrakt von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 nach 4 Stunden Induktion mit 0, 2 mM IPTG; M – prestained Molekularmassenstandard; detektiert wurde mit Anti-MBP-Antikörper.

In Abb. 17 ist das Ergebnis dieses Western Blots dargestellt. Die Abbildung zeigt einige unspezifische Bindungen des Antikörpers in jeder Spur. Im Bereich der erwarteten Größe von 79 kDa (gerahmter Bereich) ist jeweils eine deutliche Bande in der induzierten Fraktion im Vergleich zur uninduzierten Fraktion zu erkennen. Die Bande in der löslichen Fraktion spricht dafür, dass es sich um lösliches Fusionsprotein MBP-201 handelt.

In Folgeexperimenten wurde überprüft, ob das Fusionsprotein hitzestabil ist. Dazu wurde die lösliche Fraktion für 20 min bei 55 °C hitzegefällt und die daraus resultierende Fraktion auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Auf dem Gel (Daten nicht gezeigt) konnte man deutlich auch nach der Hitzefällung eine Bande im erwarteten Bereich von 79 kDa erkennen, was für eine Hitzestabilität des Fusionsproteins sprach. Jedoch zeigten Aktivitätsmessungen, dass das Protein nicht aktiv vorlag.

3.2.2. Coexpression mit Chaperongen

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die gleichzeitige Überexpression von Zielproteinen und Chaperonen in *E. coli* zu einer gesteigerten Löslichkeit des gewünschten Proteins und somit häufig auch zu dessen Aktivität führen kann.

Da verschiedene Variationen in der Anzucht, wie in 3.2.1 beschrieben zu keiner löslichen, aktiven Dehydrogenase führten, wurde nun versucht, die Dehydrogenase in *E. coli* zusammen mit verschiedenen Chaperonen überzuproduzieren. Verwendet wurden dafür verschiedene Vektoren aus dem Chaperon Plasmid Kit von Takara, die für unterschiedliche Chaperone codieren (s. Abb. 18).

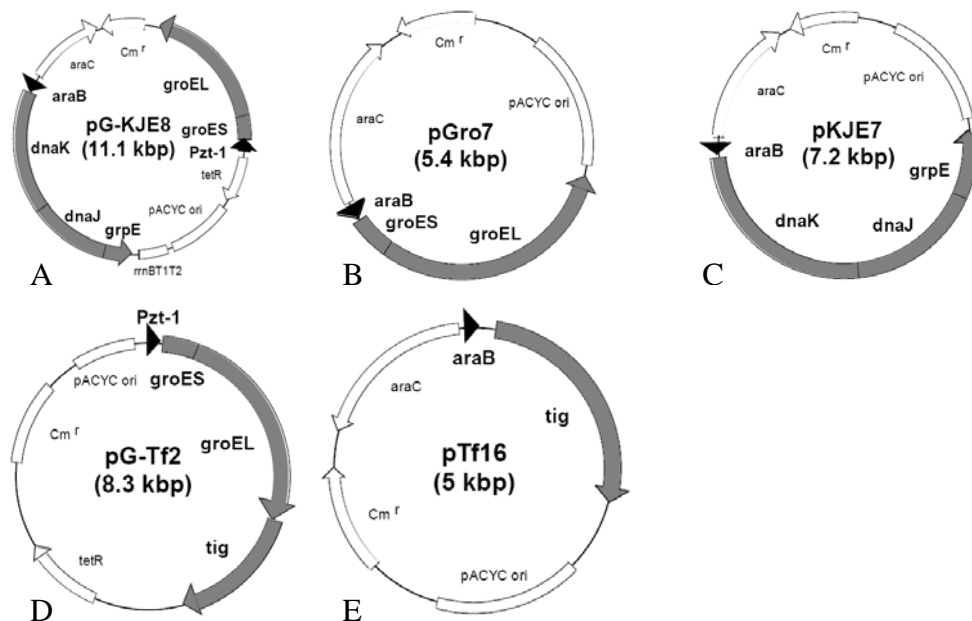


Abb. 18 Vektorkarten der verschiedenen Chaperon-Konstrukte aus dem Takara Plasmid Set. A – pG-KJE8, Chaperon 1 (C1), B – pGro7, Chaperon 2 (C2), C – pKJE7, Chaperon 3 (C3), D – pG-Tf2, Chaperon 4 (C4), E – pTf16, Chaperon 5 (C5) (Abb. s. Manual Chaperone Plasmid Set, Takara)

3.2.2.1. Konstruktion eines neuen *E. coli* Stammes zur Coexpression mit dem Takara Chaperon Set: BL21 RS

Da die Vektoren mit den Chaperonen als Selektionsmarker ein Chloramphenicol-Resistenzgen besitzen, war es nicht möglich, diese zusätzlich in den *E. coli* Stamm Ros2(DE3) zu transformieren, da dieser Stamm die gleiche Resistenz mitführt. Daher wurde für die heterologe Expression ein neuer Stamm konstruiert, der ein pRARE Plasmid mit Genen für die in *E. coli* seltenen tRNAs trägt.

Als Expressionsstamm wurde BL21(DE3) genutzt. Der Donorstamm für das pRARE Plasmid war der *E. coli* Stamm CodonPlus(DE3)-RiPL (Stratagene). Dieser Stamm enthält zwei pRARE Plasmide; Hte [*argU proL Cam^r*] und [*argU ileY leuW Strep/Spec^r*]. Isoliert wurde das pRARE Plasmid, welches für die

Streptomycin-Resistenz codiert, damit die Kompatibilität zu den Resistenzmarkern des Chaperonplasmids gewährleistet war. Zur Selektion des Plasmides wurde von einem ü.N. gewachsenen Stamm eine Plasmidminipräparation gemacht (s. 2.3.3.3) und die DNA im Anschluss sofort in BL21(DE3) Stamm via Elektroporation transformiert (s. 2.3.2). Die Zellen wurden auf LB-Platten mit Streptomycin ausgestrichen. Die gewachsenen Klone wurden erneut auf eine LB-Platte mit Streptomycin (Strep) und eine LB-Platte mit Chloramphenicol (Cm) gestempelt. Da keine Klone auf der Cm-Platte wuchsen, konnte man sicher sein, dass nur das pRARE Plasmid mit der Streptomycin-Resistenz in den Stamm transformiert worden ist. Zusätzlich wurden die Zellen auf die Anwesenheit des Plasmides überprüft. Dieser konstruierte Stamm wurde im Folgenden als BL21 RS bezeichnet.

Im Anschluss wurden von dem Stamm elektrokompetente Zellen hergestellt (s. 2.3.1) und die Chaperonplasmide (Takara) (s. Abb. 18) hinein transformiert (Bezeichnung im weiteren Verlauf: BL21 RS C1-5).

3.2.2.2. Coexpression und Aktivitätsbestimmungen von *E. coli* BL21 RS-Stämmen mit pBAD::*RPTO0201*, -605, -1123, -1538 und Chaperonplasmiden

Für die Coexpression wurde BL21 RS C1 verwendet. Bei diesem Plasmid stehen die Gene *groEL/ES* unter der Kontrolle des mit Tetrazyklin induzierbaren *Pzt-1* Promotors und die Gene *dankI/dnaJ/grpE* unter der Kontrolle des durch L-Arabinose induzierbaren *araB*-Promotors. Von BL21 RS C1 wurden elektrokompetente Zellen hergestellt und mit den Konstrukten pBAD::*201*, pBAD::*605*, pBAD::*1123* und pBAD::*1538* transformiert. Für die Expression wurde der Stamm BL21 RS C1 mit dem jeweiligen pBAD*mycHisA*-Konstrukt (::*201*, ::*605*, ::*1123*, ::*1538*) in einer 30 ml Kultur angezogen. Bei einer OD_{600 nm} von 0,6 wurde der Stamm wie in Tab. Tab. 14 beschrieben für 4 h induziert.

Tab. 14 Übersicht über die durchgeführten Expressionsversuche

Konstrukt	Induktor (Konzentration)	erwartete Banden [kDa]
pBAD::201 + C1	a) 0, 4% L-Arabinose	37 (201) 70 (DnaK) 40 (DnaJ) 22 (GrpE)
	b) 10 ng/ml Tetrazyklin	60 (GroEL) 10 (GroES)
	c) a + b	a + b
pBAD::605 + C1	a) 0, 4% L-Arabinose	37 (605) 70 (DnaK) 40 (DnaJ) 22 (GrpE)
	b) 10 ng/ml Tetrazyklin	60 (GroEL) 10 (GroES)
	c) a + b	a + b
pBAD::1123 + C1	a) 0, 4% L-Arabinose	27 (1123) 70(DnaK) 40 (DnaJ) 22 (GrpE)
	b) 10 ng/ml Tetrazyklin	60 (GroEL) 10 (GroES)
	c) a + b	a + b
pBAD::1538	a) 0, 4% L-Arabinose	37 (1538) 70 (DnaK) 40 (DnaJ) 22 (GrpE)
	b) 10 ng/ml Tetrazyklin	60 (GroEL) 10 (GroES)
	c) a + b	a + b

Es wurde versucht über die unabhängig voneinander induzierbaren Chaperongene auf einem Plasmid, verschiedene Kombinationen (s. Tab. 14) der Coexpression zu erzielen, um den jeweiligen ORF (201, 605, 1123, 1538) löslich und aktiv zu exprimieren. Auf ein SDS-Gel wurde dann jeweils der Rohextrakt, der Überstand des Rohextraktes und das Pellet aufgetragen. Als Kontrolle wurde der Rohextrakt des uninduzierten *E. coli* Stammes BL21 RS C1 mit pBADmycHisA aufgetragen. Doch auch in Kombination mit den verschiedenen Chaperonen konnte keines der Konstrukte löslich und aktiv exprimiert werden. Am Beispiel von pBAD::201 ist in Abb. 19 das SDS-Gel mit den unterschiedlichen Induktorkombinationen gezeigt.

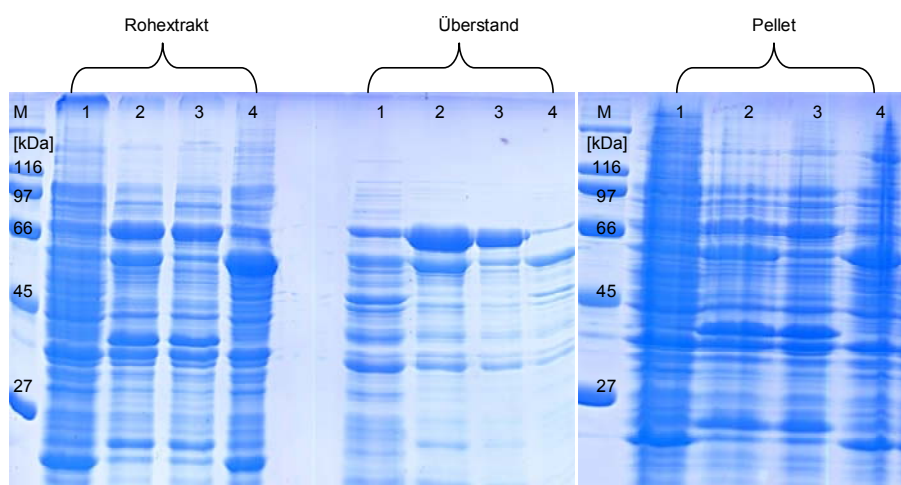


Abb. 19 SDS-PAGE-Gel der Coexpression von pBAD::201 mit C1 (pG-KJE8) in *E. coli* BL21 RS. Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel; Spur 1 – Kontrolle, *E. coli* BL21 RS pBADmycHisA + C1 uninduziert; Spur 2 – *E. coli* BL21 RS pBADmycHisA + C1, Induktion mit 0,4 % L-Arabinose und 10 ng/ml Tetrazyklin; Spur 3 – *E. coli* BL21 RS pBADmycHisA + C1, Induktion mit 0,4 % L-Arabinose; Spur 4 – *E. coli* BL21 RS pBADmycHisA + C1, Induktion mit 10 ng/ml Tetrazyklin; Induktion jeweils dargestellt im Rohextrakt, Überstand (lösliche Fraktionen) und Pellet; Spur M - Molekularmassenstandard

In der Abb. 19 ist deutlich zu erkennen, dass die Chaperone unabhängig von einander exprimiert werden können. In Spur 4 sind die Proben aufgetragen, die nur mit Tetrazyklin (10 ng/ml) induziert wurden. Wie erwartet, ist eine Bande als deutliche Überexpression des unter der Kontrolle des *Pzt-1* Promotors stehenden Chaperons GroEL mit einer Molekularmasse von 60 kDa zu erkennen. Das Chaperon GroES mit 10 kDa ist auf dem Gel nicht mehr zu erkennen. In Spur 3 erkennt man die Banden der durch L-Arabinose (0,4 %) induzierten Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE mit ihren Molekularmassen von 70 kDa, 40 kDa und 22 kDa. In Spur 2 sind die Banden aus der Kombination der Induktion mit Tetrazyklin (10 ng/ml) und L-Arabinose (0,4 %) zu erkennen. In Spur 2 und 3 hätte man zudem eine Bande im Bereich der erwarteten Größe

der Glycerol-Dehydrogenase (ORF 201) mit 37 kDa erwartet, da diese ebenfalls unter der Kontrolle des *araB*-Promotors steht. Doch weder in der löslichen Fraktion (ÜS) noch in der unlöslichen Fraktion (PE) ist in diesem Bereich eine zusätzliche Bande zu erkennen. Das gleiche Ergebnis wurde bei den anderen ORFs erhalten. Weitere Expressionsversuche, die Dehydrogenasegene mit den Chaperongen C1-5 cozuexprimieren erbrachten auch kein lösliches Protein. Da aber das Chaperon DnaJ mit 40 kDa sehr stark exprimiert wird und die gewünschten Dehydrogenasen (bis auf RPTO01123) mit einer Molekularmasse im Bereich von 36/37 kDa sehr dicht beieinander liegen, könnte es sein, dass eventuell schwach exprimierte Banden durch die intensiven Banden der Chaperone überlagert werden und dadurch auf dem SDS-Gel nicht zu detektieren sind. Daher wurden zusätzlich Aktivitätstests durchgeführt, doch diese blieben ebenfalls ohne Ergebnis.

3.2.2.3. Coexpression und Aktivitätsbestimmungen von *E. coli* BL21 RS Stämmen mit pEX::201 und Chaperonplasmiden

Für die Coexpression wurde zunächst pEX::201 jeweils in einen der Stämme BL21 RS C1-5 transformiert.

Für die Expression in einer 30 ml Kultur wurde zuerst die Chaperonproduktion mit 0,4 % L-Arabinose und mit 10 ng/ml Tetrazyklin induziert. Vier Stunden danach wurde die Produktion der Glycerol-Dehydrogenase (RPTO00201) mit 0,2 mM IPTG ü.N. induziert. Als Negativkontrolle wurde eine 5 ml Probe vor der Induktion abgenommen.

Um zu überprüfen, ob die Dehydrogenase als aktives Enzym exprimiert wurde, wurden im Anschluss von den Proben spektrophotometrische Aktivitätsbestimmungen durchgeführt.

3.2.2.3.1. Aktivitätsbestimmungen im Rohextrakt von *E. coli* BL21 RS pEX::201 C1-5

Der durch die Coexpression mit den Chaperonen erhaltene Kulturüberstand von *E. coli* BL21 RS pEX::201 C1-5 wurde in einem spektrophotometrischen Aktivitätstest (s. 2.4.11) zur Bestimmung der Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität eingesetzt. Da man aufgrund der Eigenschaften von *P. torridus* davon ausgehen kann, dass das Enzym vermutlich bis 60 °C hitzestabil ist, wurden die

Überstände der Rohextrakte von BL21 RS C1-5 pEX::201 jeweils für 20 min bei 55 °C einer Hitzefällung unterzogen.

In ersten Aktivitätstests wurde versucht zu ermitteln welchen Cofaktor die Glycerol-Dehydrogenase zur Oxidation von Glycerol zu Glyceron bevorzugt und ob monovalente Kationen, wie es von Lin und Magasanik (Lin and Magasanik, 1960) beschrieben wurde, einen aktivierenden Einfluss auf die Glycerol-Dehydrogenase haben (Abb. 20). Es wurde jeweils ein Aliquot des induzierten Kulturüberstandes von BL21 RS C1-5 pEX::201 und der Kontrolle (BL21 RS C1-5 pEX::201 ohne Induktion) abgenommen und der restliche Überstand (ÜS) hitzegefällt. In den Aktivitätstest wurden jeweils einmal NAD^+ und einmal NADP^+ als Elektronenakzeptor in die Reaktion mit dem ungefällten und dem gefällten Überstand eingesetzt. Des Weiteren wurde Ammoniumsulfat als potentieller Aktivator der Dehydrogenase in der Reaktion mit gefälltem Überstand eingesetzt. Der Test wurde in 1 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz wurde 5 min bei 55 °C vorgewärmt und anschließend die Reaktion mit Glycerol als Substrat gestartet. Gemessen wurde die NAD(P)H -Zunahme im Bereich von 340 nm nach 30 min Inkubation. Die Messung erfolgte gegen die uninduzierte Kontrolle (BL21 RS C1-5 pEX::201).

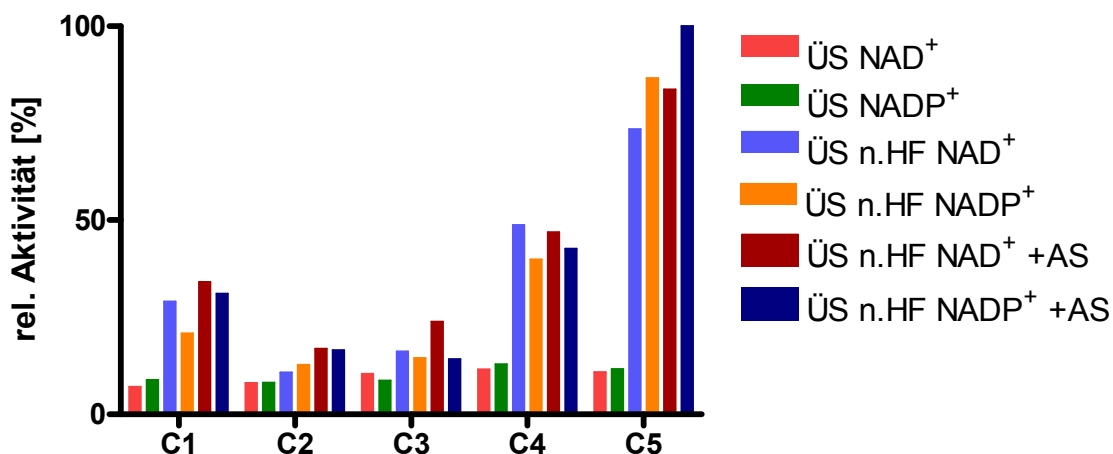


Abb. 20 Relative Aktivität der Glycerol-Dehydrogenase in der löslichen Fraktion coexprimiert mit C1-5 aus BL21 RS pEX::201 C1-5. ■ - Aktivität aus dem Überstand mit NAD^+ als Cofaktor, ■ - Aktivität aus dem Überstand mit NADP^+ als Cofaktor, ■ - Aktivität aus dem Überstand nach Hitzefällung mit NAD^+ als Cofaktor, ■ - Aktivität aus dem Überstand nach Hitzefällung mit NADP^+ als Cofaktor, ■ - Aktivität aus dem Überstand nach Hitzefällung mit NAD^+ als Cofaktor und Ammoniumsulfat als potentieller Aktivator, ■ - Aktivität aus dem Überstand nach Hitzefällung mit NADP^+ als Cofaktor und Ammoniumsulfat als potentieller Aktivator. Die Glycerol-Dehydrogenase aus pEX::201 wurde jeweils mit C1, C2, C3, C4 und C5 coexprimiert. C1-5 – Chaperone 1-5 (s. Abb. 18). Die Negativkontrolle (BL21 RS pEX::201 C1-5, uninduziert) wurde mit den Werten verrechnet. n = 3

In Abb. 20 ist die relative Aktivität der Glycerol-Dehydrogenase (ORF RPTO00201), die mit den Chaperonplasmiden C1-5 coexprimiert (aus BL21 RS pEX::201 C1-5) wurde, dargestellt. Gezeigt ist die Dehydrogenase-Aktivität, die aus dem Überstand des Rohextraktes bestimmt wurde. Grundsätzlich ist zu erkennen, dass es keinen Unterschied machte, ob der Dehydrogenase NAD^+ oder NADP^+ als Elektronenakzeptor angeboten wurde. Ebenso war keine Steigerung der Aktivität zu verzeichnen, wenn Ammoniumsulfat als potentieller Dehydrogenase-Aktivator (Lin and Magasanik, 1960) hinzugegeben wurde. Im Vergleich zu vorangegangenen Experimenten ohne gleichzeitige Expression mit den Chaperonplasmiden C1-5 (Daten nicht gezeigt) war bei der Coexpression von pEX::201 mit C1-5 in allen Proben Aktivität messbar. Nur die Stärke der Aktivität war unterschiedlich ausgeprägt mit den unterschiedlichen Chaperonen. Deutlich zu erkennen ist, dass die Aktivität nach Hitzefällung des Überstandes bei allen Proben zunahm. Des Weiteren kann man der Abbildung entnehmen, dass die Coexpression von pEX::201 mit C5, welches für das Chaperon *tig* codiert, eine Aktivitätssteigerung um fast 50 % im Vergleich zur Coexpression mit C4 hervorrief und sogar eine Steigerung um fast 75 % im Vergleich zur Coexpression mit C1-3. Die Chaperonplasmide 2 und 3 scheinen keinen, und Chaperonplasmid 1 nur einen sehr schwachen Einfluss auf eine Aktivitätszunahme zu haben.

3.2.2.3.2. Einfluss der Temperatur auf die *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität in *E. coli* BL21 RS pEX::201 C1-5

In Folgeexperimenten wurde überprüft, welchen Einfluss eine Temperaturerhöhung auf die Aktivität der mit C1-5 coexprimierten Glycerol-Dehydrogenase (RPTO00201 aus BL21 RS pEX::201 C1-5) hat. Die Messungen wurden mit hitzegefälltem Überstand des Rohextraktes durchgeführt, mit NAD^+ als Elektronenakzeptor, und wurden gegen eine uninduzierte Kontrolle (BL21 RS pEX::201 C1-5) durchgeführt.

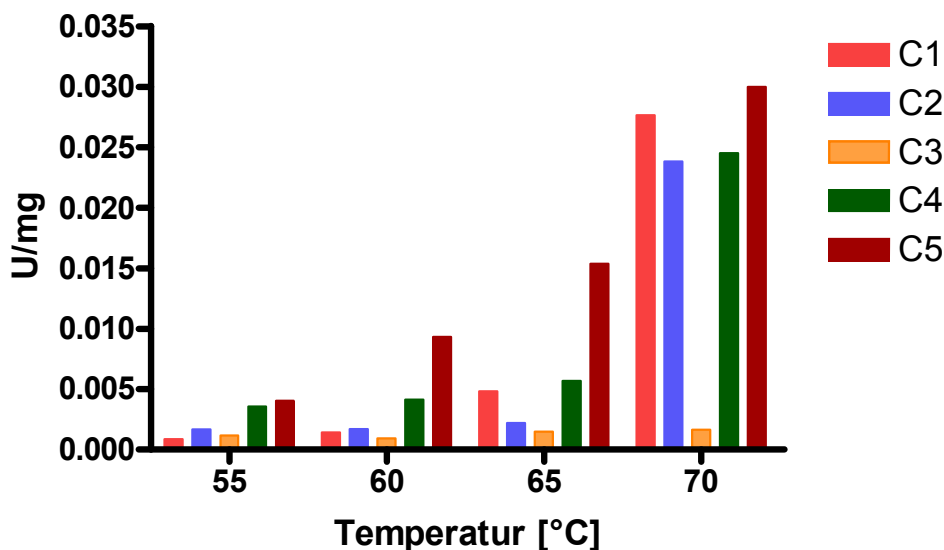


Abb. 21 Spezifische Aktivität der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase im hitzegefällten Überstand (ÜS) aus BL21 RS pEX::201 C1-5 coexprimiert mit Plasmid C1-5 bei verschiedenen Temperaturen. ■ - spezifische Aktivität von pEX::201 coexprimiert mit Plasmid 1, ■ - ~ coexprimiert mit Plasmid 2, ■ - ~ coexprimiert mit Plasmid 3, ■ - ~ coexprimiert mit Plasmid 4, ■ - ~ coexprimiert mit Plasmid 5. C1-5 s. Die Negativkontrolle (BL21 RS pEX::201 C1-5, uninduziert) wurde mit den Werten verrechnet. n = 3

Das Diagramm in Abb. 21 stellt die spezifischen Aktivitäten der Glycerol-Dehydrogenase (pEX::201), welche zusammen mit Chaperonen der Plasmide C1-5 überproduziert wurde, im hitzegefällten Überstand dar. Es ist deutlich zu entnehmen, dass bei einem Temperaturanstieg von 55 °C auf 70 °C die spezifische Aktivität der Glycerol-Dehydrogenase zunimmt. Bei der Coexpression mit Chaperonplasmid 5, welches für *tig* codiert, ist schon bei einer Temperaturerhöhung um 5 °C eine deutliche Zunahme der Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität messbar. Diese Aktivität steigt dann fast linear an bis zur Temperatur von 70 °C. Bei der Coexpression mit den Chaperonplasmiden 1, 2 und 4 ist erst bei 70 °C eine deutliche Zunahme der Aktivität zu messen. Auf die Coexpression der Dehydrogenase mit dem Chaperonplasmid 3 scheint eine Temperaturerhöhung keinen Einfluss zu haben. Interessanterweise zeigten sich in den Vorversuchen (s. 3.2.2.3.1) ähnliche Tendenzen. Durch Coexpression mit dem Chaperonplasmid 5 konnte man die größte Aktivität bestimmen, gefolgt von der Coexpression mit Chaperonplasmid 4 und dann Chaperonplasmid 1. Lediglich bei der Coexpression mit dem Chaperonplasmid 2 war keine Steigerung der Aktivität erkennbar, allerdings wurden die vorangegangenen Tests nur bei 55 °C durchgeführt und in den nun

durchgeführten Tests ist auch erst eine Aktivitätszunahme mit der Coexpression mit C2 ab 70 °C zu verzeichnen.

Bei der Coexpression mit Chaperonplasmid 5 (C5) konnte die größte Aktivität im Überstand gemessen werden. Waren es bei 55 °C noch 4 mU/mg, so war es bei einem Temperaturanstieg um 5 °C mit 9,3 mU/mg schon mehr als doppelt so viel Aktivität. Bei 65 °C wurden 15,4 mU/mg bestimmt und bei 70 °C 30 mU/mg. Bei der Coexpression mit Chaperonplasmid 3 wurde durchgehend nur eine spezifische Aktivität von ~ 1 mU/mg bestimmt. Die Coexpression mit den Chaperonplasmiden 1 und 2 (C1, 2) zeigte bis 65 °C nur spezifische Aktivitäten von 1 – 5 mU/mg. Erst bei einer Temperaturerhöhung auf 70 °C steigt die spezifische Aktivität bei C1 auf 28 mU/mg und bei C2 auf 24 mU/mg.

Da bei der Coexpression mit Chaperonplasmid 1 und 5 die größten spezifischen Aktivitäten der Glycerol-Dehydrogenase bestimmt werden konnten, wurden diese Stämme (BL21 RS C1,5 pEX::201) für die weitere Charakterisierung verwendet.

3.2.2.3.3. Bestimmung der spezifischen Aktivität der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase aus *E. coli* BL21 RS pEX::201 C1/C5 im Rohextrakt

Im folgenden Aktivitätstest wurde die spezifische Aktivität der Glycerol-Dehydrogenase von *P. torridus*, deren Gen gemeinsam mit Chaperonplasmiden 1 oder 5 coexprimiert wurde (aus *E. coli* BL21 RS pEX::201 C1/C5) im hitzegefällten Überstand des Rohextraktes bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 erfolgte die Induktion der Chaperonbildung. Zwei Stunden später wurde pEX::201 mit 0,3 mM IPTG ü.N. induziert.

In Vorversuchen wurde versucht die Test-Bedingungen so anzupassen, dass die endogene *E. coli* Glycerol-Dehydrogenase Aktivität so gering wie möglich im Testansatz war. Dazu wurde der Überstand von *E. coli* BL21 RS C1 mit verschiedenen Puffern (50 mM Phosphat-Puffer, pH 6,1; 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6,0; 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 4,5) bei 60-80 °C auf Glycerol-Dehydrogenase Aktivität untersucht. Es stellte sich heraus, dass in einem Natriumacetat-Puffer, pH 4.5 die Aktivität der endogenen Glycerol-

Dehydrogenase sehr gering gehalten werden kann. Daher wurde der folgenden Glycerol-Dehydrogenase Aktivitätstest in diesem Puffer durchgeführt.

In den Aktivitätstest wurde der Überstand eingesetzt, der zuvor bei 70 °C hitzegefällt wurde. Der Test wurde für 10 min auf die jeweilige Test-Temperatur vorgewärmt und dann mit Substrat gestartet für eine Inkubationszeit von 15 min. Die Messung erfolgte gegen die gleiche Probe ohne Substrat. Die Ergebnisse des Tests sind in Abb. 22 dargestellt. Die größte Aktivität konnte bei der Coexpression mit dem Chaperonplasmid 1 bestimmt werden. Aber auch bei der Coexpression mit dem Chaperonplasmid 5 konnte noch *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität bestimmt werden. Tendenziell zeigt sich ein Optimum bei 75 °C.

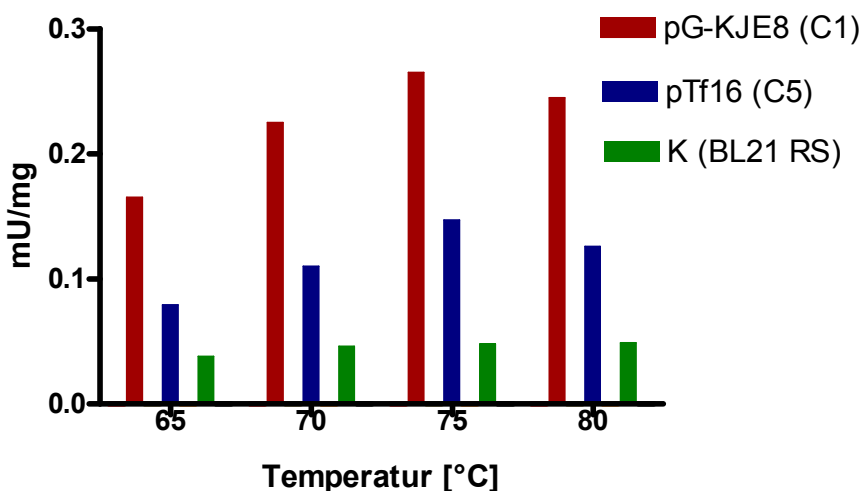


Abb. 22 Spezifische Aktivität der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase aus *E. coli* BL21 RS pEX::201 coexprimiert mit Chaperonplasmiden 1 oder 5. Induktion von pEX::201 erfolgte 2 Stunden nach der Induktion der Chaperonbildung mit 0,3 mM IPTG ü.N. ■ - spezifische Aktivität von pEX::201 coexprimiert mit C1 ■ - ~ coexprimiert mit C5, ■ - Kontrolle, BL21 RS C1, n = 3

3.2.3. Expressionsversuche und Aktivitätstests mit *E. coli* ECL 707 pEX::201 C1-5

Um bei den Aktivitätsmessungen für die *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase im Überstand das Hintergrundsignal der endogenen *E. coli* Glycerol-Dehydrogenase zu minimieren, wurde das Konstrukt pEX::201 in den Glycerol-Dehydrogenase-negativen *E. coli* Stamm ECL 707 (Sprenger et al., 1989) transformiert.

3.2.3.1. Aktivitätstests mit *E. coli* ECL 707 pEX::201 C1-5 auf Carbonylindikatorplatten

Erste Aktivitätsmessungen mit dem Stamm *E. coli* ECL 707 pEX::201 blieben ohne Erfolg. Daher wurde auch hier eine Coexpression mit den Chaperonplasmiden 1-5 (C1-5) durchgeführt.

Von dem *E. coli* Stamm ECL 707 pEX::201 wurden elektrokompente Zellen hergestellt und je ein Chaperonplasmid (C1-5) in diese Zellen transformiert. Anschließend wurde mit den Stämmen ECL 707 pEX::201 C1-5 Aktivitätstests auf Carbonylindikatorplatten durchgeführt (s. 2.4.11.2).



Abb. 23 Carbonylindikatorplattentests mit ECL 707 pEX::201 C1-C5. C1-C5: Klone ECL 707 pEX::201, die jeweils mit den Chaperonen C1-5 coexprimiert wurden. K: Kontrolle ECL 707

Der Plattentest in Abb. 23 zeigt deutlich Aktivität als starke Rotfärbung bei dem Stamm ECL 707 pEX::201 coexprimiert mit Chaperonplasmid 4.

Mittels spektrophotometrischen Aktivitätstests im hitzegefällten Überstand konnte allerdings keine Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität bestimmt werden. Da der Stamm *E. coli* ECL 707 keine T7-Polymerase codiert, konnte pEX::201 nicht induziert werden und somit das Glycerol-Dehydrogenasegen auch nicht überproduziert. Die gezeigte Aktivität auf der Indikator Platte ist daher möglicherweise auf die Transkription des T7-Promotors zurückzuführen. Um die Konstrukte aber zusätzlich zu induzieren, wurde in folgenden Experimenten zusätzlich eine Plasmid mit dem T7-Polymerase-Gen (pAK::T7, (Tabor and Richardson, 1985)) in den Stamm ECL 707 pEX::201 C1-5 transformiert.

Für die Induktion des T7-Polymerase-Gens wurden die Zellen bei 30 °C ü.N. angezogen, dann für 60 min bei 42 °C induziert und anschließend für mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Während dieser 2 Stunden erfolgte

parallel die Induktion der Chaperone und anschließend die Induktion von pEX::201 mit 0,3 mM IPTG für 4 Stunden.

Mit den induzierten Kulturen wurden spektrophotometrische Tests zur Bestimmung der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität durchgeführt. Bei keinem der Stämme konnte Aktivität gemessen werden. Daher wurde versucht Aktivität mittels des sensitiveren Carbonylindikatorplattentests zu bestimmen. Auf einer Platte wurden die Kontrolle ECL 707 mit ECL 707 pEX::201 und ECL 707 T7 pEX::201 C1-5 miteinander verglichen. Dabei zeigten die Stämme ECL 707 T7 pEX::201 C1/C2/C4/C5 Aktivität als durchgängige rote Färbung der Kolonien (s. Abb. 24). Bei der Coexpression mit C3 konnte kein Unterschied zum Kontrollstamm festgestellt werden. Der Stamm ohne coexprimierte Chaperone zeigte auf keiner der Platten Aktivität.

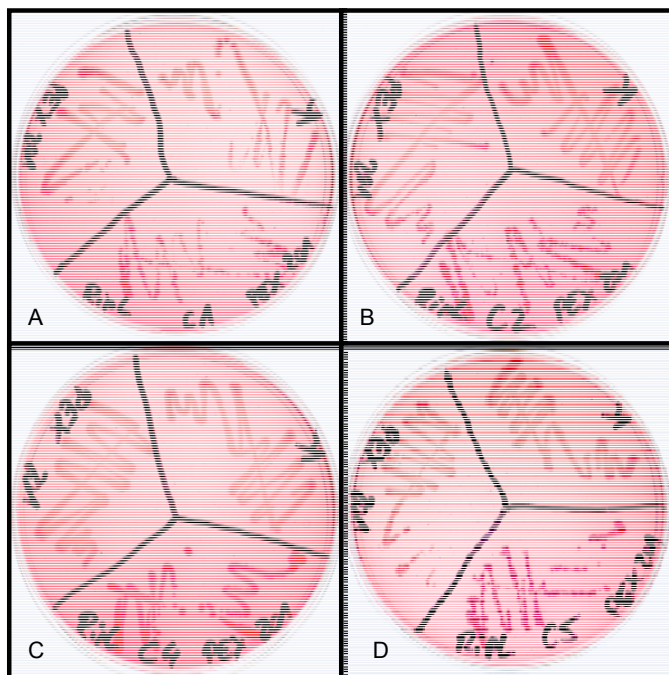


Abb. 24 Glycerol-Dehydrogenase Aktivitätstest auf Carbonylindikatorplatten. A – ECL 707 T7 pEX::201 C1; B - ECL 707 T7 pEX::201 C2; C - ECL 707 T7 pEX::201 C4; D - ECL 707 T7 pEX::201 C5, A – D ECL 707 pEX::201, ECL 707

Die vorangegangenen Expressions- und Aktivitätsbestimmungen haben gezeigt, dass die *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase teilweise löslich und auch aktiv, mittels der Coexpression von Chaperonplasmiden 1,2,4,5, exprimiert werden kann. Doch gerade bei Aktivitätsmessungen im Rohextrakt können starke Schwankungen aufgrund von Hintergrundaktivitäten entstehen. Zudem kann das Enzym im Rohextrakt nicht weitergehend charakterisiert werden.

Daher wurde versucht, die Glycerol-Dehydrogenase in Folgeexperimenten aktiv aufzureinigen.

3.3. AUFREINIGUNGSVERSUCHE

3.3.1. Aufreinigung der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase

(RPT00201) aus *E. coli* BL21 RS pEX::201 C1 mit Source 15S

Für die weitere Charakterisierung der Glycerol-Dehydrogenase (RPT00201) wurde versucht, diese über *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC, s. 2.4.10.1) aufzureinigen. Dazu wurde die Kationenaustauschersäule SOURCE 15S verwendet. Es wurde ein Rohextrakt aus 1 Liter BL21 RS C1 pEX::201 gewonnen und dieser für 20 mit bei 55 °C hitzegefällt. Der gewonnene Überstand wurde zunächst mit HiTrap-Entsalzungssäulen entsalzt, die Proteinkonzentration auf 1 mg/ml eingestellt und ~ 40 mg Protein_{gesamt} auf die Source 30Q Säule aufgetragen. Die Fraktionen 1 bis 65 wurden auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die Proben, von denen mittels Bradford-Messung Protein bestimmt werden konnte, wurden in einem Glycerol-Dehydrogenase Aktivitätstest untersucht (s. 2.4.11). In Abb. 25 sind die Ergebnisse dieser Messungen zusammengefasst.

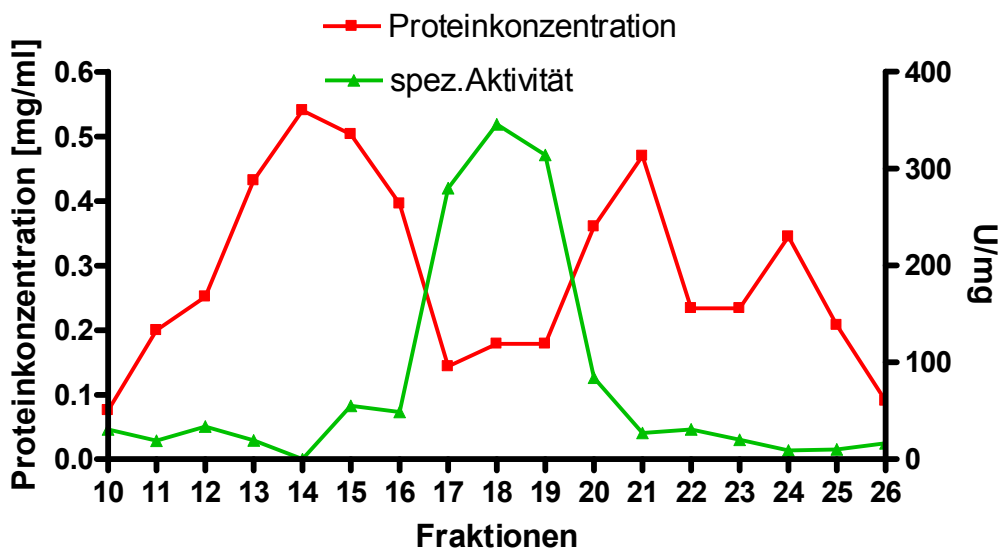


Abb. 25 Spezifische Aktivität und Proteinkonzentration der Fraktionen 10-26 nach Aufreinigung der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase aus BL21 RS C1 pEX::201 über Source 15S.

Im anschließenden Reinigungsschritt wurden die aktivsten Fraktionen 17-19 gepoolt, umgepuffert und auf eine Phenylsepharose 10/16 Säule gegeben.

Sämtliche Fraktionen der Phenylsepharose-Säule wurden auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Wie sich herausstellte, war das gesamte Protein im Durchlauf. Aktivität war weder in der Durchlaufraktion, noch in dem Aliquot, welches vor dem Lauf von den gepoolten Fraktionen 17-19 genommen wurde, messbar.

Erneute Aufreinigungsversuche über andere Säulen oder Säulenkombinationen schlugen fehl. Wurde aktives Protein aufgereinigt, so war dieses nach dem 1. Reinigungsschritt nicht annähernd sauber und die Aktivität war nur bis zu 8 Stunden nach der Aufreinigung messbar. Zudem konnte nicht definitiv ausgeschlossen werden, dass unter diesen gewählten Bedingungen die endogene *E. coli* Glycerol-Dehydrogenase aufgereinigt wurde, denn laut Asnis und Brodie (Asnis and Brodie, 1953) ist die Glycerol-Dehydrogenase von *E. coli* in dem gewählten Bereichen aktiv und weist ebenso wie die Dehydrogenase von *P. torridus* ein Molekulargewicht von 37 kDa auf.

3.3.2. Aufreinigung des Fusionsproteins MBP-201 aus *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 über Amylose-Resin

Da das Fusionsprotein MBP-201 löslich überexproduziert werden konnte, wurde nun versucht, dieses über die Bindung des Fusionsanteils Maltose-Binde-Protein (MBP) an Amylose aufzureinigen (s. 2.4.10.3). Dazu wurde eine 30 ml Kultur 1 %ig aus einer Vorkultur *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 angeimpft und bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 für 4 Stunden mit 0,2 mM IPTG induziert. Die gewonnene lösliche Fraktion wurde auf eine 2 ml Amylose-Resin-Gravitationssäule gegeben. Die Aufreinigung erfolgte wie unter 2.4.10.3 beschrieben. Die Fraktionen, in denen die größte Menge an Fusionsprotein MBP-201 eluiert wurde, wurden einer Faktor Xa-Protease Behandlung für mehrere Stunden unterzogen, um das Zielprotein RPTO00201 getrennt vom Fusionsanteil zu erhalten. Die einzelnen Aufreinigungsfractionen wurden zur Kontrolle auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

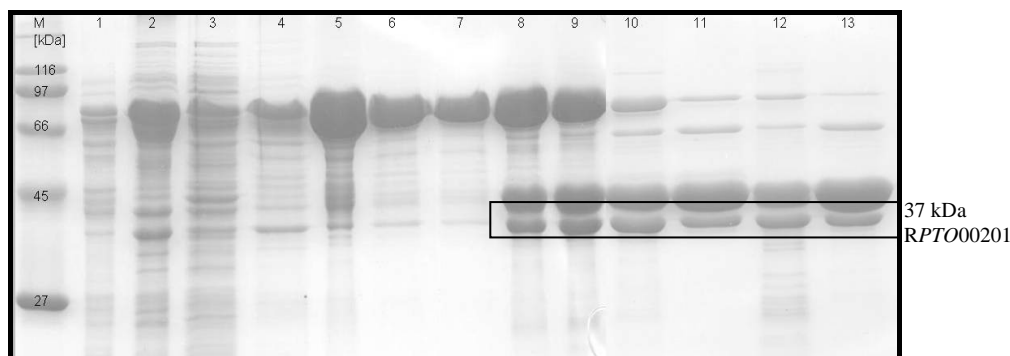


Abb. 26 SDS-PAGE-Gel nach Aufreinigung und Protease Faktor Xa-Behandlung des Fusionsproteins MBP-201. Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel, Spur 1 – Durchlauf fraktion von der Amylose-Gravitationssäule, Spur 2 – lösliche Fraktion aus *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201, Spur 3 – Waschfraktion der Amylose-Gravitationssäule, Spur 4 – 7 Elutionsfraktionen 1-4, Spur 8 – 13 Elutionsfraktion 2 nach Faktor Xa Protease-Behandlung nach 1 h; 2 h; 3 h; 4 h; 6 h; ü.N. Inkubation bei RT; Der Rahmen zeigt die 37 kDa Bande von RPTO00201.

In Abb. 26 sind die einzelnen Fraktionen von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 vor und nach der Aufreinigung über die Amylose-Resin Säule und nach der Behandlung mit Faktor Xa Protease dargestellt. Spur 2 zeigt die lösliche Fraktion von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 nach der Induktion mit 0,2 mM IPTG für 4 Stunden. Auf der erwarteten Höhe von 79 kDa ist deutlich eine Überexpressionsbande des Fusionsproteins MBP-201 zu erkennen. Spur 1 zeigt die Durchlauf fraktion nachdem die lösliche Fraktion auf die Gravitationssäule gegeben wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Teil des Fusionsproteins nicht an die Säule gebunden hat, da im Durchlauf auch eine Bande im Bereich der Größe des Fusionsproteins zu erkennen ist. Spur 3 zeigt die Waschfraktion während der Aufreinigung. In den Spuren 4-7 sind die Elutionsfraktionen dargestellt. Man kann erkennen, dass in Spur 5 der größte Teil an Fusionsprotein MBP-201 eluiert werden konnte. Die Spuren 8-13 zeigen die Elutionsfraktion 2 (aus Spur 5) die für 1, 2, 3, 4, 6 Stunden und ü.N. mit Faktor Xa Protease behandelt wurde. Man sieht deutlich eine Zunahme der Spaltprodukte Maltose-Binde-Protein (MBP) mit 42 kDa und der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase (RPTO00201) mit 37 kDa (gerahmter Bereich) und einer daraus resultierenden parallelen Abnahme des Fusionsprotein MBP-201. Eine massenspektrometrische Analyse der 37 kDa Bande bestätigte das Vorhandensein des Zielproteins RPTO00201.

Es wurde versucht die Spaltprodukte erneut über die Amylose-Resin-Säule zu geben, um das Zielprotein ORF 201 fast sauber zu gewinnen, doch dieser Versuch blieb ohne Erfolg. Auch ein weiterer Versuch nach der Spaltung eine

chromatographische Trennung über die FPLC zu erhalten blieb erfolglos. Daher wurde in folgenden Experimenten das nicht-aufgereinigte Protein zur Bestimmung der Aktivität verwendet. Dafür wurde die Fraktion nach der sechsstündigen Spaltung mit Faktor Xa Protease eingesetzt (s. Abb. 26, Spur 12). Das Ergebnis der Aktivitätsmessungen ist in Abb. 27 dargestellt.

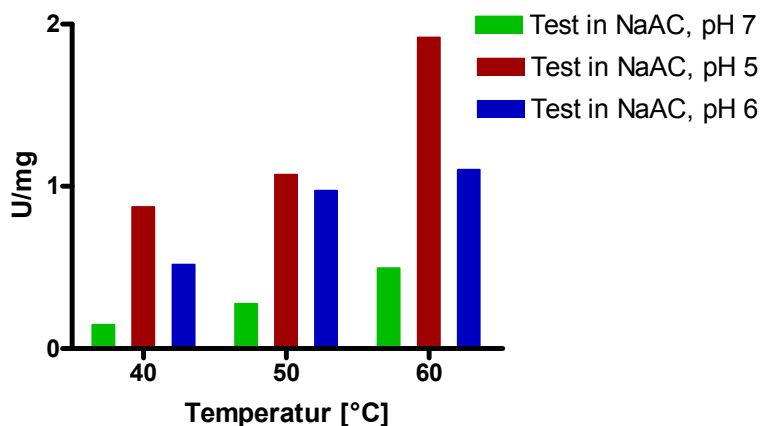


Abb. 27 spezifische Aktivität der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase nach Aufreinigung aus *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 über Amylose Gravitationssäule und Spaltung mit Faktor Xa Protease bei verschiedenen Temperaturen. ■ - spezifische Aktivität in Natriumacetat-Puffer, pH 7 bei 40, 50 und 60 °C; ■ - spezifische Aktivität Natriumacetat-Puffer, pH 5 bei 40, 50 und 60 °C; ■ - spezifische Aktivität in Natriumacetat-Puffer, pH 6 bei 40, 50 und 60 °C. n = 3

Die Abb. 27 zeigt die spezifischen Aktivitäten der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase nach der Aufreinigung aus *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 über eine Amylose Gravitationssäule und der Spaltung mit Faktor Xa Protease bei den Temperaturen 40, 50 und 60 °C. Es sind die Messungen in Puffern mit verschiedenen pH-Werten dargestellt (Natriumacetat-Puffer pH 7, pH 5, pH 6). In allen drei Puffersystemen ist ein Anstieg der Aktivität mit zunehmender Temperatur zu sehen. Bei einem pH-Wert von pH 5 wurde die größte spezifische Aktivität mit 1,92 U/mg gemessen.

Leider konnte auch hier die Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität nur bis zu 6 Stunden nach der Aufreinigung gemessen werden. Es wurden keine geeigneten Bedingungen gefunden, unter denen das Protein über einen längeren Zeitraum stabil war. Daher blieb eine weitere Charakterisierung der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase aus.

3.3.3. Zusammenfassung der Expressionsversuche und Aktivitätsbestimmungen der *P. torridus* Dehydrogenasen

Es wurden vier ORFs für potentielle Dehydrogenasen (RPTO00201, RPTO00605, RPTO01123, RPTO01538) in die Expressionsvektoren pBADmycHis-A, pEX22b und pMALc2x kloniert. Da die Glycerol-Dehydrogenase (RPTO00201) die einzige Dehydrogenase war, die in den ersten Versuchen löslich exprimiert wurde und im Rohextrakt erste Aktivität zeigte, wurde versucht die Expression dieses ORFs zu optimieren und das Enzym anschließend zu charakterisieren. Tab. 15 fasst die Ergebnisse dieser Versuche zusammen.

Tab. 15 Ergebnisse der Expressionsversuche und Aktivitätsbestimmungen der Glycerol-Dehydrogenase (RPTO00201) in verschiedenen Konstrukten

		pBAD::201	pEX22b::201	pMALc2x::201
Expression in <i>E. coli</i> Ros2(DE3)	lösliche Expression	nein	sehr schwach, der größte Teil in <i>inclusion bodies</i>	ja
	Aktivität im Rohextrakt	nein	nein	nein
Coexpression mit Chaperonplasmiden (C1-5) in BL21 RS	lösliche Expression	nein	auf einem SDS-Gel nicht erkennbar, aufgrund der gleichen Molekularmasse des Chaperons	nicht bestimmt, da schon löslich in <i>E. coli</i> Ros2(DE3)
	Aktivität im Rohextrakt	nein	rel. Aktivität bestimmt mit C1,2,4,5 spez. Aktivität bestimmt mit C1 (0,265 U/mg) und C5 (0,147 U/mg)	nicht bestimmt.
Coexpression mit Chaperonplasmiden (C1-5) in ECL707	lösliche Expression	nicht bestimmt	auf einem SDS-Gel nicht erkennbar, aufgrund der gleichen Molekularmasse des Chaperons	nicht bestimmt
	Aktivität	nicht bestimmt	Aktivität auf Carbonylindikatorplatten mit C1,2,4,5 keine Aktivität im Rohextrakt messbar	nicht bestimmt
Aufreinigung und Aktivitätsbestimmung	Source 30 Q Säule	nicht bestimmt	teilweise aufgereinigt, spez. Aktivität 0,35 U/mg	nicht bestimmt
	Amylose-Resin Säule	nicht bestimmt	nicht bestimmt	teilweise aufgereinigt spez. Aktivität 1,92 U/mg

3.4. IDENTIFIZIERUNG AKTIVER *P. TORRIDUS* DEHYDROGENASEN MITTELS FOSMIDGENBANK

Da weniger als 10 % der bisher in unserem Labor klonierten *P. torridus* Gene in *E. coli* aktiv waren, wurde versucht über die Konstruktion einer *P. torridus*-Fosmidgenbank auf dem kompletten Genom nach aktiven Dehydrogenasen zu suchen. Ziel war es, über diesen Weg direkt Klone zu finden, die Aktivität in *E. coli* aufweisen. So würde man umgehen, Gene zu klonieren, die später aufgrund der schwierigen heterologen Expression von *P. torridus* Genen in *E. coli* nicht zu aktiven Enzymen führen. Da das Genom von *P. torridus* bereits sequenziert wurde, könnten dann die Plasmid-aktiven Klone direkt angensequenziert werden und der Bereich der ORFs zugeordnet werden. Über die Sequenzbereiche können dann direkt potentielle Dehydrogenasegene zugeordnet und dementsprechend amplifiziert werden. Des Weiteren könnte so hypothetischen Proteinen oder falsch annotierten Proteinen eine Funktion zugeordnet werden. Dazu wurde zunächst eine solche Fosmidgenbank für *P. torridus* erstellt.

3.4.1. Konstruktion einer *P. torridus* Fosmidgenbank

Eine 30 ml Zellkultur von *P. torridus* mit einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde geerntet, das Pellet gründlich zweimal mit Natriumacetat-Puffer, pH 4.6 gewaschen und das Pellet wie unter 2.3.3.5 beschrieben weiter behandelt.

Um in der Fosmidgenbank eine vierfache Genomabdeckung bei einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zu erhalten wurden 127 Klone benötigt. Berechnet wurde die Anzahl der Klone wie folgt:

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f)$$

N Anzahl der Klone

P Wahrscheinlichkeit, dass das Genom komplett abgedeckt ist

f der Faktor, der sich aus Insertgröße bezogen auf das Gesamtgenom ergibt

Daraus ergab sich für *P. torridus*:

$$f = 35 \text{ kb (Insertgröße)} / 1500 \text{ kb (Genom)} = 0,0233$$

$$P = 95 \%$$

$$N = \ln(1 - 0,95) / \ln(1 - 0,0233)$$

$$N = 127 \text{ Klone}$$

Es wurde eine Fosmidgenbank von *Picrophilus torridus* genomischer DNA von 400 Klonen angelegt.

Da man bei einer Fosmidgenbank eine Insertgröße zwischen 35 kb und 45 kb erwartet, wurden die Fosmide von 12 Klonen isoliert und durch einen Restriktionsverdau auf ihre durchschnittliche Insertgröße hin überprüft. Des Weiteren sollte dadurch die Diversität der Klone überprüft werden. Die Ergebnisse des *Bam*HI- und *Eco*RI-Restriktionsverdaus sind in Abb. 28 dargestellt.

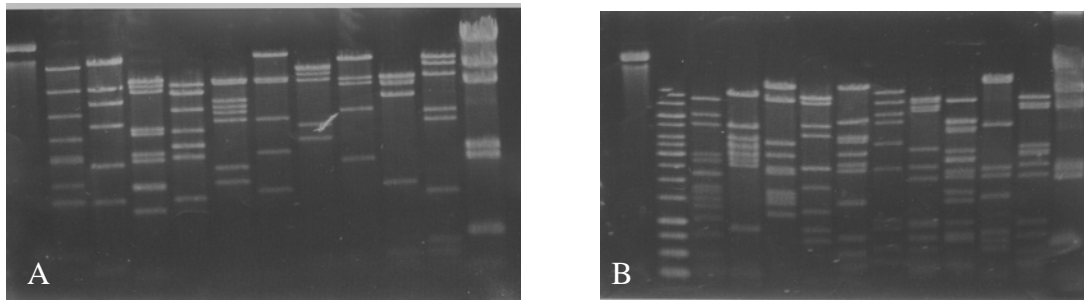


Abb. 28 Restriktionsverdau von 10 ausgewählten *P. torridus* Fosmidklonen mit *Bam*HI (A) und *Eco*RI (B). M1 – 1 kb DNA Ladder; M2 – λ *Hind*III DNA Marker; Spur 1 – ein unverdauter Fosmidklon aus der Fosmidgenbank; Spur 2-11 Bandenmuster des Restriktionsverdaus von 10 verschiedenen Fosmidklonen mit *Bam*HI (A) und *Eco*RI (B)

3.4.2. Aktivitätsscreening der Fosmidgenbank mittels

Carbonylindikator-Test

Die 400 Klone der *P. torridus* Fosmidgenbank wurden in folgenden Experimenten über einen Carbonylindikator-Test im 96-well-Format auf ihre Dehydrogenase-Aktivität untersucht (s. 2.4.11.3).

Als Substrate wurden Glycerol, Ethanol, 1,2-Butandiol und 1,2-Propandiol eingesetzt. Am Beispiel von Ethanol als Substrat ist in Abb. 29 ein solcher Carbonylindikator-Plattentest dargestellt.

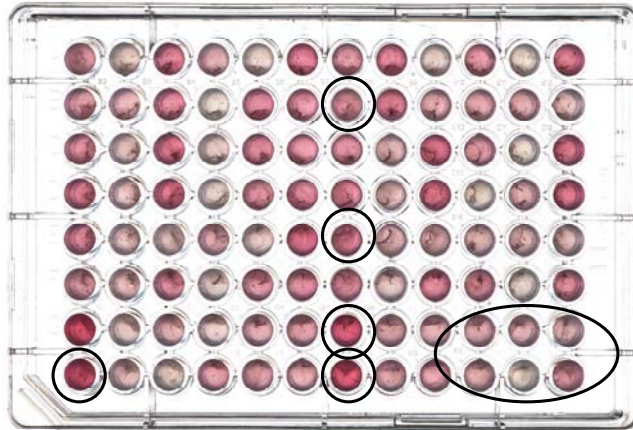


Abb. 29 Dehydrogenase-Aktivitätstest mit Fosmidgenbank Platte I mittels Carbonylindikator und Ethanol als Substrat. Kleine schwarze Kreise markieren potentiell positive Klone, die bei dreifacher Wiederholung deutlich positiv waren. Der große ovale Kreis zeigt die Negativ-Kontrollen Epi FosT300 Zellen ohne Insert.

In Abb. 29 ist Platte I der *P. torridus* Fosmidgenbank dargestellt, die mittels Carbonylindikator auf ihre Dehydrogenase-Aktivität untersucht wurde. Als Substrat wurde in dieser Abbildung 2,3-Butanodiol eingesetzt. Potentiell positive Klone sind durch eine sehr starke intensive rote Färbung im Vergleich zu denen der negativen Klone (durch großen ovalen schwarzen Kreis umrahmt) gekennzeichnet. In der Dissertation von Anja Knietsch (2003) konnte gezeigt werden, dass viele Polyol-Dehydrogenasen ein weites Substratspektrum besitzen. Für die weiteren Untersuchungen der potentiell positiven Fosmidklone wurden daher zwölf Klone ausgewählt, die bei drei Substraten (Glycerol, 1,2-Propandiol, 2,3-Butanodiol) positiv getestet wurden ($n = 3$). Tab. 16 gibt eine Übersicht über die potentiell positiven Klone.

Tab. 16 Übersicht der potentiell Dehydrogenase-positiven Klone aus der *P. torridus* Fosmidgenbank

Fosmidgenbank Platte	Klon-Nummer
I	H 1 C 7 B 7
II	A 1 D 6 A 7
III	E 1 D 3 G 7
IV	E 1 D 6 C 7

3.4.3. Aktivitätsbestimmung ausgewählter Fosmidklone über native Gelelektrophorese

Über native Gelelektrophorese (s. 2.4.11.1) wurde die Dehydrogenase-Aktivität der zwölf ausgewählten potentiell Dehydrogenase-positiven Klone (s. 3.4.2) aus der *P. torridus* Fosmidgenbank untersucht. Als Substrate wurden Glycerol und 1,2-Propandiol verwendet. Das Aktivitätsscreening wurde wie unter 2.4.11.1 beschrieben durchgeführt. In Abb. 30 ist das Ergebnis des Nativ-Gels der Fosmidklone dargestellt.

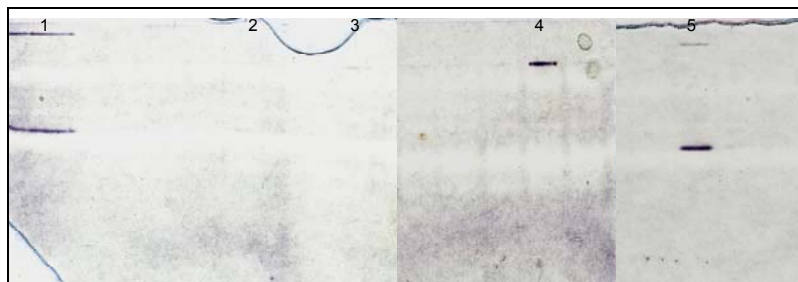


Abb. 30 Dehydrogenase-Aktivitätstest auf Nativ-PAGE mit *P. torridus* Fosmidklonen. Spur 1 – Klon C7 von Platte I; Spur 2 – Klon E1 von Platte 3; Spur 3 – positiv Kontrolle (pAK::108, Doktorarbeit Anja Knietsch); Spur 1-3 Aktivitätstest mit 1,2-Propandiol als Substrat in Phosphat-Puffer, pH 6.1; Spur 4 – positiv Kontrolle mit Glycerol als Substrat in Phosphat-Puffer, pH 6.1; Spur 5 – Klon B7 von Platte I mit Glycerol als Substrat in Phosphat-Puffer, pH 6.1.

In Abb. 30 sind Klone, die Dehydrogenase-Aktivität zeigten, mit einer schwarzen Bande auf dem Nativ-PAGE-Gel sichtbar. Die Banden in Spur 3 und 4 zeigen die Positivkontrolle pAK::108 (s. Doktorarbeit Anja Knietsch). Diese weist im Aktivitätstest mit Glycerol eine stärkere Bande als mit 1,2-Propandiol auf. Die Spuren 1, 2 und 5 zeigen positive Klone aus der *P. torridus* Fosmidgenbank. Die Klone in Spur 1 und 2 zeigen Aktivität mit 1,2-Propandiol als Substrat und der Klon in Spur 5 zeigt Aktivität mit Glycerol als Substrat. In Tab. 17 sind die positiven Klone aus der Fosmidgenbank mit ihren Substraten zusammengefasst.

Tab. 17 Klone, die nach Nativ-PAGE im Dehydrogenase-Aktivitätstest aktiv waren

Positiver Klon Nr.	Substrat
C7 (Platte I)	1,2-Propandiol
E1 (Platte III)	1,2-Propandiol
B 7 (Platte I)	Glycerol

3.4.4. Kartierung der Sequenzbereiche von Fosmidklonen mit Dehydrogenase-Aktivität

Da das Genom von *Picrophilus torridus* bereits sequenziert ist, konnten die klonierten DNA-Fragmente der potentiell positiven Fosmidklone leicht zugeordnet werden, um über die Sequenz Rückschlüsse ziehen zu können über ORFs, die möglicherweise für eine Dehydrogenase codieren, oder auch ORFs die eventuell noch nicht, oder sogar falsch annotiert sind.

Die potentiell Dehydrogenase-positiven Fosmidklone wurden dazu vorwärts und rückwärts ansequenziert und über Sequenzabgleiche mit dem *P. torridus* Genom die DNA-Bereiche zugeordnet. Die Identifizierung der Sequenzabschnitte ist am Beispiel von Klon H1 in Abb. 31 dargestellt. Tab. 18 fasst die Ergebnisse der Sequenzierung der 12 ausgewählten potentiell positiven Klone mit ihren Sequenzbereichen dar. Eine Überprüfung der ORFs der klonierten Sequenzabschnitte (s. 6.6) zeigte, dass alle bis auf die Klone II D6, III E1 und IV D6 Dehydrogenasen in diesem Bereich aufweisen, die potentiell für die identifizierte Dehydrogenase-Aktivität verantwortlich sein könnten.

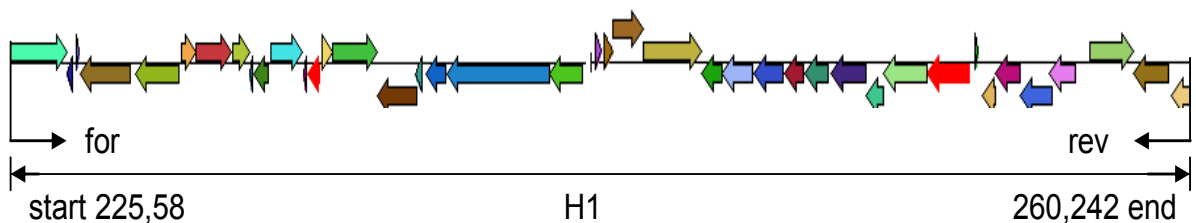


Abb. 31 Übersicht über das „Mapping“ der Sequenzbereiche eines potentiell aktiven Klons am Beispiel von Klon H1 (I).

Tab. 18 Sequenzierung der potentiell Dehydrogenase-positiven *P. torridus* Fosmidklone. Grau unterlegt sind die Klone, bei denen in den klonierten Sequenzbereichen auch Dehydrogenasen annotiert sind.

forward				reverse			
Platte	Klon Nr.	Start Chromosom	Start ORF Nr.	Platte	Klon Nr.	Start Chromosom	Start ORF Nr.
I	H1	260,242	271	I	H1	225,58	235
II	D6	630,009	657	II	D6	599,655	626
II	A1	1321,507	1321	II	A1	1290,660	1285
II	A7	207,049	213	II	A7	242,311	250
III	E1	1204,131	1187	III	E1	1168,120	1154
III	D3	449,611	473	III	D3	491,366	522
III	G7	1,299,971	1297	III	G7		
IV	C7	286,558	297	IV	C7	254,045	264
IV	D6	921,259		IV	D6	958,980	969
IV	E1	724,848	759	IV	E1	760,741	795

Bei zehn der zwölf Klone konnten die klonierten DNA-Bereiche durch Sequenzierung den enthaltenen ORFs mit Annotationen zugeordnet werden. Eine Analyse der ORFs in den klonierten Sequenzbereichen zeigte, dass bei sieben dieser Klone auch Dehydrogenasen in dem Bereich annotiert sind (s. Tab. 18, grauer Hintergrund). Bei drei der zwölf Klone konnte die Dehydrogenase-Aktivität über Aktivitätstests nach Auftrennung über ein Nativ-PAGE-Gel bestätigt werden. Die Sequenzen für Klon C7 Platte I und B7 Platte I sind noch nicht bekannt. Bei dem Klon E1 Platte III sind in dem klonierten Bereich keine Dehydrogenasen annotiert. Bei den anderen Klonen muss die potentielle Dehydrogenase-Aktivität, die über den Carbonylindikator test bestimmt wurde, über andere Tests noch untermauert werden. Im Anhang (s. 6.6) sind die Sequenzbereiche mit den dazugehörigen Annotationen zusammengefasst.

3.5. PROTEOMANALYSEN VON *PICROPHILUS TORRIDUS* UNTER VERSCHIEDENEN STRESSBEDINGUNGEN MITTELS 2D-GELELEKTROPHORESE

Um differentielle Experimente mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese (2D) mit *Picrophilus torridus* durchzuführen, musste die Methode für diesen Organismus zuerst etabliert werden. Dies war notwendig, denn zu Beginn dieser Arbeit waren noch keine Methoden für die Probenaufarbeitung dieses Organismus publiziert. Alle Stress-Analysen wurden aus der mittleren logarithmischen Wachstumsphase von *P. torridus* durchgeführt, um unerwünschte Einflüsse wie pH-Veränderung des Mediums, angehäufte Metabolite, oder eine bedingte Stress-Antwort auf den Übergang in die stationäre Phase zu vermeiden. Dazu wurden zuerst typische Wachstumskurven des Organismus erstellt, um reproduzierbare Kulturen für vergleichende Experimente zu erhalten.

3.5.1. Etablierung der 2DE-Gelelektrophorese für *P. torridus*

Zu Beginn galt es eine optimale Methode zur Proteinextraktgewinnung für *P. torridus* zu finden, bei der die Ausbeute an Proteinen ausreichend war (350 µg/

18 cm Gel), um die Gele später, aufgrund der weiteren Analyse mittels MS/MS, mit Coomassie färben zu können. Ein weiteres Problem bei der Probenaufarbeitung stellte der geringe pH Wert des Mediums, bis zu 1 M Schwefelsäure (pH 0), dar. Durch Rückstände von Schwefelsäure aus dem Medium konnte es zur schlechten Auftrennung in der isoelektrischen Fokussierung kommen konnte.

Die Proteinextraktion, wie sie unter 2.4.4.1 beschrieben ist, wurde als Ergebnis des Vergleiches vieler verschiedener Extraktionsmethoden etabliert. Es wurden verschiedene Puffer mit unterschiedlichen Detergenzien, wie auch verschiedene Methoden für den Zellaufschluss ausprobiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellyse über den pH-Wert des Puffers zu einer größeren und homogeneren Ausbeute an Proteinen führte. Dabei machte man sich zu nutze, dass die Zellwände von *P. torridus* ab einem pH-Wert von 4 instabil werden und danach lysieren (van de et al., 1998). Zudem verbesserte eine Inkubation der aufgereinigten Proteine in Probenpuffer mit 8 M Harnstoff und 3 % Chaps ü.N. die Löslichkeit der Proteine.

Durch diese Extraktionsmethoden konnten reproduzierbare Ergebnisse in der Proteinkonzentration und den 2D-Mustern, auch in unabhängig voneinander präparierten Proben erzielt werden (s. Abb. 32). Zudem hat sich über verschiedene Versuche herausgestellt, dass die Auftrennung der 2. Dimension in einem 12 %igem Polyacrylamid-Gel (PAGE) ohne SDS bessere Resultate erbringt als mit SDS im Gel. Über Auftrennung der Proteine über verschiedene pH-Bereiche in der 1. Dimension wurde der für die Gesamtproteine des Zellysates von *P. torridus* optimale pH Bereich ermittelt. In Abb. 33 sind am Beispiel der isoelektrischen Fokussierungen über pH 3-10 und pH 4-7 die verschiedenen Auftrennungen von *P. torridus* Proteinen aus dem Zellysat dargestellt.

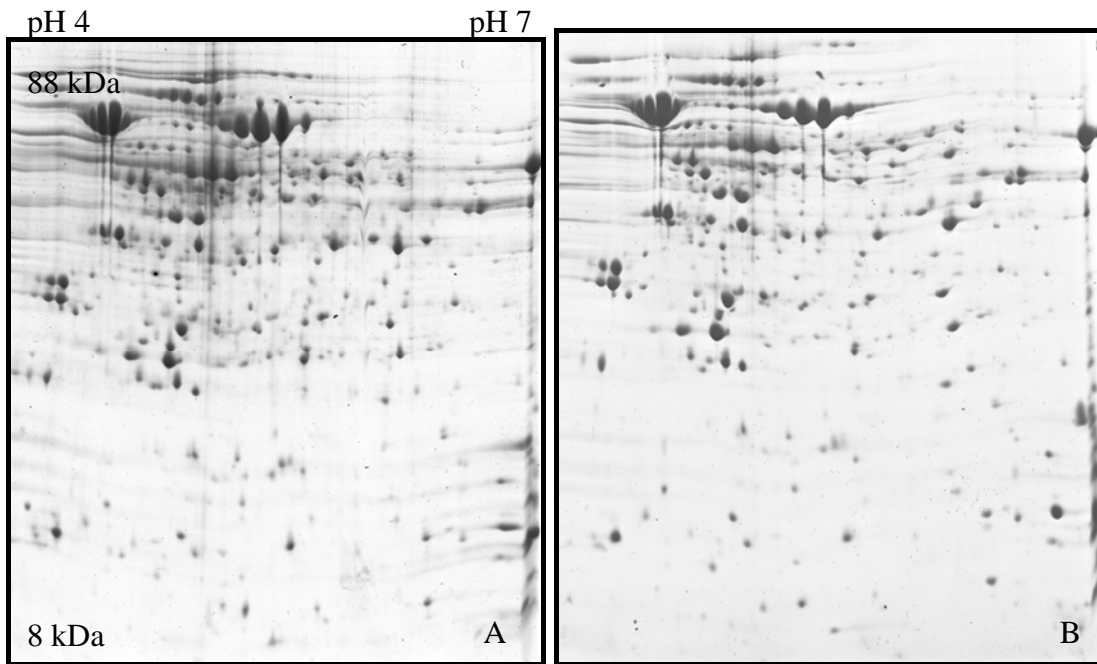


Abb. 32 Biologische Replika von *P. torridus* Zelllysate aus der mittleren logarithmischen Phase, gewachsen unter optimalen Bedingungen pH 1 und 60 °C auf einem coomassie-gefärbtem 12 %igen Polyacrylamidgel. Aufgetragen 350 µg Protein gesamt. IPG 4-7.

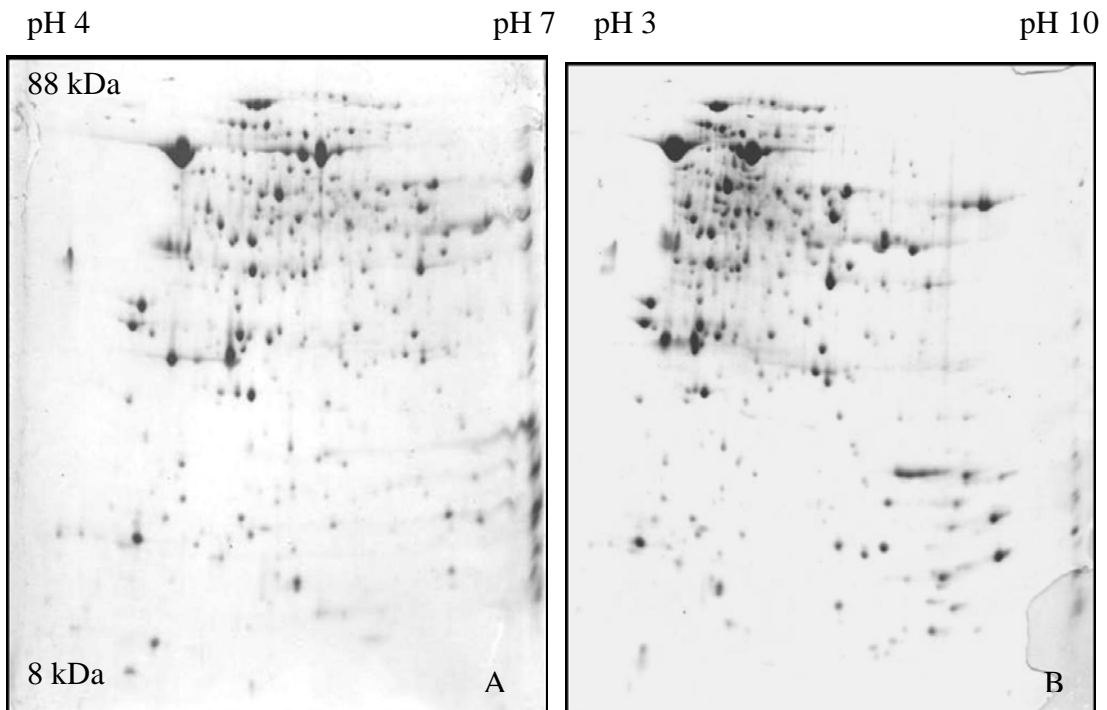


Abb. 33 A/B Coomassie-gefärbte 12 % Polyacrylamidgelle mit *P. torridus* Zelllysate aus der mittleren logarithmischen Phase, optimal gewachsen bei pH 1 und 60 °C. Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgte über IPG 4-7 (A) und IPG 3-10 (B). Aufgetragen 300 µg Protein gesamt.

Die Gelle in Abb. 33 zeigen eine sehr gute Auftrennung im Bereich von pH 4-7 (Abb. 33 A) und pH 3-10 (Abb. 33 B). Obwohl bei der Auftrennung über pH 3-10

im alkalischen Bereich einige Spots mehr aufgetrennt werden konnten, wurde für die Experiment die Auftrennung über pH 4-7 gewählt, da die Auftrennung zwischen pH 4,5 und pH 6 übersichtlicher und damit besser zur Auswertung geeignet war.

3.5.2. Versuch der Auftrennung der Membranfraktion von *P. torridus*

Um bei den Stress-Experimenten auch Aussagen über die Membranproteine treffen zu können wurde versucht, die *P. torridus* Zellmembran wie unter 2.4.4.1 beschrieben aufzureinigen und ebenfalls über 2D-Gelelektrophorese aufzutrennen. Generell ist es (fast) nicht möglich, Membranproteine über 2D-Gelelektrophorese aufzutrennen, da sie aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften in der isoelektrischen Fokussierung nicht oder nur wenig in das Gel eindringen. Daher erwartet man bei der Membranpräparation eher Membranassoziierte Proteine. Das Ergebnis ist in Abb. 34 dargestellt.

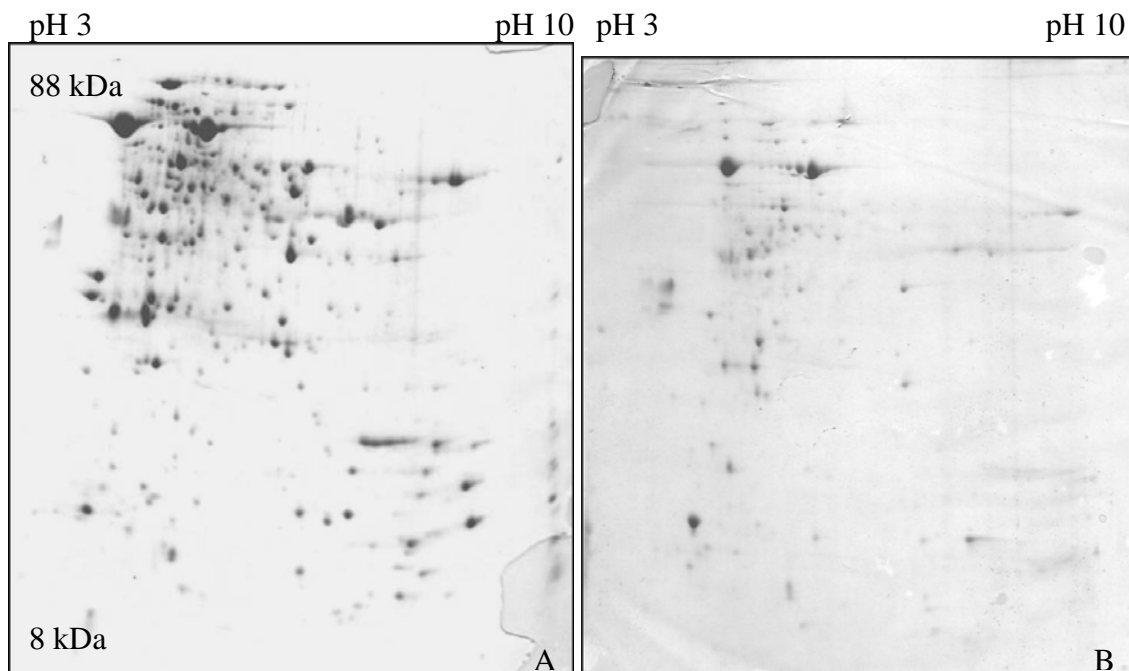


Abb. 34 A/B 12 % Polyacrylamidgele mit *P. torridus* Zellysate (A) und der aufgereinigten Zellmembran (B) aus der mittleren logarithmischen Phase, optimal gewachsen bei pH 1 und 60 °C. Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgte über IPG 3-10. Aufgetragen 350 µg Protein gesamt (A) und 200 µg Protein gesamt (B).

Wie beim Vergleich der Abb. 34 A und B zu erkennen ist, fand über diese Methode keine Trennung von Membran und Lysat statt. Alle Proteine, die im Lysat zu erkennen sind (Abb. 34 A), erscheinen auch auf dem Gel mit der

Membranfraktion (Abb. 34 B). Ein anderes Problem stellte die geringe Proteinausbeute bei der Membranaufreinigung dar. Weitere Versuche, die Membranfraktion vom Zelllysat zu trennen und optimale Ausbeuten zu erhalten brachten ebenfalls keinen Erfolg (Daten nicht gezeigt), daher wurden alle Experimente mit *P. torridus* Zelllysat durchgeführt.

3.5.3. Erstellen eines Mastergels

Um eine Übersicht über alle, bei optimalen Wachstumsbedingungen im Zelllysat vorhandenen *P. torridus*-Proteine zu bekommen, wurde ein so genanntes Mastergel (s. Abb. 37) erstellt. Dazu wurden 50 ml einer *P. torridus* Zellkultur, die im Medium bei 60 °C und pH 1 bis zur mittleren logarithmischen Phase (OD_{600nm} von 0,4) gewachsen ist, wie unter 2.4.4.1 beschrieben aufgearbeitet und in der 1. Dimension über einen pH Bereich von 3-10 und 4-7 aufgetrennt. Die 2. Dimension erfolgte über ein 12 %iges Polyacrylamid-Gel (PAGE). Im Anschluss wurden alle Spots aus den Gelen ausgeschnitten (gespottet) und im Labor von Prof. Hecker (Greifswald) unter der Betreuung von Birgit Voigt und Dirk Ambrecht mittels MS/MS sequenziert. Die Sequenzen sind im Anhang dargestellt.

Von dem Mastergel konnten insgesamt 477 verschiedene Spots gepickt werden. Von den 477 Spots konnten 420 mittels MS/MS identifiziert werden. Bei der Auswertung der Sequenzen zeigte sich, dass die 420 identifizierten Spots für 251 verschiedene Genprodukte codieren und 22 Spots davon eine potentielle Doppelsequenz aufweisen, was bedeutet, dass an einem Punkt auf dem Polyacrylamidgel 2 Proteine hintereinander liegen aufgrund ihrer gleichen Eigenschaften im Isoelektrischen Punkt und der Molekularmasse. Die Zahl von 251 verschiedenen Genprodukten aus 420 identifizierten Spots ergibt sich aus der posttranslationalen Modifizierung der Proteine. Diese können posttranslational durch Acetylierung, Methylierung oder auch Phosphorylierung modifiziert werden. Solche modifizierten Proteine sind auf einem 2D-Gel durch clusterartige Ketten sichtbar (s. Abb. 35), was vor allem für die Phosphorylierung beschrieben worden ist (Raggiaschi et al., 2005).

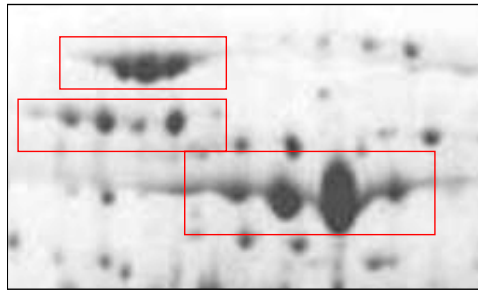


Abb. 35 Ausschnitt aus einem Coomassie gefärbtem 12 %igen 2D Gel. Die roten Rahmen zeigen gleiche Proteine, die durch posttranslationale Modifizierung in Ketten auf dem Gel erscheinen.

In Abb. 36 ist der prozentuale Anteil der identifizierten Proteine an den funktionellen Kategorien unter den oben beschriebenen Bedingungen dargestellt. Den größten Anteil macht der Energie-Stoffwechsel mit 22 % aus. Des Weiteren sind viele Proteine der Proteinsynthese (12 %), aber auch „Andere“ (15 %) und hypothetische Proteine (13 %) auf dem 2D-PAGE präsent. Einen kleineren Prozentsatz (1-9 %) machen die verbleibenden Kategorien (s.) aus.

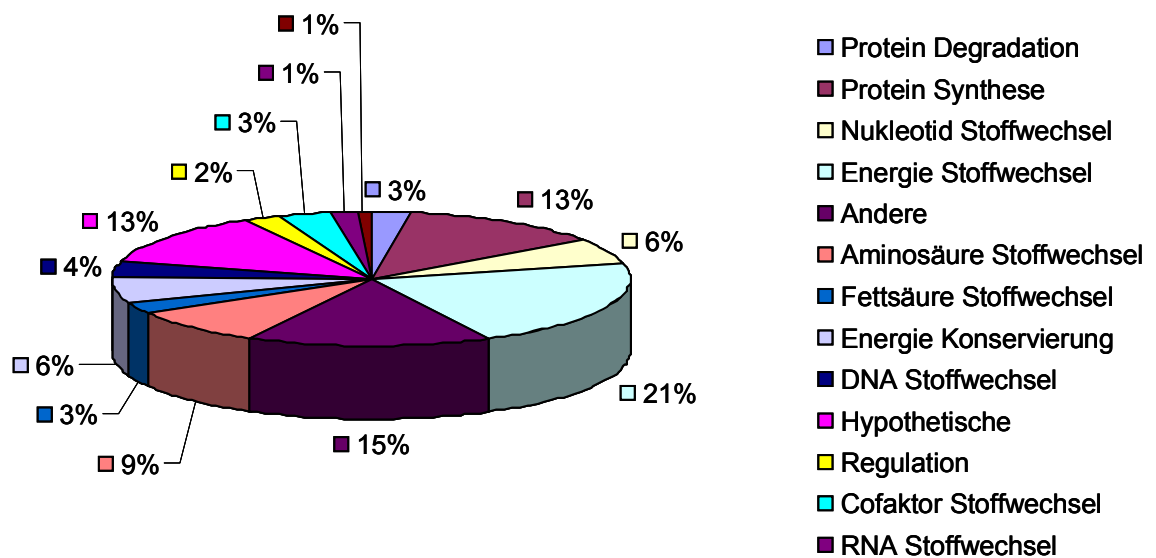


Abb. 36 Einteilung der identifizierten Proteine des Mastergels in ihre funktionellen Kategorien.

3.5.4. Erstellen einer *P. torridus* Protein-Datenbank in Delta 2D (Decodon)

Die identifizierten Proteine auf dem Mastergel wurden mit der Software Delta 2D von Decodon verarbeitet. Dazu wurden die zuvor nummerierten Spots durch die zugehörigen ERGO-Accession-Nummern ersetzt. Die Abb. 37 zeigt das Mastergel mit den identifizierten Spots. Die Proteine, die identifiziert wurden, tragen eine ERGO-Accession-Nummer, die Spots, die nicht identifiziert werden konnten tragen eine Zahl. Für jedes identifizierte Protein wurden in einer Delta-2D-Datenbank die Eigenschaften wie isoelektrischer Punkt und Molekularmasse hinterlegt. Es besteht die Möglichkeit eine direkte Verlinkung mit der NCBI-Datenbank zu hinterlegen, da hier aber mit ERGO-Accession-Nummern gearbeitet wurde und diese nicht mit den NCBI-Accession-Nummern übereinstimmen, besteht für *P. torridus* diese Verlinkung nicht. Der Vorteil dieser Datenbank besteht in zum einen in dem schnellen Auffinden von Proteinen und den dazugehörigen Eigenschaften, zum anderen sind diese Proteine auch direkt auf andere Experimente für diesen Organismus übertragbar, so dass eine weitere Sequenzierung bei anderen Experimenten entfällt. In Abb. 38 ist ein Ausschnitt der Delta-2D-Datenbank dargestellt, mit dem Programmnamen „Scout Data Editor“. Diese Datenbank bietet auch die Möglichkeit, weitere Eigenschaften wie Stoffwechselwege oder auch physikochemische Eigenschaften zusätzlich mit einzuspeisen.

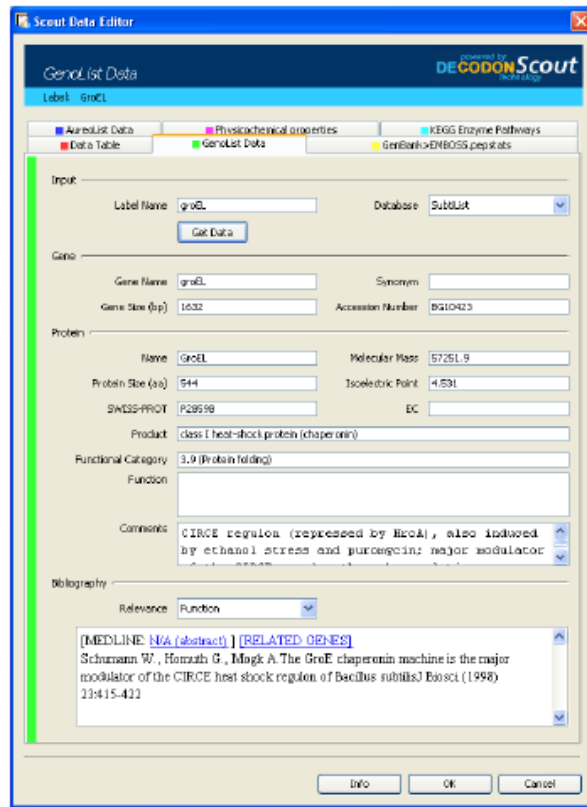


Abb. 38 Ausschnitt aus der Delta-2D-Datenbank

Die erstellten Daten des Mastergels wurden genutzt, um in den durchgeführten Experimenten den für den Versuch interessanten Proteinen eine Annotation zuzuordnen.

3.5.5. Vergleich von identifizierten Proteinen auf dem 2D-Gel mit den Genomdaten

Durch einen Vergleich mit den Genomdaten und den Daten, die durch die Sequenzierung des Mastergels erhalten wurden, wurde bestimmt wie viele Proteine der einzelnen funktionellen Kategorien, basierend auf der Gesamtsequenz des Genoms, erwartet wurden und wie viele tatsächlich in dieser Kategorie auf dem 2D-Gel bei optimalen Wachstumsbedingungen in der exponentiellen Wachstumsphase repräsentiert sind. Eine Übersicht dieses Vergleiches ist in Tab. 19 dargestellt.

Tab. 19 Übersicht über den relativen prozentualen Anteil der auf dem Mastergel repräsentierten Proteine an dem Gesamtproteom (laut Genomsequenz)

Funktionelle Kategorie	Proteinanzahl total		Relative prozentuale Anzahl an erhaltenen Proteinen bezogen auf das Proteom
	erwartet	erhalten	
Protein Degradation	30	11	36
Protein Synthese	105	53	50
Nukleotid Stoffwechsel	53	26	49
Energy Stoffwechsel	119	88	73
Andere	186	65	34
Aminosäure Stoffwechsel	110	36	32
Fettsäure Stoffwechsel	24	12	50
Energy Konservierung	74	26	35
DNA Stoffwechsel	55	15	27
Hypothetische	396	54	13
Regulation	64	10	15
Cofaktor Stoffwechsel	79	14	17
RNA Stoffwechsel	50	4	8
Transport	178	6	3
ohne Kategorie	13	0	0

Der prozentuale Anteil an einer funktionellen Kategorie ist vergleichend in Abb. 39 graphisch dargestellt. Mit roten Balken ist die prozentuale Verteilung basierend auf den Genomdaten und mit blauen Balken die prozentuale Verteilung der auf dem 2D-Gel identifizierten Proteine dargestellt. Auffallend ist der prozentuale Anteil an hypothetischen Proteinen, die auf dem 2D-Gel nur noch halb so stark repräsentiert sind, wie laut Genomsequenz postuliert wurde. Den umgekehrten Verlauf zeigen die Proteine des Energiestoffwechsels bei dem die Proteine auf dem Gel in mehr als doppelter Zahl repräsentiert sind. Alle anderen Proteine zeigen in der Kategorieverteilung einen ähnlichen Verlauf.

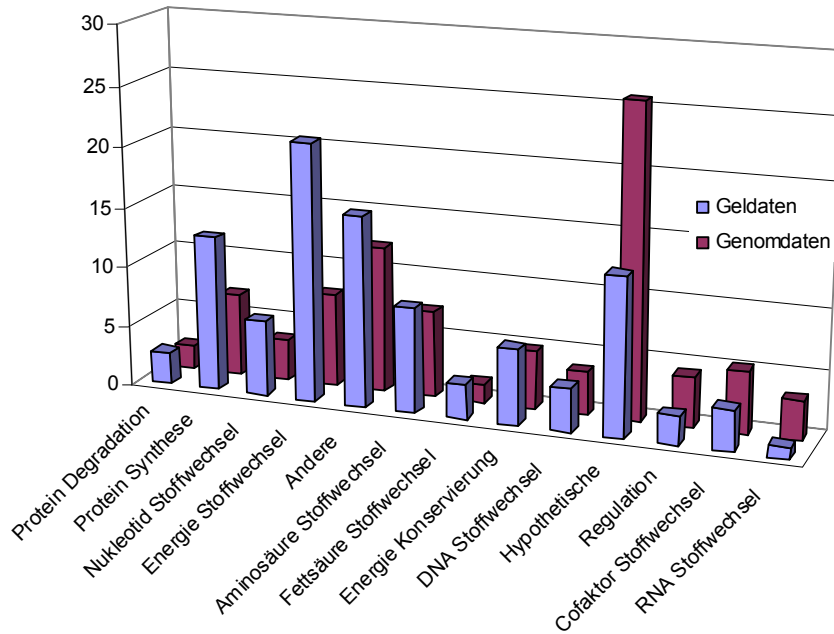


Abb. 39 Vergleich der Geldaten mit den Genomdaten. Verglichen wurde der prozentuale Anteil der Proteine an einer funktionellen Kategorie. Rote Balken zeigen den Verlauf, wie es den Anteilen laut Genom entspricht und blaue Balken zeigen die Verteilung wie es auf dem Mastergel repräsentiert ist.

3.5.6. Stationäre Phase vs exponentielle Phase

Um die Veränderungen während des Zellmetabolismus während der stationären Phase im Vergleich zur exponentiellen Phase aufzudecken, wurden Gele biologischer Replika von Zellen aus den beiden Phasen miteinander verglichen und das Spotmuster analysiert und quantifiziert. Proteine, die mindestens zweifach höher in der stationären Phase exprimiert waren, sind eine potentielle Anpassung an diesen neuen Wachstumsabschnitt der Kultur. Die Schritte der Auswertung sind unter 3.5.7.3 beschrieben. Die Übersicht über die hochregulierten Proteine sind in Tab. 20 dargestellt. Abb. 40 zeigt den graphischen Vergleich der beiden Gele mit Proben aus der exponentiellen Phase und der stationäre Phase. Die Gele wurden als „Overlay“ direkt aus dem Programm Delta 2D exportiert.

Tab. 20 Übersicht der überexprimierten Spots in der stationären Phase

label	ratio MW	Stabw	Acession no	Annotation	Pathway
1	3,27	0,95	RPTO000726	Fumarylacetoacetase (EC 3.7.1.2)	amino acid metabolism
3	2,16	0,11	RPTO000123	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase (EC 3.5.1.14)	amino acid metabolism
49	3,40	0,10	RPTO000143	4-aminobutyrate aminotransferase (EC 2.6.1.19)	amino acid metabolism
57	2,62	0,80	RPTO000083	Ornithine carbamoyltransferase (EC 2.1.3.3)	amino acid metabolism
67	4,04	0,25	RPTO000143	4-aminobutyrate aminotransferase (EC 2.6.1.19)	amino acid metabolism
75	4,09	0,32	RPTO000083	Ornithine carbamoyltransferase (EC 2.1.3.3)	amino acid metabolism
74	1,83	0,26	RPTO001011	Isochorismatase (EC 3.3.2.1)	cofactor metabolism
46	3,15	1,37	RPTO000420	DNA-binding protein	dna metabolism
64	3,56	0,97	RPTO001427	Ferredoxin	energy conservation
11	3,67	0,93	RPTO000346	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (EC 1.3.99.1)	energy metabolism
12	2,26	0,14	RPTO000498	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase (EC 1.1.1.60)	energy metabolism
33	4,18	1,87	RPTO000716	pyruvate ferredoxin oxidoreductase, alpha chain (EC 1.2.7.1)	energy metabolism
76	2,12	0,30	RPTO000523	PHOSPHOGLUCOMUTASE (EC 5.4.2.2) / PHOSPHOMANNOMUTASE (EC 5.4.2.8)	energy metabolism
15	3,21	0,89	RPTO000260	Hypothetical archaeal protein	Hypothetical
26	1,98	0,32	RPTO001521	Hypothetical Protein	Hypothetical
36	1,92	0,01	RPTO000679	Hypothetical Protein	Hypothetical
18	2,84	0,50	RPTO001488	Carbamate kinase (EC 2.7.2.2)	nucleotide metabolism
70	3,50	0,57	RPTO000210	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.205)	nucleotide metabolism
2	3,19	0,06	RPTO001353	Cell division cycle protein 48	other
8	2,81	0,31	RPTO000078	Hypothetical peroxiredoxin	other
10	2,10	0,27	RPTO001230	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	other
23	3,25	0,49	RPTO000078	Hypothetical peroxiredoxin	other
31	2,35	0,29	RPTO001315	OsmC-like protein	other
32	3,36	0,49	RPTO000078	Hypothetical peroxiredoxin	other
47	2,25	0,42	RPTO000052	Mannose-1-phosphate guanyltransferase (EC 2.7.7.13)	other
51	3,59	0,43	RPTO000078	Hypothetical peroxiredoxin	other
66	1,76	0,32	RPTO000052	Mannose-1-phosphate guanyltransferase (EC 2.7.7.13)	other
25	2,57	0,05	RPTO001408	Transcriptional regulator, GntR family / aminotransferase class-I (EC 2.6.1.-)	regulation
42	2,17	0,61	RPTO001408	Transcriptional regulator, GntR family / aminotransferase class-I (EC 2.6.1.-)	regulation
77	2,38	0,57	RPTO001093	Transcriptional regulatory protein, AsnC family	regulation

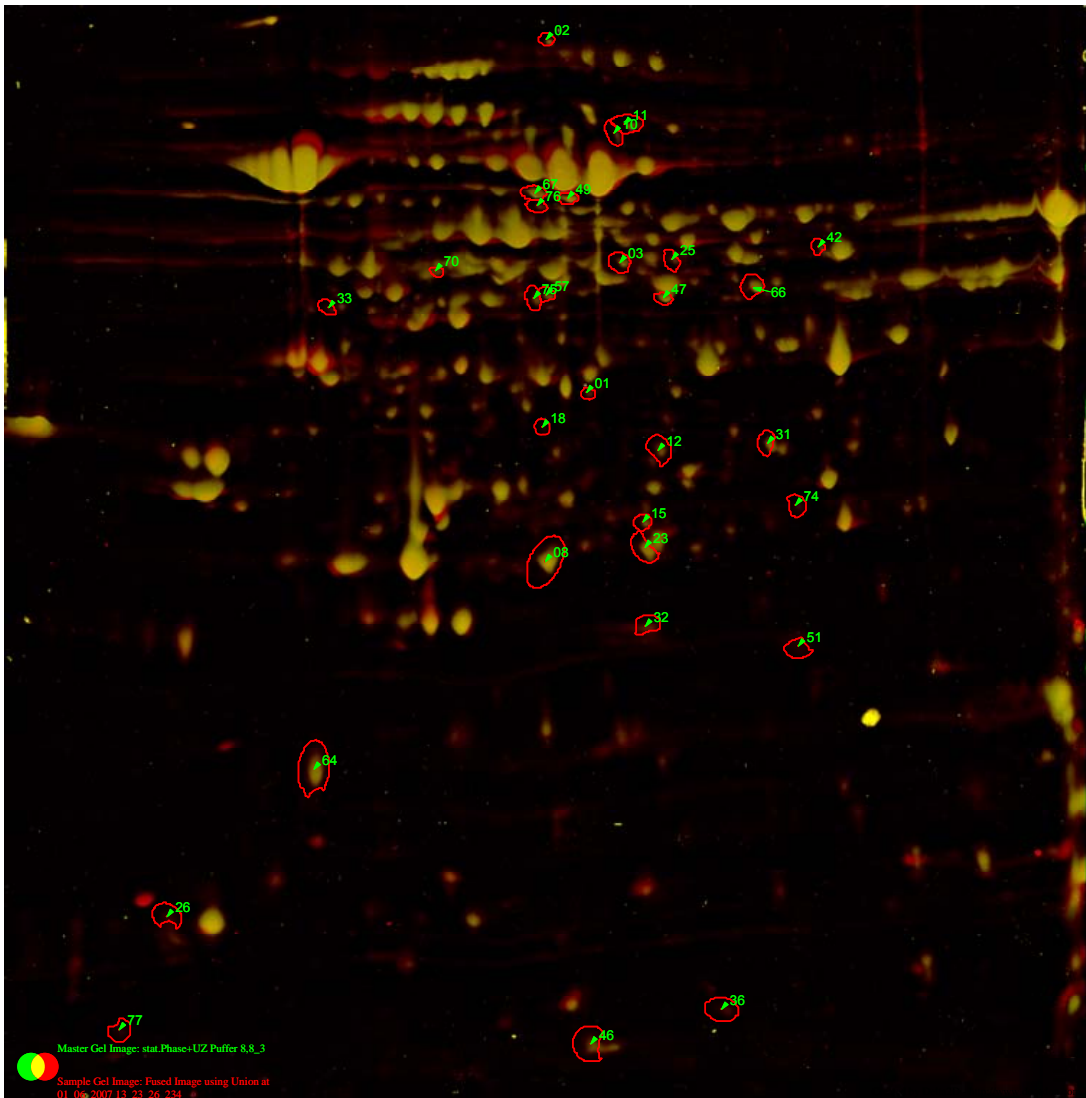


Abb. 40 Vergleich der Gele von Proben aus der exponentiellen Phase mit Proben aus der stationären Phase. In rot ist die stationäre Phase dargestellt, in grün die exponentielle Phase. Markiert sind die in der stationären Phase mind. zweifach überexprimierten Spots.

3.5.7. Analyse der Adaptation von *P. torridus* an verschiedene Stressbedingungen unter Verwendung vergleichender 2D-Gelelektrophorese

Archaea antworten auf zellulären Stress genauso wie auch Menschen, Tiere, Pflanzen oder Bakterien dies tun. Es wird angenommen, dass die Regulation hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Ziel dieser Experimente war es neue Proteine zu finden, die an der Antwort auf pH- und Temperatur-Stress beteiligt sind und daraus eventuell resultierende neue Regulationsmechanismen aufzudecken. Dazu wurden 2D-Gele von den verschiedenen Stress-Bedingungen mit einem Referenzgel verglichen, um

daraus resultierende überexprimierte Spots zu identifizieren. Den Spots wurde dann anhand des Mastergels eine Annotation zugeordnet.

Zuerst wurden anhand von Wachstumsexperimenten die Wachstumsgrenzen für den pH-Wert und die Temperatur ermittelt, um diese Bedingungen als Stressbedingung für die Experimente einzusetzen. Des Weiteren wurden Wachstumsexperimente durchgeführt, um für den genutzten experimentellen Aufbau wachstumsinduzierte Überexpression der Proteine auszuschließen.

3.5.7.1. Wachstumsexperimente zur Bestimmung der Wachstumsgrenzen von *P. torridus*

Für die Wahl der Stressbedingungen wurden zunächst Wachstumsversuche zur Bestimmung der Verdopplungszeit von *P. torridus* durchgeführt. Es wurde das Wachstum in Abhängigkeit vom pH-Wert bzw. der Temperatur untersucht und die daraus resultierende Verdopplungszeit bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 41 A und B dargestellt. Optimales Wachstum zeigte *P. torridus* bei pH 1 und 60 °C. Als Stressbedingungen wurden pH 0,5 als Säurestress, pH 1,8 als alkalischer Stress, 50 °C als Kälteschock und 70 °C als Hitzeschock ausgewählt. Alle diese Stressbedingungen liegen nah an den Wachstumsgrenzen von *P. torridus*, sind aber durchaus noch im physiologischen Bereich.

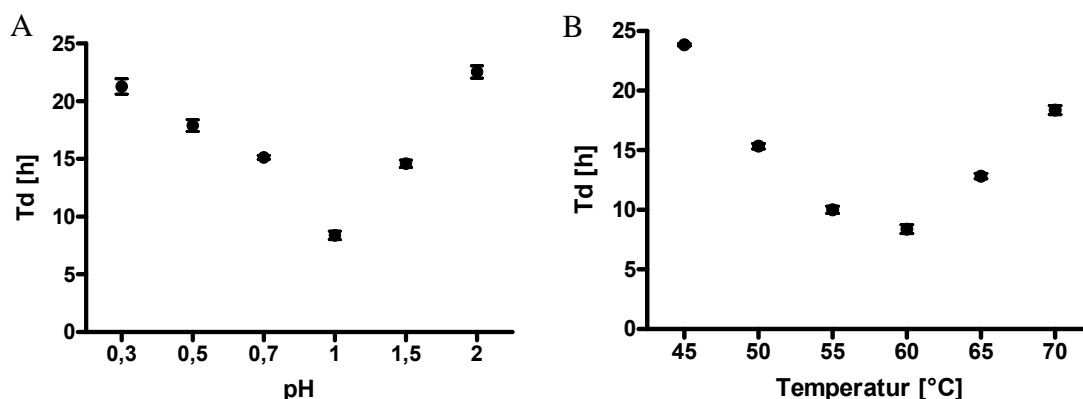


Abb. 41 A/B Bestimmung der Verdopplungszeit von *P. torridus* bei unterschiedlichen pH-Werten (A) und bei unterschiedlicher Temperatur (B).

3.5.7.2. Experimenteller Aufbau zur vergleichenden Analyse von verschiedenen Stressbedingungen mittels 2D-Gelelektrophorese

Die Experimente wurden wie in Abb. 42 dargestellt durchgeführt.

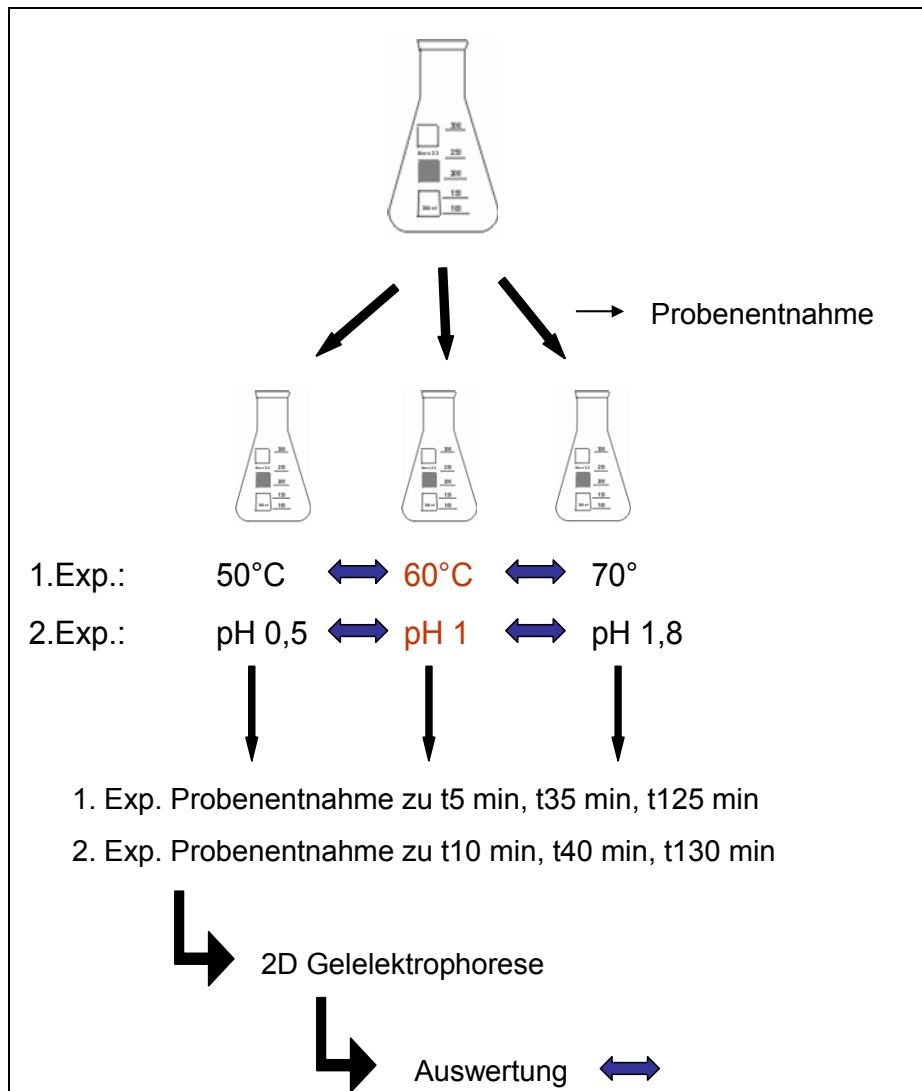


Abb. 42 Experimenteller Aufbau zur Analyse der Stressinduktion bei *P. torridus*

Eine 1 Liter *P. torridus*-Zellkultur wurde in einem 5 Liter-Erlenmeyerkolben bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,45 bei 60 °C, pH 1 und 50 rpm angezogen. In dieser mittleren exponentiellen Phase wurde die Kultur in 3 x 300 ml in 1 Liter-Erlenmeyerkolben aufgeteilt. Vor dem Teilen der Kultur wurden 50 ml Zellen als Kontrolle abgenommen. In dem ersten Experiment wurden die 300 ml Teilkultur jeweils in einen auf 50 °C, 60 °C und 70 °C vorgewärmten Kolben gegeben und anschließend bei der jeweiligen Temperatur bei 50 rpm inkubiert, wobei die Kultur bei 60 °C als Referenz diente. Es wurde direkt nach dem Umfüllen in die

entsprechend vorgewärmten Kolben wurden jeweils 2 x 40 ml und 1 x 10 ml Kultur abgenommen. Durch die 5-minütige Dauer dieses Aufteilungsvorganges erfolgte die erste Probenentnahme bei $t=5$ min. Es wurden dann weitere Proben (2 x 40 ml, 1 x 10 ml) nach einer halben Stunde ($t=35$) und nach 2 Stunden ($t=125$) entnommen. Für das zweite Experiment wurde die 1 Liter Startkultur in 3 x 300 ml Portionen auf drei auf 60 °C vorgewärmte Kolben verteilt. Vor dem Teilen wurden 50 ml als Kontrolle entnommen. Um einen Säurestress zu induzieren wurden vorsichtig bei leichtem Schwenken 3,45 ml H_2SO_4 zu der 300 ml Zellkultur getropft. Für die Induktion von alkalischem Stress wurden vorsichtig unter leichtem Schwenken 3,18 ml 10 M NaOH dazugetropft. Die dritte Kultur bei pH 1 diente als Referenz. Die Kulturen wurden anschließend bei 60 °C und 50 rpm inkubiert. Die Mengen der Säure bzw. Lauge war vorangegangenen Titrationsversuchen bestimmt worden. Der Vorgang des pH-Einstellens dauerte 10 min, daher wurde die ersten Proben (je 2 x 40 ml, 1 x 10 ml) direkt nach dem Teilen und pH-Einstellen bei $t=10$ min entnommen. Nach 30 min ($t=40$) und 2 Stunden ($t=130$) wurden erneut jeweils Proben von den einzelnen Kulturen entnommen (2 x 40 ml, 1 x 10 ml). Die einzelnen entnommenen Proben aus den Experimenten wurden immer gleich im Anschluss an die Entnahme zentrifugiert (8 min, 4000 rpm) und das Pellet jeweils 2-mal mit 50 mM NaAc-Puffer (pH 4.5) gewaschen, um die restliche Schwefelsäure des Mediums zu entfernen. Die Pellets der 10 ml Proben wurden bei -70 °C für eventuelle Transkriptionsanalysen weggefroren und die Pellets der 40 ml Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung weggefroren.

Als Problem bei diesem Experimentaufbau stellte sich das unterschiedliche Wachstum von *P. torridus* in unterschiedlichen Volumina und Kolbengrößen heraus. Um wachstumsinduzierte Unterschiede bei den Experimenten zu vermeiden wurden vor den Stressexperimenten Wachstumsuntersuchungen durchgeführt und die Bedingungen so erarbeitet, dass es beim Experimentaufbau nicht zu unerwünschten Wachstumsunterschieden kommt. Die Ergebnisse sind in Abb. 43 dargestellt. In dieser Abbildung kann man erkennen, dass je größer das Volumen in einem Kolben umso geringer ist die optische Zelldichte, wenn die Zellen in die stationäre Phase kommen. Da für die 2D-Gelelektrophorese aber eine bestimmte Menge (mind. 300 µg) an Protein

benötigt wird, also auch dementsprechend viel Zellausgangsmaterial, wurden die Kolben so gewählt, dass die Zellkulturoberfläche im Kolben relativ groß gegenüber der Kulturhöhe im Kolben war. Dieses Phänomen kann man erkennen, wenn man die Graphen der dunkelgrünen Linie mit der der hellgrünen Linie in Abb. 43 vergleicht. Für die Stressexperimente wurde nach diesen Versuchen eine Startkultur von 1 Liter in einem 5 Liter-Kolben gewählt und nach dem Aufteilen die 300 ml Anteile in 1 Liter-Kolben überführt, denn unter diesen Bedingungen sind keine Wachstumsunterschiede im Kurvenverlauf erkennbar.

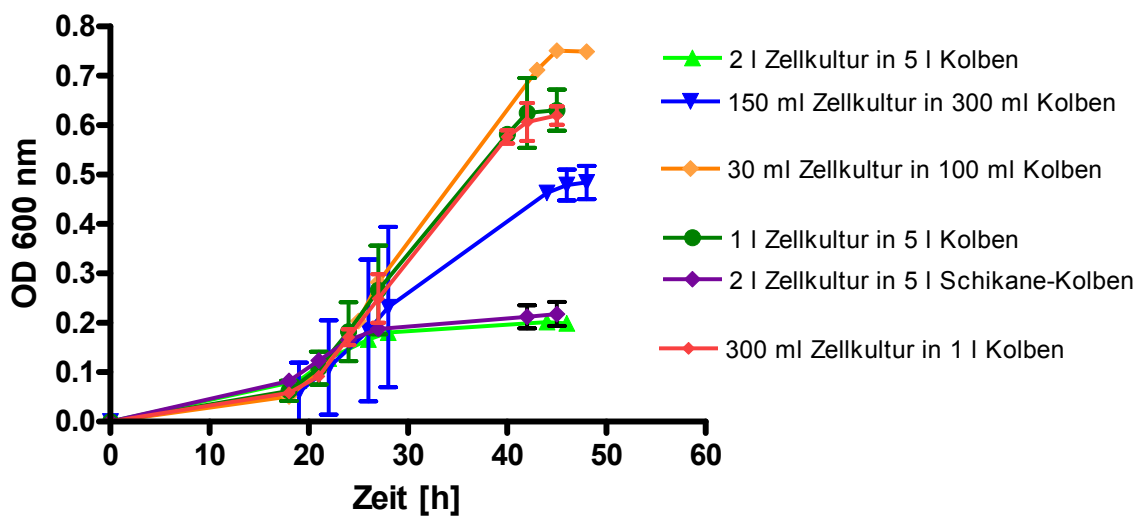


Abb. 43 Wachstumskurven von *P. torridus* in verschiedenen Zellkulturvolumen und verschiedenen Erlenmeyerkolbengrößen

3.5.7.3. Auswertung der vergleichenden 2D-Gelelektrophorese mittels Software Delta 2D (Decodon)

Die Proben, die aus den Experimenten an nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei verschiedenen Stresssituationen gewonnen wurden (s. 3.5.7.2), wurden mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software Delta 2D von Decodon. Ein Überblick über die einzelnen Schritte des Auswertprozesses mit der Software ist in Abb. 44 dargestellt.

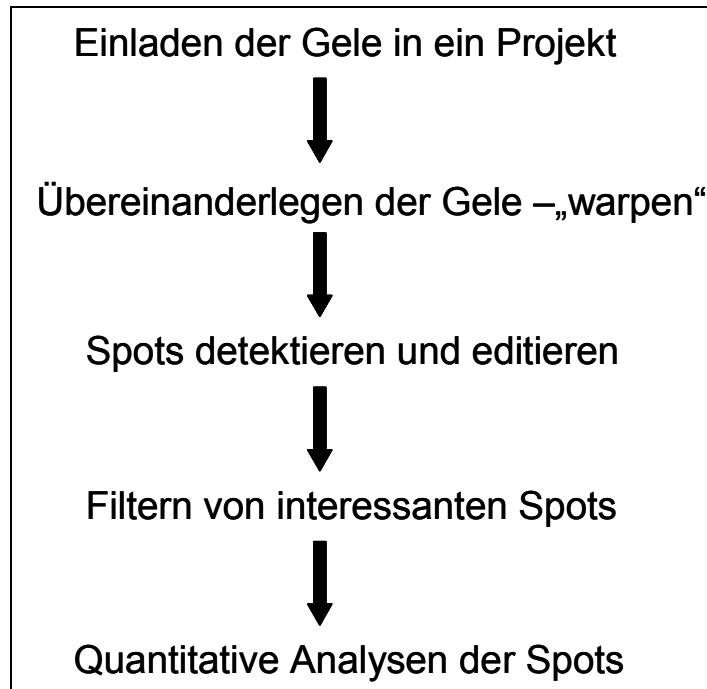


Abb. 44 Übersicht der Schritte zur Auswertung der 2D Experimente

Verglichen wurde jeweils das Referenzgel (optimale Wachstumsbedingung) mit der jeweiligen Stressbedingung zu einem Zeitpunkt. Tab. 21 gibt eine Übersicht über die verglichenen Gele.

Tab. 21 Übersicht über die 2D Gele, die mittels Delta 2D ausgewertet wurden

Referenz	pH Stress		Temperatur Stress	
	pH 0,5, 60°C	pH 1,8, 60°C	50 °C, pH 1	70 °C, pH 1
pH 1,60°C	t 10 min	t 10 min	t 5 min	t 5 min
pH 1,60°C	t 40 min	t 40 min	t 35 min	t 35 min
pH 1,60°C	t 130 min	t130 min	t 125 min	t 125 min

Von allen Gelen wurden zwei biologische daraus jeweils zwei technische Replika angefertigt. Die Gele wurden zuerst in das Programm Delta 2D eingeladen. Eine Gruppe entsprach jeweils einer Bedingung. Die Einstellung in der Software wurde so gewählt, dass immer die Gruppen miteinander verglichen wurden. Für die Experimente in dieser Arbeit wäre z.B. Gruppe 1 t= 10 pH 1 (als Referenz) und Gruppe 2 t=10 pH 0,5. So würden diese Bedingungen miteinander verglichen werden. Die Gruppierungen entsprechen der Einteilung in Tab. 21. Es besteht die Möglichkeit, in eine Gruppe parallel die jeweiligen Replika einer Probe einzuladen. In dieser Arbeit wurden die Replika in verschiedene Projekte eingeladen, ausgewertet und die Ergebnisse hinterher

miteinander verglichen. Diese Strategie ergab sich zwangsläufig daraus, dass in dieser Arbeit von jeder Probe ein einzelnes 2D-Gel generiert wurde, maximal 8 Gele parallel in der 1. und 2. Dimension laufen konnten und somit zwischen den einzelnen Gelen einige Laufunterschiede durch die nicht mögliche parallele Aufarbeitung aufgetreten sind. Diese Laufunterschiede erschwerten die Auswertung innerhalb eines Projektes in der Software, daher wurde sie in unabhängigen Projekten bearbeitet. Eine Möglichkeit sich diesen Laufunterschieden zu entziehen wäre das Arbeiten mit 2-dimensioneller differentieller 2D-Gelelektrophorese (DIGE (Viswanathan et al., 2006)). Abb. 45 zeigt eine Übersicht über ein hypothetisches Projekt in Delta 2D. Gele mit gleicher Farbe gehören einer Gruppe an und stellen eine Bedingung dar. Ein grüner Kreis mit weißem Pfeil bedeutet, diese Gele müssen manuell übereinander gelegt werden („warpen“) alle andere Gele werden automatisch gegeneinander „gewarpt“. Warpen bedeutet, dass die Gele so übereinander gelegt werden, dass gleiche Spots übereinanderliegen, wodurch auch geringfügige Laufunterschiede ausgeglichen werden können. In Abb. 46 ist ein s.g. warping dargestellt. Visualisiert wird es durch die Software, indem jedem Gel eine Farbe zugewiesen wird (hier: blau/orange) und durch das übereinanderlegen eine Mischfarbe entsteht (hier: schwarz).



Abb. 45 Übersicht über ein hypothetisches Projekt in Delta 2D (Decodon). Eine Bedingung stellt eine Gruppe dar und ist durch eine Farbe gekennzeichnet.

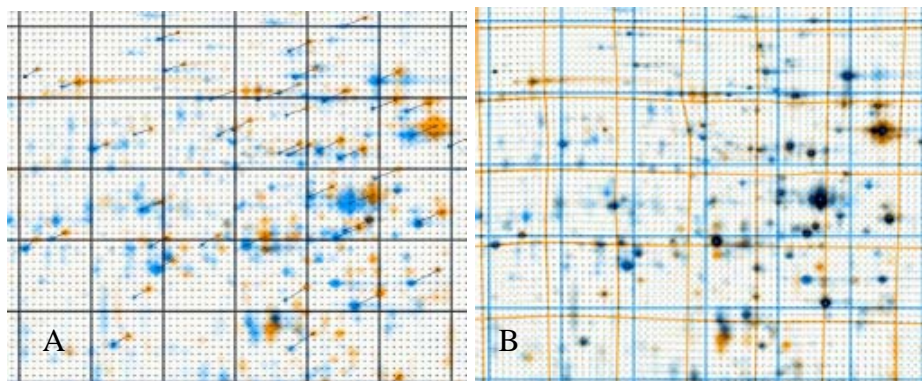


Abb. 46 A/B. Zwei Gele (Gel 1 in mit blauen Spots und Gel 2 mit orangenen Spots) die übereinandergelegt werden um Laufunterschiede auszugleichen. A: vor dem übereinanderlegen. B: nach dem Übereinanderlegen

In Abb. 47 A-D sind die Ergebnisse der gewarteten Gele aller Experimente zu jedem Zeitpunkt dargestellt. Dem jeweiligen Referenzgel (optimale Wachstumsbedingung pH 1, 60 °C zu t5/10 min; t35/40 min und t125/130 min) wurde die grüne Farbe zugeordnet und der jeweiligen vergleichenden

Stressbedingung die rote Farbe. Als Mischfarbe bei übereinandergelegten Spots ist eine gelbe Farbe zu erkennen.

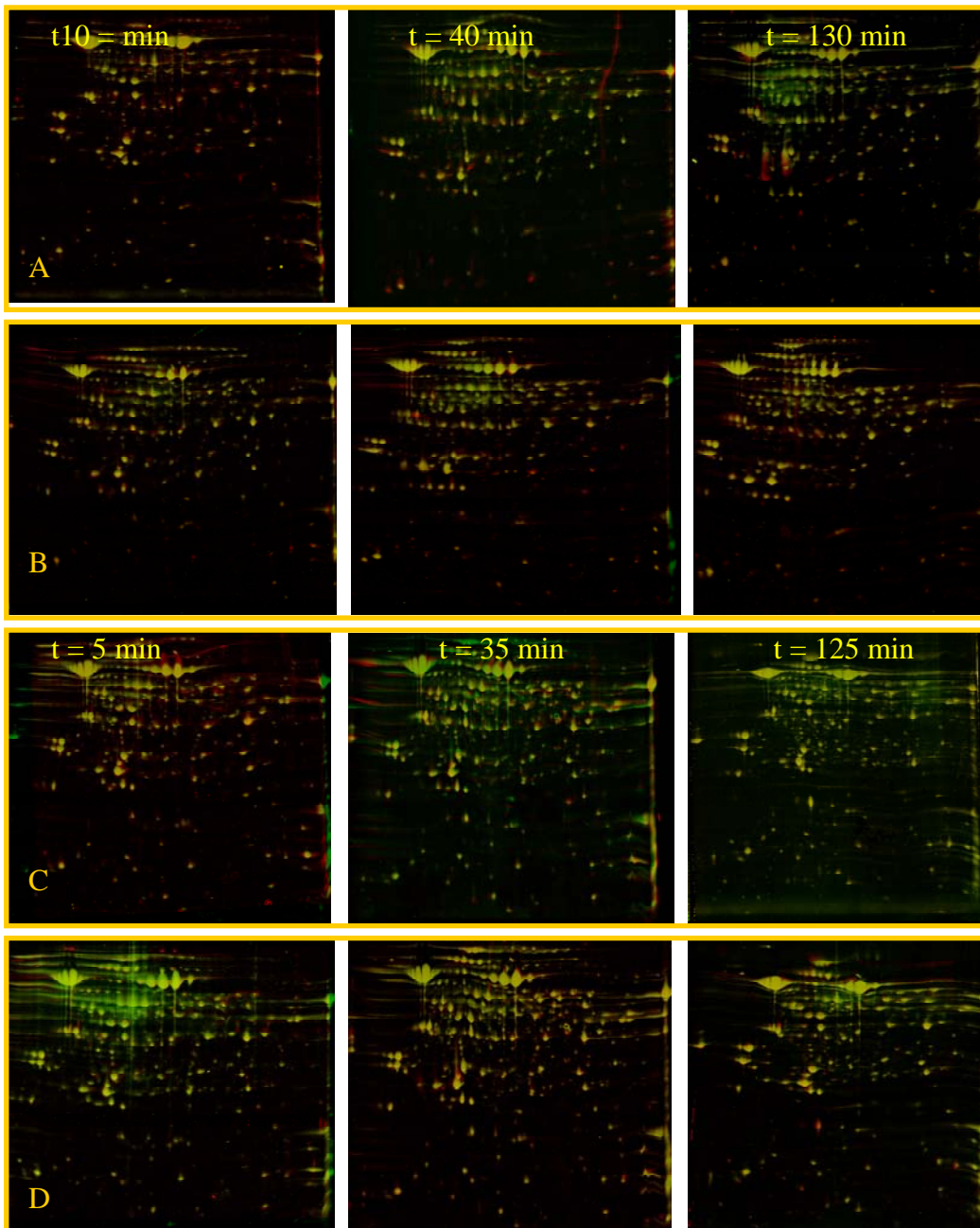


Abb. 47 A-D Warping der Gele von den biologischen Replika der Experimente Stress pH 0,5 (A), pH 1,8 (B), 50 °C (C) und 70 °C (D).

Nach dem „warping“, wurden alle Gele eines Projektes fusioniert, so dass auf einem Gel (Fusionsgel) alle Spots sichtbar waren, auch wenn sie vielleicht auf dem einen oder anderen Gel nicht präsent waren. Anhand dieses Fusionsgels wurden im Anschluss alle Spots detektiert und editiert, d.h. Spots wurden zugeordnet und danach manuell bearbeitet. Wurde z.B. von der Software nur 1

Spot erkannt, wo es sich aber tatsächlich um einen doppelten Spot handelt, wurde dieser nachträglich bearbeitet und aus einem Spot wurden 2 gemacht. Ebenso wurden die Spotgrenzen, die automatisch gesetzt werden, bei Bedarf nachbearbeitet. Hinterher wurden alle Spots von dem fusionierten Gel auf die einzelnen Gele übertragen, so wurde gewährleistet, dass auf allen Gelen alle Spots eingetragen sind. Im Anschluss an die Spotdetektion wurde auf einem Scatterplot geschaut, ob es potentiell interessante Spots in dem Experiment gab. In Abb. 48 ist ein Scatterplot aus einem hypothetischen Experiment dargestellt. Der blaue Bereich stellt das Referenzgel dar und der orange Bereich die zu vergleichende veränderte Bedingung. In weiß dargestellt sind alle Spots, die auf einem Gel detektiert wurden. Dargestellt ist hierbei das relative Volumen der einzelnen Spots in einer logarithmischen Auftragung. Alle Spots die im linearen Bereich liegen, hier gekennzeichnet durch die diagonalen Linien haben ungefähr die gleiche Expressionsrate. Interessante Spots befinden sich außerhalb des linearen Bereichs. Liegen sie im blauen Bereich handelt es sich um eine Unterexpression eines Proteins und Spots im orangen Bereich signalisieren eine potentielle Überexpression eines Proteins. Im nächsten Schritt erfolgte die Quantifizierung für die interessanten Spots. In einer Quantifizierungstabelle (s. Abb. 49) wurden die Expressionswerte für einzelne interessante Spots bestimmt. Dafür wurden Filter für die Auswertung gelegt, um die relevanten Spots einzugrenzen. Für den *ratio*, der eine Aussage über die Expressionsrate gibt, wurde eine Grenze von 2 gesetzt. Das bedeutet, eine Überexpression eines Proteins liegt erst dann vor, wenn ein Spot zweifach stärker exprimiert wurde. Der *ratio* ergibt sich aus dem Verhältnis des relativen % Volumen Anteil des Spots auf dem Gel mit der zu vergleichenden Bedingung, mit dem % Volumen Anteil des Spots auf dem Referenzgel. Der % Volumen Anteil eines Spots ergibt sich aus der Intensität des Spots bezogen auf alle Spots auf dem Gel, wobei die 10 stärksten Spots, die auf jedem Gel repräsentiert waren, aus der Normalisierung herausgenommen wurden, um nicht schwächere Spots zu unterdrücken.

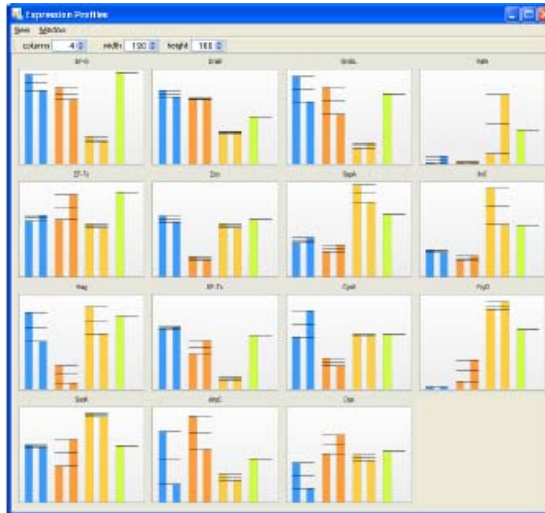


Abb. 50 Expressionsprofile der überexprimierten Spots

In Abb. 50 sind die Expressionsprofile einzelner Spots aus einem hypothetischen Projekt dargestellt. Jede Farbe entspricht einer Gruppe. Sind mehrere Balken in einer Gruppe, handelt es sich um Replika. Jedes Fenster spiegelt einen Spot wieder.

3.5.7.4. Analyse der pH-Stress-Antwort nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei pH 0,5

Die Proben zur Analyse wurden aus dem Experiment wie unter 3.5.7.2 beschrieben gewonnen und wie in 2.4.4.1 beschrieben verarbeitet. Es wurden Projekte mit zwei biologischen Replika miteinander verglichen. Es konnten anhand der Quantifizierung verschiedene Spots identifiziert werden, die bei einer Inkubation von *P. torridus* Zellen über einen Zeitraum von zwei Stunden bei pH 0,5 mindestens zweifach stärker exprimiert wurden. Wie in Abb. 51 zu erkennen ist, nimmt die Anzahl der hochregulierten Proteine nach 2 Stunden Inkubation bei pH 0,5 ab. Bereits nach 10 min sind 13 Proteine überexprimiert, eine halbe Stunde später sind es noch 11 und nach zwei Stunden wurden nur noch drei Proteine identifiziert, die hochreguliert sind.

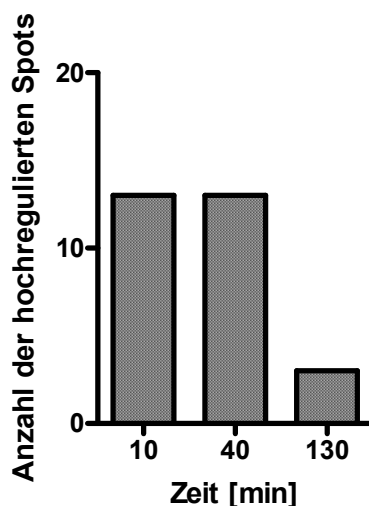


Abb. 51 Anzahl der hochregulierten Proteine nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei pH 0,5 für 10, 40 und 130 min.

An Hand des Mastergels konnten fast alle Spots identifiziert werden. Spots, deren Sequenz nicht vorhanden war, oder die nicht eindeutig zuweisbar war, wurden als *backup* erneut mittels MS/MS sequenziert. Eine Übersicht aller hochregulierten Spots mit ihrem *ratio*, der Standardabweichung, der ERGO Accession Nummer, der dazugehörigen Annotation und der Eingruppierung in die funktionelle Kategorie ist in den Tab. 22 A-C dargestellt. In Tab. 22 A sind alle hochregulierten Spots nach 10 min, B nach 40 min und C nach 130 min zusammengefasst.

Tab. 22 A-C Übersicht über alle hochregulierten Spots bei der Stressinduktion mit pH 0,5 für 10 min (A), 40 min (B) und 130 min (C). Die grau unterlegten Zeilen zeigen Protein, die entweder bei zwei Zeitpunkten, oder bei allen drei Zeitpunkten überexprimiert sind.

A label	MW ratio	Stabw ratio	Accession No	Annotation	Pathway
8	6,98	1,12	RPTO001427	Ferredoxin	energy conservation
1	3,18	0,78	RPTO000796	Hypothetical Protein	Hypothetical
6	3,93	1,20	RPTO000516	Hypothetical protein	Hypothetical
11	7,69	1,14	RPTO000119	Conserved Hypothetical protein	Hypothetical
12	3,23	0,93	RPTO000493	Hypothetical	Hypothetical
59	6,55	3,26	RPTO000516	Hypothetical protein	Hypothetical
74	5,13	0,68	RPTO000102	Hypothetical dehydrogenase	Hypothetical
87	2,12	0,16	RPTO001241	Hypothetical protein DUF 74	Hypothetical
107	5,53	0,80	RPTO001014	Thioredoxin	other
115	7,15	0,54	RPTO001097	TFAR19 PROTEIN	other
110	4,08	0,57	RPTO000637	SSU ribosomal protein L7AE	protein synthesis
54	5,62	0,43	RPTO000872	Prefoldin alpha subunit	protein synthesis
79	2,66	0,71	RPTO000578	DNA-directed RNA polymerase subunit D (EC 2.7.7.6)	protein synthesis
96	3,73	1,72	RPTO000172	Universal stress protein UspA family	regulation

B	MW	Stabw	Accession	Annotation	Pathway
label	ratio	ratio	No		
47	3,91	0,41	RPTO000728	TENA/THI-4 Family Protein	cofactor metabolism
21	2,53	0,90	RPTO001270	DNA-binding protein	dna metabolism
10	7,29	1,35	RPTO000085	Thioredoxin reductase (EC 1.6.4.5)	energy conservation
34	2,24	0,43	RPTO000244	Succinyl-CoA synthetase	energy metabolism
9	3,81	0,23	RPTO001279	Beta-ketoacyl synthase; thiolase	fatty acid metabolism
15	2,88	0,08	RPTO000516	Hypothetical protein	Hypothetical
19	2,86	0,18	RPTO000119	Conserved Hypothetical protein	Hypothetical
26	2,92	0,25	RPTO000899	Hypothetical Protein	Hypothetical
32	2,88	1,01	RPTO000516	Hypothetical protein	Hypothetical
14	6,03	0,37	RPTO000879	Alkyl hydroperoxide reductase subunit c	other
18	2,33	0,26	RPTO001318	Heat shock protein	other
28	3,73	0,56	RPTO000879	Alkyl hydroperoxide reductase subunit c	other
40	2,14	0,34	RPTO001097	TFAR19 PROTEIN	other
6	5,33	1,04	RPTO000428	Protease I (EC 3.4.-.-)	protein degradation
13	8,06	1,61	RPTO000428	Protease I (EC 3.4.-.-)	protein degradation
25	3,81	0,32	RPTO000637	SSU ribosomal protein L7AE	protein synthesis

C	MW	Stabw	Accession	Annotation	Pathway
label	ratio	ratio	No		
11	4,00	1,63	RPTO000728	TENA/THI-4 Family Protein	cofactor metabolism
5	2,32	0,30	RPTO001097	TFAR19 PROTEIN	other
9	3,17	0,30	RPTO000637	SSU ribosomal protein L7AE	protein synthesis

Die graphische Darstellung der überexprimierten Spots mit den dazugehörigen Expressionprofilen ist im Anhang (s. 6.8) dargestellt.

3.5.7.5. Analyse der pH-Stress-Antwort nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei pH 1,8

Für das Experiment zur Analyse des pH-Stresses bei der Inkubation von *P. torridus* Zellen bei pH 1,8 wurden die Proben wie unter 3.5.7.2 beschrieben gewonnen und wie in 2.4.4.1 beschrieben verarbeitet. Es wurden auch hier zwei biologische Replika nach 10, 40 und 130 min miteinander verglichen. Abb. 52 zeigt die Anzahl der hochregulierten Proteine bei den drei Zeitpunkten. Es ist zu erkennen ist, dass bereits nach 10 min eine erste potentielle Stressantwort in Form von 9 hochregulierten Proteinen erfolgt. Nach 40 min steigt die Zahl sogar auf 17 überexprimierte Proteine während nach 130 min die Anzahl auf 7 sinkt.

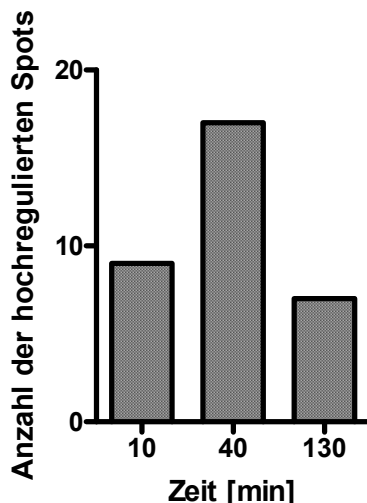


Abb. 52 Anzahl der hochregulierten Proteine nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei pH 1,8 für 10, 40 und 130 min.

Durch das Mastergel konnten fast allen Spots eine Annotation zugeordnet werden. Spots, deren Sequenz nicht vorhanden war, oder die nicht eindeutig zuweisbar war, wurden als *backup* erneut mittels MS/MS sequenziert. Eine Übersicht aller hochregulierten Spots mit ihrem *ratio*, der Standardabweichung, der ERGO Accession Nummer, der dazugehörigen Annotation und der Eingruppierung in die funktionelle Kategorie ist in den Tab. 23 A-C dargestellt. In Tab. 23 A sind alle hochregulierten Spots nach 10 min, B nach 40 min und C nach 130 min zusammengefasst.

Tab. 23 A-C Übersicht über alle hochregulierten Spots bei der Stressinduktion mit pH 1,8 für 10 min (A), 40 min (B) und 130 min (C). Die grau unterlegten Zeilen zeigen Protein, die entweder bei zwei Zeitpunkten, oder bei allen drei Zeitpunkten überexprimiert sind.

A label	ratio MW	STABW	Annotation	Annotation	Pathway
9	3,52	0,24	RPTO000728	TENA/THI-4 Family Protein	cofactor metabolism
30	4,33	0,51	RPTO001388	A1AO H+ ATPase subunit B (EC 3.6.3.15)	energy conservation
94	2,76	0,21	RPTO000085	Thioredoxin reductase (EC 1.6.4.5)	energy conservation
50	3,14	0,92	RPTO000244	Succinyl-CoA synthetase	energy metabolism
26	3,50	0,17	RPTO001180	Hypothetical Protein	Hypothetical
81	2,40	0,37	RPTO000863	Conserved Hypothetical protein	Hypothetical
97	2,89	0,18	RPTO001182	Hypothetical Protein	Hypothetical
11	2,13	0,12	RPTO000637	SSU ribosomal protein L7AE	protein synthesis
22	3,00	0,34	RPTO000191	Chaperone protein dnaK (Heat shock protein 70)	protein synthesis
79	4,81	1,43	RPTO000637	SSU ribosomal protein L7AE	protein synthesis

B	MW	Stabw	Accession	Annotation	Pathway
label	ratio		No		
63	3,18	0,09	RPTO000728	TENA/THI-4 Family Protein	cofactor metabolism
13	2,66	0,09	RPTO001328	Thioredoxin reductase (EC 1.6.4.5)	energy conservation
38	2,44	0,13	RPTO001388	A1AO H+ ATPase subunit B (EC 3.6.3.15)	energy conservation
61	4,29	0,55	RPTO001388	A1AO H+ ATPase subunit B (EC 3.6.3.15)	energy conservation
4	5,07	1,35	RPTO000802	Phosphoglycerate mutase family protein	energy metabolism
24	2,65	0,43	RPTO000739	Electron transfer flavoprotein alpha and beta-subunit	energy metabolism
27	3,20	1,55	RPTO001063	Methylisocitrate lyase (EC 4.1.3.30)	energy metabolism
48	2,16	0,21	RPTO001383	Glucuronate/galactonate dehydratase (EC 4.2.1.39)	energy metabolism
9	5,52	2,87	RPTO000198	Tetratricopeptide repeat family protein	Hypothetical
15	3,52	0,49	RPTO001352	Hypothetical protein	Hypothetical
45	4,31	0,89	RPTO000651	Hypothetical Protein	Hypothetical
1	3,10	0,40	RPTO000480	Carboxymethylenebutenolidase (EC 3.1.1.45)	other
6	8,42	0,29	RPTO000078	Hypothetical peroxiredoxin	other
26	2,25	0,01	RPTO001222	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	other
31	3,34	0,25	RPTO000078	Hypothetical peroxiredoxin	other
36	3,71	0,10	RPTO000078	Hypothetical peroxiredoxin	other
40	4,28	0,80	RPTO000480	Carboxymethylenebutenolidase (EC 3.1.1.45)	other
55	3,81	0,28	RPTO000580	Hydrolase (alpha/beta family)	other
11	2,14	0,16	RPTO000037	Proteasome beta subunit (EC 3.4.25.1)	protein degradation
19	2,33	0,50	RPTO000428	Protease I (EC 3.4.-.-)	protein degradation
18	2,67	0,04	RPTO000462	ABC transporter ATP-binding protein	transport
51	11,02	1,23	RPTO000462	ABC transporter ATP-binding protein	transport
54	2,70	0,77	RPTO000462	ABC transporter ATP-binding protein	transport

C	MW	Stabw	Accession	Annotation	Pathway
label	ratio		No		
6	2,33	0,29	RPTO001404	TATA-box binding protein	dna metabolism
5	4,13	0,39	RPTO001388	A1AO H+ ATPase subunit B (EC 3.6.3.15)	energy conservation
20	2,23	0,03	RPTO001388	A1AO H+ ATPase subunit B (EC 3.6.3.15)	energy conservation
7	2,16	0,08	RPTO000899	Hypothetical Protein	Hypothetical
23	21,79	0,99	RPTO000119	Conserved Hypothetical protein	Hypothetical
3	2,13	0,12	RPTO001513	Spermidine synthase (EC 2.5.1.16)	other
12	2,50	0,16	RPTO001513	Spermidine synthase (EC 2.5.1.16)	other
16	2,71	0,56	RPTO001318	Heat shock protein	other
9	2,06	0,25	RPTO000637	SSU ribosomal protein L7AE	protein synthesis

3.5.7.6. Analyse der Temperatur-Stressantwort nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei 50 °C

Zur Analyse der Stress-Antwort auf eine Temperatursenkung auf 50°C wurden die Proben für das Experiment wie unter 3.5.7.2 beschrieben gewonnen und anschließend mit Delta 2D verarbeitet (s. 3.5.7.3). Verglichen wurden auch hier jeweils die Proben aus bei 50 °C inkubierten *P. torridus* Zellen mit den

Referenzproben aus Zellen bei optimalen Wachstumsbedingungen. Ein Vergleich der Gele zeigte, dass erst nach 125 min eine Reaktion erfolgte durch die Überexpression von 8 Proteinen (s. Abb. 53). Nach 5 und 35 min waren die Expressionsmuster der biologischen Replika identisch.

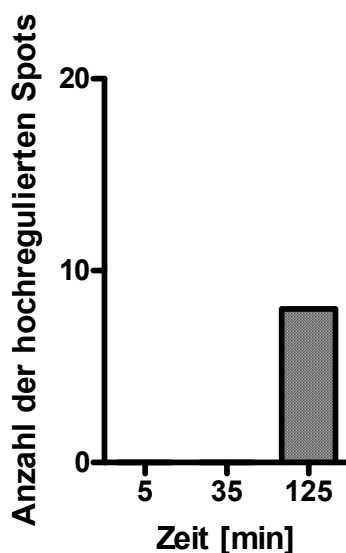


Abb. 53 Anzahl der hochregulierten Proteine nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei 50°C für 5, 35 und 125 min.

Anhand des Mastergels konnte fast allen Spots eine Annotation zugeordnet werden. Spots, deren Sequenz nicht vorhanden war, oder die nicht eindeutig zuweisbar war, wurden als *backup* erneut mittels MS/MS sequenziert. Eine Übersicht aller hochregulierten Spots mit ihrem *ratio*, der Standardabweichung, der ERGO Accession Nummer, der dazugehörigen Annotation und der Eingruppierung in die funktionelle Kategorie nach 125 min ist in Tab. 24 dargestellt.

Tab. 24 Übersicht über alle hochregulierten Spots bei der Stressinduktion 50°C für 125 min

label	MW ratio	Stabw	Accession No	Annotation	Pathway
2	2,97	0,38	RPTO000725	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)	amino acid metabolism
18	2,34	0,53	RPTO000143	4-aminobutyrate aminotransferase (EC 2.6.1.19)	amino acid metabolism
13	2,35	0,77	RPTO001427	Ferredoxin	energy conservation
4	3,67	0,51	RPTO000196	Ribulose-phosphate 3-epimerase (EC 5.1.3.1)	energy metabolism
5	4,16	2,36	RPTO001092	Archaeal Hypothetical Cytosolic Protein	Hypothetical
11	3,14	0,20	RPTO000493	Hypothetical	Hypothetical
19	5,64	1,83	RPTO001311	Protein Translation Elongation Factor Tu (EF-TU)	protein synthesis
36	2,26	0,09	RPTO001433	Nascent Polypeptide Associated Complex Protein (NAC)	protein synthesis
40	2,19	0,12	RPTO001290	Ribonuclease PH (EC 2.7.7.56)	protein synthesis

3.5.7.7. Analyse der Temperatur-Stressantwort nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei 70 °C

Von großem Interesse war auch die Analyse der Hitzeschockantwort des auch thermophilen *P. torridus* bei 70 °C. Die Proben für das Experiment wurden wie unter 3.5.7.2 beschrieben gewonnen und anschließend mit Delta 2D verarbeitet (s. 3.5.7.3). Verglichen wurden auch hier jeweils die Proben aus bei 70 °C inkubierten *P. torridus* Zellen mit den Referenzproben aus Zellen bei optimalen Wachstumsbedingungen. Ein Vergleich der Gele zeigte, dass nach 35 min eine erste Reaktion erfolgte durch die Überexpression von 7 Proteinen (s. Abb. 54). Nach 135 min stieg die Anzahl der hochregulierten Proteine sogar auf 14 an. Im Vergleich zu den pH Stress Antworten, bei denen bereits nach 10 min eine Reaktion erfolgte, erwies sich die Reaktion auf Temperaturstress auf Proteomebene als relativ langsam. Des Weiteren konnte man bei den pH-Stress-Experimenten nach zwei Stunden eine mögliche Adaptation, gezeigt durch die Abnahme der Anzahl der hochregulierten Spots, erkennen, während bei den Temperaturstress Experimenten ein anderer Verlauf zu erkennen ist, indem die Reaktion sogar erst nach zwei Stunden erfolgt (Vergleich Abb. 51, Abb. 52, Abb. 53, Abb. 54).

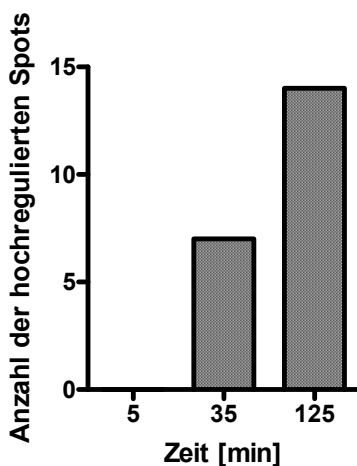


Abb. 54 Anzahl der hochregulierten Proteine nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei 70°C für 5, 35 und 125 min.

Fast allen Spots konnte eine Annotation Anhand des Mastergels zugeordnet werden. Spots, deren Sequenz nicht vorhanden war, oder die nicht eindeutig zuweisbar war, wurden als *backup* erneut mittels MS/MS sequenziert. Eine Übersicht aller hochregulierten Spots mit ihrem ratio, der Standardabweichung,

der ERGO Accession Nummer, der dazugehörigen Annotation und der Eingruppierung in die funktionelle Kategorie nach 5 min (A), 35 min (B) und 135 min ist in Tab. 25 (A-C) dargestellt.

Tab. 25 A/B Übersicht über alle hochregulierten Spots bei der Stressinduktion 70°C für 35 min (A) und 125 min (B)

A label	MW ratio	Stabw	Accession No	Annotation	Pathway
10	2,62	0,72	RPTO000523	PHOSPHOGLUCOMUTASE (EC 5.4.2.2) / PHOSPHOMANNOMUTASE (EC 5.4.2.8)	energy metabolism
12	2,80	1,07	RPTO000238	Dihydroipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4)	energy metabolism
20	2,16	0,11	RPTO001077	Cyclase	other
22	2,79	0,61	RPTO000879	Alkyl hydroperoxide reductase subunit c	other
4	2,08	0,27	RPTO000155	Proteasome alpha subunit (EC 3.4.25.1)	protein degradation
6	2,01	0,19	RPTO000072	snRNP Sm-like protein	protein synthesis
18	2,20	0,45	RPTO000637	SSU ribosomal protein L7AE	protein synthesis
11	2,61	0,82	RPTO000172	Universal stress protein UspA family	regulation

B label	MW ratio	Stabw	Accession No	Annotation	Pathway
25	8,31	0,63	RPTO000728	TENA/THI-4 Family Protein	cofactor metabolism
18	4,18	0,98	RPTO000024	Replication factor A - large subunit	dna metabolism
35	2,20	0,04	RPTO001404	TATA-box binding protein	dna metabolism
38	10,49	1,53	RPTO001438	Sulfide-quinone oxidoreductase (EC 1.8.5.-)	energy conservation
8	9,19	0,31	RPTO000244	Succinyl-CoA synthetase	energy metabolism
32	4,96	1,85	RPTO000244	Succinyl-CoA synthetase	energy metabolism
10	2,90	0,03	RPTO000679	Hypothetical Protein	Hypothetical
24	2,30	0,46	RPTO000516	Hypothetical protein	Hypothetical
7	3,00	0,65	RPTO001014	Thioredoxin	other
17	2,45	0,58	RPTO000879	Alkyl hydroperoxide reductase subunit c	other
31	2,66	0,66	RPTO000480	Carboxymethylenebutenolidase (EC 3.1.1.45)	other
11	2,43	0,74	RPTO000578	DNA-directed RNA polymerase subunit D (EC 2.7.7.6)	protein synthesis
15	10,92	3,39	RPTO001311	Protein Translation Elongation Factor Tu (EF-TU)	protein synthesis
23	2,02	0,25	RPTO001301	Protein Translation Initiation Factor 2 subunit alpha (IF-2a)	protein synthesis
36	2,04	0,16	RPTO000637	SSU ribosomal protein L7AE	protein synthesis

3.5.7.8. Sequenzvergleich des 50bp *upstream*-Bereiches der hochregulierten Proteine bei verschiedenen Stressbedingungen

Über die Stressregulation bei pH-Stress ist bisher wenig bekannt und für *P. torridus* wurde weder etwas über die Regulation der Anpassung an pH-Stress noch an Temperatur-Stress beschrieben. Über die Regulation auf DNA Ebene bei *Archaea* wurde bislang nur spekuliert. Daher wurden die 50 bp *upstream*

DNA-Bereich aller hochregulierten Proteine aus den Stressexperimenten (s. 3.5.7.4, 3.5.7.5, 3.5.7.6, 3.5.7.7) auf konservierte Sequenzmotive untersucht, die eventuell Aufschluss auf eine gemeinsame Regulation dieser Proteine bei der jeweiligen Stresssituation geben. Die 50 bp *upstream* DNA Bereich wurden dazu in die MEME Datenbank (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>) geladen und verglichen.

Abb. 55 stellt die Ergebnisse des pH Stress-Experimentes von pH 0,5 dar. Meme errechnet konservierte Sequenzmotive, die sich aus dem multiplen Alignment der eingeladenen Sequenzen ergeben. Die gefundenen Motive sind farblich dargestellt. Jede Sequenz wird dargestellt durch ihren Namen, auf welchem Strang sie codiert ist (+/- Strang), der Position an der das Motiv startet und die statistische Signifikanz (p-Value). Der p-Value stellt die Wahrscheinlichkeit der Base an der bestimmte Stelle dar und wird durch die Häufigkeit der Wiederholungen der Base an dieser Stelle bestimmt. Abb. 56 stellt das Häufigkeitsmuster der konservierten Nukleotidsequenz dar, welche durch MEME bestimmt wurde. Diese Abbildung macht die Dominanz der Basen in diesem Bereich deutlich. In Abb. 57 ist eine Übersicht der Starts der gefundenen Motive dargestellt.

Ergebnisse für pH 0,5

NAME	STRAND	START	P-VALUE	SITES
RPTO000578	+	35	3.66e-05	GGTGGCAGAA GGGGAA GGAGAGTTTA
RPTO001279	-	4	6.18e-05	TCTTACGCC GGGGCG TTC
RPTO000085	-	4	6.18e-05	AAAAATATTT GGGCAA AAG
RPTO000872	+	40	6.18e-05	GGTTATTTGG GGGCAA ATACAA
RPTO000493	+	22	6.18e-05	TCAATAACCA GGGCAA TGGAAATATT
RPTO000796	-	13	6.18e-05	TATAAACCTT GGGCAA CICTTATTTA
RPTO001097	-	36	1.07e-04	TATACATCAC CGGGAA TAATAATTAA
RPTO001318	+	41	1.30e-04	GATAACTGGA GCTGAC ATGTA
RPTO001427	+	40	1.30e-04	ATCATGTGAG GCTGAC CAGATT
RPTO000040	+	20	1.62e-04	CTTTTAAATA CGGCAA TGAACATGGT
RPTO000556	+	38	2.09e-04	TTTAGTTTAA GAGGAC AACCACCTA
RPTO001270	+	42	2.90e-04	ATTATCATAT GGTGAA ACCA
RPTO000899	+	36	3.38e-04	ATGGAAAAAA AGGGAC GTAATTAAAA
RPTO000637	+	40	5.14e-04	GAACATGAAG GAGCAA TAAATA

Abb. 55 Multiple Alignment der 50 bp *upstream* Bereiche der überexprimierten Spots bei pH 0,5. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>).

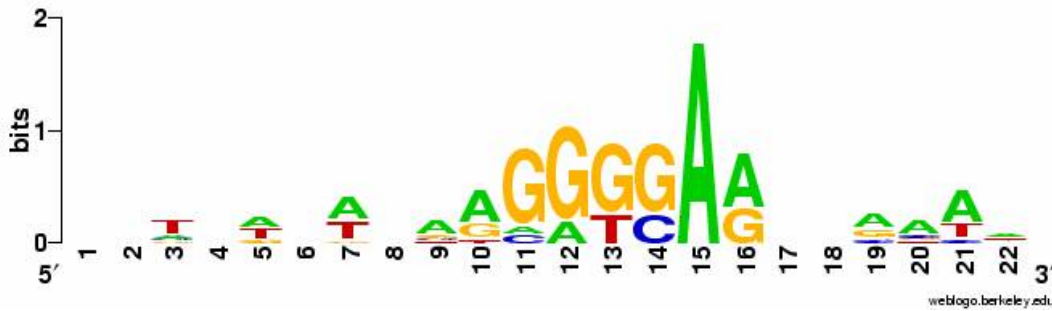


Abb. 56 Dominanz der Basen des Motivs aus dem multiplen Alignment von pH 0,5. Darstellung als Weblogo Motiv

Von den insgesamt 25 überexprimierten Spots für das Experiment pH 0,5 bei allen drei Zeitpunkten ($t=10$ min, $t=40$ min, $t=130$ min) zeigten 14 Proteine ein konserviertes Motiv. Die dominanten Basen in dem Bereich sind [G][G][GT][GC][A][AG] (s. Abb. 56). Bei vier ORFs ist das Motiv auf dem Gegenstrang codiert. Bis auf RPTO000493 und RPTO000040 (Start 22 und 20) starten alle Motive im Bereich von 35-41. Es wurden noch zwei weitere Motive gefunden, diese sind aber nicht signifikant, da sie nur bei jeweils 2 ORFs vorkommen und somit eine Konservierung nicht gegeben ist.

Name	Lowest p-value	Motifs
RPTO000578	3.7e-05	===== +1 ==
RPTO001279	6.2e-05	= -1 =====
RPTO000085	6.2e-05	= -1 =====
RPTO000872	6.2e-05	===== +1 ==
RPTO000493	6.2e-05	===== +1 =====
RPTO000796	6.2e-05	== -1 =====
RPTO001097	0.00011	===== -1 ==
RPTO001318	0.00013	===== +1 =
RPTO001427	0.00013	===== +1 ==
RPTO000040	0.00016	== +1 =====
RPTO000556	0.00021	===== +1 ==
RPTO001270	0.00029	===== +1 =
RPTO000899	0.00034	===== +1 ==
RPTO000637	0.00051	===== +1 ==
SCALE		 1 25

Abb. 57 Übersicht über die Position des gefundenen Motivs bei pH 0,5. Die Zahl beschreibt, um welches Motiv es sich handelt und +/- auf welchem Strang sich das Motiv befindet. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>).

Ergebnisse für pH 1,8

NAME	STRAND	START	P-VALUE	SITES
RPTO001063	+	37	7.32e-06	TAGATTCCAT GGAGGC GATAGAGAT
RPTO001301	+	5	7.32e-06	GACA GGAGGC CTTCTTGCAG
RPTO001318	+	38	4.17e-05	GTTGATAACT GGAGGT GAGATGTA
RPTO000899	+	38	4.17e-05	GGAAAAAAG GGAGGT AATTAAAA
RPTO001222	+	40	7.39e-05	AGAAATTATT GGTGGT TAACGA
RPTO000191	+	41	7.39e-05	AGTTTCAAAA GGTGGT AATAA
RPTO001388	+	41	7.39e-05	GATTGAGGTC GGTGGT GTAAA
RPTO000637	+	39	9.88e-05	AGAACAIGAA GGAGGA ATAARTA
RPTO000198	+	1	1.06e-04	GGCGGA TTATAATCGA
RPTO000639	+	45	1.56e-04	CAATGACAAA GAAGGC A

Abb. 58 Multiple Alignment der 50 bp *upstream* Bereiche der überexprimierten Spots bei pH 1,8. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>).

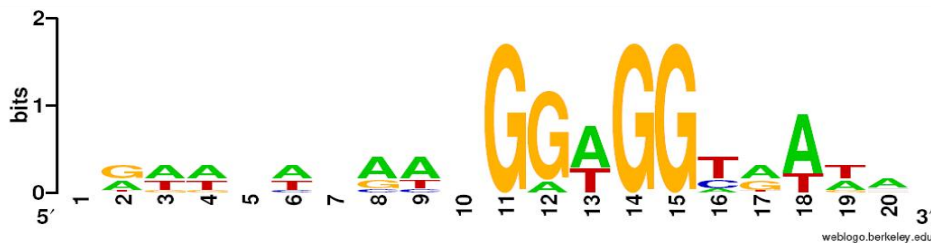


Abb. 59 Dominanz der Basen des Motivs aus dem multiplen Alignment von pH 1,8. Darstellung als Weblogo Motiv

Von den insgesamt 34 überexprimierten Spots für das Experiment pH 1,8 bei allen drei Zeitpunkten (t=10 min, t=40 min, t=130 min) zeigten 10 Proteine ein konserviertes Motiv. Die dominanten Basen in dem Bereich sind [G][G][AT][G][G][TCA] (s. Abb. 59). Bis auf RPTO001301 und RPTO000198 (Start 5 und 1) starten alle Motive im Bereich von 37-45. Es wurden noch zwei weitere Motive gefunden, diese sind aber nicht signifikant, da sie nur bei jeweils 2 Orfs vorkommen und somit eine Konservierung nicht gegeben ist.

Name	Lowest p-value	Motifs
RPTO001063	7.3e-06	===== +1 ==
RPTO001301	7.3e-06	- +1 =====
RPTO001318	4.2e-05	===== +1 ==
RPTO000899	4.2e-05	===== +1 ==
RPTO001222	7.4e-05	===== +1 ==
RPTO000191	7.4e-05	===== +1 =
RPTO001388	7.4e-05	===== +1 =
RPTO000637	9.9e-05	===== +1 ==
RPTO000198	0.00011	+1 =====
RPTO000639	0.00016	===== +1 =
SCALE		1 25

Abb. 60 Übersicht über die Position des gefundenen Motivs bei pH 1,8. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>).

Ergebnisse für 50°C**Motiv 1**

NAME	STRAND	START	P-VALUE	SITES
RPTO001290	+	12	3.99e-07	CTTACAGACA GGGTAAAGGCA TATCTTGATA
RPTO001301	+	37	7.73e-07	GCGATCTTGT AGGCGGAGGCA AAGA
RPTO001311	+	39	2.79e-06	TTAATTAAAA AGGTGAAAGAA TA
RPTO000493	+	22	3.29e-06	TCAATAACCA GGGCAATGGAA ATATTAAAAG
RPTO001092	+	41	7.06e-06	TATCTACATG AGGTGATACAA
RPTO001270	+	41	1.12e-05	TATTATCATA TGGTGAAACCA
RPTO001427	+	39	2.26e-05	TATCATGIGA GGGTGAGCAGA TT
RPTO001433	+	1	2.59e-05	AGGTAATACAA AGATAAAAAT
RPTO000024	+	41	9.66e-05	CTTTTAAAGG AAGTAAGAGAA

Abb. 61 Motiv 1 des multiplen Alignment de 50 bp *upstream* Bereiche der überexprimierten Spots bei 50 °C. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>).

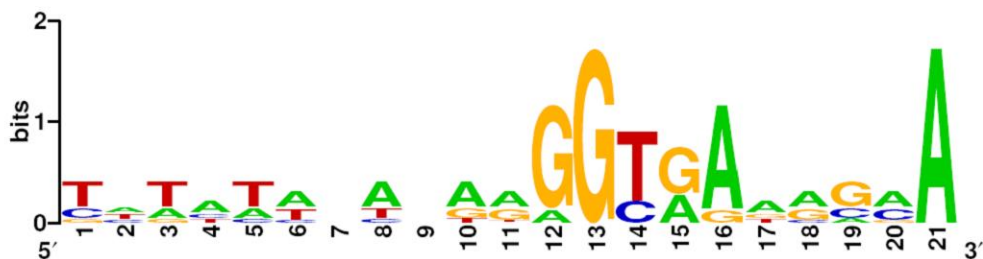


Abb. 62 Dominanz der Basen des 1. Motivs aus dem multiplen Alignment von 50°C Darstellung als Weblogo Motif.

Motiv 2

NAME	STRAND	START	P-VALUE	SITES
RPTO001290	+	40	1.24e-05	ATAAAATGAA GGGTGG AAACAA
RPTO001301	+	4	5.67e-05	GAC AGGAGG CCTTCTTGCA
RPTO000637	+	38	5.67e-05	AAGAACAATGA AGGAGG AATAAATA
RPTO001222	+	39	1.01e-04	AAGAAATTAT TGGTGG TTAACGA

Abb. 63 Motiv 2 des multiplen Alignment der 50 bp *upstream* Bereiche der überexprimierten Spots bei 50 °C. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>).



Abb. 64 Dominanz der Basen des 2. Motivs aus dem multiplen Alignment von 50°C Darstellung als Weblogo Motif.

In dem Experiment 50°C wurden bei den 21 verglichenen Sequenzen der überexprimierten Proteine bei allen drei Zeitpunkten (t=10 min, t=40 min, t=130 min) wurden 2 konservierte Motive gefunden, wobei das 2. Motiv nicht stark

signifikant ist (gezeigt durch den größeren p-Value). Es zeigt aber ein ähnliches Motiv mit gleichem Start, wie die der pH-Stress Experimente. Die dominanten Basen in Motiv 1 sind [AG][G][G][TC][GA][A][ATG][AG][GC][AC][A] (s.Abb. 62) und in Motiv 2 [ACT][G][G][A][G][G] (s. Abb. 64). Abb. 61 stellt die Position des Motivs 1 dar. Ein weiteres Motiv war statistisch nicht signifikant.

Name	Lowest p-value	Motifs
RPTO001290	4e-07	— +1 ———
RPTO001301	7.7e-07	———— +1 =
RPTO001311	2.8e-06	———— +1 *
RPTO000493	3.3e-06	—— +1 ———
RPTO001092	7.1e-06	———— +1
RPTO001270	1.1e-05	———— +1
RPTO001427	2.3e-05	———— +1 *
RPTO001433	2.6e-05	+1 ———
RPTO000024	9.7e-05	———— +1
SCALE		 1 25

Abb. 65 Übersicht über die Position des gefundenen Motivs bei 50 °C. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>).

Ergebnisse für 70°C

NAME	STRAND	START	P-VALUE	SITES
RPTO001301	+	4	2.12e-17	GAC AGGAGGCCTTCTTGCCAGCCGCCGCCGATCTTCTAGGC GGG AGGCCAAAGA
RPTO001448	+	3	2.21e-16	AA GCACATCTTACAGGGCCGCTGAGGCCTTTTCTCAAGG GGG GTTTTAAAAA
RPTO000578	+	7	1.06e-13	CCCCAT GATGCCACTAAAAAGAAAGGTGGCAGAAAGCGGAAGG A GA GTTTAA
RPTO000072	+	8	2.09e-11	TGAGCAG GGAAGAAATATGATGATGCTGATGAATATAAATTGAGG TGG TTTTAA
RPTO000637	+	5	3.35e-10	TTTA TATCATTGAATACAAATACCTTTTAAAGAACATGAAGG AGG AATAAATA
RPTO000155	+	4	1.22e-09	ATG GCAAAATATTTATAACACATTTATAATAAAGCAATA GAGG GTGAATACA

Abb. 66 Motiv des multiple Alignment des 50 bp *upstream* Bereiches der überexprimierten Spots bei 70 °C. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>).

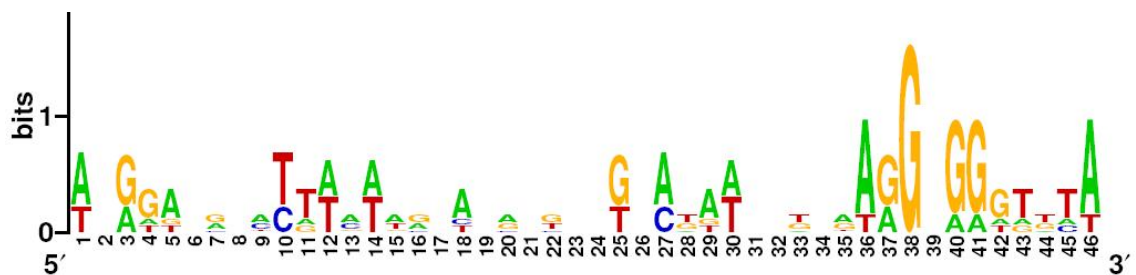


Abb. 67 Dominanz der Basen des Motivs aus dem multiple Alignment von 70°C Darstellung als Weblogo Motiv.

In dem Experiment 70°C wurde bei den 23 verglichenen Sequenzen der überexprimierten Proteine bei allen drei Zeitpunkten (t=10 min, t=40 min, t=130 min) 1 Motiv gefunden, allerdings scheint dies nicht stark signifikant zu sein.

Schaut man sich den gerahmten Bereich in Abb. 66 genauer an, fällt ein ähnliches Motiv auf, wie es bereits in den vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde. Die Abb. 67 zeigt ebenfalls dominante Basen in diesem Bereich, doch es wurde durch das Programm MEME nicht als ein solches Motiv erkannt. Abb. 68 stellt eine Übersicht über die Bereiche des gefundenen Motivs dar. Die anderen zwei gefundenen Motive waren statistisch nicht signifikant.

Name	Lowest p-value	Motifs
RPTO001301	2.1e-17	+1 —
RPTO001448	2.2e-16	+1 —
RPTO000578	1.1e-13	+1 —
RPTO000072	2.1e-11	+1 —
RPTO000637	3.3e-10	+1 —
RPTO000155	1.2e-09	+1 —
SCALE		1 1 1 25

Abb. 68 Übersicht über die Position des gefundenen Motivs bei 70 °C. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>).

4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, ausgewählte Dehydrogenasen zu klonieren, - exprimieren und - charakterisieren. Die heterologe Expression von *P. torridus* Genen in *E. coli* hat sich aufgrund der stark abweichenden intrazellulären Bedingungen als sehr schwierig herausgestellt. Über verschiedene Expressionsvektoren und – Bedingungen wurde versucht, optimale Bedingungen für eine solche Expression zu schaffen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Proteomanalysen von *P. torridus* durchgeführt. Zum einen wurde eine Datenbank mit allen Proteinen erstellt, die unter optimalen Lebensbedingungen auf einem 2D-Gel repräsentiert sind und zum anderen wurde das auf einem 2D-Gel sichtbare Proteom auf Veränderungen bei verschiedenen Stresssituationen untersucht. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden auf DNA-Ebene auf regulatorische Elemente untersucht, und es wurde versucht, Aufschluss über die Regulation bei Stressinduktion von Archaeen zu erlangen.

4.1. HETEROLOGE EXPRESSION AUSGEWÄHLTER *P. TORRIDUS* DEHYDROGENASEN UNTER VERSCHIEDENEN EXPRESSIONSBEDINGUNGEN

Für die heterologe Expression von rekombinanten *P. torridus* Genen in *E. coli* sind viele Aspekte von Bedeutung, um eine Überexpression der Proteine zu erzielen. Dazu gehören vor allem die Auswahl des Expressionswirtes und die Stärke des Promotors (transkriptionelle Regulation), um Bedingungen zu schaffen, damit lösliches und aktives Protein produziert wird. Dieses spiegelt sich in den Ergebnissen der Expression der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase (RPTO000201) wider.

4.1.1. Promotorwahl und Variation der Anzuchtbedingungen

Das Gen der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase wurde in die Vektoren pBADmycHis-A (Invitrogen), pEX22b (Invitrogen) und pMALc2x (NEB) kloniert. Durch die Expression in dem Vektor pBADmycHis-A konnte nur eine sehr

schwache Überexpressionsbande auf einem SDS-Gel produziert werden, während durch die Expression mit pEX22b und pMALc2x eine deutliche Überproduktion des Proteins stattfand. Im pBAD_{mycHis}-A Vektor steht das Gen unter der Kontrolle des P_{BAD}-Promotors, dem Promotor für das *E. coli* Arabinose-Operon, und die Expression wird kontrolliert durch den AraC Aktivator (s. Manual Invitrogen).

Die Expression ist abhängig von hohen Mengen an L-Arabinose. Im Gegenzug kann die Expression durch Glucose wieder abgeschaltet werden. Dieser Promotor hat zudem den Vorteil, dass er sehr gut regulierbar ist. Doch der P_{BAD}-Promotor ist ein sehr schwacher Promotor. Selbst Konzentrationen von bis zu 0,6 % der sehr kostenintensiven L-Arabinose führten zu keiner Überexpression des gewünschten Gens. Daher wurde das Gen über das Gateway System in den Vektor pEX22b kloniert (Jörn Voss, Diplomarbeit), in dem es unter der Kontrolle des starken T7 Phagen-Promotors steht. Die Nutzung von Phagen-Promotoren ist weit verbreitet (Dubendorff and Studier, 1991a; Dubendorff and Studier, 1991b) und resultiert in einer sehr starken Transkription der klonierten Gene. Solch starke Transkription ist sehr nützlich für die Überexpression von Genen, andererseits können dadurch auch Probleme entstehen. Große Mengen an rekombinanten Proteinen können zum einen toxisch für die Wirtszelle sein, zum anderen kommt es bei der Überexpression von rekombinanten Proteinen oft zur Aggregation des Zielproteins und zur Bildung von s.g. *inclusion bodies*. Das so akkumulierte Material ist nicht-nativ und damit inaktiv. Bei der Expression von pEX::201 in *E. coli* Ros2(DE3) befand sich der größte Teil des exprimierten Proteins auch in *inclusion bodies*. Es war nur eine sehr geringe Menge des Proteins auf dem SDS-Gel durch eine schwache Bande in der löslichen Fraktion sichtbar (s. Abb. 16) und zudem war keine Aktivität messbar. Daher galt es die Bedingungen so zu variieren, dass mehr lösliches Protein gebildet wird. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Senkung der Expressionstemperatur und der Induktorkonzentration zur Reduktion der *in vivo* Aggregation von rekombinanten Protein führen kann (Schein, 1991; Strandberg and Enfors, 1991). Durch die Senkung dieser Bedingungen wird die Expression verlangsamt und den translatierten Polypeptidketten ist die Möglichkeit gegeben, sich in ihre native Konformation zu falten (Weickert et al., 1996). Doch weder durch die Senkung

der Induktorkonzentration von 0,2 mM auf 0,01 mM, noch durch die Senkung der Anzuchttemperatur auf 30 °C und 24 °C konnte der Anteil an löslichem Protein erhöht werden (s. 3.2).

Die Anzucht von Zellen unter Stressbedingungen kann die Löslichkeit von rekombinanten Proteinen erhöhen (Blackwell and Horgan, 1991). Dabei kommt es vermutlich unter anderem zur Induktion von Chaperonen, die die Faltung von Proteinen in ihre native Konformation unterstützen. Bei den Expressionsversuchen dieser Arbeit hatte die Induktion der zellulären Stressantwort keinen Einfluss auf die Löslichkeit der Glycerol-Dehydrogenase. Zwar war nach der Zugabe von 3 % Ethanol (v/v) ein deutlich langsames Wachstum festzustellen, doch das rekombinante Protein aggregierte auch unter diesen Anzuchtbedingungen in der unlöslichen Fraktion.

4.1.2. Coexpression mit Chaperonen

Normalerweise ist die Syntheserate eines Proteins (4-20 Aminosäuren pro s) niedriger als die Faltungsrate (Radford, 2000). Proteinbiosynthese und Proteinfaltung sind deshalb in der Zelle eng gekoppelt. Unter physiologischen Bedingungen ist die Proteinfaltung somit eine hocheffiziente Reaktion, vor allem weil eine Gruppe von Proteinen die Proteinfaltung in der Zelle unterstützt. Diese Proteine wurden unter dem Namen „Molekulare Chaperone“ (frz. „chaperone“ = Anstandsdame) zusammen gefasst, da sie illegitime Interaktionen zwischen Substratproteinen verhindern, aber nicht Bestandteil der gebildeten Strukturen sind (Ellis and van der Vies, 1991). Chaperone sind ubiquitär, d.h. sie kommen in sämtlichen Organismen und Zellkompartimenten vor und gehören außerdem zu den am stärksten konservierten Proteinen. Die Anzahl und Art der Chaperone variiert jedoch in den verschiedenen Lebewesen und korreliert mit der Komplexität des Organismus (Pahl et al., 1997). Die Bildung von *inclusion bodies* als Folge von hohen Translationsraten der stark transkribierten mRNAs deutet auf eine Überlastung der zelleigenen Faltungsmaschinerie hin (Lilie et al., 1998; Rudolph and Lilie, 1996). Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass die gleichzeitige Überexpression von Faltungshelferproteinen wie molekularen Chaperonen die Ausbeute an löslichem rekombinantem Protein deutlich erhöhen können (Nishihara et al., 1998) (s. Abb. 69 A/B). Die erfolgversprechendsten und physiologisch wichtigsten *E. coli* Chaperone sind

DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL und GroES. Die ATP-abhängigen Chaperonsysteme GroEL und DnaK sind am besten untersucht und können nicht nur die Aggregation von Proteinen verhindern, sondern auch deren Rückfaltung in die native Konformation fördern. Um bereits Faltungsvorgänge am Ribosom während der Proteinsynthese zu unterstützen, könnte eine Überproduktion des Trigger-Faktors die Menge an nativem Protein erhöhen.

Es zeigte sich jedoch, dass die Überexpression von Chaperonen nur in spezifischen Fällen zur Ausbeuteverbesserung an nativem Protein führten (Lee and Olins, 1992). In der Regel müssen mehrere Chaperone für das gewünschte rekombinante Protein empirisch getestet werden, um eine optimale Ausbeute zu erhalten. Entscheidend dabei kann die Kombination von verschiedenen Chaperonen sein, wie auch die Menge und die zeitliche unabhängige Expression von Chaperon und Zielprotein. Ein Beispiel dafür sind die Untersuchungen von Yokoyama *et al* (Yokoyama et al., 1998), die zeigten, dass die Menge rekombinant hergestellter Transglutaminase durch GroEL/GroES oder DnaK nicht beeinflusst wird, wohingegen DnaJ oder DnaK und DnaJ die Ausbeute um das 4-5 fache steigerten. Bei der rekombinanten Herstellung der Adrenodoxin-Reduktase konnte hingegen nur die Co-Expression von GroEL/GroES den Anteil korrekt gefalteten Proteins wesentlich erhöhen (Vonnheim et al., 1999).

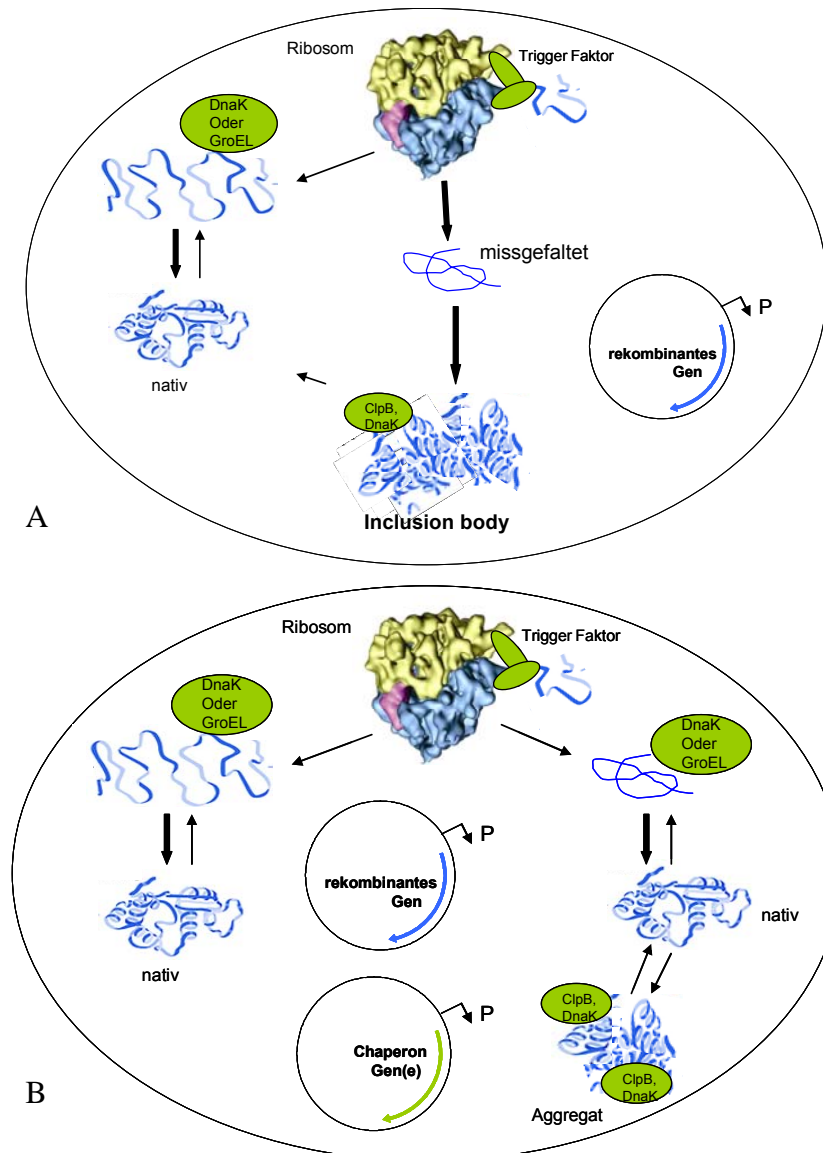


Abb. 69 Übersicht über die Proteinproduktion ohne (A) und mit (B) optimierten Mengen an Chaperonen in der Zelle. (A) Es kommt verstärkt zu Missfaltung und Aggregation, da nicht genügend Chaperone vorhanden sind. (B) Co-Expression von Chaperongen mit dem Gen für das rekombinante Protein, wodurch mehr Chaperone für die Proteinfaltung zur Verfügung stehen und somit mehr lösliches rekombinantes Protein hergestellt werden kann.

Zur Coexpression der DnaK/DnaJ/GrpE-, Tig- und GroES/EL-Chaperonsysteme mit dem Konstrukt pEX::201 wurden in dieser Arbeit die Vektoren pG-KJE8 (C1), pGro7 (C2), pKJE7 (C3), pG-Tf2 (C4) und pTf15 (C5) (Takara) verwendet. In diesen Vektoren sind die Chaperonsysteme in unterschiedlichen Kombinationen codiert und stehen unter der Kontrolle von verschiedenen Promotoren. So konnte getestet werden, welches Chaperonsystem oder welche Kombination aus den Systemen zu einer möglichen Erhöhung an nativem Protein führt. Dieses wurde anhand von verschiedenen Aktivitätstests (s. 3.2.2) überprüft. Unter 3.2.2.3 konnte anhand von photometrisch messbarer Aktivität

gezeigt werden, dass die Coexpression entweder mit C1, C2, C4 oder C5 wahrscheinlich zu einer Erhöhung von nativer Glycerol-Dehydrogenase führt (s. Abb. 21). Da die Messungen gegen eine uninduzierte Kontrolle erfolgten, kann man davon ausgehen, dass es sich bei den Messungen um die Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität des exprimierten Proteins handelt. Die Aktivität konnte aber nur bestimmt werden, wenn das Zielprotein erst drei Stunden nach der Induktion der Chaperone induziert wurde. Daraus kann man schlussfolgern, dass erst ausreichend Chaperone in der Zelle vorhanden sein müssen, damit dann das stark exprimierte Zielprotein zumindest zum Teil korrekt gefaltet werden kann. Das gleiche Ergebnis wurde mittels Aktivitätstest auf Carbonylindikatorplatten nach der Expression von pEX::201 mit C1-5 in *E. coli* ECL707 T7 erhalten. Dieser *E. coli* Stamm ist Glycerol-Dehydrogenase-negativ. Da in den Carbonylindikatorplatten Glycerol als Substrat enthalten ist, ist davon auszugehen, dass bei sichtbarer Aktivität diese durch die überproduzierte *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase hervorgerufen wird. Dieses konnte man nur bei der Coexpression entweder mit Chaperonplasmiden 1, 2, 4 oder 5, nicht aber bei der Coexpression mit dem Chaperonplasmid 3 oder bei den Kontrollen (ECL707 und ECL707 pEX::201 ohne Coexpression mit Chaperonplasmiden) nachweisen (s. Abb. 24). Allerdings konnte bei der Expression in ECL707 keine Aktivität im Überstand des Zellrohextraktes bestimmt werden. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass in diesem Stamm zusätzlich erst das Gen für T7 Polymerase exprimiert werden muss und erst im Anschluss die Expression der Gene für Chaperone und Zielprotein induziert werden können. Möglicherweise ist hierbei das Zeitfenster zu lang, um eine optimierte Expression aller drei Systeme zu erhalten. Da der Plattentest aber viel sensitiver ist, kann da bereits ohne zeitlich verschiedene Induktionen Aktivität nachgewiesen werden.

Interessanterweise war bei keinem der beiden Tests Aktivität messbar nach der Coexpression des *P. torridus* ORFs 201 mit dem Plasmid pKJE7 (Chaperonplasmid 3). Auf diesem Plasmid ist das DnaK/DnaJ/GrpE-System codiert. Dieses System besteht aus einem HSP70-Protein, dem DnaK, welches ATPase-Aktivität besitzt. Dieses Chaperon bindet an kurze Peptidsegmente mit hydrophoben Aminosäuren, die von nicht-nativem Protein exponiert werden (Fourie et al., 1994; Rudiger et al., 1997). Die ATP-Hydrolyse als auch der

ADP/ATP-Austausch werden durch die beiden Cochaperone DnaJ (41kDa) und GrpE, einem Homodimer mit 20 kDa-Untereinheiten reguliert (Liberek et al., 1991a; Liberek et al., 1991b). Bis auf das Plasmid pTf16 (C5), welches ausschließlich für *tig* codiert, unter der Kontrolle des *araB* Promotors, codieren die anderen Chaperone für das GroEL/GroES-System. Entweder steht dabei das GroEL/GroES-System ausschließlich unter der Kontrolle des *araB*-Promotors (C2) oder in Kombination mit dem DnaK/DnaJ/GrpE-System unter dem unabhängigen Pzt-1-Promotor (C1), oder unter dem Pzt-1 Promotor in Fusion mit dem Triggerfaktor, codiert durch *tig*. Die beiden Chaperone GroEL und GroES sind die ersten (aus *E. coli*), die auf molekularer Ebene untersucht wurden und ihre Funktionsweise gilt daher als Modell für die allgemeine Proteinfaltung (Goloubinoff et al., 1989a; Goloubinoff et al., 1989b; Lorimer, 2001). Das Hsp60-Chaperon GroEL besteht aus zwei Ringen mit je sieben Untereinheiten, wobei jede Untereinheit ATPase-Aktivität zeigt. Es kooperiert mit GroES, einem siebengliedrigen Ring mit deutlich kleineren Untereinheiten, das den „Deckel“ des GroEL Rings bildet. Das GroEL/GroES-System bildet also im Gegensatz zum DnaK/DnaJ/GrpE-System einen abgeschlossenen Raum, in dem nicht-native Proteine gefaltet werden. Der Trigger Faktor, codiert durch *tig*, bindet in 1:1 Stöchiometrie an die Ribosomen und interagiert direkt mit den translatierten Polypeptidketten. Dieser Komplex aus Trigger-Faktor, Ribosom und Polypeptidkette wird ATP-unabhängig wieder vom Ribosom entlassen (Hesterkamp et al., 1996).

Für die lösliche Expression der Glycerol-Dehydrogenase in dieser Arbeit scheinen potentiell die Coexpression mit dem Trigger Faktor und dem GroEL/GroES-System von Vorteil zu sein.

In ersten Versuchen wurde auch versucht, die Löslichkeit der Glycerol-Dehydrogenase aus der Expression von pBAD::201 mit der Coexpression mit den Chaperonplasmiden (C1-5) zu erhöhen, doch hier konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Dies macht deutlich, dass viele Faktoren bei der heterologen Expression von Bedeutung sind. So ist es nicht nur die korrekte Faltung, sondern auch die Menge des Proteins, die wahrscheinlich aufgrund des schwächeren P_{BAD}-Promotors zu gering war, entscheidend. Des Weiteren war aufgrund der gleichen Promotoren (*araB*) keine unabhängige Induktion von Chaperonen und Zielprotein möglich. So könnte es möglich sein, dass die

produzierte Menge an Chaperonen nicht ausreichend ist, wenn parallel das Zielprotein exprimiert wird. Dieser Punkt untermauert das Ergebnis, dass bei der Coexpression von pEX::201 mit C1, C2, C4 und C5 erst Aktivität messbar war, als das Gen erst drei Stunden nach den Chaperongen gen induziert wurde. Alle Aktivitätsbestimmungen wurden im Rohextrakt durchgeführt, der zuvor bei 55 °C hitzegefällt worden war. Die spezifischen Aktivitäten, die mittels Coexpression bestimmt werden konnten, waren zudem sehr gering (bis 350 mU/mg). Tendenziell führte eine Erhöhung der Temperatur zu einer größeren Aktivität (s. Abb. 22). Doch Messungen im Rohextrakt sind sehr instabil und unterliegen großer Hintergrundaktivität. Gerade bei spektrophotometrischen Messungen, bei denen die Zunahme von NADH gemessen wird, können die Ergebnisse sehr inhomogen sein aufgrund der Instabilität von NADH bei hohen Temperaturen und im sauren pH-Bereich (Angelov et al., 2005; Wu et al., 1986). Doch mehrere Wiederholungen und auch die Aktivitätsbestimmungen mittels Carbonylindikatorplatten konnten die Ergebnisse bestätigen.

4.1.3. Expression von Fusionsproteinen

Es ist gezeigt worden, dass durch die Fusion mit Maltose-Bindeprotein (MBP) die Löslichkeit von Proteinen erhöht werden kann (Maina et al., 1988). Zudem erleichtert diese Fusion die Aufreinigung des gewünschten Proteins über die Bindung des MBPs an Amylose. Das Fusionsprodukt aus MBP und Glycerol-Dehydrogenase steht in dem Vektor pMALc2x unter der Kontrolle des starken P_{tac} -Promotors. Durch die Expression mit dem Fusionsanteil konnte lösliches Protein produziert werden, ohne die Anzuchtbedingungen zu variieren (s. Abb. 27). Allerdings wurde im Rohextrakt keine Aktivität gefunden. Terpe *et al* (Terpe, 2003) haben gezeigt, dass es notwendig ist den Fusionsanteil abzuspalten. Möglicherweise stört der MBP-Fusionsanteil die korrekte Konformation des Proteins oder blockiert in irgendeiner Weise das aktive Zentrum des Proteins, so dass kein Substrat gebunden werden kann. Daher wurde versucht, nach einer Aufreinigung über den MBP-Fusionsanteil diesen abzuspalten und das Protein zu charakterisieren.

4.1.4. Aufreinigung

Erste Versuche zur säulenchromatographischen Anreicherung der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase wurden nach Coexpression von pEX::201 mit pG-KJE8 (Chaperonplasmid 1) in *E. coli* BL21 RS unternommen. Nach der chromatographischen Auftrennung über den Kationenaustauscher Source 15 S konnte Protein angereichert werden (s. Abb. 25). Allerdings korrelierte die gemessene Aktivität nicht mit den Fraktionen, in denen der größte Proteinanteil gemessen wurde. Die Aktivitätstests wurden bei 60 °C in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,1 durchgeführt. Asnis *et al* (Asnis and Brodie, 1953) konnten zeigen, dass die *E. coli* Glycerol-Dehydrogenase auch in diesem Bereich Aktivität zeigt. Daher ist nicht ganz sicher, ob hierbei nicht die endogene *E. coli* Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität gemessen wurde und das überproduzierte Protein sich eventuell in den Fraktionen befindet, in denen größere Proteinkonzentrationen bestimmt wurden. Auch anhand eines SDS-Gels konnte das Vorhandensein der *E. coli* Dehydrogenase nicht ausgeschlossen werden, da diese mit 37 kDa das gleiche Molekulargewicht besitzt wie das *P. torridus* Enzym. Zudem konnte die Aktivität nur wenige Stunden nach der Aufreinigung gemessen werden, was ein Ausschluss der *E. coli*-Dehydrogenase-Aktivität über die Auswahl geeigneter Bedingungen verhinderte. Es wurden keine Bedingungen gefunden, die ein säulenchromatographisches Anreichern ermöglichen. Daher wurde eine Aufreinigung der Glycerol-Dehydrogenase über das Fusionsprotein MBP-201, durch die Bindung an eine Amylose-Gravitationssäule versucht. In Abb. 26 ist zu erkennen, dass diese Säule relativ spezifisch ist, und nur noch wenig „Rest-Banden“ auf dem SDS-Gel zu erkennen sind. Da im Rohextrakt nach Expression des Fusionsproteins keine Aktivität messbar war, wurde das Maltose-Binde-Protein über die Faktor Xa-Protease, die spezifisch zwischen dem Fusionsanteil und dem stromabwärts klonierten Zielprotein spaltet, entfernt. Eine MS/MS Sequenzierung bestätigte das Vorhandensein der löslichen *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase. Anhand von spektrophotometrischen Aktivitätsbestimmungen konnte für die Glycerol-Dehydrogenase eine spezifische Aktivität von 1,92 U/mg ermittelt werden. Als Negativkontrolle wurde das ungespaltene Fusionsprodukt eingesetzt, da dieses keine Aktivität zeigte (s. 3.2.1.3). Die Bestimmung der Aktivität bestätigte somit

die Hypothese, dass der Fusionsanteil möglicherweise durch die Blockierung des aktiven Zentrums, die Aktivität des Proteins einschränkt. Doch auch hier konnte die Aktivität nur bis ca. 6 Stunden nach der teilweisen Aufreinigung gemessen werden. Es konnten keine Bedingungen gefunden werden, bei denen das Protein über einen längeren Zeitraum stabil war. Weder verschiedene Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten noch die Temperatur hatten einen positiven Einfluss auf die Stabilität. Möglicherweise fehlen dem Enzym spezifische Stabilisatoren, die im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden konnten. Eine weitere Erklärung könnte in einer möglichen Sauerstoffempfindlichkeit des Enzyms liegen. Unter oxidativen Bedingungen kann das Enzym möglicherweise irreversibel geschädigt werden. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass ein homologes Glycerol-Dehydrogenase Enzym in *Klebsiella aerogenes* nur unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird (Ruch and Lin, 1975) und somit physiologisch auch an eine geringe oxidative Umgebung angepasst ist. Daher wäre es wünschenswert für Folgeexperimente Aktivitätstests unter anaeroben Bedingungen durchzuführen. Die Ergebnisse der heterologen Expression machen deutlich, dass sehr viele Faktoren für die Expression von nativem Protein nötig sind. Erschwerend hinzu kommen die gravierenden physiologischen Unterschiede im intrazellulären Milieu von *E. coli*, mit einem annähernd neutralem pH Wert, verglichen mit dem eher sauren intrazellulären Milieu von *P. torridus* mit pH 4.6. Dafür bedarf es wahrscheinlich einer viel komplexeren Anpassung bei der Expression als sie im Rahmen dieser Arbeit geschaffen werden konnten. Daher blieb eine Aufreinigung und Charakterisierung der rekombinant hergestellten *P. torridus* Dehydrogenase aus.

4.2. SCREENING NACH DEHYDROGENASEGENEN ÜBER EINE FOSMIDGENBANK

Von den bisher in unserem Labor klonierten *P. torridus* Genen waren weniger als 10 % in *E. coli* aktiv. Die geringe Ausbeute ist wahrscheinlich auf die im vorherigen Kapitel erläuterten und diskutierten Probleme bei der heterologen Expression zurückzuführen. Um schnell und effektiv Enzyme aus *P. torridus* zu finden, die in *E. coli* potentiell aktiv sind, wurde eine *P. torridus* Fosmidgenbank konstruiert. Somit hat man die Möglichkeit, auf dem kompletten Genom schnell

nach aktiven Enzymen zu suchen. Über dieses „High-throughput-screening“ umgeht man Gene zu klonieren, die später aufgrund der schwierigen heterologen Expression von *P. torridus* Enzymen in *E. coli* nicht aktiv sind. Ziel war es in dieser Arbeit, potentielle in *E. coli* aktive Polyol-Dehydrogenasen aus *P. torridus* zu finden. Dafür wurde ein Test etabliert, der es ermöglichte potentielle Polyol-Dehydrogenasen auf Mikrotiterplatten zu finden (s. 2.4.11.3). In diesem Test kann die Umsetzung von verschiedenen C2-C4 Polyolen zu Carbonylverbindungen durch die Ausbildung einer Schiff'schen Base in Form einer intensiven Rotfärbung nachgewiesen werden. Unterschiede in den Färbungen der Klone sind deutlich erkennbar (s. Abb. 29). Durch Bestimmung der Zelldichte konnte ausgeschlossen werden, dass die unterschiedliche Färbung durch die unterschiedliche Zellzahl zu Stande kam. Anhand der Negativkontrolle konnte man ungefähr das Hintergrundsignal abziehen, allerdings erfolgte die Auswahl der stärkeren roten Färbung rein visuell, da kein geeignetes Messgerät zur Verfügung stand. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Dehydrogenasen mehrere Polyol-Verbindungen umsetzen können (Knietsch et al., 2003), daher wurde der Test mit den Substraten Glycerol, 1,2-Propandiol und 2,3-Butandiol durchgeführt. Um auszuschließen, dass durch die Inkubation bei 60 °C die einzelnen Klone unterschiedlich stark lysieren und es somit durch die unterschiedliche Menge an Carbonylverbindungen zu den unterschiedlich starken Rotfärbungen kommt, wurde das Experiment dreimal wiederholt und darüber die potentiell aktiven Klone ausgewählt.

Da das Genom von *P. torridus* bereits sequenziert ist, wurden die Fosmide potentiell aktiver Klone direkt ansequenziert und dieser Bereich anhand von Sequenzalignments den ORF-Annotationen zugeordnet (s. 6.6). Für neun der zwölf potentiell positiven Klone konnten die Sequenzbereiche zugeordnet werden und dementsprechend eine Liste für die ORFs in diesem Bereich erstellt werden. Betrachtet man die ORFs (s. 6.6) genauer, findet man bei sechs von den neun Klonen in jedem Bereich mehrere Dehydrogenasegene. Auch wenn diese nicht immer spezifisch die verwendeten Substrate nutzen, könnte hier die potentielle Aktivität durch diese klonierten Dehydrogenasen hervorgerufen worden sein. Interessant sind aber vor allem die drei Klone, bei denen über den Sequenzbereich kein ORF als Dehydrogenase annotiert ist.

Ferrer *et. al* (Ferrer et al., 2005) konnten über das Screening einer Metagenom Bank aus einem Rinderpansen Hydrolase-Enzyme identifizieren, von denen 36 % völlig neu waren. Im Hinblick auf diese Ergebnisse wäre es möglich, dass aktive Klone, die in dem klonierten Bereich keine Dehydrogenasen annotiert haben, in diesem Sequenzabschnitt für Gene codieren, von denen die Funktion nicht bekannt ist, und somit neue funktionelle Enzyme gefunden werden können. Des Weiteren könnten falsch annotierte Proteine aufgedeckt werden, oder hypothetischen Enzymen könnte eine Funktion zugeordnet werden. Solche potentiellen Gene könnten zum einen über Transposon-Mutagenese identifiziert werden, zum anderen aber auch über die Herstellung von „shot-gun“-Klonen. Um diese Schritte durchzuführen, müsste die potentielle Aktivität der zwölf Klone zunächst über andere Tests sicher bestätigt werden. Dieses war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Ein erster Versuch, die Aktivität zu verifizieren, erfolgte über eine native Gelelektrophorese. Dabei waren von den zwölf im Carbonylindikator Test positiven Klonen drei ebenfalls positiv. Bei zwei Klonen (I C7 und I B7) fehlt bis jetzt die Fosmidsequenz. Erste Sequenzierungen lassen aber die Vermutung zu, dass es sich bei den Klonen um möglicherweise durch *E. coli* verursachte Kontamination handelt. Der Klon III E1 zeigte auf dem nativen Polyacrylamidgel ein nur sehr schwaches Signal mit dem Substrat 1,2-Propandiol. Da dieser Klon in dem klonierten Sequenzbereich keine Dehydrogenase annotiert hat, wäre dieses ein potentieller Kandidat, bei dem eventuell ein Gen aufgedeckt wurde, welches für Polyol-Dehydrogenase-Aktivität codiert, aber nicht als ein solches annotiert ist. Des Weiteren bietet diese *P. torridus* Fosmidgenbank Potential, um auch schnell und effektiv nach anderen Enzymen bzw. Enzymgruppen zu suchen, die möglicherweise biotechnologische Anwendung finden könnten.

4.3. PROTEOMANALYSEN VON *P. TORRIDUS*

Die steigende Zahl an Genomsequenzierungsprojekten bietet eine gute Basis für noch weitergehende Enthüllungen. Zusammen mit der Entwicklung von post-Genomik-Werkzeugen, wie Proteomics sind wir in der Lage, die verschiedenen Schichten an Informationen, die vom Transkriptom über das Proteom and Metabolom reichen, zusammensetzen, um in Zukunft ein

Gerüst zu formen, das die funktionelle Biologie darstellt. Proteomstudien erweitern und komplementieren die statischen Genomstudien durch die Darstellung der Protein-Produkte, die von den Organismen unter verschiedenen Umweltbedingungen exprimiert werden, und deren posttranslationale Modifikationen, die eine Anpassung an Proteinaktivität und zelluläre Lokalisation darstellen. Es gilt hierbei, dieses dynamische Zusammenspiel zwischen den tausenden biologischen Molekülen über die zeitliche Veränderung eines Organismus selbst oder durch die Anpassung an äußere Bedingungen aufzudecken. Durch den Einsatz solcher Studien können neue Stoffwechselwege oder auch Regulationsmechanismen aufgedeckt und verstanden werden.

4.3.1. Mastergel

Als Basis für die Proteomanalysen wurde eine 2D-Proteom-Karte von der löslichen Fraktion aus *P. torridus* Zellen, die unter optimalen Wachstumsbedingungen angezogen wurden, erstellt. Es zeigte sich, dass der niedrige pH im Zellinneren von *P. torridus* die isoelektrische Fokussierung störte, aber mit den unter 2.4.4.1 beschriebenen Bedingungen konnte die 2D-PAGE für diesen Organismus reproduzierbar (s. Abb. 32) etabliert werden. Für *P. torridus* konnten über die Auftrennung über zwei verschiedene pH-Bereiche (pH 3-10, pH 4-7) insgesamt 477 Spots aufgetrennt werden. Von den 420 daraus identifizierten Spots sind 251 durch verschiedene Genprodukte codiert, was 16 % der angenommenen 1537 Proteine auf Grundlage der Genomsequenz entspricht. Im Vergleich dazu konnten Barry *et al.* (Barry *et al.*, 2006) von den angenommenen 2987 Proteinen von *Sulfolobus solfataricus* ca. 1300 über 2D-Gelelektrophorese auftrennen und davon 867 Proteine identifizieren. Diese repräsentierten 324 verschiedene Genprodukte, was 11 % der durch das Genom codierten Gene entspricht. Ein Ausschnitt aus der Swiss-2D-Datenbank (s. Abb. 70) macht die Schwierigkeit deutlich, alle Proteine eines Organismus mittels 2D-Gelelektrophorese aufzudecken. Zum einen sind nicht immer alle Proteine eines Organismus zur gleichen Zeit exprimiert und zum anderen gibt es wahrscheinlich viele Proteine, die so schwach exprimiert sind, dass sie auf einem 2D-PAGE-Gel nicht detektiert werden können. Doch Weiterentwicklungen in der Massenspektrometrie bieten die Möglichkeit, PAGE-

MS-Methoden durch „shot gun“ Proteomic-Methoden zu ersetzen (Joerg Reinders, 2004). So kann man z.B. über LC-MS/MS direkt hydrophobe Membranproteine, die sich, wie in Abb. 33 gezeigt, nicht über 2D-PAGE auftrennen lassen, analysieren und identifizieren (Garrels et al., 1997; Gygi et al., 2000; Joerg Reinders, 2004).

Map	Creation	Last modification	Detected spots	Identified spots
CSF	AUG-93	JUN-97	1664	309
DICTYSLUG	SEP-97	SEP-97	3164	25
ELC	AUG-93	JUN-97	2144	35
ECOLI	AUG-95	SEP-97	2364	200
HEPG2	AUG-93	SEP-97	2862	98
HEPG2SP	AUG-93	JAN-96	1734	155
HL60	SEP-97	SEP-97	3164	26
KIDNEY	SEP-97	SEP-97	2896	42
LIVER	AUG-93	SEP-97	2413	138
LYMPHOMA	AUG-93	JUN-97	1890	60
PLASMA	AUG-93	SEP-97	1966	626
PLATELET	AUG-93	JUN-97	2193	41
RBC	AUG-93	SEP-97	1800	190
U937	AUG-93	JUN-97	895	42
YEAST	FEB-95	JUN-97	1940	101

Abb. 70 Ausschnitt der SWISS-2D-Datenbank mit einer Übersicht der Anzahl der Spots, die über 2D-PAGE für verschiedene Organismen aufgetrennt werden konnten und wie viele davon bis zu dem dort genannten Zeitpunkt identifiziert werden konnten. CSF, Cerebrospinal fluid; DICTYSLUG, *Dictyostelium discoideum*; ELC, Erythroleukemia cell line; ECOLI, *Escherichia coli*; HEPG2, hepatoblastoma carcinoma derived cells; HEPG2SP, hepatoblastoma carcinoma derived cell line secreted proteins; HL60, promyelocytic leukaemia derived cells; RBC, red blood cells; U937, macrophage like cell line; YEAST, *Saccharomyces cerevisiae*.

Ein Vergleich des prozentualen Anteils der Proteine, die auf dem Gel repräsentiert sind, mit denen, die laut Genomcodierung erwartet werden, anhand der Einteilung in die funktionelle Kategorie unterstreicht die Notwendigkeit von Proteomanalysen, da sich diese von Computer-basierenden Vorhersagen unterscheiden (Knight et al., 2004). Der Verlauf im Diagramm (s. Abb. 71 A) zeigt, dass alle Proteine einer funktionellen Kategorie ähnlich stark auf dem Gel repräsentiert sind, wie es laut Genomvorhersage angenommen wurde, bis auf die hypothetischen Proteine, die Proteine des Energiestoffwechsels und die der Proteinsynthese. Letztere und die Proteine des Energiestoffwechsels sind auf dem Gel (mindestens) doppelt so stark repräsentiert, als laut Genomcodierung angenommen. Diese Tatsache lässt

den Schluss zu, dass diese Stoffwechselwege in der exponentiellen Phase besonders stark angeschaltet sind. Von den hypothetischen Proteinen sind allerdings nicht einmal 50 % auf dem Gel zu identifizieren, wie es anhand der Genomcodierung angenommen wurde. Man kann daher vermuten, dass die hypothetischen Proteine eine nicht ganz so starke Rolle in dem Organismus spielen. Möglicherweise sind diese Proteine auch teilweise falsch annotiert oder haben Funktionen, die in andere Kategorien fallen. Ein Vergleich mit *S. solfataricus* zeigte aber, dass dies nicht nur ein für *P. torridus* spezifisches Phänomen ist (vergleiche Abb. 71 A und B). Auch bei *S. solfataricus* sind auf dem Gel die hypothetischen Proteine deutlich geringer repräsentiert als laut Genomsequenz angenommen. Und auch bei den Proteinen der Proteinsynthese und denen des Energiestoffwechsels ist der prozentuale Anteil der Proteine auf dem Gel größer als angenommen, wobei er dort nur geringfügig ansteigt. Ein weiteres Phänomen, das durch das Erstellen des Mastergels aufgedeckt wurde, ist, dass einige Proteine auf dem 2D-Gel auftauchen, die eigentlich aufgrund ihres postulierten isoelektrischen Punktes (P_i) in dem gewählten pH-Bereich nicht aufgetrennt werden dürften. Dieses konnte auch schon bei der Erstellung eines Mastergels für andere Organismen beobachtet werden. Eine definitive Erklärung dafür gibt es noch nicht. Es wird zum einen angenommen, dass die Proteine durch posttranslationale Modifikationen ihren P_i geringfügig verändern, sodass sie durch den immobilisierten pH-Gradienten (IPG) aufgetrennt werden. Eine weitere Hypothese besagt, dass der P_i für die Proteine rein rechnerisch erstellt wurde und diese theoretischen Werte nicht grundlegend für das physiologische Protein übernommen werden können (Chong and Wright, 2005; Isabelle Maillet, 2007).

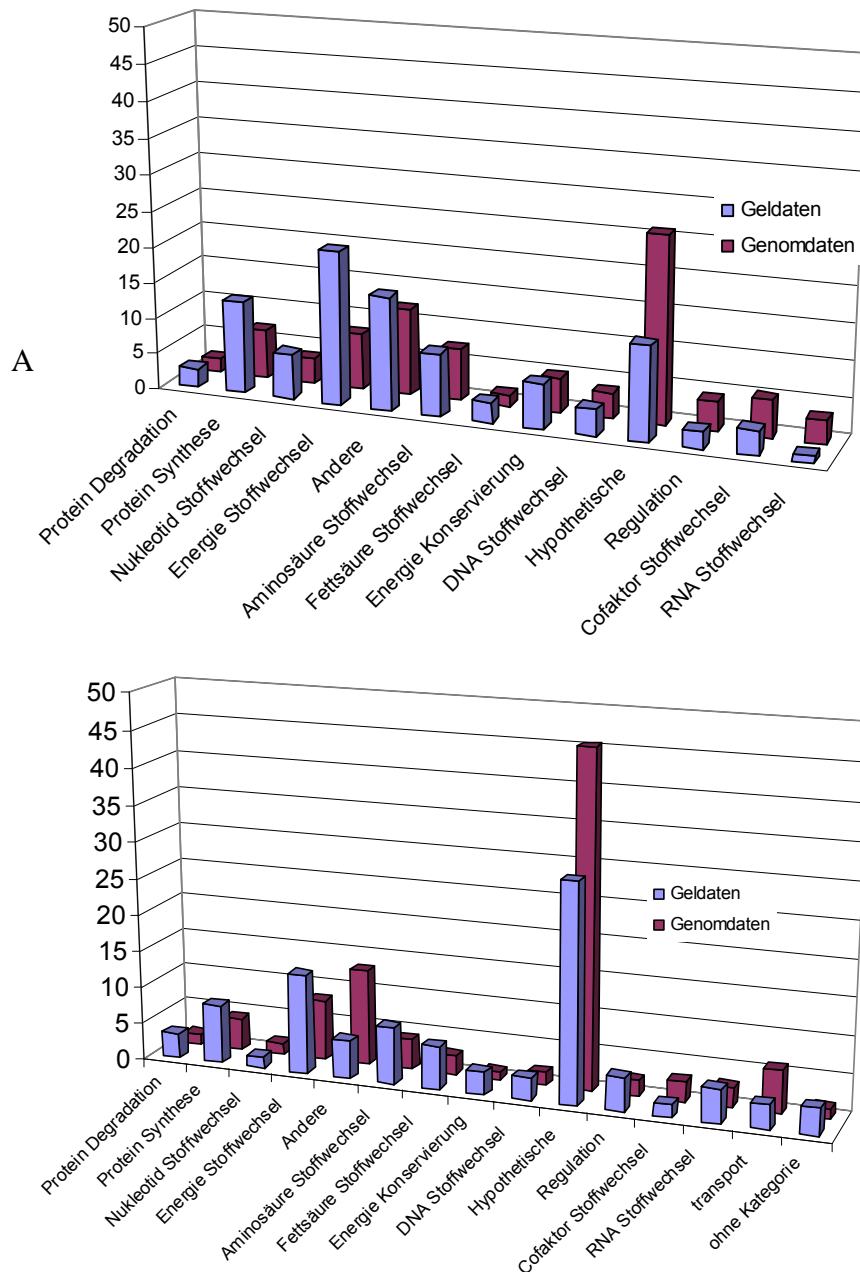


Abb. 71 A/B Vergleich der Proteine, die auf einem 2D-Gel repräsentiert sind mit denen, die laut Genomsequenzierung erwartet werden, in der Einteilung in ihre funktionelle Kategorie A) *P. torridus* B) *S. solfataricus*

Aufgrund des relativ kleinen Genoms von *P. torridus* war es möglich, über die genannten Bedingungen einen relativ großen Anteil (16 %) der Proteine aufzudecken. Um die Ausbeute zu erhöhen, müsste das Proteom über weitere, engere pH-Bereiche in der ersten Dimension und über verschieden prozentige Polyacrylamidgele in der zweiten Dimension aufgetrennt werden. Zudem helfen verschiedene Solubilisierungstechniken und diverse Präfraktionierungsmethoden mehr zellulären Proteine aufzudecken (Bunai and Yamane, 2005; Kheir Zuobi-Hasona, 2005; Lu and Zhu, 2005). Die Anwendung

der 2D-Technik ist ein sehr wichtiges Hilfsmittel, um die zellulären Mechanismen aufzuklären, die Extremophile wie *P. torridus* verwenden, um in ihren extremen Umgebungen zu überleben. Durch das initiale Erstellen der Proteom-Karte von *P. torridus* war es möglich, erste Experimente mit vergleichenden 2D-Studien durchzuführen, um die unterschiedliche Expression durch die Anpassung an verschiedene Stressbedingungen zu studieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen geben möglicherweise einen ersten Anstoß, um die biochemischen Stoffwechselwege oder auch Regulationsmechanismen dieses extremen Organismus zu verstehen.

4.3.2. Untersuchung der Stressadaptation

Die geringe Menge an Information zur Adaptation an Stressbedingungen von Extremophilen hat uns dazu bewogen, dieses an dem acidothermophilen Organismus *P. torridus* zu untersuchen. Dieser Organismus lebt optimal bei 60 °C und pH 1. Durch die Stressinduktion mit einem pH von 0,5 und einer Temperatur von 70 °C haben wir versucht, anhand des differentiellen Expressionsmusters auf 2D-Gelen Proteine zu identifizieren, die zur Adaptation an diesen Stress angeschaltet werden, um daraufhin eventuell Rückschlüsse zu erlangen, wie dieser Organismus an die sauren und heißen Bedingungen angepasst ist. Des Weiteren wollten wir untersuchen, was sich auf Proteomebene verändert, wenn *P. torridus* Zellen an der unteren Wachstumsgrenze von 50 °C und der oberen Grenze von pH 1,8 °C gestresst werden.

4.3.2.1. Globale Veränderung der Proteine auf einem 2D-Gel in Reaktion auf Temperatur- und pH-Stress und die funktionellen Kategorien, in die sie fallen

Durch die Analyse von vergleichenden 2D-Gele bei verschiedenen Stressbedingungen konnten mehrere Proteine identifiziert werden, die bei Temperatur- und pH-Stress mindestens zweifach überexprimiert sind. Die Stressbedingungen wurden so gewählt, dass *P. torridus* an seinen Wachstumsgrenzen lebt, es aber noch nicht letal für den Organismus ist (s. Abb. 41). Da *P. torridus* unter optimalen Wachstumsbedingungen eine Verdopplungszeit von ca. 8 Stunden hat, kann man wachstumsinduzierte

Überexpression ausschließen. Anders als bei Experimenten, in denen Organismen mit unterschiedlichen Substraten angezogen werden (Voigt et al., 2007), verändert sich das Expressionsmuster der 2D-Gele bei den durchgeführten Stressexperimenten nicht so stark, sondern zeigt nur Unterschiede in der Stärke der Expression der Proteine, die auf dem Gel bereits repräsentiert waren. Bei einer Auftrennung von ca. 340 Proteinen über einen pH Wert von 4-7 zeigten die Gele bei den verschiedenen Stressexperimenten eine Veränderung von ca. 3 % (beim Temperaturstress 50 °C) bis 9 % (beim Temperaturstress 70°C und pH-Stress-Experimente). Andere Arbeiten mit *Vibrio* sp. strain ANT-300 und *Methanococcoides burtonii* zeigten in Zusammenhang mit Temperaturstress-Untersuchungen eine Abweichung von 10-15 % (Araki, 1991; Goodchild et al., 2004; Hebraud and Potier, 1999; Herendeen et al., 1979). Auffällig war, dass die zeitliche Reaktion bei den zwei Stresssituationen verschieden war. Bei der Induktion von Säure- und alkalischem Stress erfolgte sofort nach 10 min eine Reaktion in Form von 13 bzw. 9 überexprimierten Spots, während zwei Stunden später nur noch 3 bzw. 7 Proteine identifiziert werden konnten. Bei der Induktion von Temperaturstress erfolgte erst nach 35 min eine sichtbare Reaktion in Form von 7 überexprimierten Spots bei 70 °C und sogar erst nach zwei Stunden bei 50 °C mit 8 identifizierten Spots. Dies lässt vermuten, dass eine pH-Veränderung einen weitaus größeren Einfluss auf die intrazelluläre Maschinerie hat als eine Temperaturveränderung. Die Tatsache, dass bei pH 0,5 die Molarität der Schwefelsäure um mehr als das dreifache des Optimal-pHs steigt und bei pH 1,8 die Molarität fast nur ein Zehntel von der des optimalen pH-Wertes beträgt, macht deutlich, dass dieses eine sehr starke physiologische Veränderung für den Organismus bedeutet, und er auch schnell darauf reagieren muss, um sein Überleben zu sichern. Die Reduktion der überexprimierten Proteine nach zwei Stunden Inkubation bei den pH-Stress-Experimenten ist möglicherweise auf eine Adaptation des Organismus an diese Bedingungen zurückzuführen. Eine Adaptation an bestimmte Stresssituationen nach Inkubation über einen längeren Zeitraum konnte schon für verschiedene Organismen gezeigt werden (*Bacillus subtilis*, persönliche Mitteilung B. Voigt, Greifswald (Han et al., 1997; Tachdjian and Kelly, 2006)). Zunächst wurden die überexprimierten Spots in ihrer Verteilung in den funktionellen Kategorien des zellulären Stoffwechsels

untersucht (Tab. 26). Gemeinsam haben alle Stress-Experimente, dass keine Proteine des Nukleotidstoffwechsels und des RNA-Stoffwechsels identifiziert worden sind. Ebenso wurden, mit Ausnahme beim Stressexperiment 50 °C, keine Proteine des Aminosäurestoffwechsels und keine Proteine, außer beim Stress mit pH 1,8, des Transportes identifiziert. Bedenkt man aber, dass über die 2D-Gele nur der lösliche Proteinanteil aufgetrennt wurde und gerade die Proteine des Transports entweder membranständig oder membranassoziiert sind, wird klar, dass für den Transport der relative Anteil mit 3 % von dem, was laut Genom angenommen wird (s. Tab. 1) sehr gering ist. Auch bei den anderen Proteinen wird nur ein Teil der Proteine der einzelnen Kategorien auf einem 2D-Gel repräsentiert. Daher wäre es möglich, dass durchaus auch noch andere Proteine involviert sind, die durch diese Methode nicht aufgedeckt werden können. Dies macht auch die Arbeit von Suzuki *et al* (Suzuki et al., 2006), die die Hitzeschockantwort von *Synechocystis* beschreibt, deutlich. In diesem Fall war diese Stressantwort mittels Proteomics und Transkriptomics untersucht und gezeigt worden, dass sich die Ergebnisse der hochregulierten Gene auf den beiden Ebenen doch sehr unterscheiden. Daher wäre ein Vergleich auf Transkriptomebene, welcher im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, für diese Experimente wünschenswert.

Tab. 26 Klassifizierung der Proteine, die durch Temperatur- (50 °C/ 70 °C) und pH- Stress (pH 0,5/ pH 1,8) mindestens zweifach überexprimiert auf 2D-Gelen zu verschiedenen Zeiten identifiziert wurden

Funktionelle Kategorie	Anzahl der Proteine											
	Temperatur Stress						pH Stress					
	50 °C			70 °C			pH 0,5			pH 1,8		
	t5	t35	t125	t5	t35	t125	t10	t40	130	t10	t40	t130
Protein Degradation	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0
Protein Synthese	0	0	2	0	2	4	3	1	1	1	0	1
Nukleotid Stoffwechsel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Energie Stoffwechsel	0	0	1	0	2	0	0	1	0	2	4	0
Andere	0	0	0	0	1	3	2	3	1	0	4	2
Aminosäure Stoffwechsel	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fettsäure Stoffwechsel	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Energie Konservierung	0	0	1	0	0	1	1	1	0	2	2	1
DNA Stoffwechsel	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	1
Hypothetische	0	0	2	0	0	2	6	3	0	3	3	2
Regulation	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Cofaktor Stoffwechsel	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
RNA Stoffwechsel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Transport	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Total	0	0	8	0	7	13	13	13	3	9	17	7

4.3.2.2. Untersuchung der Funktion der identifizierten Proteine in der Stress-Antwort

Mikroorganismen, einschließlich derjenigen, die in extremen Umgebungen leben, (Boonyaratanakornkit et al., 2005; Cavicchioli et al., 2000; Kagawa et al., 1995), können ebenso wie der Mensch, Tiere oder Pflanzen auf Stress reagieren (Aertsen and Michiels, 2004; Pedone et al., 2004). Bestimmte *Crenarchaea*, sowie *P. torridus*, beanspruchen Nischen, die in zweierlei Hinsicht extrem sind: niedriger pH und hohe Temperatur. Um dem pH bei hohen Temperaturen zu widerstehen und eine zelluläre Zerstörung zu verhindern, sind komplexe genetische und metabolische Strategien nötig. Um solche Mechanismen aufzudecken, wurden die einzelnen Proteine, die über die vergleichende 2D-Gelelektrophorese identifiziert wurden, untersucht, um anhand ihrer Annotation Aufschluss über die mögliche Funktion innerhalb der Stressantwort zu erhalten.

4.3.2.2.1. Identifizierte Proteine bei pH-Stress

Das Wissen zur Anpassung an sehr niedrige pH-Bedingungen oder auch an eine für den Organismus höhere pH-Wert-Umgebung ist bis jetzt sehr begrenzt. Bisherige Arbeiten zur Anpassung an sehr saure Umgebungen wurden nur anhand von *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1, *Lactococcus lactis* und *E. coli* untersucht (De Angelis et al., 2001; Foster, 2004; Frees et al., 2003). *E. coli* ist bisher der einzige Organismus für den der Säureresistenzmechanismus über das Ausschleusen von Protonen durch die Decarboxylierung von Glutamat/Arginin zu GABA/Agmatin beschrieben wurde (s. Abb. 6, (Foster, 2004)). Interessanterweise wurden die Gene für diesen Mechanismus nur bei acidophilen Organismen, so auch bei *P. torridus*, gefunden, was eine mögliche Anpassung der Acidophilen über diesen Weg vermuten lässt. Über die Analyse von vergleichender 2D-Gelelektrophorese bei der Induktion von pH-Stress konnte bei *P. torridus* kein Hinweis auf eine Anpassung über diesen Mechanismus gefunden werden. Bei der Inkubation von *P. torridus* Zellen bei pH 0,5 wurden 29 verschiedene Proteine identifiziert (s. Tab. 22), die zu unterschiedlichen Zeiten mindestens zweifach exprimiert wurden. Viele davon, darunter auch welche, die auffallend stark überexprimiert wurden, gehören zu den hypothetischen Proteinen, aufgrund dessen ihnen keine Funktion

zugeordnet werden kann. Es gibt Proteine, die sind über den Zeitraum von zwei Stunden stark exprimiert, aber auch welche, die nur nach 10 min oder auch nur nach 40 min auftauchen. Auffällig bei den identifizierten Proteinen ist das Homolog des TFAR19 Protein. Dieses Protein ist beschrieben, bei Eukaryoten in den Apoptose-Weg mit verwickelt zu sein (Gu et al., 2005). Möglicherweise kommt ihm bei *P. torridus* eine ähnliche Funktion zu und ist daher anfangs als Schockreaktion auf diese neue Bedingung noch sehr stark (ratio 7,15) exprimiert, und wird dann weniger stark (ratio 2,2 nach 40 min, ratio 2,3 nach 130 min) exprimiert als mögliche Folge der Adaptation. Die Überexpression eines homologen Proteins der TENA/THI-4-Familie war nach 40 min sichtbar und auch nach 130 min konnte dieses Protein noch identifiziert werden. Proteine der TENA/THI-4-Familie wurden in allen Domänen des Lebens gefunden, *Archaea*, *Bakteria* und *Eukarya*. Diese Proteine sind potentielle transkriptionelle Aktivatoren. In *Bacillus subtilis* ist TENA eines der vielen Proteine, welches die Expression von extrazellulären Enzymen, wie z.B. verschiedenen Proteasen, verstärkt (Toyama et al., 2002). Das THI-4 Protein gehört ebenfalls in diese Familie und ist an der Thiamin-Biosynthese beteiligt. Das bakterielle Coenzym PQQ-Synthese-Protein PQQC gehört ebenfalls in diese Familie. PQQ ist eine prosthetische Gruppe von verschiedenen bakteriellen Enzymen, während PQQC notwendig ist um PQQ zu synthetisieren (Akiyama and Nakashima, 1996; Pang et al., 1991). Allerdings ist die genaue Funktion der Proteine dieser Gruppe noch unklar. Ein weiteres identifiziertes homologes Protein bzw. Protein System, welches schon in Zusammenhang mit verschiedenen Stress Antworten beschrieben wurde, ist das Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase System (s. Abb. 72) (Ritz et al., 2000a; Zeller and Klug, 2006). Thioredoxin ist in viele verschiedene Reaktionen der Ribonukleotidreduktion verwickelt, dient auch als Aktivator einer Reihe von Zielproteinen durch die reversiblen Austauschreaktionen von Thiol-Disulfiden und ist zudem auch noch eine strukturelle Komponente in Protein-Komplexen (Arner and Holmgren, 2000). Über eine Vielzahl von Wegen ist es an der Stressantwort in verschiedenen Organismen beteiligt (Ritz et al., 2000b).

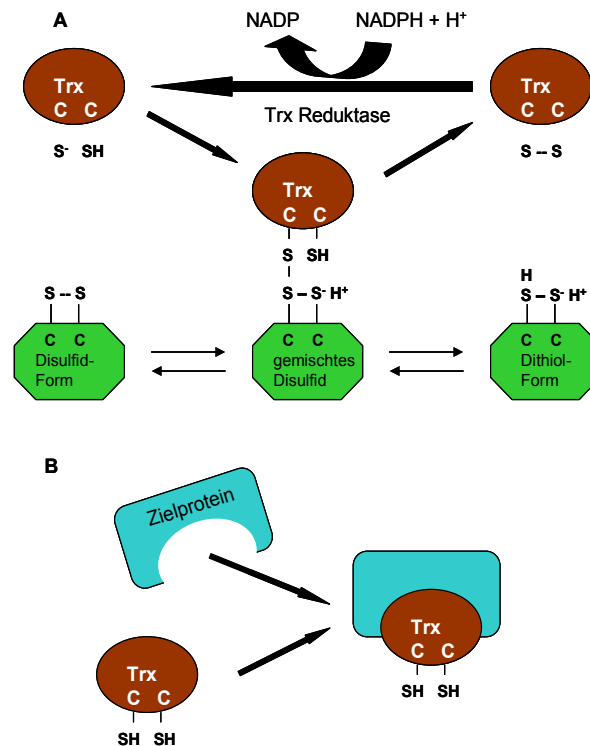


Abb. 72 Schema der Proteinaktivität von Thioredoxin. A) Thioredoxin als Reduktase b) Thioredoxin als strukturelles Element modifiziert nach (Kumar et al., 2004)

Ein weiteres, sehr stark überexprimiertes Protein ist das Homolog der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase (ratio 6). Dieses Enzym interagiert als Schutzsystem zum „Abfangen“ von freien Radikalen in der Zelle als Folge von Stress (Jacobson et al., 1989; Mongkolsuk et al., 2000; Seaver and Imlay, 2001). Es wurde gezeigt, dass dieses Enzym mit der Superoxid-Dismutase und der Thiol-Peroxidase mit Thioredoxin assoziiert ist, woraus deren gemeinsame Expression resultieren könnte (Baker and Poole, 2003; Jean et al., 2004; Kashima and Ishikawa, 2003). Die differentielle Expression des Homologs der Beta-Ketoacyl-Synthase, die zum Fettsäuremetabolismus gehört, weist darauf hin, dass möglicherweise eine Reorganisation der Fettsäurezusammensetzung in der Zellmembran durch den pH-Stress induziert wird. So eine Reorganisation von Fettsäuren in der Zellmembran wurde bereits für Kälte-Schock Experimente beschrieben (Panoff et al., 1998). Tang *et al* (Tang et al., 2002) haben durch Analysen des oxidativen Stresses in *E. coli* neben der Thioredoxin-Reduktase, der Superoxid-Dismutase und Chaperonen auch das in dieser Arbeit identifizierte homologe Protein der Succinyl-CoA-synthetase gefunden. Sie vermuten, dass dieses Enzym durch den bei Stress sehr stark reduzierten Zitratzyklus angeschaltet wird. In einer anderen Arbeit wurden verschiedene

Thioredoxin-assoziierte Proteine aufgedeckt, zu denen unter anderem die Succinyl-CoA-synthetase und auch das ribosomale Protein L7AE (Rozhdestvensky et al., 2003) gehören, welche auch in diesem Experiment identifiziert wurden (Kumar et al., 2004). Zudem wurden noch ein homologes „Heat shock“ Protein, das wahrscheinlich zur Unterstützung der Rückfaltung aggregierter Proteine unter diesen Bedingungen benötigt wird, und ein homologes Protein des universellen Stressproteins der UspA Familie identifiziert. Dieses Protein wurde auch schon für die Stressantwort bei verschiedenen Organismen beschrieben und ist wahrscheinlich mit dem Chaperon GroEL assoziiert (Bochkareva et al., 2002). Die Überexpression des Proteasom-Homologs macht deutlich, dass ein Teil der intrazellulären Proteine unter diesen Bedingungen wahrscheinlich irreversibel denaturiert worden sind.

Bei der Untersuchung der Stress-Antwort auf eine Inkubation von *P. torridus* Zellen bei pH 1,8 wurden 43 verstärkt exprimierte Proteine identifiziert. Bis auf das TFAR19 Protein, der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase und des universellen Stressproteins wurden alle anderen Proteine auch hier identifiziert. Auch hier ist ein Großteil den hypothetischen Proteinen zuzuordnen. Sehr dominant und auffällig wurden bei diesem Experiment zusätzlich die A_1A_0 H^+ ATPase und ein ABC Transporter ATP-Binde-Protein exprimiert. Die Klasse der archaellen A_1/A_0 ATPasen/Synthasen unterscheiden sich von $V_1V_0^-$, F_1F_0 ATPasen/Synthase, wie sie für Bakterien und Eukaryoten beschrieben sind, vor allem in der Zusammensetzung der Untereinheiten und der Struktur (Gruber et al., 2001; Muller, 2004; Muller and Gruber, 2003). Gemeinsam ist ihnen, dass die Bildung von ATP über eine von einem Ionen-Gradienten getriebene Phosphorylierung vollzogen wird. Bei vielen bakteriellen Spezies wie *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Lactococcus lactis* wird die Expression der F_0F_1 ATPase durch sehr niedrige pH-Werte induziert. Daraus kann man schließen, dass ein steigender pH-Gradient über die Zellmembran, wenn Protonen außerhalb angesammelt werden, zu einer gesteigerten Anschaltung der F_0F_1 ATPase-Aktivität führt (Coskun et al., 2004). Erstaunlicherweise wurde erst kürzlich gezeigt, dass die F_0F_1 ATPase bei *E. coli* durch alkalischen extrazellulären pH angeschaltet wird (Maurer et al., 2005). In welcher Form der Prozess bei einem pH-Anstieg in *P. torridus* abläuft ist nicht eindeutig zu erklären, da man eher vermuten würde, dass aufgrund des

großen pH-Gradienten an der *P. torridus* Zellmembran die A_1A_0 ATPase-Aktivität eher bei einer pH-Erniedrigung verstärkt würde. Für ABC-Transporter und deren assoziierte Proteine wurde bereits auch ein Zusammenhang ihrer Überexpression als Antwort auf Stress beschrieben. Energiebetriebene Transportproteine der ABC-Superfamilie schleusen eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate aktiv durch biologische Membranen und erfüllen dabei wichtige Funktionen im zellulären Metabolismus und in der Entgiftung. Haas *et al.* haben eine solche Überexpression als Stressantwort auf Vancomycin-Stress beschrieben (Haas *et al.*, 2005).

Die Proteine, die durch die pH-Stress-Experimente identifiziert wurden, sind alle schon einmal in Zusammenhang mit verschiedenen Stresssituationen beschrieben worden. Da einige aber ubiquitär bei vielen Stressantworten vorkommen, kann man davon ausgehen, dass es sich dabei um allgemeine Stressproteine handelt, und hier nicht eine spezifische Anpassung an den pH-Stress darstellt. Dieser Vorgang ist vermutlich sehr komplex und benötigt eine viel detaillierte Untersuchung und auch die unterstützende Analyse über Transkriptionsanalysen.

4.3.2.2.2. Identifizierte Proteine bei Hitzestress

Die am besten charakterisierte Stressantwort ist die Hitzeschock-Antwort. Diese wurde schon an einer Vielzahl von Eukaryoten und Bakterien (Bardwell and Craig, 1984; Hebert *et al.*, 1991; Hecker *et al.*, 1996; VanBogelen *et al.*, 1987a), aber auch an einigen Archaeen untersucht (Han *et al.*, 1997; Hebert *et al.*, 1991; Shockley *et al.*, 2003; Tachdjian and Kelly, 2006; Trent *et al.*, 1990). Charakteristisch für die Hitzeschockantwort ist im Allgemeinen die Induktion von Hitzeschockproteinen („heat shock proteins“, HSPs). In den meisten Arbeiten, in denen auf Proteomebene die Hitzeschockantwort untersucht wurde, wird über eine Induktion dieser HSPs berichtet. Durch den Temperaturanstieg von 60 °C auf 70 °C bei *P. torridus* konnten mittels vergleichender 2D-Gelelektrophorese keine HSPs, die mindestens zweifach überexprimiert sind, gefunden werden. Ein Vergleich mit dem Mastergel zeigt, dass die Chaperone DnaK, aus der HSP70 Familie, und das Thermosom, ein archaeelles TypII-Chaperonin (Waldmann *et al.*, 1995b), auf dem 2D-Gel aufgetrennt wurden. Da das Thermosom auf jedem 2D-Gel die prominentesten und intensivsten Spots

bildete, scheint es konstitutiv in der Zelle in großen Mengen vorhanden zu sein. Daher wird eine Anpassung an die Temperatur, die über den optimalen Werten des Organismus liegt, wahrscheinlich nicht zusätzlich über die Induktion des Thermosoms reguliert.

DnaK als Komponente des Hsp70-Systems ist in Bakterien und Eukaryoten ubiquitär, wurde aber bisher nicht bei allen Archaeen gefunden (Bult et al., 1996; Klenk et al., 1997). Über die Funktion von archaeellem Hsp70 ist wenig bekannt. Aufgrund der großen Ähnlichkeiten in Sequenz und Struktur zu den bakteriellen Homologen erfüllen sie vermutlich gleichartige Funktionen als molekulare Chaperone. Bei der Stressantwort auf eine Temperaturerhöhung um 10 °C wurden 20 Proteine identifiziert. Da eine erste Reaktion erst nach 35 min zu erkennen war, könnte man vermuten, dass das Aktivitätsspektrum des intrazellulären Proteins des thermophilen *P. torridus* viel größer ist und nur langsam Einfluss auf die zelluläre Maschinerie nimmt. Mit der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase, der L7AE SSU Ribosom Proteins, des TENA/THI-4 Proteins, der Succinyl-CoA-Synthetase, des Thioredoxins, des Proteasoms und einiger hypothetischer Proteine konnten auch hier erneut die gleichen Proteine identifiziert werden, wie sie als Reaktion auf pH-Stress gefunden wurden. Dieses unterstreicht auch ihr universelles Vorkommen bei den verschiedenen Stressexperimenten (Baker and Poole, 2003; Chhabra et al., 2006; De Angelis et al., 2001; Haas et al., 2005; Jacobson et al., 1989; Jean et al., 2004; Kashima and Ishikawa, 2003; Kumar et al., 2004; Mongkolsuk et al., 2000; Rozhdestvensky et al., 2003; Seaver and Imlay, 2001; Tang et al., 2002). Die verstärkte Expression der Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (Chhabra et al., 2006; Markus Laukel, 2004), die Bestandteil der Atmungskette ist, macht die Bedeutung der Energiekonservierung in einer solchen Stresssituation deutlich. Bei einer Temperaturveränderung um 10 °C nach unten auf 50 °C konnte bis auf Ferredoxin (pH 0,5) keines der Proteine identifiziert werden, wie sie zuvor bei den anderen Stresssituationen aufgedeckt wurden. Literaturrecherchen zeigten auch keinerlei Hinweise auf einen Zusammenhang mit einer Stressantwort. Es ist daher fraglich, ob es sich hierbei um eine spezifische Stressantwort auf die niedrige Temperatur handelt. Da eine Antwort auch erst nach 125 min erfolgte, wird diese Hypothese auch noch unterstrichen. Es wäre möglich, dass *P. torridus* aufgrund der geringen Temperatur einige

Stoffwechselwege verlangsamt, und als negative Regulation daraufhin verschiedene Proteine der Proteinsynthese oder des Energiestoffwechsels angeschaltet werden. Diese Stresssituation lässt zwar den Organismus verlangsamt wachsen, doch wird dadurch wahrscheinlich weder die Zellmembran, noch die intrazelluläre Maschinerie angegriffen, sodass eine Stressantwort „im klassischen Sinne“, bei der es darum geht, dass sich ein Organismus vor dem Zelltod schützen muss, wie bei pH-Stress oder Hitzeschock, nicht stattfindet. Es erfolgt vermutlich durch die Temperaturabsenkung lediglich eine Verlangsamung vieler Stoffwechselwege.

4.3.2.3. Gibt es universelle Stressproteine???

Bis auf das Stressexperiment mit 50 °C ist bei allen anderen Stresssituationen der gleiche Satz von auffälligen Proteinen zu finden. Proteine, die ubiquitär bei den Stressexperimenten identifiziert werden konnten sind Thioredoxin Reduktase, Succinyl-CoA-Synthetase, SSU Ribosom-Protein L7AE und ein Protein der TENA/THI-4-Familie. Alle diese Protein-Homologe wurden auch schon bei Stressuntersuchungen an anderen Organismen beschrieben (Baker and Poole, 2003; Chhabra et al., 2006; De Angelis et al., 2001; Haas et al., 2005; Jacobson et al., 1989; Jean et al., 2004; Kashima and Ishikawa, 2003; Kumar et al., 2004; Mongkolsuk et al., 2000; Rozhdestvensky et al., 2003; Seaver and Imlay, 2001; Tang et al., 2002). Das Ausbleiben von Proteinen, die im Zusammenhang mit Säureresistenzmechanismen oder auch der Hitzeschockantwort, wie sie für *E. coli* als Modell untersucht wurde, kann zum einen an der begrenzten Proteinzusammensetzung liegen, die auf einem Gel repräsentiert ist, zum anderen zeigt uns das aber auch, dass solche Anpassungsmechanismen von Extremophilen viel komplexer sind und dass noch viel Arbeit investiert werden muss.

Die ersten Studien der Hitzeschockantwort mittels 2D-Gelelektrophorese wurden anhand von *E. coli* untersucht (Neidhardt et al., 1981; VanBogelen et al., 1987b). Die gleichen Studien wurden dann an anderen Organismen (z.B. *B. subtilis*, *B. japonicum*, *Brucella melitensis*, *A. tumefaciens*, und *Vibrio sp.* Stamm S14) durchgeführt um zu untersuchen, welche Proteine bei den Organismen durch Hitzeschock induziert werden und welche unter mehr als einer Stress-Bedingung induziert werden (Bernhardt et al., 1997; Buttner et al.,

2001; Munchbach et al., 1999; Nystrom et al., 1992; Rosen et al., 2001; Teixeira-Gomes et al., 2000). Es stellte sich heraus, dass Proteine, die bei verschiedenen Stressbedingungen auffällig waren, zu einem unterschiedlichen Ausmaß überlappen können. Von Rosen *et al* (Ran Rosen, 2002) wurde ein Modell aufgestellt, das die unterschiedlichen Überlappungen bei verschiedenen Experimenten deutlich macht (s. Abb. 73). Es gibt Stimuli, die komplett überlappen, wie das Hitzeschock-Stimulon und das Ethanol-Stimulon in *E. coli* (s. Abb. 74 A). Das Modell, das in Abb. 74 B dargestellt ist, stellt den Fall von Cadmiumchlorid-induziertem Stress dar, welches alle Hitzeschock-induzierten Proteine aufweist und noch zusätzlich CdCl₂-spezifische Proteine (VanBogelen, Kelley, & Neidhardt, 1987a). In *B. subtilis* bilden die, durch σ^B regulierte Gruppe der allgemeinen Stressproteine den Kern der Antwort auf viele verschiedene Stressbedingungen. Hinzu kommen stressspezifische Proteine, die durch Hitzeschock, Salz-Stress, Säure-Stress und andere Stressbedingungen induziert werden (Richter & Hecker, 1986, Bernhardt et al, 1997, Buttner et al, 2001); dieses Modell ist in Abb. 74 C dargestellt. Die Induktion von Hitzeschockproteinen, Säure-Stress Proteinen und oxidativen-Stress Proteinen in *A. tumefaciens* (Rosen et, 2001) und *B. meliitensis* (Teixeira-Gomes, Cloeckart, & Zygmunt, 2000) zeigt das Modell in Abb. 74 D. Letzendlich noch das Modell in Abb. 74 E, welches nicht-überlappende Stress-Stimuli, die bei der oxidativen Stressantwort und der SOS-Antwort in *E. coli* gefunden wurden, darstellt (VanBogelen, Kelley, & Neidhardt, 1987a).

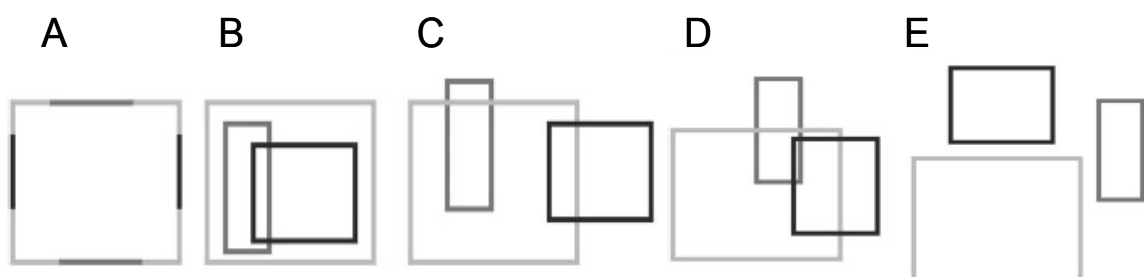


Abb. 73 Überlappungen der verschiedenen Stress-Stimulationen. Stress-induzierte Proteine überlappen in verschiedenem Ausmaß (A-E). Jeder Grauton repräsentiert ein Stress-Stimulon (modifiziert nach (Ran Rosen, 2002))

Überträgt man das Model auf die untersuchten Stressbedingungen bei *P. torridus* ergibt sich auch ein spezifisches Bild (Abb. 74).

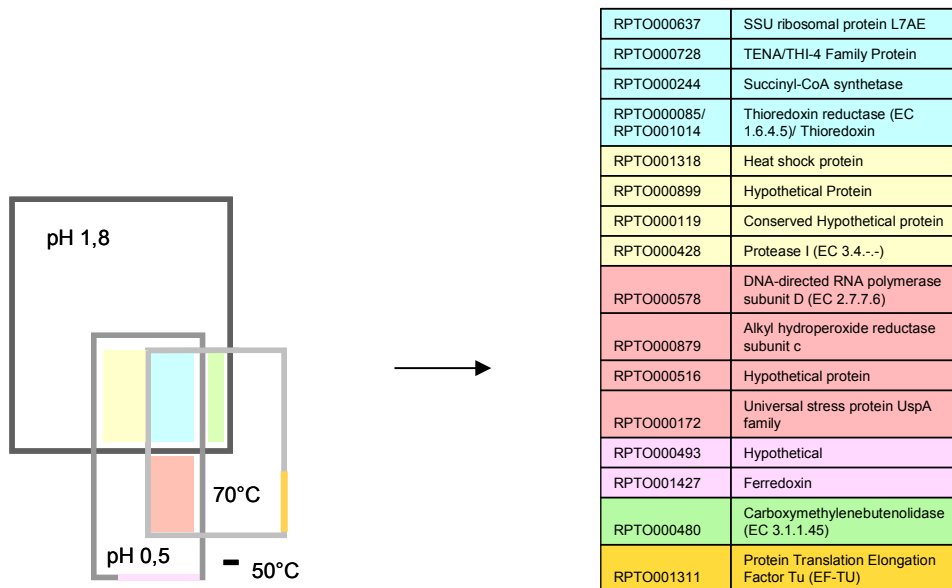


Abb. 74 Überlappung der identifizierten Proteine bei den verschiedenen Stress-Experimenten mit *P. torridus*. Die Überlappungen sind durch Farbcodierungen dargestellt. Deren zugehörige Proteine sind in der nebenstehenden Tabelle aufgeführt.

Als Schlussfolgerung kann man sagen, dass jeder Organismus seine optimalen physiologischen Bedingungen zum Leben hat. Bei der Anpassung an extrazelluläre Veränderungen gibt es Stressgene, die spezifisch und eine große Vielfalt an Genen, die über eine breite Spanne von Stresssituationen induziert werden, was sie wiederum zu allgemeinen Stress-Antwort-Genen macht (Foster, 1999; Foster and Moreno, 1999; Hecker et al., 1996).

4.3.2.4. Untersuchung der identifizierten Proteine auf regulatorischer Elemente

Die Regulation bestimmter Stressantworten erfolgt häufig auf Transkriptionsebene. Eine sehr gut untersuchte Regulation ist die Hitzeschockantwort bei Bakterien, bei der die Transkription über einen alternativen Sigma-Faktor (σ_{32}) reguliert wird. Durch die Bindung des Sigma Faktors an das RNA-Polymerase-Core-Enzym als Folge einer Temperaturerhöhung bindet diese dann an bestimmte Promotorbereiche, die spezifisch vor Genen liegen, die als Antwort auf diesen Hitzestress dann vermehrt transkribiert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Säurestress das F₀F₁ Operon, welches für komplexe Multiprotein-ATP-Synthase kodiert, stark induziert wird, ebenfalls durch Bindung an einen spezifischen Promotor (Foster and Moreno, 1999). Eine Analyse der 50 bp

„upstream“ Bereiche der bei den verschiedenen Stressbedingungen identifizierten Proteine sollte zeigen, ob es bei dem Archaeon *P. torridus* in dem Promotorbereich möglicherweise ähnliche Motive gibt, die auf eine gemeinsame Regulation dieser Gene schließen lässt (Barriuso-Iglesias et al., 2006). Solche regulatorischen Elemente sind in der -35 bp Region zu finden. Die archaeelle Transkription ist insofern interessant, da sie sowohl bakterielle, als auch eukaryotische Elemente besitzt. Auf Grund der Tatsache, dass der basale Transkriptionsapparat der Archaeen ähnlich dem der Eukaryoten ist, könnte man vermuten, dass auch die Regulation der Transkription ähnlich der Eukaryotischen ist. In den Genomsequenzen bereits vollständig sequenzierter Archaeen-Genome findet man allerdings viele Homologe zu bakteriellen Regulatoren (Aravind and Koonin, 1999; Kyripides and Ouzounis, 1999). Der bisher charakterisierte Transkriptionsaktivator GvpE aus dem halophilen Archaeon *Hb. salinarum* PHH1 und *Hf. mediterranei* ist an der Regulation der Gasvesikelproteine beteiligt (Kruger and Pfeifer, 1996; Plosser and Pfeifer, 2002; Roder and Pfeifer, 1996). Durch die Analyse der 50 bp *upstream* Sequenzbereiche, der in dieser Arbeit identifizierten *P. torridus*-Stressgene über die Datenbank MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>) wurden keine homologen Sequenzmotive im möglichen regulatorischen Bereich von -35 bp gefunden. Daher findet wahrscheinlich auf Transkriptionsebene keine gemeinsame Regulation der identifizierten Proteine, als Reaktion auf die verschiedenen Stresssituationen, statt. Man kann vermuten, dass die Regulation vermutlich eher auf Proteinebene vollzogen wird, durch Protein-Protein Wechselwirkung oder posttranslationale Modifikation.

Bei der Suche nach einem gemeinsamen regulatorischen -35 bp Motiv wurde aber ein anderes -10 bp Motiv gefunden, was möglicherweise einer Shine Dalgarno Sequenz (SD) entspricht (Gualerzi and Pon, 1990; Kozak, 1983; Shine and Dalgarno, 1974). Solche möglichen SD-Sequenzen, die komplementär zum 3`-Ende der 16S rRNA sind, wurden bereits für *Archaea* beschrieben (Bell and Jackson, 1998; Bell et al., 1998; Dennis, 1997). Allerdings wurde dieses Motiv nur bei einem Drittel der identifizierten Proteine gefunden. Es wurde beschrieben, dass mögliche SD-Sequenzen meistens nur vor Genen innerhalb eines Operons nicht aber vor dem ersten Gen eines Operons oder einzeln transkribierten Genen zu finden sind (Londei, 2005;

Tolstrup et al., 2000). Eine Untersuchung der Gene mit dem gefundenen Motiv zeigte, dass diese in potentiellen Operons liegen. Die Gene, die dieses Motiv nicht aufweisen sind tatsächlich entweder Einzelgene oder potentielle Startgene eines Operons. *In vitro* Experimente mit Genen aus *Sulfolobus solfataricus* haben gezeigt, dass die Translation von mRNAs ohne SD-Sequenz im 5'-untranslatierten Region (5'UTR) nicht möglich ist, da die mRNA keinen stabilen Komplex mit der ribosomalen 30S Untereinheit bilden kann (Benelli et al., 2003; Condo et al., 1999; Moll and Blasi, 2002). Wie die Translation von mRNAs ohne SD-Sequenz im 5'UTR initiiert wird, ist bisher nicht endgültig geklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die *gvpA*-mRNA aus *Hb. Salinarum*, die keine Ähnlichkeit zu einer möglichen SD-Sequenz im mRNA-leader besitzt, in großen Mengen translatiert wird (Englert et al., 1992; Offner et al., 1996).

In silico Analysen und auch *in vivo* Daten zeigen, dass vielen archaellen Transkripten ein mRNA-leader fehlt, diese aber sehr effizient translatiert werden. Solche leader-losen mRNAs findet man in allen drei Domänen des Lebens, wobei der Anteil bei *Archaea* mit 30 % am höchsten ist (Sensen et al., 1996; Slupska et al., 2001).

Da die archaellen Erkennungssequenzen für die Translation nicht ubiquitär bei allen archaellen Genen sind, und auch die Kenntnis über mögliche regulatorische Bereiche nicht sehr weit reichend sind, bleibt viel Spielraum für eine mögliche gemeinsame Regulationen auf bestimmte Stresssituationen.

Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit keine potentiellen gemeinsamen Regulationen aufgedeckt werden konnten, bietet die Identifizierung der Proteine in dieser Arbeit die Grundlage für die weiteren Untersuchungen der pH- und Temperatur- Adaptation in Extremophilen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen versucht, eine Glycerol-Dehydrogenase (RPTO000201), eine Alkohol-Dehydrogenase (RPTO000605) und zwei verschiedene Glucose-1-Dehydrogenasen (RPTO001123, PPTO001538) aus *P. torridus* heterolog zu exprimieren, aufzureinigen und zu charakterisieren, zum anderen wurden die pH-Stress- und Temperaturstressantwort in *P. torridus* mittels vergleichender 2D-Gelelektrophorese untersucht.

Die Leserahmen der vier *P. torridus*-Dehydrogenasen wurden in die Expressionsvektoren pBADmycHis-A, pEX22b und pMALc2x kloniert. Die Glycerol-Dehydrogenase war das einzige Enzym, das bei der heterologen Expression seiner Gene in *E. coli* Aktivität im Rohextrakt zeigte. Daher wurden sämtliche Versuche mit diesem Enzym durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Überexpression in dem Vektor pBADmycHis-A nicht möglich war. Durch die Expression als Fusionsgen im Vektor pMALc2x konnte lösliches Dehydrogenase-MBP-Fusionsprotein produziert werden. Allerdings war so keine Aktivität messbar. Durch die Expression des Glycerol-Dehydrogenase-Leserahmens unter dem starken T7 Promotor in pEX22b konnte nur sehr wenig lösliches Protein gewonnen werden, der größte Teil befand sich als Aggregat in *inclusion bodies*. Zudem konnte auch hier keine Aktivität gemessen werden. Über die Variation der Anzuchtbedingungen (Temperatur, Stressinduktion mit Ethanol, Induktionskonzentration) konnte das Problem nicht behoben werden. Erst durch die Coexpression des Gens mit dem GroEL/GroES-Chaperon-System war Glycerol-Dehydrogenase-Aktivität im Rohextrakt und auf Carbonylindikatorplatten detektierbar. Der Versuch der Aufreinigung über FPLC und anschließende Charakterisierung des Proteins schlug fehl. Eine teilweise Aufreinigung gelang mit dem inaktiven MBP-Fusionskonstrukt Mal-201 über eine Amylose-Gravitationssäule. Nach der Abspaltung des Fusionsanteils MBP konnte eine spezifische Aktivität von 1,92 U/mg bei 55 °C und pH 5 bestimmt werden. Eine anschließende Charakterisierung des Enzyms blieb aus, da keine geeigneten Bedingungen gefunden werden konnten, bei denen diese Aktivität länger als ca. 5 Stunden messbar war.

Durch erste Versuche zum Screening nach in *E. coli* funktionell exprimierten Dehydrogenasegenen über eine *P. torridus* Fosmidgenbank konnten erste potentiell positive Klone identifiziert werden.

Für die Analyse der verschiedenen Stressantworten in *P. torridus* wurde zunächst erfolgreich die 2D-Gelelektrophorese für diesen Organismus etabliert. Eine für die Zwecke dieser Arbeit optimale Auftrennung wurde über den pH-Bereich von 4-7 in der 1. Dimension und einem 12 %igen Polyacrylamidgel in der 2. Dimension erzielt. Für die Erstellung eines Mastergels für *P. torridus* wurde Zelllysate, von Zellen aus optimalen Wachstumsbedingungen über die pH-Bereiche 4-7 und 3-10 aufgetrennt. Alle sichtbaren Proteine wurden ausgeschnitten und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Hecker (Greifswald) über MS/MS sequenziert. Für die identifizierten Spots wurde eine Datenbank mit Eigenschaften wie Molekularmasse, isoelektrischen Punkt und Annotation in dem Programm Delta 2D erstellt. Es konnten 16 % aller laut Genom annotierter Proteine aufgetrennt und identifiziert werden.

Die Untersuchung der verschiedenen Stressantworten zeigte, dass die Antwort auf pH-Stress in *P. torridus* nicht nur viel schneller als an die Anpassung an eine höhere oder niedrigere Temperatur erfolgt, sondern zudem auch viel komplexer ist, da unter pH-Stress-Bedingungen eine weitaus größere Anzahl an Proteinen mindestens zweifach überexprimiert wurde. Ein großer Teil der in den Proteomvergleichen auffälligen Proteinen waren spezifisch unter der jeweiligen Stressbedingung hochreguliert, es wurden aber auch Proteine gefunden, die bis auf das Temperaturexperiment bei 50 °C, bei jedem Experiment identifiziert wurden, was auf ihre universelle Bedeutung als Stressproteine hindeutet. Proteine, die ubiquitär bei den Stressexperimenten identifiziert werden konnten sind, Thioredoxin Reduktase/Thioredoxin, Succinyl-CoA-Synthetase, SSU Ribosom-Protein L7AE und ein Protein der TENA/THI-4-Familie. Durch die Untersuchung der identifizierten Proteine von jedem Stressexperiment auf dem 50 bp *upstream* DNA-Bereich, konnten keine gemeinsamen regulatorischen Elemente gefunden werden. Dies schließt eine gemeinsame Regulation auf Transkriptionsebene aus.

6. ANHANG

6.1. LITERATUR

- Accardi, A. and Miller, C.** (2004). Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CIC Cl⁻ channels. *Nature* **427**, 803-7.
- Aertsen, A. and Michiels, C. W.** (2004). Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit Rev Microbiol* **30**, 263-73.
- Akiyama, M. and Nakashima, H.** (1996). Molecular cloning of thi-4, a gene necessary for the biosynthesis of thiamine in *Neurospora crassa*. *Curr Genet* **30**, 62-7.
- Alban, A., David, S. O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S. and Currie, I.** (2003). A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* **3**, 36-44.
- Allers, T. and Mevarech, M.** (2005). Archaeal genetics - the third way. *Nat Rev Genet* **6**, 58-73.
- Andra, S., Frey, G., Nitsch, M., Baumeister, W. and Stetter, K. O.** (1996). Purification and structural characterization of the thermosome from the hyperthermophilic archaeum *Methanopyrus kandleri*. *FEBS Lett* **379**, 127-31.
- Angelov, A., Futterer, O., Valerius, O., Braus, G. H. and Liebl, W.** (2005). Properties of the recombinant glucose/galactose dehydrogenase from the extreme thermoacidophile, *Picrophilus torridus*, vol. 272, pp. 1054-1062.
- Angelov, A. and Liebl, W.** (2006). Insights into extreme thermoacidophily based on genome analysis of *Picrophilus torridus* and other thermoacidophilic archaea. *J Biotechnol* **126**, 3-10.
- Araki, T.** (1991). The effect of temperature shifts on protein synthesis by the psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ANT-300. *J Gen Microbiol* **137**, 817-26.
- Aravind, L. and Koonin, E. V.** (1999). DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res* **27**, 4658-70.
- Arner, E. S. J. and Holmgren, A.** (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, vol. 267, pp. 6102-6109.
- Asnis, R. E. and Brodie, A. F.** (1953). A GLYCEROL DEHYDROGENASE FROM *ESCHERICHIA COLI*. *J. Biol. Chem.* **203**, 153-159.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E. and Iturriaga, G.** (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis, vol. 6, pp. 109.
- Baker, L. M. and Poole, L. B.** (2003). Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. *J Biol Chem* **278**, 9203-11.
- Bardwell, J. C. and Craig, E. A.** (1984). Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 848-52.
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. and Pace, N. R.** (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9188-93.
- Barriuso-Iglesias, M., Barreiro, C., Flechoso, F. and Martin, J. F.** (2006). Transcriptional analysis of the F0F1 ATPase operon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 reveals strong induction by alkaline pH. *Microbiology* **152**, 11-21.
- Barry, R. C., Young, M. J., Stedman, K. M. and Dratz, E. A.** (2006). Proteomic mapping of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Electrophoresis* **27**, 2970-83.
- Bell, S. D. and Jackson, S. P.** (1998). Transcription in Archaea. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 41-51.

- Bell, S. D., Jaxel, C., Nadal, M., Kosa, P. F. and Jackson, S. P.** (1998). Temperature, template topology, and factor requirements of archaeal transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15218-22.
- Benelli, D., Maone, E. and Londei, P.** (2003). Two different mechanisms for ribosome/mRNA interaction in archaeal translation initiation. *Mol Microbiol* **50**, 635-43.
- Berggren, K. N., Schulenberg, B., Lopez, M. F., Steinberg, T. H., Bogdanova, A., Smejkal, G., Wang, A. and Patton, W. F.** (2002). An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics* **2**, 486-98.
- Bernhardt, J., Volker, U., Volker, A., Antelmann, H., Schmid, R., Mach, H. and Hecker, M.** (1997). Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*--a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* **143**, 999-1017.
- Bienvenut, W. V., Sanchez, J. C., Karmime, A., Rouge, V., Rose, K., Binz, P. A. and Hochstrasser, D. F.** (1999). Toward a clinical molecular scanner for proteome research: parallel protein chemical processing before and during western blot. *Anal Chem* **71**, 4800-7.
- Binz, P. A., Muller, M., Walther, D., Bienvenut, W. V., Gras, R., Hoogland, C., Bouchet, G., Gasteiger, E., Fabbretti, R., Gay, S. et al.** (1999). A molecular scanner to automate proteomic research and to display proteome images. *Anal Chem* **71**, 4981-8.
- Blackwell, J. R. and Horgan, R.** (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett* **295**, 10-2.
- Blomberg, A.** (2000). Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett* **182**, 1-8.
- Bochkareva, E. S., Girshovich, A. S. and Bibi, E.** (2002). Identification and characterization of the *Escherichia coli* stress protein UP12, a putative in vivo substrate of GroEL. *Eur J Biochem* **269**, 3032-40.
- Boonyaratankornkit, B. B., Simpson, A. J., Whitehead, T. A., Fraser, C. M., El-Sayed, N. M. and Clark, D. S.** (2005). Transcriptional profiling of the hyperthermophilic methanarchaeon *Methanococcus jannaschii* in response to lethal heat and non-lethal cold shock. *Environ Microbiol* **7**, 789-97.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D. et al.** (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**, 1058-73.
- Bunai, K. and Yamane, K.** (2005). Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives. *Journal of Chromatography B* **815**, 227-236.
- Burggraf, S., Stetter, K. O., Rouviere, P. and Woese, C. R.** (1991). *Methanopyrus kandleri*: an archaeal methanogen unrelated to all other known methanogens. *Syst Appl Microbiol* **14**, 346-51.
- Butt, A., Davison, M. D., Smith, G. J., Young, J. A., Gaskell, S. J., Oliver, S. G. and Beynon, R. J.** (2001). Chromatographic separations as a prelude to two-dimensional electrophoresis in proteomics analysis. *Proteomics* **1**, 42-53.
- Buttner, K., Bernhardt, J., Scharf, C., Schmid, R., Mader, U., Eymann, C., Antelmann, H., Volker, A., Volker, U. and Hecker, M.** (2001). A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **22**, 2908-35.
- C. Bertoldo, C. D. G. A.** (2004). Thermoacidophilic Microorganisms and their Novel Biocatalysts, vol. 4, pp. 521-532.

- Cardoso, F. S., Castro, R. F., Borges, N. and Santos, H.** (2007). Biochemical and genetic characterization of the pathways for trehalose metabolism in *Propionibacterium freudenreichii*, and their role in stress response. *Microbiology* **153**, 270-80.
- Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F. and Foster, J. W.** (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 3525-35.
- Cavicchioli, R., Thomas, T. and Curmi, P. M.** (2000). Cold stress response in Archaea. *Extremophiles* **4**, 321-31.
- Chenault, H. K. and Whitesides, G. M.** (1987). Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl Biochem Biotechnol* **14**, 147-97.
- Chhabra, S. R., He, Q., Huang, K. H., Gaucher, S. P., Alm, E. J., He, Z., Hadi, M. Z., Hazen, T. C., Wall, J. D., Zhou, J. et al.** (2006). Global Analysis of Heat Shock Response in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, vol. 188, pp. 1817-1828.
- Chong, P. K. and Wright, P. C.** (2005). Identification and Characterization of the *Sulfolobus solfataricus* P2 Proteome, vol. 4, pp. 1789-1798.
- Clarens, M., Macario, A. J. and Conway de Macario, E.** (1995). The archaeal dnaK-dnaJ gene cluster: organization and expression in the methanogen *Methanosarcina mazei*. *J Mol Biol* **250**, 191-201.
- Condo, I., Ciammaruconi, A., Benelli, D., Ruggero, D. and Londei, P.** (1999). Cis-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* **34**, 377-84.
- Coskun, U., Radermacher, M., Muller, V., Ruiz, T. and Gruber, G.** (2004). Three-dimensional Organization of the Archaeal A1-ATPase from *Methanosarcina mazei* Go1, vol. 279, pp. 22759-22764.
- De Angelis, M., Bini, L., Pallini, V., Cocconcelli, P. S. and Gobbetti, M.** (2001). The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* **147**, 1863-73.
- de Macario, E. C. and Macario, A. J.** (2000). Stressors, stress and survival: overview. *Front Biosci* **5**, D780-6.
- Dennis, P. P.** (1997). Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* **89**, 1007-10.
- Dowsey, A. W., Dunn, M. J. and Yang, G. Z.** (2003). The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **3**, 1567-96.
- Dubendorff, J. W. and Studier, F. W.** (1991a). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* **219**, 45-59.
- Dubendorff, J. W. and Studier, F. W.** (1991b). Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. *J Mol Biol* **219**, 61-8.
- Ellis, J.** (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature* **328**, 378-9.
- Ellis, R. J.** (1994). Chaperoning nascent proteins. *Nature* **370**, 96-7.
- Ellis, R. J. and van der Vies, S. M.** (1991). Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **60**, 321-47.
- Englert, C., Kruger, K., Offner, S. and Pfeifer, F.** (1992). Three different but related gene clusters encoding gas vesicles in halophilic archaea. *J Mol Biol* **227**, 586-92.
- Fang, Y., Kolmakova-Partensky, L. and Miller, C.** (2007). A Bacterial Arginine-Agmatine Exchange Transporter Involved in Extreme Acid Resistance, vol. 282, pp. 176-182.
- Ferrer, M., Golyshina, O. V., Chernikova, T. N., Khachane, A. N., Reyes-Duarte, D., Santos, V. A., Strompl, C., Elborough, K., Jarvis, G., Neef, A. et al.** (2005). Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ Microbiol* **7**, 1996-2010.
- Figeys, D. and Pinto, D.** (2001). Proteomics on a chip: promising developments. *Electrophoresis* **22**, 208-16.
- Foster, J. W.** (1999). When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr Opin Microbiol* **2**, 170-4.

- Foster, J. W.** (2004). ESCHERICHIA COLI ACID RESISTANCE: TALES OF AN AMATEUR ACIDOPHILE. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 898-907.
- Foster, J. W. and Moreno, M.** (1999). Inducible acid tolerance mechanisms in enteric bacteria. *Novartis Found Symp* **221**, 55-69; discussion 70-4.
- Fountoulakis, M., Takacs, M. F., Berndt, P., Langen, H. and Takacs, B.** (1999a). Enrichment of low abundance proteins of Escherichia coli by hydroxyapatite chromatography. *Electrophoresis* **20**, 2181-95.
- Fountoulakis, M., Takacs, M. F. and Takacs, B.** (1999b). Enrichment of low-copy-number gene products by hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A* **833**, 157-68.
- Fourie, A. M., Sambrook, J. F. and Gething, M. J.** (1994). Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J Biol Chem* **269**, 30470-8.
- Frees, D., Vogensen, F. K. and Ingmer, H.** (2003). Identification of proteins induced at low pH in Lactococcus lactis. *Int J Food Microbiol* **87**, 293-300.
- Futterer, O., Angelov, A., Liesegang, H., Gottschalk, G., Schleper, C., Schepers, B., Dock, C., Antranikian, G. and Liebl, W.** (2004). Genome sequence of Picrophilus torridus and its implications for life around pH 0, vol. 101, pp. 9091-9096.
- Garrels, J. I., McLaughlin, C. S., Warner, J. R., Futcher, B., Latter, G. I., Kobayashi, R., Schwender, B., Volpe, T., Anderson, D. S., Mesquita-Fuentes, R. et al.** (1997). Proteome studies of Saccharomyces cerevisiae: identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis* **18**, 1347-60.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M. et al.** (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-7.
- Godovac-Zimmermann, J. and Brown, L. R.** (2001). Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrom Rev* **20**, 1-57.
- Goloubinoff, P., Christeller, J. T., Gatenby, A. A. and Lorimer, G. H.** (1989a). Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* **342**, 884-9.
- Goloubinoff, P., Gatenby, A. A. and Lorimer, G. H.** (1989b). GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in Escherichia coli. *Nature* **337**, 44-7.
- Goodchild, A., Saunders, N. F., Ertan, H., Raftery, M., Guilhaus, M., Curmi, P. M. and Cavicchioli, R.** (2004). A proteomic determination of cold adaptation in the Antarctic archaeon, Methanococcoides burtonii. *Mol Microbiol* **53**, 309-21.
- Gorden, J. and Small, P. L.** (1993). Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun* **61**, 364-7.
- Gorg, A., Postel, W., Gunther, S. and Friedrich, C.** (1988). Horizontal two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients using PhastSystem. *Electrophoresis* **9**, 57-9.
- Gorg, A. and Weiss, W.** (1999). Horizontal SDS-PAGE for IPG-Dalt. *Methods Mol Biol* **112**, 235-44.
- Goshe, M. B., Conrads, T. P., Panisko, E. A., Angell, N. H., Veenstra, T. D. and Smith, R. D.** (2001). Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses. *Anal Chem* **73**, 2578-86.
- Gruber, G., Wiczorek, H., Harvey, W. R. and Muller, V.** (2001). Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J Exp Biol* **204**, 2597-605.
- Gu, L., Jiang, Y., Wang, Y., Yao, W., Sun, D., Ka, W., Tang, Z., Xu, X., Wen, Z. and Chien, S.** (2005). TFAR19 gene changes the biophysical properties of murine erythroleukemia cells. *Cell Biochemistry and Biophysics* **43**, 355-363.

- Gualerzi, C. O. and Pon, C. L.** (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**, 5881-9.
- Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y. and Aebersold, R.** (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9390-5.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H. and Aebersold, R.** (1999a). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-9.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. and Aebersold, R.** (1999b). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**, 1720-30.
- Haas, W., Kaushal, D., Sublett, J., Obert, C. and Tuomanen, E. I.** (2005). Vancomycin Stress Response in a Sensitive and a Tolerant Strain of *Streptococcus pneumoniae*, vol. 187, pp. 8205-8210.
- Han, C. J., Park, S. H. and Kelly, R. M.** (1997). Acquired Thermotolerance and Stressed-Phase Growth of the Extremely Thermoacidophilic Archaeon *Metallosphaera sedula* in Continuous Culture. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2391-2396.
- Hanford, M. and Peeples, T.** (2002). Archaeal tetraether lipids. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **97**, 45-62.
- Hebert, A. M., Kropinski, A. M. and Jarrell, K. F.** (1991). Heat shock response of the archaeobacterium *Methanococcus voltae*, vol. 173, pp. 3224-3227.
- Hebraud, M. and Potier, P.** (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 211-9.
- Hecker, M., Schumann, W. and Volker, U.** (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*, vol. 19, pp. 417-428.
- Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C. and Watanabe, C.** (1993). Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5011-5.
- Herbert, R. A.** (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol* **10**, 395-402.
- Herendeen, S. L., VanBogelen, R. A. and Neidhardt, F. C.** (1979). Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J Bacteriol* **139**, 185-94.
- Hesterkamp, T., Hauser, S., Lutcke, H. and Bukau, B.** (1996). *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4437-41.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K. et al.** (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-3.
- Holden, J. F. and Baross, J. A.** (1993). Enhanced thermotolerance and temperature-induced changes in protein composition in the hyperthermophilic archaeon ES4. *J Bacteriol* **175**, 2839-43.
- Houen, G., Bruun, L. and Barkholt, V.** (1997). Combined immunostaining and Coomassie Brilliant Blue staining of polyvinylidene difluoride membranes without organic solvent. *Electrophoresis* **18**, 701-5.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. and Stetter, K. O.** (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**, 63-7.
- Hummel, W.** (1997). New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **58**, 145-84.
- Hummel, W.** (1999). Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends Biotechnol* **17**, 487-92.

- Hunt, S. M., Thomas, M. R., Sebastian, L. T., Pedersen, S. K., Harcourt, R. L., Sloane, A. J. and Wilkins, M. R. (2005). Optimal replication and the importance of experimental design for gel-based quantitative proteomics. *J Proteome Res* **4**, 809-19.
- Isabelle Maillet, P. B. C. M. S. R. R. A. B. Z. P. S. A. H. L. M. W. (2007). From the genome sequence to the proteome and back: Evaluation of E. coli genome annotation with a 2-D gel-based proteomics approach, vol. 7, pp. 1097-1106.
- Iyer, R., Iverson, T. M., Accardi, A. and Miller, C. (2002). A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature* **419**, 715-8.
- Jacobson, F. S., Morgan, R. W., Christman, M. F. and Ames, B. N. (1989). An alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties, vol. 264, pp. 1488-1496.
- Jean, D., Briolat, V. and Reyssset, G. (2004). Oxidative stress response in Clostridium perfringens, vol. 150, pp. 1649-1659.
- Joerg Reinders, U. L. J. M. Y. W. A. S. (2004). Challenges in mass spectrometry-based proteomics, vol. 4, pp. 3686-3703.
- Johnson, D. B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms, vol. 27, pp. 307-317.
- Kagawa, H. K., Osipiuk, J., Maltsev, N., Overbeek, R., Quate-Randall, E., Joachimiak, A. and Trent, J. D. (1995). The 60 kDa heat shock proteins in the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus shibatae. *J Mol Biol* **253**, 712-25.
- Kandler, O. and Konig, H. (1998). Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol Life Sci* **54**, 305-8.
- Karner, M. B., DeLong, E. F. and Karl, D. M. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**, 507-10.
- Karp, N. A. and Lilley, K. S. (2005). Maximising sensitivity for detecting changes in protein expression: experimental design using minimal CyDyes. *Proteomics* **5**, 3105-15.
- Kashima, Y. and Ishikawa, K. (2003). Alkyl Hydroperoxide Reductase Dependent on Thioredoxin-Like Protein from Pyrococcus horikoshii, vol. 134, pp. 25-29.
- Kaufmann, H., Bailey, J. E. and Fussenegger, M. (2001). Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **1**, 194-9.
- Kheir Zuobi-Hasona, P. J. C. A. H. A. S. B. L. J. B. (2005). Solubilization of cellular membrane proteins from Streptococcus mutans for two-dimensional gel electrophoresis, vol. 26, pp. 1200-1205.
- Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D. et al. (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon Archaeoglobus fulgidus. *Nature* **390**, 364-70.
- Klose, J. (1999). Genotypes and phenotypes. *Electrophoresis* **20**, 643-52.
- Klose, J. and Kobalz, U. (1995). Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **16**, 1034-59.
- Klose, J. and Spielmann, H. (1975). Gel isoelectric focusing of mouse lactate dehydrogenase: heterogeneity of the isoenzymes A4 and X4. *Biochem Genet* **13**, 707-20.
- Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A. and Daniel, R. (2003). Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1408-16.
- Knight, C. G., Kassen, R., Hebestreit, H. and Rainey, P. B. (2004). From The Cover: Global analysis of predicted proteomes: Functional adaptation of physical properties, vol. 101, pp. 8390-8395.

- Kozak, M.** (1983). Translation of insulin-related polypeptides from messenger RNAs with tandemly reiterated copies of the ribosome binding site. *Cell* **34**, 971-8.
- Kruger, K. and Pfeifer, F.** (1996). Transcript analysis of the c-vac region and differential synthesis of the two regulatory gas vesicle proteins GvpD and GvpE in *Halobacterium salinarium* PHH4. *J Bacteriol* **178**, 4012-9.
- Kumar, J. K., Tabor, S. and Richardson, C. C.** (2004). Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3759-64.
- Kyrpides, N. C. and Ouzounis, C. A.** (1999). Transcription in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8545-50.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, S. C. and Olins, P. O.** (1992). Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 2849-52.
- Liberatori, S., Bini, L., De Felice, C., Magi, B., Marzocchi, B., Raggiaschi, R., Frutiger, S., Sanchez, J. C., Wilkins, M. R., Hughes, G. et al.** (1997). A two-dimensional protein map of human amniotic fluid at 17 weeks' gestation. *Electrophoresis* **18**, 2816-22.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M.** (1991a). *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2874-8.
- Liberek, K., Skowyra, D., Zylicz, M., Johnson, C. and Georgopoulos, C.** (1991b). The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *J Biol Chem* **266**, 14491-6.
- Lillie, H., Schwarz, E. and Rudolph, R.** (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* **9**, 497-501.
- Lin, E. C. C.** (1976). Glycerol Dissimilation and its Regulation in Bacteria, vol. 30, pp. 535-578.
- Lin, E. C. C. and Magasanik, B.** (1960). The Activation of Glycerol Dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by Monovalent Cations, vol. 235, pp. 1820-1823.
- Lin, J., Lee, I. S., Frey, J., Slonczewski, J. L. and Foster, J. W.** (1995). Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 4097-104.
- Londei, P.** (2005). Evolution of translational initiation: new insights from the archaea. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 185-200.
- Lopez, M. F., Berggren, K., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Robinson, M. and Patton, W. F.** (2000). A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* **21**, 3673-83.
- Lorimer, G. H.** (2001). A personal account of chaperonin history. *Plant Physiol* **125**, 38-41.
- Lu, X. and Zhu, H.** (2005). Tube-Gel Digestion: A Novel Proteomic Approach for High Throughput Analysis of Membrane Proteins, vol. 4, pp. 1948-1958.
- Macario, A. J. L., Lange, M., Ahring, B. K. and De Macario, E. C.** (1999). Stress Genes and Proteins in the Archaea, vol. 63, pp. 923-967.
- Macfarlane, D. E.** (1983). Use of benzyltrimethyl-n-hexadecylammonium chloride ("16-BAC"), a cationic detergent, in an acidic polyacrylamide gel electrophoresis system to detect base labile protein methylation in intact cells. *Anal Biochem* **132**, 231-5.
- Macfarlane, D. E.** (1989). Two dimensional benzyltrimethyl-n-hexadecylammonium chloride---sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. *Anal Biochem* **176**, 457-63.

- Madigan, M. T. and Mairs, B. L.** (1997). Extremophiles. *Sci Am* **276**, 82-7.
- Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea, A. G., 3rd, Slatko, B. E., Moran, L. S., Tagliamonte, J. A., McReynolds, L. A. and Guan, C. D.** (1988). An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**, 365-73.
- Mann, M. and Wilm, M.** (1994). Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal Chem* **66**, 4390-9.
- Markus Laukel, M. R. G. B. U. V. J. A. V.** (2004). Comparison of the proteome of Methylobacterium extorquens AM1 grown under methylotrophic and nonmethylotrophic conditions, vol. 4, pp. 1247-1264.
- Martin, J. and Hartl, F. U.** (1994). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Bioessays* **16**, 689-92.
- Matin, A.** (1992). Genetics of bacterial stress response and its applications. *Ann N Y Acad Sci* **665**, 1-15.
- Matsui, N. M., Smith-Beckerman, D. M. and Epstein, L. B.** (1999). Staining of preparative 2-D gels. Coomassie blue and imidazole-zinc negative staining. *Methods Mol Biol* **112**, 307-11.
- Maurer, L. M., Yohannes, E., Bondurant, S. S., Radmacher, M. and Slonczewski, J. L.** (2005). pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **187**, 304-19.
- Moll, D., Prinz, A., Gesellchen, F., Drewianka, S., Zimmermann, B. and Herberg, F. W.** (2006). Biomolecular interaction analysis in functional proteomics. *J Neural Transm* **113**, 1015-32.
- Moll, I. and Blasi, U.** (2002). Differential inhibition of 30S and 70S translation initiation complexes on leaderless mRNA by kasugamycin. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 1021-1026.
- Mongkolsuk, S., Whangsuk, W., Vattanaviboon, P., Loprasert, S. and Fuangthong, M.** (2000). A Xanthomonas Alkyl Hydroperoxide Reductase Subunit C (ahpC) Mutant Showed an Altered Peroxide Stress Response and Complex Regulation of the Compensatory Response of Peroxide Detoxification Enzymes, vol. 182, pp. 6845-6849.
- Muller, V.** (2004). An exceptional variability in the motor of archael A1A0 ATPases: from multimeric to monomeric rotors comprising 6-13 ion binding sites. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 115-25.
- Muller, V. and Gruber, G.** (2003). ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell Mol Life Sci* **60**, 474-94.
- Muller, V., Spanheimer, R. and Santos, H.** (2005). Stress response by solute accumulation in archaea. *Current Opinion in Microbiology* **8**, 729-736.
- Munchbach, M., Dainese, P., Staudenmann, W., Narberhaus, F. and James, P.** (1999). Proteome analysis of heat shock protein expression in Bradyrhizobium japonicum. *Eur J Biochem* **264**, 39-48.
- Nedelkov, D. and Nelson, R. W.** (2001). Delineation of in vivo assembled multiprotein complexes via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Proteomics* **1**, 1441-6.
- Neidhardt, F. C., Phillips, T. A., VanBogelen, R. A., Smith, M. W., Georgalis, Y. and Subramanian, A. R.** (1981). Identity of the B56.5 protein, the A-protein, and the groE gene product of Escherichia coli. *J Bacteriol* **145**, 513-20.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. and Yura, T.** (1998). Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in Escherichia coli, vol. 64, pp. 1694-1699.
- Norin, M. and Sundstrom, M.** (2002). Structural proteomics: developments in structure-to-function predictions. *Trends Biotechnol* **20**, 79-84.
- Nystrom, T., Olsson, R. M. and Kjelleberg, S.** (1992). Survival, stress resistance, and alterations in protein expression in the marine vibrio sp. strain S14 during starvation for different individual nutrients. *Appl Environ Microbiol* **58**, 55-65.

- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, vol. 250, pp. 4007-4021.
- Offner, S., Wanner, G. and Pfeifer, F. (1996). Functional studies of the *gvpACNO* operon of *Halobacterium salinarium* reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. *J Bacteriol* **178**, 2071-8.
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 334-48.
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S. and Galinski, E. A. (2002). Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* **6**, 491-8.
- Pahl, A., Brune, K. and Bang, H. (1997). Fit for life? Evolution of chaperones and folding catalysts parallels the development of complex organisms. *Cell Stress Chaperones* **2**, 78-86.
- Pang, A. S., Nathoo, S. and Wong, S. L. (1991). Cloning and characterization of a pair of novel genes that regulate production of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**, 46-54.
- Panoff, J. M., Thammavongs, B., Gueguen, M. and Boutibonnes, P. (1998). Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology* **36**, 75-83.
- Patton, W. F. (2000). A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* **21**, 1123-44.
- Pawson, T. and Scott, J. D. (2005). Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* **30**, 286-90.
- Pedone, E., Bartolucci, S. and Fiorentino, G. (2004). Sensing and adapting to environmental stress: the archaeal tactic. *Front Biosci* **9**, 2909-26.
- Perales, M., Eubel, H., Heinemeyer, J., Colaneri, A., Zabaleta, E. and Braun, H. P. (2005). Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I + III₂ levels and alters mitochondrial physiology in *Arabidopsis*. *J Mol Biol* **350**, 263-77.
- Phipps, B. M., Hoffmann, A., Stetter, K. O. and Baumeister, W. (1991). A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. *Embo J* **10**, 1711-22.
- Plosser, P. and Pfeifer, F. (2002). A bZIP protein from halophilic archaea: structural features and dimer formation of cGvpE from *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* **45**, 511-20.
- Posch, A., Chen, Z., Wheeler, C., Dunn, M. J., Raulf-Heimsoth, M. and Baur, X. (1997). Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *J Allergy Clin Immunol* **99**, 385-95.
- Rabilloud, T. (1999). Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* **112**, 297-305.
- Rabilloud, T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3-10.
- Rabilloud, T., Strub, J. M., Luche, S., van Dorsselaer, A. and Lunardi, J. (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**, 699-704.
- Radford, S. E. (2000). Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* **25**, 611-8.
- Raggiaschi, R., Gotta, S. and Terstappen, G. (2005). Phosphoproteome Analysis. *Bioscience Reports* **25**, 33-44.
- Raman, B., Cheung, A. and Marten, M. R. (2002). Quantitative comparison and evaluation of two commercially available, two-dimensional electrophoresis image analysis software packages, Z3 and Melanie. *Electrophoresis* **23**, 2194-202.
- Ran Rosen, E. Z. R. (2002). Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response, vol. 21, pp. 244-265.
- Reid, M. F. and Fewson, C. A. (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* **20**, 13-56.

- Richard, H. and Foster, J. W.** (2004). Escherichia coli Glutamate- and Arginine-Dependent Acid Resistance Systems Increase Internal pH and Reverse Transmembrane Potential, vol. 186, pp. 6032-6041.
- Ritz, D., Patel, H., Doan, B., Zheng, M., Aslund, F., Storz, G. and Beckwith, J.** (2000a). Thioredoxin 2 Is Involved in the Oxidative Stress Response in Escherichia coli, vol. 275, pp. 2505-2512.
- Ritz, D., Patel, H., Doan, B., Zheng, M., Aslund, F., Storz, G. and Beckwith, J.** (2000b). Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in Escherichia coli. *J Biol Chem* **275**, 2505-12.
- Robertson, C. E., Harris, J. K., Spear, J. R. and Pace, N. R.** (2005). Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. *Curr Opin Microbiol* **8**, 638-42.
- Roder, R. and Pfeifer, F.** (1996). Influence of salt on the transcription of the gas-vesicle genes of *Haloferax mediterranei* and identification of the endogenous transcriptional activator gene. *Microbiology* **142 (Pt 7)**, 1715-23.
- Rosen, R., Buttner, K., Schmid, R., Hecker, M. and Ron, E. Z.** (2001). Stress-induced proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 277-285.
- Rozhdestvensky, T. S., Tang, T. H., Tchirkova, I. V., Brosius, J., Bachellerie, J.-P. and Huttenhofer, A.** (2003). Binding of L7Ae protein to the K-turn of archaeal snoRNAs: a shared RNA binding motif for C/D and H/ACA box snoRNAs in Archaea, vol. 31, pp. 869-877.
- Ruch, F. E. and Lin, E. C.** (1975). Independent constitutive expression of the aerobic and anaerobic pathways of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **124**, 348-52.
- Rudiger, S., Buchberger, A. and Bukau, B.** (1997). Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* **4**, 342-9.
- Rudolph, R. and Lilie, H.** (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *Faseb J* **10**, 49-56.
- Ruzheinikov, S. N., Burke, J., Sedelnikova, S., Baker, P. J., Taylor, R., Bullough, P. A., Muir, N. M., Gore, M. G. and Rice, D. W.** (2001). Glycerol Dehydrogenase: Structure, Specificity, and Mechanism of a Family III Polyol Dehydrogenase. *Structure* **9**, 789-802.
- Schein, C. H.** (1991). Optimizing protein folding to the native state in bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **2**, 746-50.
- Schleper, C., Piihler, G., Kuhl Morgen, B. and Zillig, W.** (1995a). Life at extremely low pH. *Nature* **375**, 741-742.
- Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., Klenk, H. P. and Zillig, W.** (1995b). *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0, vol. 177, pp. 7050-7059.
- Seaver, L. C. and Imlay, J. A.** (2001). Alkyl Hydroperoxide Reductase Is the Primary Scavenger of Endogenous Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*, vol. 183, pp. 7173-7181.
- Sensen, C. W., Klenk, H. P., Singh, R. K., Allard, G., Chan, C. C., Liu, Q. Y., Penny, S. L., Young, F., Schenk, M. E., Gaasterland, T. et al.** (1996). Organizational characteristics and information content of an archaeal genome: 156 kb of sequence from *Sulfolobus solfataricus* P2. *Mol Microbiol* **22**, 175-91.
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A. et al.** (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7835-40.
- Shine, J. and Dalgarno, L.** (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1342-6.
- Shinoda, W., Shinoda, K., Baba, T. and Mikami, M.** (2005). Molecular Dynamics Study of Bipolar Tetraether Lipid Membranes, vol. 89, pp. 3195-3202.

- Shockley, K. R., Ward, D. E., Chhabra, S. R., Conners, S. B., Montero, C. I. and Kelly, R. M.** (2003). Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2365-71.
- Slupska, M. M., King, A. G., Fitz-Gibbon, S., Besemer, J., Borodovsky, M. and Miller, J. H.** (2001). Leaderless transcripts of the crenarchaeal hyperthermophile *Pyrobaculum aerophilum*. *J Mol Biol* **309**, 347-60.
- Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E. and Slonczewski, J. L.** (1994). Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J Bacteriol* **176**, 1729-37.
- Smith, J. L.** (2003). The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J Food Prot* **66**, 1292-303.
- Smolka, M., Zhou, H. and Aebersold, R.** (2002). Quantitative protein profiling using two-dimensional gel electrophoresis, isotope-coded affinity tag labeling, and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **1**, 19-29.
- Sprenger, G. A., Hammer, B. A., Johnson, E. A. and Lin, E. C.** (1989). Anaerobic growth of *Escherichia coli* on glycerol by importing genes of the *dha* regulon from *Klebsiella pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **135**, 1255-62.
- Stancato, L. F. and Petricoin, E. F., 3rd.** (2001). Fingerprinting of signal transduction pathways using a combination of anti-phosphotyrosine immunoprecipitations and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **22**, 2120-4.
- Strandberg, L. and Enfors, S. O.** (1991). Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1669-74.
- Strohmaier, R.** (1994). Epigenesis: the missing beat in biotechnology? *Biotechnology (N Y)* **12**, 156-64.
- Suzuki, I., Simon, W. J. and Slabas, A. R.** (2006). The heat shock response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 analysed by transcriptomics and proteomics. *J Exp Bot* **57**, 1573-8.
- Tabor, S. and Richardson, C. C.** (1985). A Bacteriophage T7 RNA Polymerase/Promoter System for Controlled Exclusive Expression of Specific Genes, vol. 82, pp. 1074-1078.
- Tachdjian, S. and Kelly, R. M.** (2006). Dynamic Metabolic Adjustments and Genome Plasticity Are Implicated in the Heat Shock Response of the Extremely Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*, vol. 188, pp. 4553-4559.
- Tang, Y., Quail, M. A., Artymiuk, P. J., Guest, J. R. and Green, J.** (2002). *Escherichia coli* acetonitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of *sodA* expression, vol. 148, pp. 1027-1037.
- Teixeira-Gomes, A. P., Cloeckaert, A. and Zygmunt, M. S.** (2000). Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **68**, 2954-61.
- Terpe, K.** (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 523-33.
- Thomm, M.** (1996). Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiol Rev* **18**, 159-71.
- Tolstrup, N., Sensen, C. W., Garrett, R. A. and Clausen, I. G.** (2000). Two different and highly organized mechanisms of translation initiation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* **4**, 175-9.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I. and Davison, M.** (2001). Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **1**, 377-96.
- Toyama, H., Fukumoto, H., Saeki, M., Matsushita, K., Adachi, O. and Lidstrom, M. E.** (2002). PqqC/D, which converts a biosynthetic intermediate to pyrroloquinoline quinone. *Biochem Biophys Res Commun* **299**, 268-72.

- Trent, J. D., Osipiuk, J. and Pinkau, T.** (1990). Acquired thermotolerance and heat shock in the extremely thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus* sp. strain B12. *J Bacteriol* **172**, 1478-84.
- Tu, J. and Zillig, W.** (1982). Organization of rRNA structural genes in the archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Nucleic Acids Res* **10**, 7231-45.
- Uetz, P. and Hughes, R. E.** (2000). Systematic and large-scale two-hybrid screens. *Curr Opin Microbiol* **3**, 303-8.
- Unlu, M., Morgan, M. E. and Minden, J. S.** (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-7.
- van de, V., Driessen, A. J., Zillig, W. and Konings, W. N.** (1998). Bioenergetics and cytoplasmic membrane stability of the extremely acidophilic, thermophilic archaeon *Picrophilus oshimae*. *Extremophiles* **2**, 67-74.
- van den Burg, B.** (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 213-218.
- VanBogelen, R. A., Acton, M. A. and Neidhardt, F. C.** (1987a). Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **1**, 525-31.
- VanBogelen, R. A., Kelley, P. M. and Neidhardt, F. C.** (1987b). Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 26-32.
- Viswanathan, S., Unlu, M. and Minden, J. S.** (2006). Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat. Protocols* **1**, 1351-1358.
- Voigt, B., Hoi le, T., Jurgen, B., Albrecht, D., Ehrenreich, A., Veith, B., Evers, S., Maurer, K. H., Hecker, M. and Schweder, T.** (2007). The glucose and nitrogen starvation response of *Bacillus licheniformis*. *Proteomics* **7**, 413-23.
- Vonrhein, C., Schmidt, U., Ziegler, G. A., Schweiger, S., Hanukoglu, I. and Schulz, G. E.** (1999). Chaperone-assisted expression of authentic bovine adrenodoxin reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **443**, 167-9.
- Waldmann, T., Lupas, A., Kellermann, J., Peters, J. and Baumeister, W.** (1995a). Primary structure of the thermosome from *Thermoplasma acidophilum*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**, 119-26.
- Waldmann, T., Nimmesgern, E., Nitsch, M., Peters, J., Pfeifer, G., Muller, S., Kellermann, J., Engel, A., Hartl, F. U. and Baumeister, W.** (1995b). The thermosome of *Thermoplasma acidophilum* and its relationship to the eukaryotic chaperonin TRiC. *Eur J Biochem* **227**, 848-56.
- Walsh, B. J. and Herbert, B. R.** (1999). Casting and running vertical slab-gel electrophoresis for 2D-PAGE. *Methods Mol Biol* **112**, 245-53.
- Washburn, M. P., Wolters, D. and Yates, J. R., 3rd.** (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**, 242-7.
- Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A. and Olins, P. O.** (1996). Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 494-9.
- Wessel, D. and Flugge, U. I.** (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* **138**, 141-143.
- Wilkins, M. R., Appel, R. D., Van Eyk, J. E., Chung, M. C., Gorg, A., Hecker, M., Huber, L. A., Langen, H., Link, A. J., Paik, Y. K. et al.** (2006). Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics* **6**, 4-8.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I. et al.** (1996a). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* **14**, 61-5.

- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F. and Williams, K. L.** (1996b). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* **13**, 19-50.
- Woese, C. R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-71.
- Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L.** (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4576-9.
- Woese, C. R. and Olsen, G. J.** (1986). Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms. *Syst Appl Microbiol* **7**, 161-77.
- Wu, J. T., Wu, L. H. and Knight, J. A.** (1986). Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation [published erratum appears in *Clin Chem* 1987 May;33(5):724], vol. 32, pp. 314-319.
- Yates, J. R., 3rd, Eng, J. K., McCormack, A. L. and Schieltz, D.** (1995). Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal Chem* **67**, 1426-36.
- Yokoyama, K., Kikuchi, Y. and Yasueda, H.** (1998). Overproduction of DnaJ in *Escherichia coli* improves in vivo solubility of the recombinant fish-derived transglutaminase. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 1205-10.
- Yura, T., Kawasaki, Y., Kusukawa, N., Nagai, H., Wada, C. and Yano, R.** (1990). Roles and regulation of the heat shock sigma factor sigma 32 in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**, 187-90.
- Zeller, T. and Klug, G.** (2006). Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften* **93**, 259-266.
- Zhou, H., Ranish, J. A., Watts, J. D. and Aebersold, R.** (2002). Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **20**, 512-5.

6.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1 Phylogenetischer Stammbaum modifiziert nach (Allers and Mevarech, 2005) 2
- Abb. 2 Elektronenmikroskopisches Bild von *Picrophilus torridus* (von Michael Hoppert, Göttingen) 4
- Abb. 3 Reaktionsschema zur Bildung von chiralen Verbindungen durch NAD(P)H-abhängige Dehydrogenasen. Es entsteht als Produkt ein Alkohol wenn für das X ein Sauerstoffatom, steht und ein Amin, wenn es für NH steht. 6
- Abb. 4 Schema der Glycerol Oxidation 6
- Abb. 5 Die Aufgaben von Chaperonen in der Zelle. Nach der Synthetisierung von Proteinen am Ribosom werden diese entweder sekretiert, oder falten sich nach dem Loslösen vom Ribosom in ihre native Struktur. Stress, z.B. Hitzeschock macht die Proteine anfällig für Aggregatbildung, was ein Auflösen ihrer nativen Struktur bedeutet. Die Wechselwirkung mit Chaperonen kann die Bildung von Aggregation reduzieren. Durch das Zusammenspiel der Chaperone Hsp70 und Hsp100 können solche Aggregate zum Teil wieder aufgelöst werden. Dabei vermitteln die Chaperone Hsp70 und Hsp60 aktiv die Rückfaltung in die native Struktur. ATP-unabhängige Chaperone (Hsp90, Hsp25) binden entfaltete Proteine und halten sie so unterstützend in Lösung. Ist es nicht mehr möglich den nativen Zustand des Proteins zu erzielen werden sie durch Proteasen, die oft mit Hsp100 Chaperonen assoziiert sind, abgebaut. 8
- Abb. 6 Verbrauch der Protonen während der Decarboxylierung von Glutamat (a) und Arginin (b). Die Zahlen in Klammern geben die Ladung während des Prozesses an. Die roten Kreise markieren die Zugabe eines Protons. GABA = γ -amino Butyrat. Modifiziert nach (Foster, 2004). 11
- Abb. 7 DIGE System mit verschiedenen CyDye™ Floureszenz Farbstoffen (Ettan DIGE System Manuel, Amersham Biosciences) 16
- Abb. 8 A/B DNA-Ladder. A – 1 kb DNA Ladder, B – λ Hind III Ladder (Abb. aus <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/index.html>) 38
- Abb. 9 Übersicht zur Konstruktion einer Fosmidgenbank (Abb. s. Copy Control Fosmid Kit Manual Epicentre®) 41
- Abb. 10 Prinzip der Reinigung über MBP (Abb. s. pMAL™ Protein Fusion and Purification Manual, New England Biolabs) 60
- Abb. 11 Testprinzip der Aldehyd/Keton-Indikatorplatten. 64
- Abb. 12 Schema der Klonierung von verschiedenen Dehydrogenasen aus *P. torridus* in pBADmycHisA. 1. Restriktionsverdau des Vektors mit *Nco*I und PCR aus genomischer DNA mit den modifizierten Primern. 2. Auffüllen des Vektors zu glatten Enden 3. Restriktionsverdau von Vektor und PCR Fragmenten mit *Xho*I. 4. Ligation von Vektor und PCR Fragment. 70
- Abb. 13 Schema des pMalc2x-Konstruktes 72
- Abb. 14 Vektorkarte des pRARE Plasmids (Abb. s. Manual Competent cells, Novagen) 73
- Abb. 15 SDS-PAGE-Gel von der Expression von ORF RPTO00201 in *E. coli* Ros2(DE3) (pEX22b::201). Induktion mit 0,2 mM IPTG für 4 h; Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel. Spur 1 – Kontrolle, *E. coli* Ros2(DE3) pEX22b::201 ohne Induktion, Spur 2 – *E. coli* Ros2(DE3) pEX22b::201 lösliche Fraktion (Überstand, ÜS), induziert mit 0,2 mM IPTG für 4 Stunden, Spur 3 – *E. coli* Ros2(DE3) pEX22b::201 unlösliche Fraktion (Pellet) induziert mit 0,2 mM IPTG für 4 Stunden, Spur M – Molekularmassenstandard, A – Vergrößerung des Bereiches mit der Überexpression von RPTO00201 mit einem Molekulargewicht von 37 kDa nach Induktion mit 0,2 mM IPTG für 4 Stunden; der Pfeil markiert die lösliche Dehydrogenase im Überstand. 75
- Abb. 16 SDS-PAGE-Gel des Expressionsversuches von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 bei 37 °C mit 0,2 mM IPTG induziert. Das Gel ist Coomassie-gefärbt. Spur 1 – Rohextrakt von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 vor Induktion; Spur 2 - Rohextrakt von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 nach 4 Stunden Induktion mit 0,2 mM IPTG; Spur 3 – Überstand (lösliche Fraktion) von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 vor Induktion, Spur 4 – Überstand (lösliche Fraktion) von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 nach 4 Stunden Induktion; M – Molekularmassenstandard 76
- Abb. 17 Western Blot von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201. Spur 1 – lösliche Fraktion von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 nach 4 Stunden Induktion mit 0, 2 mM IPTG, Spur 2 - lösliche Fraktion von *E. coli* Ros 2(DE3) pMALc2x::201 ohne Induktion, Spur 3 - Rohextrakt von *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 ohne Induktion, Spur 4 – Rohextrakt von *E. coli* Ros2(DE3)

pMALc2x::201 nach 4 Stunden Induktion mit 0, 2 mM IPTG; M – prestained Molekularmassenstandard; detektiert wurde mit Anti-MBP-Antikörper. 77

Abb. 18 Vektorkarten der verschiedenen Chaperon-Konstrukte aus dem Takara Plasmid Set. A – pG-KJE8, Chaperon 1 (C1), B – pGro7, Chaperon 2 (C2), C – pKJE7, Chaperon 3 (C3), D – pG-Tf2, Chaperon 4 (C4), E – pTf16, Chaperon 5 (C5) (Abb. s. Manual Chaperone Plasmid Set, Takara) 78

Abb. 19 SDS-PAGE-Gel der Coexpression von pBAD::201 mit C1 (pG-KJE8) in *E. coli* BL21 RS. Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel; Spur 1 – Kontrolle, *E. coli* BL21 RS pBADmycHisA + C1 uninduziert; Spur 2 – *E. coli* BL21 RS pBADmycHisA + C1, Induktion mit 0,4 % L-Arabinose und 10 ng/ml Tetrazyklin; Spur 3 – *E. coli* BL21 RS pBADmycHisA + C1, Induktion mit 0,4 % L-Arabinose; Spur 4 – *E. coli* BL21 RS pBADmycHisA + C1, Induktion mit 10 ng/ml Tetrazyklin; Induktion jeweils dargestellt im Rohextrakt, Überstand (lösliche Fraktionen) und Pellet; Spur M - Molekularmassenstandard 81







Abb. 20 Relative Aktivität der Glycerol-Dehydrogenase in der löslichen Fraktion coexprimiert mit C1-5 aus BL21 RS pEX::201 C1-5.  - Aktivität aus dem Überstand mit NAD⁺ als Cofaktor,  - Aktivität aus dem Überstand mit NADP⁺ als Cofaktor,  - Aktivität aus dem Überstand nach Hitzefällung mit NAD⁺ als Cofaktor,  - Aktivität aus dem Überstand nach Hitzefällung mit NADP⁺ als Cofaktor,  - Aktivität aus dem Überstand nach Hitzefällung mit NAD⁺ als Cofaktor und Ammoniumsulfat als potentieller Aktivator,  - Aktivität aus dem Überstand nach Hitzefällung mit NADP⁺ als Cofaktor und Ammoniumsulfat als potentieller Aktivator. Die Glycerol-Dehydrogenase aus pEX::201 wurde jeweils mit C1, C2, C3, C4 und C5 coexprimiert. C1-5 – Chaperone 1-5 (s. Abb. 18). Die Negativkontrolle (BL21 RS pEX::201 C1-5, uninduziert) wurde mit den Werten verrechnet. n = 3 83






Abb. 21 Spezifische Aktivität der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase im hitzegefällten Überstand (ÜS) aus BL21 RS pEX::201 C1-5 coexprimiert mit Plasmid C1-5 bei verschiedenen Temperaturen.  - spezifische Aktivität von pEX::201 coexprimiert mit Plasmid 1,  - ~ coexprimiert mit Plasmid 2,  ~ coexprimiert mit Plasmid 3,  - ~ coexprimiert mit Plasmid 4,  - ~ coexprimiert mit Plasmid 5. C1-5 s. Die Negativkontrolle (BL21 RS pEX::201 C1-5, uninduziert) wurde mit den Werten verrechnet. n = 3 85




Abb. 22 Spezifische Aktivität der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase aus *E. coli* BL21 RS pEX::201 coexprimiert mit Chaperonplasmiden 1 oder 5. Induktion von pEX::201 erfolgte 2 Stunden nach der Induktion der Chaperonbildung mit 0,3 mM IPTG ü.N.  - spezifische Aktivität von pEX::201 coexprimiert mit C1  - ~ coexprimiert mit C5  - Kontrolle, BL21 RS C1, n = 3 87

Abb. 23 Carbonylindikatorplattentests mit ECL 707 pEX::201 C1-C5. C1-C5: Klone ECL 707 pEX::201, die jeweils mit den Chaperonen C1-5 coexprimiert wurden. K: Kontrolle ECL 707 88

Abb. 24 Glycerol-Dehydrogenase Aktivitätstest auf Carbonylindikatorplatten. A – ECL 707 T7 pEX::201 C1; B - ECL 707 T7 pEX::201 C2; C - ECL 707 T7 pEX::201 C4; D - ECL 707 T7 pEX::201 C5, A – D ECL 707 pEX::201, ECL 707 89

Abb. 25 Spezifische Aktivität und Proteinkonzentration der Fraktionen 10-26 nach Aufreinigung der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase aus BL21 RS C1 pEX::201 über Source 15S. 90

Abb. 26 SDS-PAGE-Gel nach Aufreinigung und Protease Faktor Xa-Behandlung des Fusionsproteins MBP-201. Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel, Spur 1 – Durchlaufaktion von der Amylose-Gravitationsäule, Spur 2 – lösliche Fraktion aus *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201, Spur 3 – Waschfraktion der Amylose-Gravitationsäule, Spur 4 – 7 Elutionsfraktionen 1-4, Spur 8 – 13 Elutionsfraktion 2 nach Faktor Xa Protease-Behandlung nach 1 h; 2 h; 3 h; 4 h; 6 h; ü.N. Inkubation bei RT; Der Rahmen zeigt die 37 kDa Bande von RPT000201. 92




Abb. 27 spezifische Aktivität der *P. torridus* Glycerol-Dehydrogenase nach Aufreinigung aus *E. coli* Ros2(DE3) pMALc2x::201 über Amylose Gravitationsäule und Spaltung mit Faktor Xa Protease bei verschiedenen Temperaturen.  - spezifische Aktivität in Natriumacetat-Puffer, pH 7 bei 40, 50 und 60 °C;  - spezifische Aktivität Natriumacetat-Puffer, pH 5 bei 40, 50 und 60 °C;  - spezifische Aktivität in Natriumacetat-Puffer, pH 6 bei 40, 50 und 60 °C. n = 3 93

Abb. 28 Restriktionsverdau von 10 ausgewählten *P. torridus* Fosmidklonen mit *Bam*HI (A) und *Eco*RI (B). M1 – 1 kb DNA Ladder; M2 – λ *Hind*III DNA Marker; Spur 1 – ein unverdauter Fosmidklon aus der Fosmidgenbank; Spur 2-11 Bandenmuster des Restriktionsverdaus von 10 verschiedenen Fosmidklonen mit *Bam*HI (A) und *Eco*RI (B) 96

- Abb. 29 Dehydrogenase-Aktivitätstest mit Fosmidgenbank Platte I mittels Carbonylindikator und Ethanol als Substrat. Kleine schwarze Kreise markieren potentiell positive Klone, die bei dreifacher Wiederholung deutlich positiv waren. Der große ovale Kreis zeigt die Negativ-Kontrollen Epi FosT300 Zellen ohne Insert. 97
- Abb. 30 Dehydrogenase-Aktivitätstest auf Nativ-PAGE mit *P. torridus* Fosmidklonen. Spur 1 – Klon C7 von Platte I; Spur 2 – Klon E1 von Platte 3; Spur 3 – positiv Kontrolle (pAK::108, Doktorarbeit Anja Knietsch); Spur 1-3 Aktivitätstest mit 1,2-Propandiol als Substrat in Phosphat-Puffer, pH 6.1; Spur 4 – positiv Kontrolle mit Glycerol als Substrat in Phosphat-Puffer, pH 6.1; Spur 5 – Klon B7 von Platte I mit Glycerol als Substrat in Phosphat-Puffer, pH 6.1. 98
- Abb. 31 Übersicht über das „Mapping“ der Sequenzbereiche eines potentiell aktiven Klons am Beispiel von Klon H1 (I). 99
- Abb. 32 Biologische Replika von *P. torridus* Zelllysate aus der mittleren logarithmischen Phase, gewachsen unter optimalen Bedingungen pH 1 und 60 °C auf einem coomassie-gefärbtem 12 %igen Polyacrylamidgel. Aufgetragen 350 µg Protein gesamt. IPG 4-7. 102
- Abb. 33 A/B Coomassie-gefärbte 12 % Polyacrylamidgelle mit *P. torridus* Zelllysate aus der mittleren logarithmischen Phase, optimal gewachsen bei pH 1 und 60 °C. Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgte über IPG 4-7 (A) und IPG 3-10 (B). Aufgetragen 300 µg Protein gesamt. 102
- Abb. 34 A/B 12 % Polyacrylamidgelle mit *P. torridus* Zelllysate (A) und der aufgereinigten Zellmembran (B) aus der mittleren logarithmischen Phase, optimal gewachsen bei pH 1 und 60 °C. Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgte über IPG 3-10. Aufgetragen 350 µg Protein gesamt (A) und 200 µg Protein gesamt (B). 103
- Abb. 35 Ausschnitt aus einem Coomassie gefärbtem 12 %igen 2D Gel. Die roten Rahmen zeigen gleiche Proteine, die durch posttranslationale Modifizierung in Ketten auf dem Gel erscheinen. 105
- Abb. 36 Einteilung der identifizierten Proteine des Mastergels in ihre funktionellen Kategorien. 105
- Abb. 37 Mastergel. Gesamtprotein aus dem Zelllysate von *P. torridus*. Aufgetrennt über einen IPG von 3-10 und in der 2. Dimension über ein 12 % SDS Gel. Zu erkennen sind Coomassie-gefärbte Spots mit der zugehörigen Annotation. Darstellung aus Delta 2D (Decodon) 107
- Abb. 38 Ausschnitt aus der Delta-2D-Datenbank 108
- Abb. 39 Vergleich der Geldaten mit den Genomdaten. Verglichen wurde der prozentuale Anteil der Proteine an einer funktionellen Kategorie. Rote Balken zeigen den Verlauf, wie es den Anteilen laut Genom entspricht und blaue Balken zeigen die Verteilung wie es auf dem Mastergel repräsentiert ist. 110
- Abb. 40 Vergleich der Gele von Proben aus der exponentiellen Phase mit Proben aus der stationären Phase. In rot ist die stationäre Phase dargestellt, in grün die exponentielle Phase. Markiert sind die in der stationären Phase mind. zweifach überexprimierten Spots. 112
- Abb. 41 A/B Bestimmung der Verdopplungszeit von *P. torridus* bei unterschiedlichen pH-Werten (A) und bei unterschiedlicher Temperatur (B). 113
- Abb. 42 Experimenteller Aufbau zur Analyse der Stressinduktion bei *P. torridus* 114
- Abb. 43 Wachstumskurven von *P. torridus* in verschiedenen Zellkulturvolumen und verschiedenen Erlenmeyerkolbengrößen 116
- Abb. 44 Übersicht der Schritte zur Auswertung der 2D Experimente 117
- Abb. 45 Übersicht über ein hypothetisches Projekt in Delta 2D (Decodon). Eine Bedingung stellt eine Gruppe dar und ist durch eine Farbe gekennzeichnet. 119
- Abb. 46 A/B. Zwei Gele (Gel 1 in mit blauen Spots und Gel 2 mit orangenen Spots) die übereinandergelegt werden um Laufunterschiede auszugleichen. A: vor dem übereinanderlegen. B: nach dem Übereinanderlegen 119
- Abb. 47 A-D Warping der Gele von den biologischen Replika der Experimente Stress pH 0,5 (A), pH 1,8 (B), 50 °C (C) und 70 °C (D). 120
- Abb. 48 Scatterplot eines hypothetischen Projektes 122
- Abb. 49 Quantifizierungstabelle eines hypothetischen Projektes 122
- Abb. 50 Expressionsprofile der überexprimierten Spots 123
- Abb. 51 Anzahl der hochregulierten Proteine nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei pH 0,5 für 10, 40 und 130 min. 124
- Abb. 52 Anzahl der hochregulierten Proteine nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei pH 1,8 für 10, 40 und 130 min. 126
- Abb. 53 Anzahl der hochregulierten Proteine nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei 50°C für 5, 35 und 125 min. 128

- Abb. 54 Anzahl der hochregulierten Proteine nach Inkubation von *P. torridus* Zellen bei 70°C für 5, 35 und 125 min. 129
- Abb. 55 Multiple Alignment der 50 bp upstream Bereiche der überexprimierten Spots bei pH 0,5. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>). 131
- Abb. 56 Dominanz der Basen des Motivs aus dem multiplen Alignment von pH 0,5. Darstellung als Weblogo Motiv. 132
- Abb. 57 Übersicht über die Position des gefundenen Motivs bei pH 0,5. Die Zahl beschreibt, um welches Motiv es sich handelt und +/- auf welchem Strang sich das Motiv befindet. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>). 132
- Abb. 58 Multiple Alignment der 50 bp upstream Bereiche der überexprimierten Spots bei pH 1,8. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>). 133
- Abb. 59 Dominanz der Basen des Motivs aus dem multiplen Alignment von pH 1,8. Darstellung als Weblogo Motiv 133
- Abb. 60 Übersicht über die Position des gefundenen Motivs bei pH 1,8. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>). 133
- Abb. 61 Motiv 1 des multiplen Alignment der 50 bp upstream Bereiche der überexprimierten Spots bei 50 °C. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>). 134
- Abb. 62 Dominanz der Basen des 1. Motivs aus dem multiplen Alignment von 50°C Darstellung als Weblogo Motiv. 134
- Abb. 63 Motiv 2 des multiplen Alignment der 50 bp upstream Bereiche der überexprimierten Spots bei 50 °C. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>). 134
- Abb. 64 Dominanz der Basen des 2. Motivs aus dem multiplen Alignment von 50°C Darstellung als Weblogo Motiv. 134
- Abb. 65 Übersicht über die Position des gefundenen Motivs bei 50 °C. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>). 135
- Abb. 66 Motiv des multiple Alignment des 50 bp upstream Bereiches der überexprimierten Spots bei 70 °C. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>). 135
- Abb. 67 Dominanz der Basen des Motivs aus dem multiple Alignment von 70°C Darstellung als Weblogo Motiv. 135
- Abb. 68 Übersicht über die Position des gefundenen Motivs bei 70 °C. Darstellung exportiert aus MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.htm>). 136
- Abb. 69 Übersicht über die Proteinproduktion ohne (A) und mit (B) optimierten Mengen an Chaperonen in der Zelle. (A) Es kommt verstärkt zu Missfaltung und Aggregation, da nicht genügend Chaperone vorhanden sind. (B) Co-Expression von Chaperongen mit dem Gen für das rekombinante Protein, wodurch mehr Chaperone für die Proteinfaltung zur Verfügung stehen und somit mehr lösliches rekombinantes Protein hergestellt werden kann. 141
- Abb. 70 Ausschnitt der SWISS-2D-Datenbank mit einer Übersicht der Anzahl der Spots, die über 2D-PAGE für verschiedene Organismen aufgetrennt werden konnten und wie viele davon bis zu dem dort genannten Zeitpunkt identifiziert werden konnten. CSF, Cerebrospinal fluid; DICTYSLUG, *Dictyostelium discoideum*; ELC, Erythroleukemia cell line; ECOLI, *Escherichia coli*; HEPG2, hepatoblastoma carcinoma derived cells; HEPG2SP, hepatoblastoma carcinoma derived cell line secreted proteins; HL60, promyelocytic leukaemia derived cells; RBC, red blood cells; U937, macrophage like cell line; YEAST, 150
- Abb. 71 A/B Vergleich der Proteine, die auf einem 2D-Gel repräsentiert sind mit denen, die laut Genomsequenzierung erwartet werden, in der Einteilung in ihre funktionelle Kategorie A) *P. torridus* B) *S. solfataricus* 152
- Abb. 72 Schema der Proteinaktivität von Thioredoxin. A) Thioredoxin als Reduktase b) Thioredoxin als strukturelles Element modifiziert nach (Kumar et al., 2004) 158
- Abb. 73 Überlappungen der verschiedenen Stress-Stimulationen. Stress-induzierte Proteine überlappen in verschiedenem Ausmaß (A-E). Jeder Grauton repräsentiert ein Stress-Stimulon (modifiziert nach (Ran Rosen, 2002)) 163
- Abb. 74 Überlappung der identifizierten Proteine bei den verschiedenen Stress-Experimenten mit *P. torridus*. Die Überlappungen sind durch Farbcodierungen dargestellt. Deren zugehörige Proteine sind in der nebenstehenden Tabelle aufgeführt. 164

6.3. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Verwendete Organismen	20
Tab. 2:	verwendete Plasmide	21
Tab. 3	verwendete Oligonukleotide	22
Tab. 4	Konzentration der verwendeten Medienzusätze	23
Tab. 5	pH Einstellung des Brock Mediums	25
Tab. 6	Verdünnungen zur Bestimmung des Phagentiters	43
Tab. 7	Pipettierschema 10% SDS Gel	45
Tab. 8	HMW Marker	46
Tab. 9	IEF Programm	52
Tab. 10	Pipettierschema 12% Polyacrylamidgel	53
Tab. 11	Übersicht über das TakaRa Chaperon Plasmid Set®	58
Tab. 12	Übersicht über die erwarteten Fragmente des Kontroll-Restriktionsverdaus. Die Zahlen 1-4 beschreiben das jeweilige verdaute Konstrukt. Rote Sterne zeigen positive Klone des jeweiligen Konstruktes an.	71
Tab. 13	Übersicht über die Expression der pBAD <i>mycHisA</i> -Dehydrogenase-Konstrukte	74
Tab. 14	Übersicht über die durchgeführten Expressionsversuche	80
Tab. 15	Ergebnisse der Expressionsversuche und Aktivitätsbestimmungen der Glycerol-Dehydrogenase (RPTO00201) in verschiedenen Konstrukten	94
Tab. 16	Übersicht der potentiell Dehydrogenase-positiven Klone aus der <i>P. torridus</i> Fosmidgenbank	97
Tab. 17	Klone, die nach Nativ-PAGE im Dehydrogenase-Aktivitätstest aktiv waren	98
Tab. 18	Sequenzierung der potentiell Dehydrogenase-positiven <i>P. torridus</i> Fosmidklone. Grau unterlegt sind die Klone, bei denen in den klonierten Sequenzbereichen auch Dehydrogenasen annotiert sind.	99
Tab. 19	Übersicht über den relativen prozentualen Anteil der auf dem Mastergel repräsentierten Proteine an dem Gesamtproteom (laut Genomsequenz)	109
Tab. 20	Übersicht der überexprimierten Spots in der stationären Phase	111
Tab. 21	Übersicht über die 2D Gele, die mittels Delta 2D ausgewertet wurden	117
Tab. 22 A-C	Übersicht über alle hochregulierten Spots bei der Stressinduktion mit pH 0,5 für 10 min (A), 40 min (B) und 130 min (C). Die grau unterlegten Zeilen zeigen Protein, die entweder bei zwei Zeitpunkten, oder bei allen drei Zeitpunkten überexprimiert sind.	124
Tab. 23 A-C	Übersicht über alle hochregulierten Spots bei der Stressinduktion mit pH 1,8 für 10 min (A), 40 min (B) und 130 min (C). Die grau unterlegten Zeilen zeigen Protein, die entweder bei zwei Zeitpunkten, oder bei allen drei Zeitpunkten überexprimiert sind.	126
Tab. 24	Übersicht über alle hochregulierten Spots bei der Stressinduktion 50°C für 125 min	128
Tab. 25 A/B	Übersicht über alle hochregulierten Spots bei der Stressinduktion 70°C für 35 min (A) und 125 min (B)	130
Tab. 26	Klassifizierung der Proteine, die durch Temperatur- (50 °C/ 70 °C) und pH- Stress (pH 0,5/ pH 1,8) mindestens zweifach überexprimiert auf 2D-Gelen zu verschiedenen Zeiten identifiziert wurden	155
Tab. 28	Orfs mit Annotationen der sequenzierten <i>P. torridus</i> Fosmidklone	190

6.4. SEQUENZEN ORFs

Im Folgenden sind die DNA Sequenzen der klonierten *P. torridus* ORFs dargestellt.

RPTO000201 chromosome_191398_192450

```

1 ATGAATTTCA ACAAGATAAA GAGCATGCAC TTCCCAAGCG ATGTTTACAT
51 AGGTCACGAT GCAATTTTAA ATATAGGCAG TGTTGTTTCA AAGTTCTTAA
101 AGTCAGGCGA GGTTCCTTTA ATAACCGGTG AAAACACATA TAATATAGCT
151 GGCAAAAAGG TTCTATCAAA TTAAATGAT TTTGATGTTA ATGTAATAAT
201 AGCATCCAGG GCAACAAGGG ATTCAATAAA AAGCATAGAG GAATCTTTGA
251 AAAACAGGAG ATCAGGTATA GTGCTTGGTG TTGGCGGTGG CTCCAAAATA
301 GATATAGCAA AGAAGATAGC ATATGATTG GGCATACCTT TTATAAGTGT
351 GCCAACAAACG CCAAGCCATG ATGGCATAGC ATCTCCAAGG GCATCAATAT
401 ATGATGGCAA ATCTGTTTAC TCCGAGGAGG CAACGATGCC GTCGGCAATA
451 GTTGC GGACA CATCAATAAT GGTTCCTTGA CCTTACAGAT ACGTTGCCGC
501 AGGCGCGGCA GATGTAATAT CAAATATAAC AGCGGTTCTT GACTGGAAGC
551 TTGCAAACCG TTTAAAGGGG GAGGAATTCA GCAGCACGGC TGCCGTTATG
601 TCTGAATACG CCGGAAGGGA GCTGATTGAA AGATCATCAA TGATCCAGCC
651 CGGGCTTGAG GAAAGCATAT GGCTTGTAAC AAAGCAGATA CTGGCCTCTG
701 GCGCAGCCAT GGCCATAGCA GGCAGTTCCA GGCCTGCAAG TGGCAGCGAG
751 CACCTGTTCT CGCATGCAAT AGAAATACTT GGTCCTGGCA GCTCAATACA
801 TGGTGAGCAG TGTGCCATGG GATCCTTAAT ATCAATGTAC CTTACGGCG
851 GGGACTGGGA GCTTTTAAAA AATACATACA GAAAAATAGG GTTAAACACA
901 AGGGCAGAAT CCTATGGAAT AGGCAGGGAG GTAGCAATAA AGGCATTAAG
951 CATAGCACAC AGGATAAGGC CATCAAGGTA CACCATACTT GGTGAAAGCG
1001 ATTTATCATA CAATGTTGCA GAAAGAATAT TATCAATAAC AGGAATTATA
1051 TAA

```

RPTO000605 chromosome_576795_577805

```

1 ATGAAGGCAA TGGTACTAGA AAAGGTAGGA AAAGTGGAGG AAAATCCATT
51 AAAATACAAG GACGTTGATA TAAAGAAGCC AGAGGGTTTT GAAATTTTGA
101 TAAAAAACCT TGCCGTGTGGT GTATGCCATT CAAATCTGCA TATGATAGAG
151 GGGGACTGGG TTCAGTACGG TCTTCCTGGA AAATCAAATA TAATCCGGG
201 CCACGAGATA ATCGGCCGCG TTGAGGAGCT TGGCGATAAT GTTACAGATT
251 TAAAGAAGGG TGATATAGTC GGTCTTCAGC CACTTTACAG TGCATGTGGA
301 AAGTGTGAGT ACTGTTTATC CGGCAGGGAG CATCTATGCC CATATGGTAA
351 ATGGACCGGT GAAACCGTTG ATGGCGGCTA TGCAGAATAC ATGATAGCCG
401 ATTCAAGGTA CGTTAATAAG GTTCCATCAA ACATAGACCC GGTTAATGCA
451 CCATTATTCT GCCCGGGTGT TACAGCATAT ACTGCGGTAA AAAAAGCAGA
501 ACTATCGCCA GACAAGACTG TTTACATAGT TGGAATAGGC GGTGTCGGTC
551 ACATAGCACT GCAGATAGCA AAGCTTTACG GTTCAAGGGT TGTTGCTGTA
601 ACAACATCAA AGAACCATGA GGATCTTGCA TATAAGATGG GCGCCGATGA
651 TGTTGTAATC ATGGACCGCA ACTATGAAAA TGCCGACATG CTCGCAAAGA
701 CTGCAGATGC TGCAATAATC TTTGCGCCTG CCGATGCTGC AATAAAGAAC
751 TCAATAAAGT TTGTAAAGGA CGGCGGTGTT GTTGTTCAGG GAGTTCGTGG
801 CAACCAGGGT GAGTTTGATT TTACAAGGGA GTTAAAAATT AAGGGATCAA
851 AGATCGGCAC AAGGCAGGAC ATGAACGAGG TATTAAAGCT TGCAGCAGAT
901 GGTAAAATAA AGGTCGAGTC GAAAACATAT AAAC TGAGG AGGCAAATGA
951 GGCTTTAAAG GCCTTAAAGC ATGGCGAGGT AAACGGCAGG GCCGTTCTTA
1001 AGATGTATTA A

```

RPTO001123 chromosome_1131479_1130715

```

 1 ATGCGGGGCC TTAAAAATAA AAATGTTATA GTAACAGGTG GTTCAAAGGG
51 CATTGGTGCT GCAATAGTAT CAAGATTTAT GGATGAGGGT TCAAATGTCT
101 TTTCAATATC AAGAAGTATG CCTGAAAAAA TGATAAATAA AGTAAAATAT
151 CTAAAATGCG ACGTTTCAAA TGAGGATGAA GTTTACAATA CAATAAATGA
201 GATATCGTCA CAGTGCGGGA ATATCGATGT ACTTGTTAAC AACGCCGGCA
251 TTGAAAAATA TGCCAGCCTT GGAAAAACAG ATTCAGGGAC ATGGAATGAG
301 ATAATAAACA CAAACATGAA CAGTGTATTT TATGTATCAA GGGAGGTAAT
351 AAAACACATG AAAACAGGCT CAATTGTAAA TGTATCATCT GTTCAGGCCG
401 ATATTGTTAC CAGAAACGCA GCGGCATACG TAACATCAA ACATGCAATA
451 ATAGGAATAA CAAAGAGCAT TGCCGTTGAT TATGCACCAG CGATAAGGTG
501 CAATGCAGTT CTTCCAGGAA CAATAGATAC ACCACTTGTT GATATGGCTG
551 CAATGCTTGA GGTGGAAAA GACCCGAAA AGATAGCAAG AAAGAAGCTT
601 GAATGGGGCA ATCTATATCC AATGAAGCGG ATCGGCAGGC CTGATGAGGT
651 TGCATCCGTT GTTGCATTTT TTGCATCAGA TGAATCATCA TTTATAACCG
701 GATCATCAAT ATATGTTGAC GGTGGTCTCA GCGTTCCTGC ACCTGTGAGC
751 ACACCAGATA AATAA

```

RPTO001538 chromosome_1539840_1540898

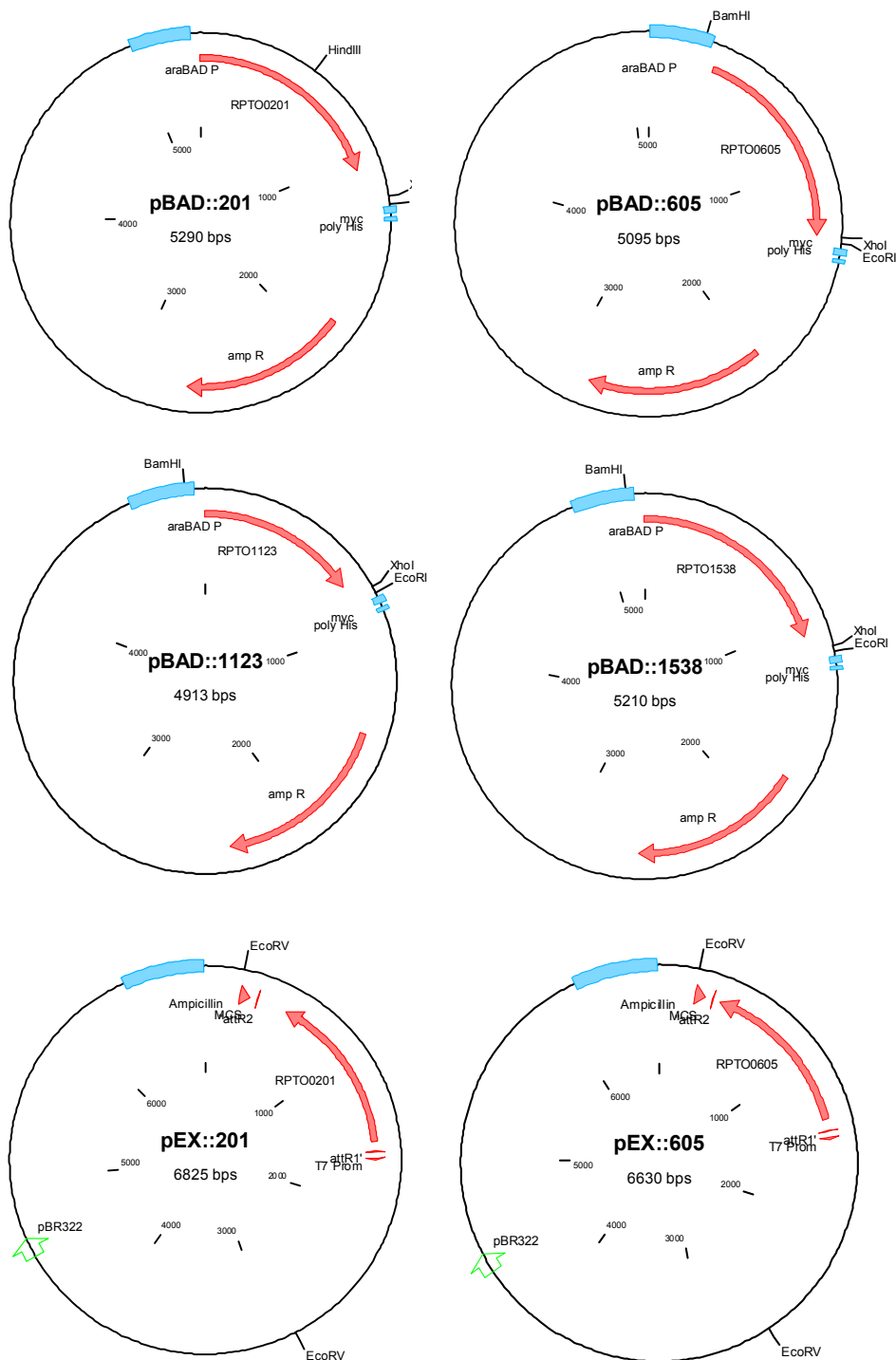
```

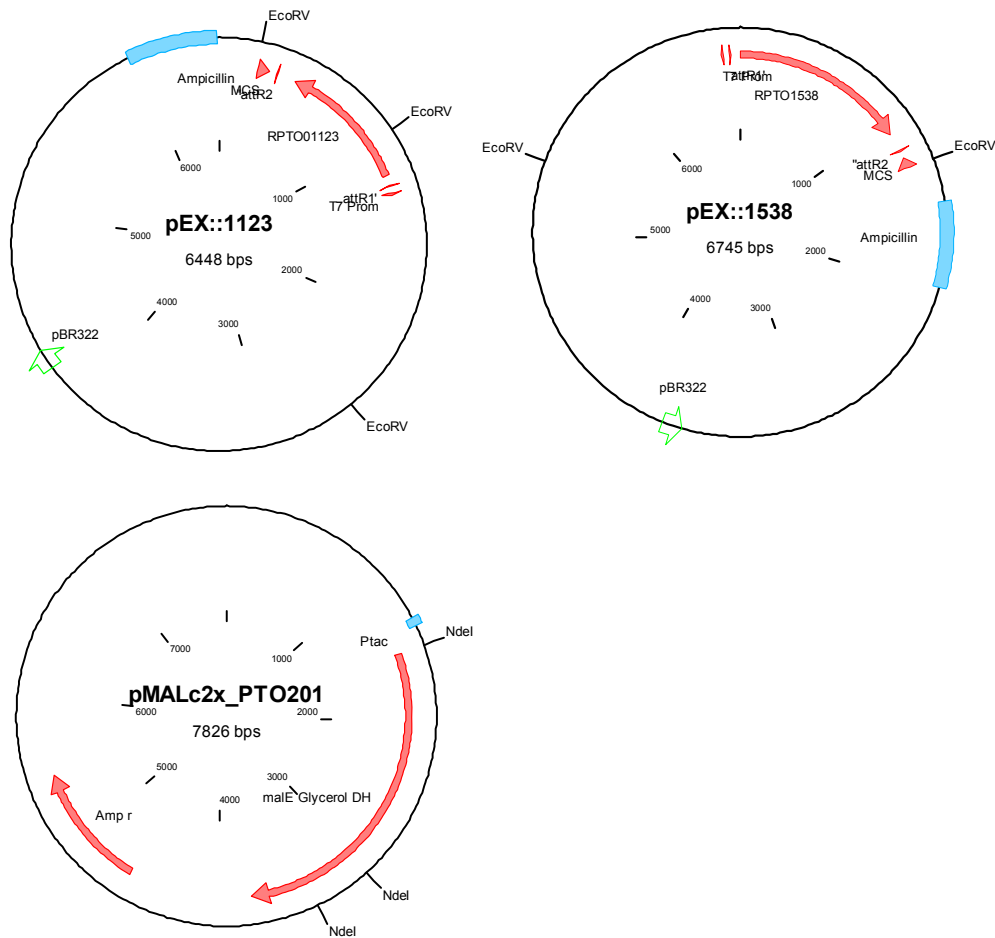
 1 ATGAAGGCAA TAATAGTTCA TCCTCCAGGA GCCGGGGTAT CAATAGAAGA
51 TGTAACATT AACGGCAACG GTCCAGGGAT AAAAAATCCTG GAGAATGGCA
101 TATGTGGAAC GGACCGTGAG ATAGTAAACG GTGAGCTTTC GGCGGCCACA
151 TCATTAAATG GCTTCTGGT GCTTGGCCAT GAGGCTTTAG GCATTCTTGA
201 GGAGGATACA AAGAATTTAA GAAAGGGCGA TCTTGTCATG CCGATAACA
251 GAAGGGGCTG TGGCAGGTGT CTTAACTGCA TGCTTGGAAG GCCAGATTTT
301 TGTGAAACGG GTGAGCAGCT TGAGGCAGGC ATAAGCGGCA TGCACGGTTT
351 CATGCGTGAA TACATAACG ACGATGAAAG GTATCTTGTT AAGGTTCCAG
401 ACGTGATAAG GGACATTGCA ATAATGGCCC AGCCACTTGC AGATCTTGAA
451 AAATCCATAG AGGAAATGAT AAGCATAACG AAGAGACTGC ACTGGCCATG
501 CATTGATGGA ACCTACAATT GCAGAAAGGT TCTTATAACA GGAACAGGCA
551 CAATAGGCAT ACTTTTGGCA ATGCTTTTAA AGACCTACGG CTTCAGTGTT
601 TATATATCAA ATAAAAGAGA GCCAAATGAC ATTGAATCCA AAATATTCGA
651 TGAGCTTTCA GTAAAATACA AAAATTTATC AAATAAATA GATGAAAGTT
701 TTGATGCGAT AATAGAGGCA TCAGGCTCTG GCACAGATGT TATAGAAAGA
751 ACACTGCCAT TACTTAAGAA CAATGGTTTT TATGGAATCT TCGGCTTTGA
801 AAAACAGGC ACATTGAATT TAACATCTGA ATTTTACAG GGCATCGTTT
851 ATAAATCAAT AAATATAACA GGCCTTATAA ATGGCCAGAA ACCTCACATG
901 GAGATGGCGA TGAACCATCT AATACAGTGG AAAAAACAAT TCCAAAAAC
951 AACGTCAATG ATGATAACAG AAAAGGTTTC AATAACAAT GAAAGGAGAT
1001 TAAAGGAGGT CCTTCAAAA AAGAGACCAG GTGAGATAAA GATAAAAATA
1051 ATATGGTAA

```

6.5. VEKTORKARTEN

Die folgenden Abbildungen stellen die Konstrukte mit den klonierten *P. torridus*-Dehydrogenase-ORFs dar.





6.6. SEQUENZEN FOSMIDBANK

In der folgenden Tabelle sind die ORFs mit den Annotationen der sequenzierten potentiell positiven Klone aus der *P. torridus* Fosmidgenbank dargestellt (s. 3.4.4).

Tab. 27 Orfs mit Annotationen der sequenzierten *P. torridus* Fosmidklone

Klon	Insertgröße	Orfs mit Annotation
I H1	ca. 35 kbp	235 hypothetical membrane protein
		236 DNA REPAIR HELICASE (RAD3/RAD15/XPD FAMILY)
		237 Hypothetical Exported Protein (PQQ-dependent)
		238 Dihydropolipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4)
		239 CBS domain containing protein
		240 Citrate synthase (EC 4.1.3.7)
		241 METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.-)
		242 TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
		243 Asparaginyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.22)
		244 Succinyl-CoA synthetase
		245 DNA-directed RNA polymerase subunit M (EC 2.7.7.6)
		246 Signal recognition particle protein srp54
		247 Geranylgeranyl hydrogenase

		248 Ferredoxin
		249 Endonuclease III (EC 4.2.99.18)
		250 Carbamoyl-phosphate synthase (EC 6.3.5.5)
		251 Carbamoyl-phosphate synthase small chain (EC 6.3.5.5)
		252 hypothetical archaeal protein
		253 hypothetical protein
		254 hypothetical membrane protein
		255 hypothetical membrane protein
		256 hypothetical protein conserved in archaea
		257 Ribose-phosphate pyrophosphokinase (EC 2.7.6.1)
		258 Gluconolactonase (EC 3.1.1.17)
		259 Conserved Protein (Archaea) with ACT-Domain
		260 hypothetical archaeal protein
		261 3-isopropylmalate dehydrogenase (EC 1.1.1.85)
		262 3-isopropylmalate dehydratase small subunit (EC 4.2.1.33)
		263 3-isopropylmalate dehydratase large subunit (EC 4.2.1.33)
		264 2-isopropylmalate synthase (EC 4.1.3.12)
		265 conserved hypothetical membrane protein involved in antibiotic resistance
		266 hypothetical membrane protein
		267 hypothetical archaeal membrane protein
		268 "ABC transporter, ATP-binding protein"
		269 Glutamyl-tRNA reductase (EC 1.2.1.-)
		270 "DNA POLYMERASE, BACTERIOPHAGE-TYPE "
		271 hypothetical membrane protein
II D6	31 kbp	626 Amino acid permease
		627 Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)
		628 Phosphoglycerate mutase (EC 5.4.2.1)
		629 Hypothetical Protein
		630 Metallo-beta-lactamase
		631 Hypothetical Protein
		632 Hypothetical Protein
		633 Hypothetical Protein
		634 Nucleoside-Diphosphate-Sugar Epimerase
		635 Transporter
		636 Dihydrodipicolinate synthase (EC 4.2.1.52)
		637 SSU ribosomal protein L7AE
		638 SSU ribosomal protein S28E
		639 Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)
		640 Sodium/Calcium Exchanger Protein
		641 Protein Translation Initiation Factor 5B (IF-5B)
		642 S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (EC 4.1.1.50)
		643 Transcriptional regulator
		644 Thiamin-phosphate pyrophosphorylase (EC 2.5.1.3)
		645 AIR Synthase (EC 6.3.3.1)
		646 PHOSPHOMETHYLPYRIMIDINE KINASE (EC 2.7.4.7) / HYDROXYMETHYLPYRIMIDINE KINASE (EC 2.7.1.49)
		647 Molybdopterin biosynthesis MoeA protein
		648 Molybdopterin biosynthesis MoeA protein
		649 Molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein A
		650 Hypothetical Membrane Spanning Protein
		651 Hypothetical Protein
		652 Tricorn protease interacting factor F3 (EC 3.4.11.-)

		653 Histidinol-phosphate aminotransferase (EC 2.6.1.9)
		654 Hypothetical Membrane Spanning Protein
		655 Ferredoxin
		656 Cytochrome C Oxidase Assembly Factor
		657 Transporter
II A1	31 kbp	1283 hypothetical protein DUF655
		1284 DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE SUBUNIT F (EC 2.7.7.6)
		1285 LSU ribosomal protein L21E
		1286 hypothetical conserved protein
		1287 DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE SUBUNIT P (EC 2.7.7.6)
		1288 LSU ribosomal protein L37AE
		1289 Ribonuclease PH (EC 2.7.7.56)
		1290 Ribonuclease PH (EC 2.7.7.56)
		1291 3'->5' exoribonuclease
		1292 Ferredoxin like protein
		1293 hypothetical conserved protein
		1294 Probable electron transfer flavoprotein-quinone oxidoreductase ydiS (EC 1.5.5.-)
		1295 hypothetical membrane protein
		1296 hypothetical peptidase
		1297 hypothetical oxidoreductase (DUF224)
		1298 iron-sulfur cluster-binding protein
		1299 hypothetical alkyl hydroperoxide reductase
		1300 hypothetical DUF75 protein
		1301 Protein Translation Initiation Factor 2 subunit alpha (IF-2a)
		1302 SSU ribosomal protein S27E
		1303 LSU ribosomal protein L44E
		1304 hypothetical protein
		1305 PROTEIN SECRETION CHAPERONIN CSAA
		1306 hypothetical membrane protein
		1307 Isoleucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.5)
		1308 METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.-)
		1309 DNA-directed RNA polymerase subunit L (EC 2.7.7.6)
		1310 hypothetical protein
		1311 Protein Translation Elongation Factor Tu (EF-TU)
		1312 SSU ribosomal protein S10P
		1313 Protein Translation Elongation Factor
		1314 Threonine synthase (EC 4.2.99.2)
		1315 OsmC-like protein
		1317 ArsS family-protein
		1318 Heat shock protein
		1319 deaminase (EC 3.5.4.-)
		1320 Alanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.7)
		1321 hypothetical Zinc metalloprotease (EC 3.4.24.-)
		1322 asparaginase (EC 3.5.1.1)
		1323 Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC 1.1.1.42)
		1324 Fumarate hydratase (EC 4.2.1.2)
		1325 "TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN, ASNC FAMILY"
		1326 hypothetical oxidoreductase (EC 1.8.-.-)
II A7	37 kbp	213 Tricorn protease interacting factor F2 (EC 3.4.11.-)
		214 hypothetical protein

		215 Cytochrome ubiquinol oxidase subunit I (EC 1.10.3.-)
		216 hypothetical membrane protein
		217 DNA-directed RNA polymerase subunit E' (EC 2.7.7.6)
		218 DNA-directed RNA polymerase subunit E (EC 2.7.7.6)
		219 archaeal conserved hypothetical protein
		220 SSU ribosomal protein S24E
		221 SSU ribosomal protein S27AE
		222 hypothetical protein
		223 "replication factor C, large subunit"
		224 hypothetical protein
		225 Methionyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.10)
		226 LSU ribosomal protein L15E
		227 hypothetical protein
		228 hypothetical protein
		229 Glutamyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.17)
		230 GTP-binding protein
		231 ATP-dependent helicase
		232 hypothetical aldo/keto reductase
		233 hypothetical membrane protein
		234 hypothetical protein
		235 DNA REPAIR HELICASE (RAD3/RAD15/XPD FAMILY)
		236 hypothetical protein
		237 Hypothetical Exported Protein (PQQ-dependent)
		238 Dihydrolipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4)
		239 CBS domain containing protein
		240 Citrate synthase (EC 4.1.3.7)
		241 METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.-)
		242 TRANSCRIPTIONAL REGULATORY PROTEIN
		243 Asparaginyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.22)
		244 Succinyl-CoA synthetase
		245 DNA-directed RNA polymerase subunit M (EC 2.7.7.6)
		246 Signal recognition particle protein srp54
		247 Geranylgeranyl hydrogenase
		248 Ferredoxin
		249 Endonuclease III (EC 4.2.99.18)
		250 Carbamoyl-phosphate synthase (EC 6.3.5.5)
III		
E1	37 kbp	1154 Tryptophanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.2)
		1155 Archaeal Protein Translation Initiation Factor 2B subunit 1 (aIF-2B1)
		1156 Hypothetical Protein
		1157 Mercuric reductase (EC 1.16.1.1)
		1158 Molybdenum cofactor biosynthesis protein A
		1159 Hypothetical Protein
		1160 Hypothetical Protein
		1161 GLYCOSYL TRANSFERASE (EC 2.4.1.-)
		1162 Methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2)
		1163 Methylmalonyl-CoA mutase alpha subunit (EC 5.4.99.2)
		1164 LAO/AO transport system kinase argK (EC 2.7.-.-)
		1165 Hypothetical Membrane Spanning Protein
		1166 Chorismate synthase (EC 4.6.1.4)
		1167 GLYCOSYL TRANSFERASE (EC 2.4.1.-)
		1168 METAL DEPENDENT HYDROLASE (EC 3.-.-.-)
		1169 DNA Binding Protein

		1170 Hypothetical Membrane Associated Protein
		1171 "Membrane Spanning Protein, YeeE/YedE family "
		1172 pyridoxine biosynthesis protein
		1173 Hypothetical Membrane Spanning Protein
		1174 Electron transfer flavoprotein beta-subunit
		1175 Electron transfer flavoprotein alpha subunit
		1176 Acetyl-coenzyme A synthetase (EC 6.2.1.1)
		1177 Hypothetical Protein
		1178 Transcriptional regulator
		1179 Hypothetical Protein
		1180 Hypothetical Protein
		1181 Putative serine/threonine protein phosphatase (EC 3.1.3.16)
		1182 Hypothetical Protein
		1183 Hypothetical Membrane Associated Protein
		1184 Hypothetical Exported Protein
		1185 Hypothetical Membrane Associated Protein
		1186 Hypothetical Exported Protein
		1187 Hypothetical Membrane Spanning Protein
III	D3	473 Carbon monoxide dehydrogenase beta subunit (EC 1.2.99.2)
	42 kpb	474 Sugar fermentation stimulation protein
		475 METAL DEPENDENT HYDROLASE (EC 3.-.-.-)
		476 Hypothetical Protein
		477 probable sugar transporter
		478 hypothetical
		479 Hypothetical Protein
		480 Carboxymethylenebutenolidase (EC 3.1.1.45)
		481 Hypothetical Protein
		482 Sec-independent protein translocase protein tatC
		483 Sec-independent protein translocase protein tata
		484 RIESKE IRON-SULFUR PROTEIN
		485 Cytochrome b
		486 Hypothetical Protein
		487 hypothetical
		488 Hypothetical Protein
		489 Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] (EC 2.6.1.16)
		490 Hypothetical Protein
		491 Esterase
		492 PHOSPHOPANTOTHENATE--CYSTEINE LIGASE (EC 6.3.2.5) / PHOSPHOPANTOTHENOYL-CYSTEINE DECARBOXYLASE (EC 4.1.1.36)
		493 hypothetical
		494 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (EC 1.1.1.34)
		495 probable transporter
		496 probable multidrug resistance protein
		497 Alkaline phosphatase like protein
		498 2-hydroxy-3-oxopropionate reductase (EC 1.1.1.60)
		499 Iron-dependent repressor
		500 Pirin
		502 "Transcriptional regulator, MarR family"
		504 Zinc-binding dehydrogenase
		505 NADPH-dependent oxidoreductase

		506 Carbon-nitrogen hydrolase (EC 3.5.-.-)
		507 TRANSPORTER
		511 DNA polymerase IV (EC 2.7.7.7)
		512 Chloride channel protein
		513 hypothetical
		514 hypothetical
		515 OXIDOREDUCTASE (EC 1.1.1.-)
		516 hypothetical
		517 probable PiIT ATPase
		518 Transporter
		519 Zinc finger protein
		520 Archaeal Protein Translation Elongation Factor 1 subunit beta (EF-1b)
		521 Glycosyltransferase (EC 2.4.-.-)
		522 CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.5)
		523 PHOSPHOGLUCOMUTASE (EC 5.4.2.2) / PHOSPHOMANNOMUTASE (EC 5.4.2.8)
IV		
C7	32 kbp	264 2-isopropylmalate synthase (EC 4.1.3.12)
		265 conserved hypothetical membrane protein involved in antibiotic resistance
		266 hypothetical membrane protein
		267 hypothetical archaeal membrane protein
		268 "ABC transporter, ATP-binding protein"
		269 Glutamyl-tRNA reductase (EC 1.2.1.-)
		270 "DNA POLYMERASE, BACTERIOPHAGE-TYPE "
		271 hypothetical membrane protein
		272 hypothetical protein
		273 hypothetical membrane associated protein
		274 Hypothetical Exported Protein
		275 hypothetical protein
		276 Signal peptidase I (EC 3.4.21.89)
		277 hypothetical protein
		278 hypothetical protein
		279 hypothetical protein
		280 NADH-quinone oxidoreductase chain M (EC 1.6.5.3)
		281 NADH-quinone oxidoreductase chain L (EC 1.6.5.3)
		282 hypothetical archaeal protein
		283 4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase (EC 2.5.1.-)
		284 amino acid permease
		285 hypothetical protein
		286 Aconitate hydratase (EC 4.2.1.3)
		287 hypothetical transporter
		288 Fe-S oxidoreductase
		289 Hypothetical sulfite dehydrogenase
		290 hypothetical Mannose-6-phosphate isomerase
		291 hypothetical membrane protein
		292 hypothetical Aldo-Keto Reductase
		293 5'-methylthioadenosine phosphorylase (EC 2.4.2.28)
		294 mRNA 3'-end processing factor with metallo-Lactamase domain
		295 Sua5 superfamily-related protein
		295 Sua5 superfamily-related protein
		296 hypothetical protein with acetyltransferase domain
		297 amino acid transporter

IV D6	37 kbp	936 Altronate hydrolase (EC 4.2.1.7)
		937 Nucleotidyltransferase (EC 2.7.7.-)
		938 Nucleotidyltransferase (EC 2.7.7.-)
		939 Hypothetical Protein
		940 Conserved Hypothetical Protein
		941 DNA polymerase (EC 2.7.7.7)
		942 Hypothetical Protein
		943 Hypothetical Protein
		944 Conserved Hypothetical Protein
		945 HD domain family protein
		946 Conserved Hypothetical Protein
		947 Hypothetical Membrane Spanning Protein
		948 Hypothetical Protein
		949 Hypothetical Protein
		950 Hypothetical Membrane Associated Protein
		951 SAM-dependent methyltransferase
		952 Conserved Hypothetical Protein
		953 Hypothetical Protein
		954 Hypothetical Membrane Associated Protein
		955 Transcriptional regulatory protein
		956 Permease
		957 Sugar transporter
		958 Hypothetical Protein
		959 "1,4-alpha-glucan branching enzyme (EC 2.4.1.18)"
		960 "1,4-alpha-glucan branching enzyme (EC 2.4.1.18)"
		961 Trehalose synthase (EC 5.4.99.16)
		962 Trehalose synthase (EC 5.4.99.16)
		963 Hypothetical Membrane Spanning Protein
		964 Transporter
		965 Transporter
966 Hypothetical Protein		
968 Hypothetical Protein		
969 TYPE I RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM RESTRICTION SUBUNIT (EC 3.1.21.3)		
IV E1	36 kbp	759 NADH-quinone oxidoreductase chain D (EC 1.6.5.3)
		760 NADH-quinone oxidoreductase chain H (EC 1.6.5.3)
		761 NADH-quinone oxidoreductase chain I (EC 1.6.5.3)
		762 NADH-quinone oxidoreductase chain J (EC 1.6.5.3)
		763 NADH-quinone oxidoreductase chain J (EC 1.6.5.3)
		764 NADH-quinone oxidoreductase chain K (EC 1.6.5.3)
		765 NADH-quinone oxidoreductase chain N (EC 1.6.5.3)
		766 Hypothetical Protein
		767 Hypothetical Protein
		769 Asparaginyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.22)
		770 Uroporphyrinogen decarboxylase (EC 4.1.1.37)
		771 DNA gyrase subunit B (EC 5.99.1.3)
		772 DNA gyrase subunit A (EC 5.99.1.3)
		773 Pyrroline-5-carboxylate reductase (EC 1.5.1.2)
		774 Homoserine dehydrogenase (EC 1.1.1.3)
		775 Hypothetical Protein
		776 Replication factor-A protein 1
		777 Hypothetical Protein

		778 NMD protein affecting ribosome stability and mRNA decay
		779 Thymidylate kinase (EC 2.7.4.9)
		780 "Phosphoglycerate mutase/fructose-2,6-bisphosphatase"
		781 Hydrolase (HAD superfamily)
		782 Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)
		783 Hypothetical Protein
		784 Hypothetical Protein
		785 "Transporter, MMPL family"
		786 O6-methylguanine-DNA methyltransferase (EC 2.1.1.63) / Endonuclease V (EC 3.1.25.1)
		787 Hypothetical Protein
		788 Serine--pyruvate aminotransferase (EC 2.6.1.51)
		789 Precorrin-4 C11-methyltransferase (EC 2.1.1.133)
		790 Precorrin-2 C20-methyltransferase (EC 2.1.1.130)
		791 "Precorrin-6Y C5,15-methyltransferase [decarboxylating] (EC 2.1.1.132)"
		792 Uroporphyrin-III C-methyltransferase (EC 2.1.1.107)
		793 TRANSPORTER
		794 Dihydroxy-acid dehydratase (EC 4.2.1.9)
		795 Gluconate 2-dehydrogenase (EC 1.1.1.215)

6.7. SEQUENZEN MS/MS

In der folgenden Tabelle sind Ergebnisse der MS/MS der Mastergele (pH 4-7, pH 3-10) zusammengefaßt. Gezeigt sind jeweils die Zahl der Peptide, der Protein Score (total) und der Protein Score C.I. %.

pH 4-7					Protein MW	PI	Peptide Count	Protein Score	Protein Score C.I. %
Spot Nr.	Matrix	Rank	AA	Accession No					
1	A2	1	228 AA	RPTO001122	25940,44	6,23	4	28,20	0
2	A3	1	732 AA	RPTO001313	80774,87	5,65	27	479,00	100
3	A4	2	732 AA	RPTO001313	80774,87	5,65	23	166,00	100
3	A4	1	773 AA	RPTO000597	88110,12	5,72	23	476,00	100
4	A5	1	773 AA	RPTO000597	88110,12	5,72	29	669,00	100
5	A6	2	833 AA	RPTO000286	92585,89	5,54	31	257,00	100
5	A6	1	773 AA	RPTO000597	88110,12	5,72	23	480,00	100
6	A7	1	833 AA	RPTO000286	92585,89	5,54	36	693,00	100
7	A8	1	228 AA	RPTO001122	25940,44	6,23	4	28,40	0
8	A9	1	732 AA	RPTO001313	80774,87	5,65	26	513,00	100
9	A10	1	732 AA	RPTO001313	80774,87	5,65	27	567,00	100
10	A11	1	732 AA	RPTO001313	80774,87	5,65	27	553,00	100
11	A12	2	773 AA	RPTO000597	88110,12	5,72	17	211,00	100
11	A12	1	732 AA	RPTO001313	80774,87	5,65	27	460,00	100
12	A13	2	732 AA	RPTO001313	80774,87	5,65	21	242,00	100
12	A13	1	773 AA	RPTO000597	88110,12	5,72	19	366,00	100
13	A14	1	744 AA	RPTO001353	82332,65	5,28	41	878,00	100
14	A15	1	228 AA	RPTO001122	25940,44	6,23	5	37,30	71,342473
15	A16	1	744 AA	RPTO001353	82332,65	5,28	36	771,00	100

16	A17	1	631 AA	RPTO000351	70151,71	5,78	28	695,00	100
17	A18	1	631 AA	RPTO000351	70151,71	5,78	28	632,00	100
18	A19	1	631 AA	RPTO000351	70151,71	5,78	24	539,00	100
19	A20	1	560 AA	RPTO000346	62309,48	5,76	22	493,00	100
20	A21	1	560 AA	RPTO000346	62309,48	5,76	23	637,00	100
21	A22	1	140 AA	RPTO000639	15753,98	5,39	7	389,00	100
22	A23	1	607 AA	RPTO000739	66426,41	5,25	20	436,00	100
23	A24	1	607 AA	RPTO000739	66426,41	5,25	28	646,00	100
24	B1	1	607 AA	RPTO000739	66426,41	5,25	24	513,00	100
25	B2	1	613 AA	RPTO000191	66311,51	5,17	28	567,00	100
26	B3	1	613 AA	RPTO000191	66311,51	5,17	29	574,00	100
27	B4	1	613 AA	RPTO000191	66311,51	5,17	29	558,00	100
28	B5	1	613 AA	RPTO000191	66311,51	5,17	27	463,00	100
29	B6	1	94 AA	RPTO001274	11146,60	4,78	6	117,00	100
30	B7	1	94 AA	RPTO001274	11146,60	4,78	8	183,00	100
31	B8	1	96 AA	RPTO001521	10852,42	4,67	5	180,00	100
32	B9	1	96 AA	RPTO001521	10852,42	4,67	5	239,00	100
33	B10	1	551 AA	RPTO000996	61412,43	5,97	16	273,00	100
34	B11	1	555 AA	RPTO001230	61973,84	5,48	29	690,00	100
35	B12	2	555 AA	RPTO001230	61973,84	5,48	16	208,00	100
35	B12	1	493 AA	RPTO001226	55128,36	5,39	21	392,00	100
36	B13	1	493 AA	RPTO001226	55128,36	5,39	22	286,00	100
37	B14	1	583 AA	RPTO000716	64449,72	5,31	28	665,00	100
38	B15	1	583 AA	RPTO000716	64449,72	5,31	27	770,00	100
39	B16	2	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	16	163,00	100
39	B16	1	494 AA	RPTO000096	55504,48	5,57	16	276,00	100
40	B17	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	23	513,00	100
41	B18	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	28	563,00	100
42	B19	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	28	538,00	100
43	B20	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	26	670,00	100
44	B21	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	26	397,00	100
45	B22	1	541 AA	RPTO000551	58533,26	4,94	24	476,00	100
46	B23	1	541 AA	RPTO000551	58533,26	4,94	26	510,00	100
47	B24	1	541 AA	RPTO000551	58533,26	4,94	24	486,00	100
48	C1	1	541 AA	RPTO000551	58533,26	4,94	25	482,00	100
49	C2	1	411 AA	RPTO001438	45210,97	5,85	15	467,00	100
50	C3	1	411 AA	RPTO001438	45210,97	5,85	16	555,00	100
51	C4	1	411 AA	RPTO001438	45210,97	5,85	16	569,00	100
52	C5	1	411 AA	RPTO001438	45210,97	5,85	17	365,00	100
53	C6	2	411 AA	RPTO001438	45210,97	5,85	8	147,00	100
53	C6	1	415 AA	RPTO000544	45178,55	5,7	15	352,00	100
54	C7	1	411 AA	RPTO001438	45210,97	5,85	13	429,00	100
55	C8	1	386 AA	RPTO001446	43237,46	5,65	16	306,00	100
56	C9	1	386 AA	RPTO001446	43237,46	5,65	16	351,00	100
57	C10	1	386 AA	RPTO001446	43237,46	5,65	19	288,00	100
58	C11	1	386 AA	RPTO001446	43237,46	5,65	18	360,00	100
59	C12	1	448 AA	RPTO000143	50207,67	5,35	19	627,00	100
60	C13	1	448 AA	RPTO000143	50207,67	5,35	17	553,00	100
61	C14	1	448 AA	RPTO000143	50207,67	5,35	15	471,00	100
62	C15	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	9	94,50	100
63	C16	1	460 AA	RPTO001388	50960,83	5,14	21	513,00	100
64	C17	1	460 AA	RPTO001388	50960,83	5,14	16	370,00	100
65	C18	1	429 AA	RPTO001516	47915,24	5,03	24	521,00	100

66	C19	1	429 AA	RPTO001516	47915,24	5,03	27	575,00	100
67	C20	1	429 AA	RPTO001516	47915,24	5,03	24	477,00	100
68	C21	1	429 AA	RPTO001516	47915,24	5,03	21	425,00	100
69	C22	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	17	431,00	100
70	C23	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	17	405,00	100
71	C24	1	132 AA	RPTO001278	15431,75	8,34	3	25,30	0
72	D1	1	397 AA	RPTO000247	43720,66	5,85	15	304,00	100
73	D2	2	386 AA	RPTO001446	43237,46	5,65	15	252,00	100
73	D2	1	426 AA	RPTO001445	46995,98	5,46	14	337,00	100
74	D3	1	426 AA	RPTO001445	46995,98	5,46	19	549,00	100
75	D4	1	386 AA	RPTO001446	43237,46	5,65	16	353,00	100
76	D5	1	426 AA	RPTO001445	46995,98	5,46	18	551,00	100
77	D6	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	16	379,00	100
78	D7	1	397 AA	RPTO000247	43720,66	5,85	14	314,00	100
79	D8	1	194 AA	RPTO000879	21584,80	5,1	8	406,00	100
80	D9	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	25	434,00	100
81	D10	2	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	19	337,00	100
81	D10	1	377 AA	RPTO000727	44582,83	5,7	13	369,00	100
82	D11	1	396 AA	RPTO000740	43320,48	6,7	16	491,00	100
83	D12	2	394 AA	RPTO001408	44490,98	5,88	12	178,00	100
83	D12	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	19	341,00	100
84	D13	1	394 AA	RPTO001408	44490,98	5,88	20	443,00	100
85	D14	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	23	407,00	100
86	D15	1	388 AA	RPTO000862	42088,50	5,66	14	503,00	100
87	D16	1	385 AA	RPTO000454	42797,63	5,54	14	411,00	100
88	D17	1	400 AA	RPTO000590	43934,45	5,6	17	579,00	100
89	D18	2	392 AA	RPTO001060	44156,81	5,59	7	96,60	100
89	D18	1	381 AA	RPTO000123	42622,69	5,48	14	390,00	100
90	D19	1	392 AA	RPTO001060	44156,81	5,59	15	223,00	100
91	D20	2	394 AA	RPTO001408	44490,98	5,88	11	182,00	100
91	D20	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	19	304,00	100
92	D21	2	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	14	102,00	100
92	D21	1	415 AA	RPTO000671	45655,29	5,22	16	529,00	100
93	D22	1	415 AA	RPTO000671	45655,29	5,22	18	597,00	100
94	D23	1	338 AA	RPTO001155	37597,41	6,4	5	26,30	0
95	D24	1	415 AA	RPTO000671	45655,29	5,22	14	348,00	100
96	E2	1	194 AA	RPTO000879	21584,80	5,1	12	430,00	100
97	E3	1	396 AA	RPTO000740	43320,48	6,7	16	465,00	100
98	E4	1	396 AA	RPTO000740	43320,48	6,7	20	625,00	100
99	E5	1	336 AA	RPTO000605	36590,85	6,67	14	434,00	100
100	E6	2	348 AA	RPTO000093	39386,24	6,48	13	104,00	100
100	E6	1	338 AA	RPTO001155	37597,41	6,4	20	313,00	100
101	E7	1	338 AA	RPTO001155	37597,41	6,4	18	407,00	100
102	E8	1	336 AA	RPTO001172	36937,04	5,78	17	342,00	100
103	E9	1	349 AA	RPTO001395	38814,84	5,88	20	485,00	100
104	E10	1	361 AA	RPTO000052	39616,77	5,7	14	472,00	100
105	E11	1	336 AA	RPTO001172	36937,04	5,78	15	299,00	100
106	E12	1	349 AA	RPTO001395	38814,84	5,88	20	498,00	100
107	E13	1	349 AA	RPTO001395	38814,84	5,88	18	500,00	100
108	E14	1	378 AA	RPTO000158	41862,28	5,56	22	531,00	100
109	E15	2	336 AA	RPTO001172	36937,04	5,78	14	179,00	100
109	E15	1	361 AA	RPTO000052	39616,77	5,7	12	401,00	100
110	E16	1	318 AA	RPTO001422	36016,22	5,57	16	323,00	100

111	E17	2	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	12	180,00	100
111	E17	1	381 AA	RPTO000123	42622,69	5,48	9	349,00	100
112	E18	1	378 AA	RPTO000158	41862,28	5,56	18	282,00	100
113	E19	2	359 AA	RPTO000421	40437,42	5,56	14	108,00	100
113	E19	1	378 AA	RPTO000158	41862,28	5,56	18	408,00	100
114	E20	2	328 AA	RPTO000774	36608,70	5,35	8	135,00	100
114	E20	1	349 AA	RPTO001395	38814,84	5,88	12	325,00	100
115	E21	1	328 AA	RPTO000774	36608,70	5,35	17	563,00	100
116	E22	1	338 AA	RPTO001155	37597,41	6,4	6	36,60	66,330336
117	E23	2	402 AA	RPTO001294	44653,45	5,42	22	217,00	100
117	E23	1	368 AA	RPTO000725	42114,24	5,38	14	336,00	100
118	E24	1	301 AA	RPTO000083	34250,62	5,3	15	389,00	100
119	F1	1	328 AA	RPTO000774	36608,70	5,35	16	684,00	100
120	F2	2	402 AA	RPTO001294	44653,45	5,42	14	104,00	100
120	F2	1	379 AA	RPTO000461	42319,49	5,19	13	314,00	100
121	F3	1	377 AA	RPTO000752	41983,72	5,29	18	470,00	100
122	F4	1	368 AA	RPTO000354	40798,55	5,16	21	550,00	100
123	F5	1	328 AA	RPTO000774	36608,70	5,35	14	507,00	100
124	F6	2	328 AA	RPTO000774	36608,70	5,35	12	204,00	100
124	F6	1	333 AA	RPTO001448	37950,15	5,14	15	330,00	100
125	F7	1	368 AA	RPTO000354	40798,55	5,16	20	487,00	100
126	F8	1	151 AA	RPTO001536	16726,34	5,9	11	462,00	100
127	F9	2	328 AA	RPTO000774	36608,70	5,35	5	139,00	100
127	F9	1	333 AA	RPTO001448	37950,15	5,14	16	302,00	100
128	F10	1	402 AA	RPTO001279	43282,11	5,08	18	523,00	100
129	F11	1	391 AA	RPTO001383	44317,09	5,02	20	521,00	100
130	F12	2	378 AA	RPTO000452	42597,96	5,04	16	214,00	100
130	F12	1	391 AA	RPTO001383	44317,09	5,02	11	329,00	100
131	F13	1	391 AA	RPTO001383	44317,09	5,02	12	336,00	100
132	F14	1	335 AA	RPTO001366	37204,28	5	19	426,00	100
133	F15	1	335 AA	RPTO001366	37204,28	5	15	450,00	100
134	F16	1	429 AA	RPTO001516	47915,24	5,03	18	489,00	100
135	F17	1	331 AA	RPTO001328	36167,03	6,03	16	308,00	100
136	F18	1	324 AA	RPTO000345	35192,38	5,8	14	361,00	100
137	F19	1	331 AA	RPTO001328	36167,03	6,03	20	423,00	100
138	F20	1	324 AA	RPTO000345	35192,38	5,8	18	608,00	100
139	F21	1	331 AA	RPTO001328	36167,03	6,03	19	429,00	100
140	F22	2	331 AA	RPTO001328	36167,03	6,03	12	96,90	100
140	F22	1	324 AA	RPTO000345	35192,38	5,8	16	628,00	100
141	F23	1	324 AA	RPTO000345	35192,38	5,8	15	614,00	100
142	F24	1	294 AA	RPTO000312	33173,04	5,34	12	388,00	100
143	G1	1	315 AA	RPTO001336	34736,65	5,29	15	461,00	100
144	G2	1	154 AA	RPTO000618	18187,16	5,63	10	382,00	100
145	G3	2	154 AA	RPTO000618	18187,16	5,63	4	114,00	100
145	G3	1	321 AA	RPTO001447	35288,22	5,24	14	271,00	100
146	G4	1	154 AA	RPTO000618	18187,16	5,63	9	295,00	100
147	G5	1	255 AA	RPTO001222	29740,07	4,96	20	567,00	100
148	G6	1	255 AA	RPTO001222	29740,07	4,96	18	584,00	100
149	G7	1	256 AA	RPTO000680	28238,52	6,23	13	321,00	100
150	G8	1	258 AA	RPTO000462	28869,16	6,1	19	549,00	100
151	G9	1	256 AA	RPTO000680	28238,52	6,23	13	331,00	100
152	G10	2	228 AA	RPTO001122	25940,44	6,23	10	173,00	100
152	G10	1	256 AA	RPTO000680	28238,52	6,23	10	212,00	100

153	G11	1	204 AA	RPTO000644	22839,95	5,92	9	629,00	100
154	G12	1	223 AA	RPTO000040	24559,91	6,09	16	424,00	100
155	G13	1	285 AA	RPTO000484	31181,69	6,16	9	428,00	100
156	G14	1	233 AA	RPTO001174	25429,50	5,82	11	389,00	100
157	G15	2	284 AA	RPTO001063	31593,17	5,86	9	104,00	100
157	G15	1	250 AA	RPTO001527	29250,81	5,78	18	536,00	100
158	G16	1	273 AA	RPTO000861	30427,81	5,78	8	199,00	100
159	G17	1	257 AA	RPTO000293	28814,61	6,18	8	285,00	100
160	G18	1	280 AA	RPTO000498	30917,87	5,68	18	470,00	100
161	G19	1	210 AA	RPTO000037	23025,76	5,88	12	333,00	100
162	G20	1	205 AA	RPTO001378	24064,12	5,84	12	362,00	100
163	G21	1	250 AA	RPTO001527	29250,81	5,78	16	597,00	100
164	G22	1	281 AA	RPTO000466	31791,53	5,51	18	463,00	100
165	G23	1	266 AA	RPTO000636	30371,24	5,37	9	235,00	100
166	G24	1	319 AA	RPTO000085	34821,62	5,61	19	399,00	100
167	H1	1	287 AA	RPTO000470	32008,10	5,34	15	328,00	100
168	H2	2	319 AA	RPTO000085	34821,62	5,61	13	98,90	100
168	H2	1	282 AA	RPTO000717	31348,60	5,28	9	162,00	100
169	H3	1	319 AA	RPTO000085	34821,62	5,61	16	338,00	100
170	H4	1	319 AA	RPTO000085	34821,62	5,61	14	351,00	100
171	H5	1	321 AA	RPTO001447	35288,22	5,24	10	209,00	100
172	H6	1	260 AA	RPTO001289	28612,78	4,95	9	137,00	100
173	H7	1	280 AA	RPTO000498	30917,87	5,68	17	380,00	100
174	H8	1	230 AA	RPTO001525	26082,61	5,64	17	422,00	100
175	H9	1	289 AA	RPTO001175	32413,93	5,09	19	533,00	100
176	H10	1	289 AA	RPTO001175	32413,93	5,09	19	515,00	100
177	H11	1	297 AA	RPTO001068	32180,66	5,21	13	439,00	100
178	H12	1	237 AA	RPTO000129	27592,63	5,16	10	424,00	100
179	H13	2	251 AA	RPTO001301	28995,93	5,24	8	129,00	100
179	H13	1	237 AA	RPTO000129	27592,63	5,16	7	136,00	100
180	H14	1	273 AA	RPTO000258	30812,62	5,21	14	382,00	100
181	H15	2	204 AA	RPTO000644	22839,95	5,92	6	330,00	100
181	H15	1	214 AA	RPTO000196	23890,46	5,88	10	341,00	100
182	H16	1	183 AA	RPTO000651	21086,85	5,85	12	369,00	100
183	H17	1	227 AA	RPTO001273	25971,36	5,79	11	322,00	100
184	H18	1	205 AA	RPTO001378	24064,12	5,84	10	186,00	100
185	H19	1	217 AA	RPTO001011	24272,34	5,98	9	288,00	100
186	H20	1	198 AA	RPTO000802	22268,48	5,57	10	419,00	100
187	H21	1	203 AA	RPTO000160	23826,31	7,77	15	500,00	100
188	H22	1	233 AA	RPTO001174	25429,50	5,82	11	345,00	100
189	H23	1	217 AA	RPTO001101	23374,24	5,43	13	519,00	100
190	H24	1	219 AA	RPTO000260	24262,37	5,55	14	300,00	100
191	I2	1	201 AA	RPTO000078	23268,06	5,82	12	279,00	100
192	I3	1	234 AA	RPTO000155	25856,25	5,3	11	217,00	100
193	I4	1	210 AA	RPTO000037	23025,76	5,88	11	403,00	100
194	I5	1	238 AA	RPTO000305	26296,54	5,39	17	354,00	100
195	I6	1	250 AA	RPTO000944	28846,80	6,37	17	293,00	100
196	I7	1	219 AA	RPTO000728	25688,91	5,26	17	404,00	100
197	I8	1	234 AA	RPTO000155	25856,25	5,3	14	320,00	100
198	I9	2	195 AA	RPTO000217	21667,23	5,27	6	117,00	100
198	I9	1	234 AA	RPTO000155	25856,25	5,3	8	161,00	100
199	I10	1	219 AA	RPTO000260	24262,37	5,55	13	266,00	100
200	I11	2	238 AA	RPTO000801	26415,38	5,21	11	234,00	100

200	I11	1	219 AA	RPTO000728	25688,91	5,26	14	298,00	100
201	I12	1	234 AA	RPTO000155	25856,25	5,3	13	331,00	100
202	I13	1	234 AA	RPTO000155	25856,25	5,3	13	323,00	100
203	I14	1	220 AA	RPTO001263	24888,31	4,69	9	342,00	100
204	I15	1	220 AA	RPTO001263	24888,31	4,69	8	225,00	100
205	I16	1	255 AA	RPTO001180	28787,07	4,43	12	553,00	100
206	I17	1	255 AA	RPTO001180	28787,07	4,43	12	530,00	100
207	I18	1	245 AA	RPTO000672	27069,04	4,72	17	646,00	100
208	I19	1	245 AA	RPTO000672	27069,04	4,72	16	603,00	100
209	I20	1	194 AA	RPTO000879	21584,80	5,1	11	481,00	100
210	I21	1	237 AA	RPTO000493	27511,54	4,8	13	198,00	100
211	I22	1	184 AA	RPTO001404	20451,83	4,61	7	326,00	100
212	I23	1	184 AA	RPTO001404	20451,83	4,61	7	293,00	100
213	I24	1	184 AA	RPTO001404	20451,83	4,61	7	342,00	100
214	J1	1	242 AA	RPTO000193	28386,72	5,13	18	393,00	100
215	J2	1	194 AA	RPTO000879	21584,80	5,1	13	525,00	100
216	J3	1	194 AA	RPTO000879	21584,80	5,1	13	509,00	100
217	J4	1	186 AA	RPTO000428	20811,68	5,19	10	238,00	100
218	J5	1	177 AA	RPTO000710	20484,27	5,19	9	218,00	100
219	J6	1	177 AA	RPTO000710	20484,27	5,19	9	246,00	100
220	J7	1	201 AA	RPTO000078	23268,06	5,82	12	379,00	100
221	J8	1	201 AA	RPTO000078	23268,06	5,82	13	438,00	100
222	J9	1	171 AA	RPTO000043	18423,53	6,05	5	306,00	100
223	J10	1	171 AA	RPTO000043	18423,53	6,05	6	400,00	100
224	J11	1	201 AA	RPTO000078	23268,06	5,82	7	174,00	100
225	J12	1	201 AA	RPTO000078	23268,06	5,82	12	302,00	100
226	J13	1	154 AA	RPTO000003	17228,81	5,37	4	291,00	100
227	J14	1	154 AA	RPTO000003	17228,81	5,37	5	292,00	100
228	J15	1	163 AA	RPTO000144	18570,72	5,6	9	576,00	100
229	J16	2	154 AA	RPTO000003	17228,81	5,37	3	102,00	100
229	J16	1	201 AA	RPTO000078	23268,06	5,82	5	142,00	100
230	J17	2	174 AA	RPTO001163	19336,29	9,21	8	142,00	100
230	J17	1	156 AA	RPTO000604	17799,02	6,34	10	255,00	100
231	J18	2	192 AA	RPTO000339	21305,51	5,36	9	149,00	100
231	J18	1	156 AA	RPTO000604	17799,02	6,34	9	211,00	100
232	J19	1	149 AA	RPTO000307	17733,22	6,17	12	143,00	100
233	J20	1	156 AA	RPTO000604	17799,02	6,34	11	454,00	100
234	J21	1	192 AA	RPTO000339	21305,51	5,36	10	694,00	100
235	J22	1	192 AA	RPTO000339	21305,51	5,36	10	626,00	100
236	J23	1	113 AA	RPTO001097	13634,15	6,64	9	135,00	100
237	J24	2	107 AA	RPTO000054	12570,67	6,14	10	189,00	100
237	J24	1	87 AA	RPTO001153	9972,39	6,29	5	216,00	100
238	K1	1	87 AA	RPTO001153	9972,39	6,29	5	246,00	100
239	K2	1	113 AA	RPTO001035	12411,58	7,77	12	406,00	100
240	K3	1	149 AA	RPTO000307	17733,22	6,17	12	291,00	100
241	K4	1	127 AA	RPTO000637	14035,30	6,38	8	241,00	100
242	K5	2	127 AA	RPTO000637	14035,30	6,38	7	116,00	100
242	K5	1	129 AA	RPTO000244	15082,81	6,14	6	298,00	100
243	K6	1	113 AA	RPTO001035	12411,58	7,77	8	159,00	100
244	K7	1	79 AA	RPTO000730	9431,82	5,84	6	287,00	100
245	K8	1	210 AA	RPTO000037	23025,76	5,88	7	388,00	100
246	K9	1	96 AA	RPTO000679	11204,60	5,58	8	379,00	100
247	K10	1	127 AA	RPTO000637	14035,30	6,38	9	194,00	100

248	K11	1	145 AA	RPTO000991	16545,11	5,58	8	291,00	100
249	K12	1	145 AA	RPTO000991	16545,11	5,58	8	234,00	100
250	K13	1	148 AA	RPTO000796	17185,85	5,35	9	288,00	100
251	K14	2	154 AA	RPTO000618	18187,16	5,63	2	92,80	100
251	K14	1	148 AA	RPTO000796	17185,85	5,35	7	123,00	100
252	K15	1	118 AA	RPTO001241	12545,53	5,26	6	369,00	100
253	K16	1	144 AA	RPTO000172	15645,34	5,35	6	353,00	100
254	K17	1	124 AA	RPTO001535	14785,55	5,2	8	218,00	100
255	K18	1	127 AA	RPTO000516	14761,59	5,22	6	396,00	100
256	K19	1	123 AA	RPTO000359	14255,37	5,16	9	378,00	100
257	K20	1	144 AA	RPTO000172	15645,34	5,35	5	368,00	100
258	K21	1	115 AA	RPTO000378	13922,99	5,02	11	303,00	100
259	K22	1	115 AA	RPTO000378	13922,99	5,02	7	127,00	100
260	K23	1	139 AA	RPTO000872	15746,01	4,96	13	371,00	100
261	K24	1	192 AA	RPTO000339	21305,51	5,36	10	349,00	100
262	L1	1	145 AA	RPTO001427	15997,52	4,93	2	52,50	99,133994
263	L2	1	145 AA	RPTO001427	15997,52	4,93	5	113,00	100
264	L3	1	145 AA	RPTO001427	15997,52	4,93	3	73,10	99,992467
265	L4	1	145 AA	RPTO001427	15997,52	4,93	4	143,00	100
266	L5	1	116 AA	RPTO000767	13446,82	4,81	10	294,00	100
267	L6	1	101 AA	RPTO001337	11065,68	4,83	7	369,00	100
268	L7	1	128 AA	RPTO000119	14439,51	4,82	7	238,00	100
269	L8	2	96 AA	RPTO001521	10852,42	4,67	2	133,00	100
269	L8	1	101 AA	RPTO001337	11065,68	4,83	4	137,00	100
270	L9	1	96 AA	RPTO001521	10852,42	4,67	2	133,00	100
271	L10	1	116 AA	RPTO001425	12799,33	4,48	4	210,00	100
272	L11	1	116 AA	RPTO001425	12799,33	4,48	4	109,00	100
273	L12	1	106 AA	RPTO001385	12563,48	4,74	10	284,00	100
274	L13	1	99 AA	RPTO001093	11186,88	4,62	8	374,00	100
275	L14	1	82 AA	RPTO000766	9710,75	4,85	7	244,00	100
276	L15	1	99 AA	RPTO001093	11186,88	4,62	9	340,00	100
277	L16	1	124 AA	RPTO001523	14281,08	4,7	5	204,00	100
278	L17	1	101 AA	RPTO000520	11090,80	4,6	6	306,00	100
279	L18	2	75 AA	RPTO000560	8516,48	4,82	4	159,00	100
279	L18	1	73 AA	RPTO000783	8472,24	4,77	5	233,00	100
280	L19	1	75 AA	RPTO001413	8350,49	4,87	7	333,00	100
281	L20	1	85 AA	RPTO001092	9281,76	4,81	4	167,00	100
282	L21	1	75 AA	RPTO001413	8350,49	4,87	7	318,00	100
283	L22	1	143 AA	RPTO000239	15709,27	7,96	7	307,00	100
284	L23	2	129 AA	RPTO000068	14580,64	7,85	4	108,00	100
284	L23	1	143 AA	RPTO000239	15709,27	7,96	6	207,00	100
285	L24	1	111 AA	RPTO000420	12061,05	5,76	6	186,00	100
286	M2	1	388 AA	RPTO000862	42088,50	5,66	7	32,30	9,3769455
287	M3	1	329 AA	RPTO000424	36812,81	5,34	7	35,60	57,612405
288	M4	1	329 AA	RPTO000424	36812,81	5,34	6	27,60	0
289	M5	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	17	345,00	100
290	M6	1	396 AA	RPTO000740	43320,48	6,7	10	357,00	100
291	M7	1	336 AA	RPTO000605	36590,85	6,67	12	376,00	100
292	M8	1	108 AA	RPTO001433	12196,31	6,32	11	261,00	100
293	M9	1	71 AA	RPTO000072	7920,13	5,33	4	142,00	100
294	M10	1	148 AA	RPTO000796	17185,85	5,35	6	188,00	100
295	M11	1	128 AA	RPTO000045	15488,69	5,29	5	183,00	100
296	M12	1	310 AA	RPTO000899	35359,96	4,94	5	145,00	100

297	M13	1	255 AA	RPTO001222	29740,07	4,96	14	361,00	100
298	M14	1	132 AA	RPTO001278	15431,75	8,34	3	25,40	0
299	M15	1	82 AA	RPTO000558	9470,91	5,39	7	98,90	100
300	M16	1	108 AA	RPTO001433	12196,31	6,32	5	92,50	100
301	M17	1	108 AA	RPTO000225	12209,46	5,31	8	419,00	100
302	M18	1	255 AA	RPTO001180	28787,07	4,43	9	427,00	100
303	M19	1	255 AA	RPTO001180	28787,07	4,43	10	487,00	100
304	M20	2	111 AA	RPTO000530	12460,41	7,66	6	121,00	100
304	M20	1	90 AA	RPTO000556	10049,34	7,98	6	200,00	100
305	M21	1	90 AA	RPTO000556	10049,34	7,98	6	179,00	100
306	M22	1	59 AA	RPTO000631	6274,15	4,31	3	28,70	0
307	M23	1	80 AA	RPTO001349	9354,78	6,07	7	285,00	100
308	M24	1	170 AA	RPTO000259	18960,11	6,13	12	342,00	100
309	N1	1	156 AA	RPTO000604	17799,02	6,34	9	283,00	100
310	N2	1	285 AA	RPTO000484	31181,69	6,16	6	322,00	100
311	N3	1	230 AA	RPTO001525	26082,61	5,64	12	255,00	100
312	N4	1	283 AA	RPTO001488	31272,23	5,44	15	341,00	100
313	N5	1	284 AA	RPTO001063	31593,17	5,86	13	323,00	100
314	N6	1	233 AA	RPTO001174	25429,50	5,82	8	302,00	100
315	N7	1	389 AA	RPTO000292	45053,23	5,97	14	312,00	100
316	N8	1	139 AA	RPTO000872	15746,01	4,96	12	352,00	100
317	N9	1	142 AA	RPTO000174	16728,30	4,89	7	144,00	100
318	N10	1	78 AA	RPTO000228	8920,37	4,44	4	359,00	100

pH 3-10	Spot Nr.	Matrix	Rank	AA	Accession No	Protein MW	PI	Peptide Count	Protein Score	Protein Score C.I. %
	1	A02-B1	1	678 AA	RPTO000473	74478,63	5,67	22	171,00	100
	2	A03-C1								
	3	A04-D1			RPTO000346					
	4	A05-E1	1	744 AA	RPTO001353	82332,65	5,28	9	37,30	71,3610948
	5	A06-F1	1	744 AA	RPTO001353	82332,65	5,28	34	323,00	100
	6	A07-G1	1	744 AA	RPTO001353	82332,65	5,28	40	431,00	100
	7	A08-H1	1	744 AA	RPTO001353	82332,65	5,28	38	402,00	100
	8	A09-A2	1	744 AA	RPTO001353	82332,65	5,28	37	377,00	100
	9	A10-B2	1	744 AA	RPTO001353	82332,65	5,28	27	223,00	100
	10	A11-C2	1	744 AA	RPTO001353	82332,65	5,28	23	178,00	100
	11	A12-D2	1	744 AA	RPTO001353	82332,65	5,28	19	130,00	100
	12	A13-E2	1	833 AA	RPTO000286	92585,89	5,54	19	120,00	100
	13	A14-F2	1	833 AA	RPTO000286	92585,89	5,54	23	163,00	100
	14	A15-G2	1	833 AA	RPTO000286	92585,89	5,54	34	318,00	100
	15	A16-H2	1	773 AA	RPTO000597	88110,12	5,72	17	97,70	100
	15	A16-H2	2	732 AA	RPTO001313	80774,87	5,65	10	41,60	89,3596359
	16	A17-A3	1	732 AA	RPTO001313	80774,87	5,65	17	105,00	100
	16	A17-A3	2	773 AA	RPTO000597	88110,12	5,72	17	102,00	100
	17	A18-B3	1	773 AA	RPTO000597	88110,12	5,72	19	127,00	100
	17	A18-B3	2	732 AA	RPTO001313	80774,87	5,65	13	65,90	99,9604673
	18	A19-C3	1	140 AA	RPTO000639	15753,98	5,39	6	46,50	96,5568469
	19	A20-D3								
	20	A21-E3			RPTO000346					
	21	A22-F3	1	613 AA	RPTO000191	66311,51	5,17	29	286,00	100
	22	A23-G3	1	613 AA	RPTO000191	66311,51	5,17	30	306,00	100

23	A24-H3	1	613 AA	RPTO000191	66311,51	5,17	31	323,00	100
24	A25-A4	1	607 AA	RPTO000739	66426,41	5,25	25	233,00	100
25	A26-B4	1	607 AA	RPTO000739	66426,41	5,25	28	297,00	100
26	A27-C4	1	607 AA	RPTO000739	66426,41	5,25	21	172,00	100
27	A28-D4	1	493 AA	RPTO001226	55128,36	5,39	19	160,00	100
28	A29-E4	1	493 AA	RPTO001226	55128,36	5,39	22	217,00	100
29	A30-F4	1	555 AA	RPTO001230	61973,84	5,48	23	204,00	100
30	A31-G4	1	560 AA	RPTO000346	62309,48	5,76	17	124,00	100
31	A32-H4	1	560 AA	RPTO000346	62309,48	5,76	20	163,00	100
32	A33-A5	1	631 AA	RPTO000351	70151,71	5,78	16	98,30	100
32	A33-A5	2	560 AA	RPTO000346	62309,48	5,76	10	52,80	99,192846
33	A34-B5	1	631 AA	RPTO000351	70151,71	5,78	12	59,50	99,8274336
33	A34-B5	2	560 AA	RPTO000346	62309,48	5,76	10	52,60	99,1548058
34	A35-C5	1	560 AA	RPTO000346	62309,48	5,76	18	134,00	100
35	A36-D5	1	631 AA	RPTO000351	70151,71	5,78	24	191,00	100
36	A37-E5	1	631 AA	RPTO000351	70151,71	5,78	26	241,00	100
37	A38-F5	1	560 AA	RPTO000346	62309,48	5,76	16	113,00	100
38	A39-G5	2	560 AA	RPTO000346	62309,48	5,76	5	22,70	0
39	A40-H5	1	510 AA	RPTO001118	55925,71	5,69	15	115,00	100
40	A41-A6	1	551 AA	RPTO000996	61412,43	5,97	23	202,00	100
41	A42-B6	1	319 AA	RPTO000085	34821,62	5,61	17	158,00	100
42	A43-C6	1	319 AA	RPTO000085	34821,62	5,61	19	188,00	100
42	A43-C6	2	541 AA	RPTO000551	58533,26	4,94	14	95,00	100
43	A44-D6	1	319 AA	RPTO000085	34821,62	5,61	21	220,00	100
43	A44-D6	2	541 AA	RPTO000551	58533,26	4,94	10	56,10	99,6224656
44	A45-E6	1	583 AA	RPTO000716	64449,72	5,31	21	177,00	100
45	A46-F6	1	583 AA	RPTO000716	64449,72	5,31	24	225,00	100
46	A47-G6								
47	A48-H6								
48	A49-A7	1	480 AA	RPTO000463	54363,21	5,21	21	194,00	100
49	A50-B7	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	13	83,90	100
50	A51-C7	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	23	203,00	100
51	A52-D7	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	26	259,00	100
52	A53-E7	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	28	298,00	100
53	A54-F7	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	27	283,00	100
54	A55-G7	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	25	241,00	100
55	A56-H7	1	384 AA	RPTO000430	44467,58	6,18	8	50,70	98,6909499
56	A57-A8	1	492 AA	RPTO001517	55098,19	5,82	14	101,00	100
57	A58-B8	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	21	174,00	100
58	A59-C8	1	546 AA	RPTO000086	58783,90	5,56	20	162,00	100
59	A60-D8	1	773 AA	RPTO000597	88110,12	5,72	16	92,00	100
60	A61-E8	1	773 AA	RPTO000597	88110,12	5,72	11	46,30	96,3945754
61	A62-F8	1	631 AA	RPTO000351	70151,71	5,78	12	63,10	99,924672
62	A63-G8	1	583 AA	RPTO000716	64449,72	5,31	14	95,60	100
63	A64-H8	1	515 AA	RPTO000616	57698,26	5,54	10	49,30	98,1930072
63	A64-H8	2	551 AA	RPTO000996	61412,43	5,97	9	47,40	97,2013011
64	A65-A9	1	552 AA	RPTO000794	58591,91	6,37	20	160,00	100
65	A66-B9	1	483 AA	RPTO001368	52526,55	6,44	17	145,00	100
66	A67-C9	1	552 AA	RPTO000794	58591,91	6,37	22	186,00	100
67	A68-D9	1	483 AA	RPTO001368	52526,55	6,44	21	189,00	100
68	A69-E9	1	483 AA	RPTO001368	52526,55	6,44	14	95,50	100
69	A70-F9	1	429 AA	RPTO001516	47915,24	5,03	19	171,00	100
69	A70-F9	2	541 AA	RPTO000551	58533,26	4,94	11	61,70	99,8960185

70	A71-G9	1	429 AA	RPTO001516	47915,24	5,03	24	243,00	100
71	A72-H9								
72	A73-A10	1	410 AA	RPTO000800	46873,17	5,36	22	198,00	100
72	A73-A10	2	448 AA	RPTO000143	50207,67	5,35	9	51,10	98,8061315
73	A74-B10	1	448 AA	RPTO000143	50207,67	5,35	9	50,60	98,6604575
74	A75-C10	1	448 AA	RPTO000143	50207,67	5,35	15	117,00	100
74	A75-C10	2	450 AA	RPTO000211	51281,24	5,2	13	83,60	100
75	A76-D10	1	448 AA	RPTO000143	50207,67	5,35	16	134,00	100
76	A77-E10	1	448 AA	RPTO000143	50207,67	5,35	14	104,00	100
77	A78-F10	1	443 AA	RPTO000523	48976,04	5,62	11	72,30	99,9909436
78	A79-G10								
79	A80-H10								
80	A81-A11	1	443 AA	RPTO000523	48976,04	5,62	23	229,00	100
81	A82-B11	1	446 AA	RPTO000238	49103,23	5,49	17	151,00	100
82	A83-C11	1	504 AA	RPTO001363	57967,49	5,85	10	53,40	99,2969986
82	A83-C11	2	415 AA	RPTO000544	45178,55	5,7	8	45,20	95,3553151
83	A84-D11	1	443 AA	RPTO000523	48976,04	5,62	16	133,00	100
84	A85-E11								
85	A86-F11	1	418 AA	RPTO000095	46298,87	5,98	24	254,00	100
85	A86-F11	2	397 AA	RPTO000247	43720,66	5,85	12	80,80	99,9987207
86	A87-G11								
87	A88-H11	1	194 AA	RPTO000879	21584,80	5,1	7	56,20	99,6310596
88	A89-A12	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	10	61,90	99,9006984
89	A90-B12	1	460 AA	RPTO001388	50960,83	5,14	23	219,00	100
90	A91-C12								
91	A92-D12	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	16	132,00	100
92	A93-E12	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	10	59,80	99,8389516
93	A94-F12	1	415 AA	RPTO000671	45655,29	5,22	16	128,00	100
94	A95-G12	1	415 AA	RPTO000671	45655,29	5,22	16	130,00	100
95	A96-H12								
96	B02-B1	1	415 AA	RPTO000671	45655,29	5,22	17	142,00	100
97	B03-C1	1	455 AA	RPTO001324	50427,20	5,42	17	144,00	100
98	B04-D1	1	426 AA	RPTO001445	46995,98	5,46	15	119,00	100
98	B04-D1	2	455 AA	RPTO001324	50427,20	5,42	10	66,30	99,9639458
99	B05-E1	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	14	108,00	100
99	B05-E1	2	410 AA	RPTO000718	47157,95	5,43	9	55,90	99,6046733
100	B06-F1								
101	B07-G1	1	400 AA	RPTO000590	43934,45	5,6	17	153,00	100
102	B08-H1	2	411 AA	RPTO001438	45210,97	5,85	7	36,30	63,9457545
103	B09-A2	1	418 AA	RPTO000095	46298,87	5,98	20	194,00	100
103	B09-A2	2	400 AA	RPTO000590	43934,45	5,6	19	184,00	100
104	B10-B2	1	388 AA	RPTO000862	42088,50	5,66	15	131,00	100
104	B10-B2	2	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	10	60,60	99,8660458
105	B11-C2	1	394 AA	RPTO001408	44490,99	5,88	20	186,00	100
106	B12-D2	1	379 AA	RPTO001182	42327,88	5,9	25	244,00	100
107	B13-E2								
108	B14-F2								
109	B15-G2								
110	B16-H2	1	397 AA	RPTO000247	43720,66	5,85	18	167,00	100
111	B17-A3								
112	B18-B3	1	394 AA	RPTO001408	44490,99	5,88	14	105,00	100
113	B19-C3	1	425 AA	RPTO001064	48003,71	5,87	17	144,00	100
114	B20-D3	1	336 AA	RPTO001172	36937,04	5,78	15	108,00	100

114	B20-D3	2	357 AA	RPTO000980	40383,09	5,87	13	106,00	100
115	B21-E3	1	336 AA	RPTO001172	36937,04	5,78	16	121,00	100
116	B22-F3	1	381 AA	RPTO000788	41798,42	6,02	13	96,50	100
117	B23-G3	1	433 AA	RPTO001510	48514,72	5,95	11	75,80	99,9959547
117	B23-G3	2	411 AA	RPTO001438	45210,97	5,85	9	58,30	99,7725131
118	B24-H3	1	411 AA	RPTO001438	45210,97	5,85	14	114,00	100
119	B25-A4	1	442 AA	RPTO000308	48767,42	6,1	17	142,00	100
120	B26-B4	1	396 AA	RPTO000740	43320,48	6,7	9	57,80	99,7447555
121	B27-C4	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	12	86,00	100
121	B27-C4	2	450 AA	RPTO001506	49457,26	6,78	10	62,50	99,9135119
122	B28-D4	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	18	160,00	100
123	B29-E4	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	19	181,00	100
124	B30-F4	3	768 AA	RPTO000945	89299,29	5,61	5	13,60	0
125	B31-G4	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	21	210,00	100
126	B32-H4								
127	B33-A5	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	15	123,00	100
128	B34-B5	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	17	149,00	100
129	B35-C5	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	17	148,00	100
130	B36-D5	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	20	186,00	100
131	B37-E5	1	396 AA	RPTO000740	43320,48	6,7	16	135,00	100
132	B38-F5	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	10	67,20	99,970694
132	B38-F5	2	391 AA	RPTO001383	44317,09	5,02	10	66,30	99,9639458
132	B38-F5	3	541 AA	RPTO000551	58533,26	4,94	11	57,00	99,6931287
133	B39-G5	1	391 AA	RPTO001383	44317,09	5,02	13	101,00	100
133	B39-G5	2	378 AA	RPTO000452	42597,96	5,04	9	58,80	99,7972521
134	B40-H5	1	391 AA	RPTO001383	44317,09	5,02	16	138,00	100
135	B41-A6								
136	B42-B6	1	359 AA	RPTO000210	40933,06	5,17	11	72,30	99,9909436
137	B43-C6	1	368 AA	RPTO000354	40798,55	5,16	16	137,00	100
137	B43-C6	2	377 AA	RPTO000752	41983,72	5,29	10	68,10	99,9761792
138	B44-D6	1	359 AA	RPTO000210	40933,06	5,17	19	166,00	100
139	B45-E6	1	368 AA	RPTO000354	40798,55	5,16	16	139,00	100
139	B45-E6	2	379 AA	RPTO000461	42319,49	5,19	15	131,00	100
139	B45-E6	3	377 AA	RPTO000752	41983,72	5,29	12	91,60	100
140	B46-F6								
141	B47-G6	1	368 AA	RPTO000725	42114,24	5,38	12	87,00	100
141	B47-G6	2	357 AA	RPTO000332	39984,46	5,38	10	66,70	99,9671181
141	B47-G6	3	378 AA	RPTO000158	41862,28	5,56	8	51,30	98,8598646
141	B47-G6	4	381 AA	RPTO000123	42622,69	5,48	7	43,70	93,4392082
142	B48-H6	1	379 AA	RPTO000461	42319,49	5,19	15	136,00	100
143	B49-A7	1	368 AA	RPTO000725	42114,24	5,38	10	65,00	99,9513642
143	B49-A7	2	392 AA	RPTO001060	44156,81	5,59	7	36,90	68,5980814
144	B50-B7	1	378 AA	RPTO000158	41862,28	5,56	15	134,00	100
144	B50-B7	2	357 AA	RPTO000332	39984,46	5,38	10	75,90	99,9960467
144	B50-B7	3	402 AA	RPTO001294	44653,45	5,42	10	66,20	99,9631059
145	B51-C7								
146	B52-D7	1	392 AA	RPTO001060	44156,81	5,59	7	36,80	67,8666199
147	B53-E7	1	381 AA	RPTO000123	42622,69	5,48	17	163,00	100
148	B54-F7	1	336 AA	RPTO001172	36937,04	5,78	17	136,00	100
148	B54-F7	2	378 AA	RPTO000158	41862,28	5,56	14	115,00	100
149	B55-G7	1	378 AA	RPTO000158	41862,28	5,56	16	145,00	100
150	B56-H7	1	336 AA	RPTO001172	36937,04	5,78	14	91,90	100
151	B57-A8	1	336 AA	RPTO001172	36937,04	5,78	17	131,00	100

152	B58-B8	1	327 AA	RPTO000447	36696,18	5,55	13	110,00	100
153	B59-C8	1	336 AA	RPTO001172	36937,04	5,78	17	130,00	100
154	B60-D8	1	361 AA	RPTO000052	39616,77	5,7	13	114,00	100
155	B61-E8	1	583 AA	RPTO000716	64449,72	5,31	11	64,60	99,9466719
156	B62-F8	1	429 AA	RPTO001516	47915,24	5,03	12	87,20	100
156	B62-F8	2	690 AA	RPTO001441	79427,60	6,08	10	49,20	98,1509176
157	B63-G8	1	402 AA	RPTO001279	43282,11	5,08	16	141,00	100
158	B64-H8								
159	B65-A9	1	583 AA	RPTO000716	64449,72	5,31	11	65,40	99,9556436
159	B65-A9	2	429 AA	RPTO001516	47915,24	5,03	8	46,50	96,5568469
160	B66-B9	1	335 AA	RPTO001366	37204,28	5	8	50,20	98,5312217
161	B67-C9	1	333 AA	RPTO001448	37950,15	5,14	14	122,00	100
162	B68-D9	1	351 AA	RPTO001280	38365,04	5,24	9	61,50	99,8911179
163	B69-E9	1	333 AA	RPTO001448	37950,15	5,14	15	140,00	100
164	B70-F9								
165	B71-G9								
166	B72-H9	1	368 AA	RPTO000725	42114,24	5,38	12	86,80	100
166	B72-H9	2	301 AA	RPTO000083	34250,62	5,3	10	77,60	99,9973273
167	B73-A10	1	301 AA	RPTO000083	34250,62	5,3	14	131,00	100
168	B74-B10	1	378 AA	RPTO000158	41862,28	5,56	13	106,00	100
168	B74-B10	2	336 AA	RPTO001172	36937,04	5,78	9	47,40	97,2013011
169	B75-C10	1	389 AA	RPTO000292	45053,23	5,97	12	91,00	100
170	B76-D10	1	351 AA	RPTO001280	38365,04	5,24	11	85,50	100
170	B76-D10	2	328 AA	RPTO000774	36608,70	5,35	10	74,90	99,9950231
171	B77-E10	1	336 AA	RPTO000108	37530,47	5,48	16	138,00	100
172	B78-F10	1	328 AA	RPTO000774	36608,70	5,35	15	138,00	100
173	B79-G10								
174	B80-H10								
175	B81-A11	1	318 AA	RPTO001422	36016,22	5,57	12	99,70	100
176	B82-B11	1	312 AA	RPTO000347	36184,87	6	16	96,40	100
177	B83-C11	1	312 AA	RPTO000347	36184,87	6	17	116,00	100
178	B84-D11	1	312 AA	RPTO000347	36184,87	6	21	154,00	100
179	B85-E11	1	296 AA	RPTO001077	33637,97	5,65	16	156,00	100
180	B86-F11	1	306 AA	RPTO000350	33505,20	5,59	11	88,80	100
181	B87-G11	1	331 AA	RPTO001328	36167,03	6,03	20	213,00	100
182	B88-H11								
183	B89-A12	1	336 AA	RPTO000605	36590,85	6,67	13	101,00	100
184	B90-B12	1	336 AA	RPTO000605	36590,85	6,67	10	65,30	99,9546104
185	B91-C12								
186	B92-D12								
187	B93-E12	1	336 AA	RPTO000605	36590,85	6,67	17	151,00	100
188	B94-F12	1	336 AA	RPTO000605	36590,85	6,67	17	154,00	100
189	B95-G12								
190	B96-H12	1	336 AA	RPTO000605	36590,85	6,67	15	126,00	100
190	B96-H12	2	338 AA	RPTO001155	37597,41	6,4	10	70,10	99,9849701
191	A02-B1	1	338 AA	RPTO001155	37597,41	6,4	22	225,00	100
192	A03-C1	1	338 AA	RPTO001155	37597,41	6,4	14	115,00	100
192	A03-C1	2	334 AA	RPTO000504	36547,99	7,56	12	94,20	100
193	A04-D1	1	338 AA	RPTO001155	37597,41	6,4	8	43,70	93,4392082
194	A05-E1	1	282 AA	RPTO000717	31348,60	5,28	9	75,50	99,9956653
195	A06-F1	1	287 AA	RPTO000470	32008,10	5,34	13	117,00	100
195	A06-F1	2	255 AA	RPTO001222	29740,07	4,96	12	104,00	100
196	A07-G1	1	255 AA	RPTO001222	29740,07	4,96	16	160,00	100

197	A08-H1	1	324 AA	RPTO000345	35192,38	5,8	12	98,60	100
197	A08-H1	2	255 AA	RPTO001222	29740,07	4,96	11	96,10	100
198	A09-A2	1	310 AA	RPTO000899	35359,96	4,94	19	197,00	100
199	A10-B2	1	321 AA	RPTO001447	35288,22	5,24	12	99,80	100
199	A10-B2	2	285 AA	RPTO001342	32233,61	5,03	9	68,30	99,9772513
200	A11-C2	1	345 AA	RPTO001200	38016,88	5,24	15	129,00	100
201	A12-D2	1	321 AA	RPTO001447	35288,22	5,24	14	134,00	100
202	A13-E2	1	282 AA	RPTO000717	31348,60	5,28	9	78,60	99,997877
203	A14-F2	1	338 AA	RPTO001155	37597,41	6,4	11	82,30	100
203	A14-F2	2	287 AA	RPTO000470	32008,10	5,34	8	57,40	99,7201301
203	A14-F2	3	334 AA	RPTO000504	36547,99	7,56	8	49,00	98,0637727
204	A15-G2	1	287 AA	RPTO000470	32008,10	5,34	16	156,00	100
204	A15-G2	2	282 AA	RPTO000717	31348,60	5,28	8	62,40	99,9114974
205	A16-H2	1	282 AA	RPTO000717	31348,60	5,28	11	101,00	100
206	A17-A3	1	287 AA	RPTO000470	32008,10	5,34	17	170,00	100
206	A17-A3	2	255 AA	RPTO001222	29740,07	4,96	9	68,90	99,9801867
207	A18-B3	1	319 AA	RPTO000085	34821,62	5,61	16	150,00	100
208	A19-C3	1	324 AA	RPTO000345	35192,38	5,8	17	164,00	100
208	A19-C3	2	255 AA	RPTO001222	29740,07	4,96	13	118,00	100
209	A20-D3	1	324 AA	RPTO000345	35192,38	5,8	17	166,00	100
210	A21-E3	1	315 AA	RPTO000874	35345,53	5,94	16	144,00	100
211	A22-F3	1	331 AA	RPTO001328	36167,03	6,03	21	227,00	100
212	A23-G3	1	290 AA	RPTO000348	32067,16	6,14	9	58,30	99,7725131
213	A24-H3								
214	A25-A4	1	284 AA	RPTO000353	30338,89	6,61	14	136,00	100
215	A26-B4	1	286 AA	RPTO001078	33490,46	6,34	17	167,00	100
216	A27-C4	1	284 AA	RPTO000353	30338,89	6,61	12	107,00	100
217	A28-D4	1	284 AA	RPTO000353	30338,89	6,61	10	79,60	99,9983136
218	A29-E4	1	284 AA	RPTO000353	30338,89	6,61	14	140,00	100
219	A30-F4	1	284 AA	RPTO000353	30338,89	6,61	14	132,00	100
219	A30-F4	2	389 AA	RPTO000792	44398,78	5,9	9	58,50	99,7827517
220	A31-G4	1	311 AA	RPTO000608	35472,16	5,09	17	164,00	100
221	A32-H4								
222	A33-A5	1	275 AA	RPTO001513	31317,89	4,83	9	66,70	99,9671181
222	A33-A5	2	271 AA	RPTO000578	30844,61	5,06	8	55,20	99,5355315
223	A34-B5	1	271 AA	RPTO000578	30844,61	5,06	9	66,70	99,9671181
223	A34-B5	2	275 AA	RPTO001513	31317,89	4,83	8	57,40	99,7201301
224	A35-C5	1	289 AA	RPTO001175	32413,93	5,09	19	204,00	100
225	A36-D5								
226	A37-E5	1	275 AA	RPTO001513	31317,89	4,83	12	101,00	100
227	A38-F5	1	237 AA	RPTO000129	27592,63	5,16	13	111,00	100
228	A39-G5								
229	A40-H5								
230	A41-A6	1	283 AA	RPTO000726	32523,93	5,39	12	87,80	100
231	A42-B6	1	266 AA	RPTO000636	30371,24	5,37	8	61,00	99,8778323
232	A43-C6	1	281 AA	RPTO000466	31791,53	5,51	15	141,00	100
233	A44-D6	1	274 AA	RPTO001364	29625,73	5,74	16	161,00	100
234	A45-E6	1	283 AA	RPTO001488	31272,23	5,44	16	160,00	100
235	A46-F6	1	280 AA	RPTO000498	30917,87	5,68	12	107,00	100
236	A47-G6								
237	A48-H6								
238	A49-A7	1	258 AA	RPTO000480	29318,75	5,81	8	59,00	99,8063773
239	A50-B7	1	280 AA	RPTO000498	30917,87	5,68	16	162,00	100

240	A51-C7	1	249 AA	RPTO000337	28501,57	5,76	10	73,80	99,9935886
241	A52-D7	1	220 AA	RPTO001263	24888,32	4,69	10	88,70	100
242	A53-E7								
243	A54-F7	1	237 AA	RPTO000493	27511,54	4,8	13	104,00	100
244	A55-G7	1	194 AA	RPTO000879	21584,80	5,1	11	112,00	100
245	A56-H7	1	194 AA	RPTO000879	21584,80	5,1	10	93,20	100
246	A57-A8	1	234 AA	RPTO000155	25856,25	5,3	13	126,00	100
247	A58-B8	1	228 AA	RPTO000198	26791,16	4,87	15	130,00	100
248	A59-C8	1	234 AA	RPTO000155	25856,25	5,3	10	81,40	99,9988858
249	A60-D8	1	234 AA	RPTO000155	25856,25	5,3	11	91,90	100
250	A61-E8	1	219 AA	RPTO000728	25688,91	5,26	15	140,00	100
251	A62-F8	1	220 AA	RPTO000469	24564,73	5,1	12	125,00	100
252	A63-G8	1	194 AA	RPTO000879	21584,80	5,1	12	125,00	100
252	A63-G8	2	242 AA	RPTO000193	28386,72	5,13	8	57,40	99,7201301
253	A64-H8	1	249 AA	RPTO001265	28727,62	5,41	18	199,00	100
254	A65-A9	1	219 AA	RPTO000728	25688,91	5,26	17	174,00	100
255	A66-B9	1	238 AA	RPTO000305	26296,54	5,39	14	135,00	100
255	A66-B9	2	218 AA	RPTO001464	24761,58	5,38	10	80,30	99,9985647
256	A67-C9	1	218 AA	RPTO001464	24761,58	5,38	11	90,50	100
256	A67-C9	2	227 AA	RPTO001273	25971,36	5,79	7	51,70	98,9601846
257	A68-D9	1	230 AA	RPTO001525	26082,61	5,64	14	110,00	100
257	A68-D9	2	230 AA	RPTO001291	26122,36	5,53	8	62,00	99,9029588
258	A69-E9	1	233 AA	RPTO001174	25429,50	5,82	10	91,60	100
259	A70-F9	1	247 AA	RPTO001115	27621,52	5,49	18	190,00	100
260	A71-G9	1	219 AA	RPTO000260	24262,37	5,55	14	133,00	100
261	A72-H9								
262	A73-A10	1	203 AA	RPTO000160	23826,31	7,77	10	73,60	99,9932864
263	A74-B10	1	198 AA	RPTO000802	22268,48	5,57	11	112,00	100
263	A74-B10	2	217 AA	RPTO001437	23882,17	4,8	10	82,30	100
264	A75-C10	1	217 AA	RPTO001011	24272,34	5,98	8	58,90	99,8018673
265	A76-D10	1	223 AA	RPTO000040	24559,91	6,09	10	92,20	100
266	A77-E10	1	233 AA	RPTO001174	25429,50	5,82	11	105,00	100
267	A78-F10	1	205 AA	RPTO001378	24064,12	5,84	12	123,00	100
268	A79-G10	1	210 AA	RPTO000037	23025,76	5,88	9	82,60	100
268	A79-G10	2	205 AA	RPTO001378	24064,12	5,84	8	67,70	99,973881
269	A80-H10	1	210 AA	RPTO000037	23025,76	5,88	10	96,30	100
269	A80-H10	2	205 AA	RPTO001378	24064,12	5,84	8	68,00	99,9756243
270	A81-A11	1	210 AA	RPTO000037	23025,76	5,88	10	95,30	100
271	A82-B11	1	258 AA	RPTO000462	28869,16	6,1	18	189,00	100
272	A83-C11	1	231 AA	RPTO000491	26202,53	6,09	8	67,50	99,9726501
273	A84-D11	1	256 AA	RPTO000680	28238,52	6,23	11	90,40	100
274	A85-E11	1	223 AA	RPTO000040	24559,91	6,09	11	103,00	100
274	A85-E11	2	205 AA	RPTO001378	24064,12	5,84	8	67,70	99,973881
275	A86-F11	1	214 AA	RPTO000196	23890,46	5,88	12	123,00	100
276	A87-G11								
277	A88-H11								
278	A89-A12	1	424 AA	RPTO001311	46675,44	7,74	10	63,50	99,9313001
279	A90-B12	1	237 AA	RPTO001016	26403,78	6,45	10	90,40	100
279	A90-B12	2	243 AA	RPTO001076	26566,04	6,77	8	58,10	99,7617919
280	A91-C12	1	205 AA	RPTO001485	23431,31	6,64	6	43,00	92,2917403
281	A92-D12	1	200 AA	RPTO001416	22731,07	7,77	6	43,50	93,1300064
282	A93-E12								
283	A94-F12								

284	A95-G12								
285	A96-H12	1	183 AA	RPTO001283	21559,56	8,89	12	120,00	100
286	B02-B1	1	180 AA	RPTO001112	20189,26	7,85	7	48,20	99,6721432
287	B03-C1	1	182 AA	RPTO001392	21299,05	8,29	7	60,10	99,8497009
288	B04-D1	1	182 AA	RPTO001392	21299,05	8,29	7	57,90	99,7505657
289	B05-E1	1	255 AA	RPTO001180	28787,07	4,43	8	62,40	99,9114974
290	B06-F1	1	184 AA	RPTO001404	20451,83	4,61	7	58,10	99,7617919
291	B07-G1	1	186 AA	RPTO000428	20811,68	5,19	10	110,00	100
291	B07-G1	2	156 AA	RPTO000604	17799,02	6,34	9	79,20	99,9981509
292	B08-H1	1	189 AA	RPTO001403	21028,92	6,92	9	83,40	100
293	B09-A2	1	186 AA	RPTO000428	20811,68	5,19	11	125,00	100
294	B10-B2	1	178 AA	RPTO001318	20651,27	4,97	9	82,60	100
295	B11-C2	1	195 AA	RPTO000217	21667,23	5,27	9	84,60	100
296	B12-D2								
297	B13-E2	1	201 AA	RPTO000078	23268,06	5,82	12	117,00	100
297	B13-E2	2	189 AA	RPTO000306	21413,20	6,18	7	50,50	98,6292561
298	B14-F2	1	201 AA	RPTO000078	23268,06	5,82	11	104,00	100
299	B15-G2	1	176 AA	RPTO001325	20461,63	5,95	8	71,70	99,9896018
300	B16-H2	1	201 AA	RPTO000078	23268,06	5,82	8	66,30	99,9639458
300	B16-H2	2	255 AA	RPTO001180	28787,07	4,43	8	62,50	99,9135119
301	B17-A3	1	174 AA	RPTO001163	19336,29	9,21	6	48,20	97,6721432
302	B18-B3	1	156 AA	RPTO000604	17799,02	6,34	12	121,00	100
303	B19-C3	1	189 AA	RPTO001403	21028,92	6,92	10	94,60	100
304	B20-D3	1	180 AA	RPTO000190	21221,94	7,74	14	125,00	100
305	B21-E3	1	156 AA	RPTO000604	17799,02	6,34	10	92,10	100
306	B22-F3	1	170 AA	RPTO000632	19971,04	5,27	9	87,30	100
307	B23-G3								
308	B24-H3	1	145 AA	RPTO001427	15997,52	4,93	5	37,40	72,0130106
309	B25-A4	1	192 AA	RPTO000339	21305,51	5,36	11	113,00	100
310	B26-B4	1	140 AA	RPTO000639	15753,98	5,39	7	58,70	99,7925295
311	B27-C4	1	167 AA	RPTO000863	17716,13	5,57	9	91,20	100
312	B28-D4	1	176 AA	RPTO001325	20461,63	5,95	14	132,00	100
313	B29-E4	1	255 AA	RPTO001180	28787,07	4,43	8	62,60	99,9154806
314	B30-F4	1	174 AA	RPTO001163	19336,29	9,21	7	59,60	99,8313616
315	B31-G4	1	156 AA	RPTO000604	17799,02	6,34	13	131,00	100
316	B32-H4								
317	B33-A5	1	156 AA	RPTO000604	17799,02	6,34	12	118,00	100
318	B34-B5	1	156 AA	RPTO000604	17799,02	6,34	12	122,00	100
319	B35-C5								
320	B36-D5	1	150 AA	RPTO001339	17043,87	7,79	11	110,00	100
320	B36-D5	2	148 AA	RPTO001299	16889,65	7,74	10	98,10	100
321	B37-E5	1	148 AA	RPTO001299	16889,65	7,74	13	143,00	100
321	B37-E5	2	150 AA	RPTO001339	17043,87	7,79	8	66,20	99,9631059
322	B38-F5	1	166 AA	RPTO001100	18191,75	7,77	10	89,70	100
323	B39-G5	2	138 AA	RPTO001315	15858,83	5,71	4	27,70	0
324	B40-H5	1	129 AA	RPTO000244	15082,81	6,14	8	77,70	99,9973881
325	B41-A6	1	127 AA	RPTO000637	14035,30	6,38	7	67,40	99,972013
326	B42-B6	1	149 AA	RPTO000307	17733,22	6,17	9	82,10	100
327	B43-C6	1	139 AA	RPTO000872	15746,01	4,96	9	99,40	100
327	B43-C6	2	132 AA	RPTO001278	15431,75	8,34	8	70,50	99,9862926
328	B44-D6	1	148 AA	RPTO000796	17185,85	5,35	9	75,60	99,995764
329	B45-E6	1	143 AA	RPTO000239	15709,27	7,96	7	55,30	99,5461039
330	B46-F6								

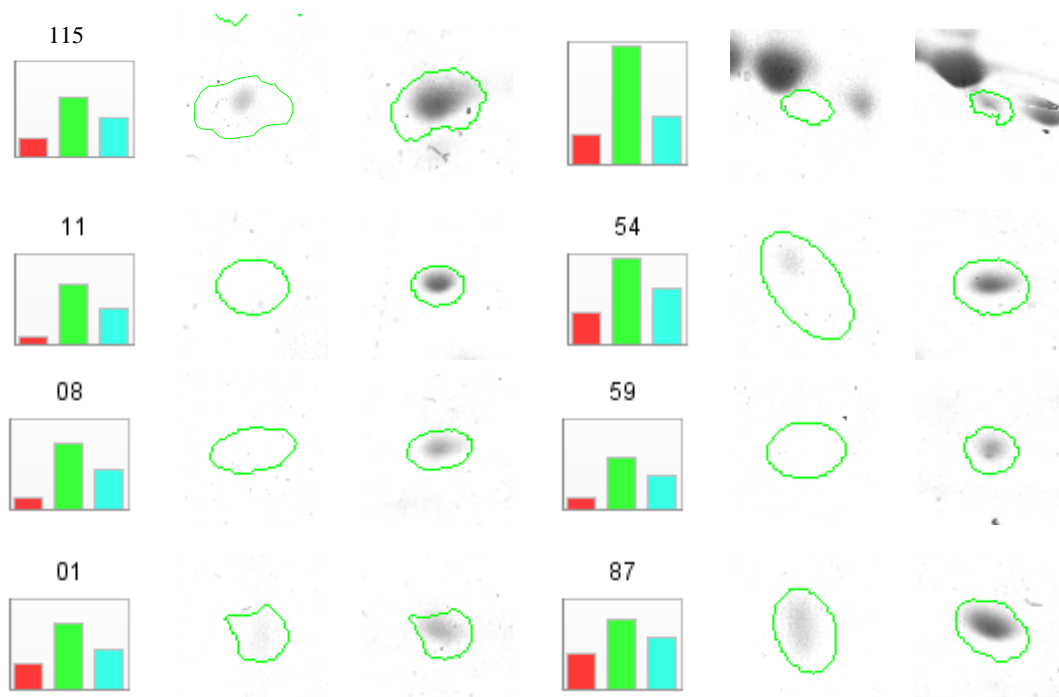
331	B47-G6	1	145 AA	RPTO000991	16545,11	5,58	7	66,10	99,9622466
332	B48-H6	1	151 AA	RPTO000318	16814,92	7,6	5	35,90	60,4673268
333	B49-A7	1	297 AA	RPTO001322	32108,91	6,6	8	43,10	92,4671991
333	B49-A7	2	151 AA	RPTO000318	16814,92	7,6	5	42,20	90,7326352
334	B50-B7								
335	B51-C7	1	138 AA	RPTO001315	15858,83	5,71	6	44,40	94,4158615
336	B52-D7	1	113 AA	RPTO001097	13634,15	6,64	7	53,50	99,3130006
337	B53-E7	1	129 AA	RPTO000244	15082,81	6,14	9	90,00	100
338	B54-F7	1	127 AA	RPTO000637	14035,30	6,38	8	82,10	100
339	B55-G7	1	149 AA	RPTO000307	17733,22	6,17	12	122,00	100
340	B56-H7	1	132 AA	RPTO001278	15431,75	8,34	10	94,40	100
340	B56-H7	2	139 AA	RPTO000872	15746,01	4,96	8	83,70	100
341	B57-A8	1	140 AA	RPTO001439	15911,37	6,84	11	103,00	100
342	B58-B8	1	143 AA	RPTO000239	15709,27	7,96	9	79,70	99,998352
343	B59-C8	1	113 AA	RPTO001097	13634,15	6,64	5	35,50	56,6532705
344	B60-D8								
345	B61-E8								
346	B62-F8	1	116 AA	RPTO001425	12799,33	4,48	5	47,40	97,2013011
347	B63-G8	1	101 AA	RPTO001337	11065,68	4,83	5	44,80	94,9072025
348	B64-H8	1	116 AA	RPTO000767	13446,82	4,81	9	87,00	100
349	B65-A9								
350	B66-B9	1	128 AA	RPTO000119	14439,51	4,82	7	68,90	99,9801867
351	B67-C9								
352	B68-D9	1	127 AA	RPTO000516	14761,59	5,22	6	48,60	97,8769683
353	B69-E9	1	132 AA	RPTO001014	15271,89	5,48	4	26,20	0
354	B70-F9	1	123 AA	RPTO000359	14255,37	5,16	5	43,70	93,4392082
355	B71-G9	1	118 AA	RPTO001241	12545,53	5,26	4	31,80	0
356	B72-H9	1	144 AA	RPTO000172	15645,34	5,35	7	65,90	99,9604673
357	B73-A10	1	127 AA	RPTO000516	14761,59	5,22	8	78,40	99,9977769
358	B74-B10	1	115 AA	RPTO000378	13922,99	5,02	8	83,30	100
358	B74-B10	2	126 AA	RPTO001156	14470,48	5,03	5	41,40	88,8581788
359	B75-C10	1	108 AA	RPTO000225	12209,46	5,31	8	93,30	100
360	B76-D10	1	127 AA	RPTO000637	14035,30	6,38	7	66,90	99,9685981
361	B77-E10	1	112 AA	RPTO001424	13057,99	5,32	7	71,40	99,9888582
362	B78-F10								
363	B79-G10								
364	B80-H10	1	101 AA	RPTO000520	11090,80	4,6	5	49,70	98,3520036
365	B81-A11								
366	B82-B11	1	111 AA	RPTO000420	12061,05	5,76	5	39,50	82,7433562
367	B83-C11	1	123 AA	RPTO000359	14255,37	5,16	5	38,80	79,7252078
368	B84-D11	1	85 AA	RPTO001092	9281,76	4,81	4	42,40	91,1497369
369	B85-E11								
370	B86-F11	1	107 AA	RPTO000054	12570,67	6,14	9	80,50	99,9986293
371	B87-G11	1	87 AA	RPTO001153	9972,39	6,29	6	66,00	99,9613672
372	B88-H11	1	116 AA	RPTO000878	13300,71	6,41	8	82,30	100
373	B89-A12	2	95 AA	RPTO000741	11025,36	7,48	4	28,70	0
374	B90-B12	1	90 AA	RPTO000556	10049,34	7,98	7	79,30	99,998193
374	B90-B12	2	144 AA	RPTO000845	15930,10	6,59	7	64,50	99,9454297
375	B91-C12								
376	B92-D12	1	100 AA	RPTO001309	11766,16	6,9	7	76,90	99,9968598
377	B93-E12								
378	B94-F12	1	90 AA	RPTO000556	10049,34	7,98	8	93,40	100
379	B95-G12	2	143 AA	RPTO000239	15709,27	7,96	5	35,60	57,6399477

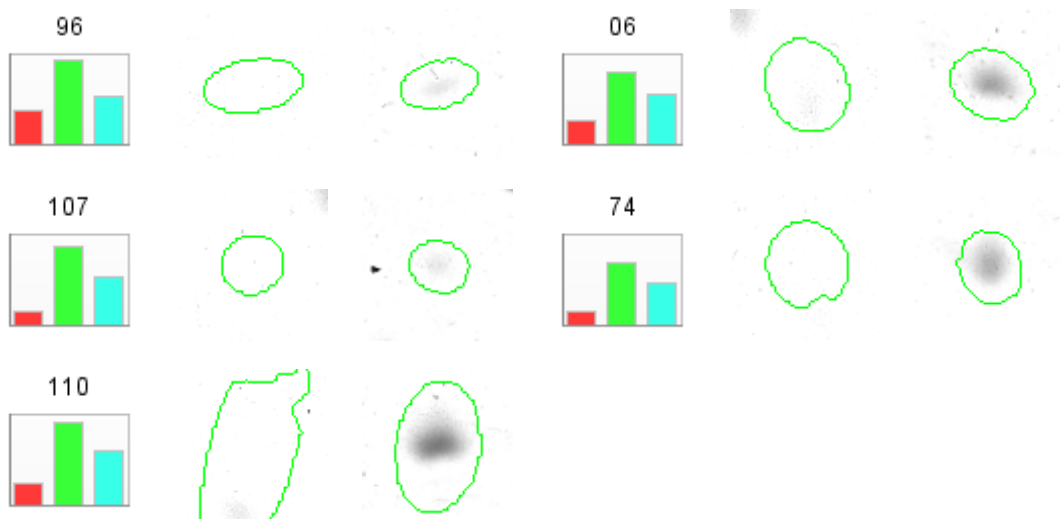
380	B96-H12	1	109 AA	RPTO000349	12629,64	9,2	7	74,90	99,9950231
-----	---------	---	--------	------------	----------	-----	---	-------	------------

6.8. ÜBEREXPRIMIERTE SPOTS AUS DEN STRESS-EXPERIMENTEN

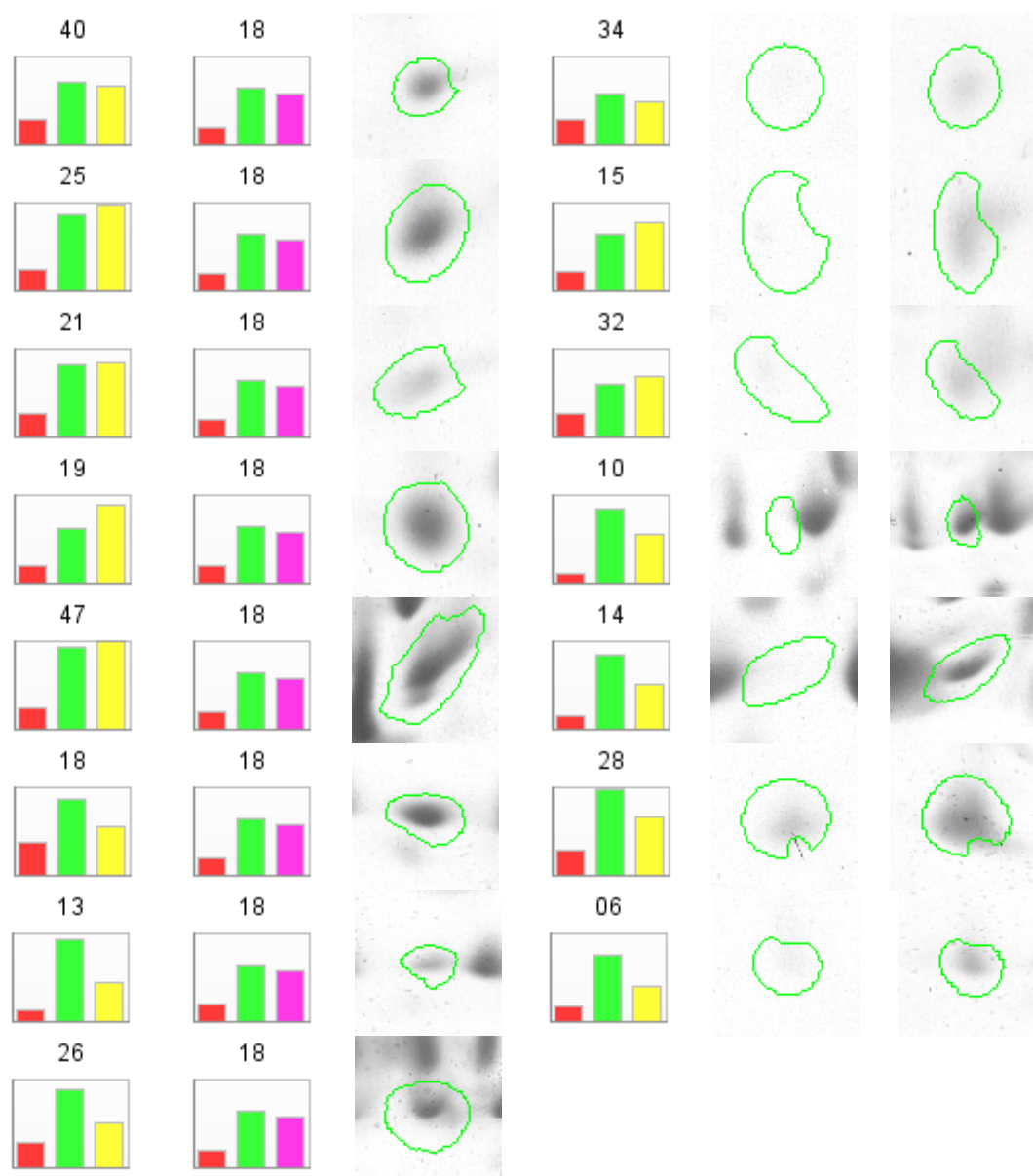
In den folgenden Abbildungen sind die überexprimierten Spots graphisch dargestellt. Gezeigt ist immer der Spot aus dem Gel der jeweiligen Stress Bedingung zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ($t= 5/10$ min, $t= 35/40$ min, $t= 125/130$ min) im Vergleich mit dem Spot aus dem Referenzgel und dem dazugehörigen Expressionsprofil. Es ist jeweils der identische Gelausschnitt dargestellt. Dieser wurde im Format 75 % zu 100 % für jeden Spot direkt aus dem Programm Delta 2D exportiert. Die Label Nummern entsprechen den Nummern in der Tabelle (s. 3.5.7.4, 3.5.7.5, 3.5.7.6, 3.5.7.7). Bei den Expressionsprofilen der Spots entspricht der rote Balken, dem der Referenz und der grüne Balken stellt die Expression des gleichen Proteins bei der Stressbedingung dar. Der blaue, gelbe oder lila Balken, der jeweils im Expressionsprofil erscheint, ergibt sich aus der Fusion der Gele im Projekt, hat aber hier keine weitere Bedeutung. Das Programm ermöglicht es nicht, den dritten Balken beim Exportieren zu entfernen.

pH 0,5 $t= 10$ min

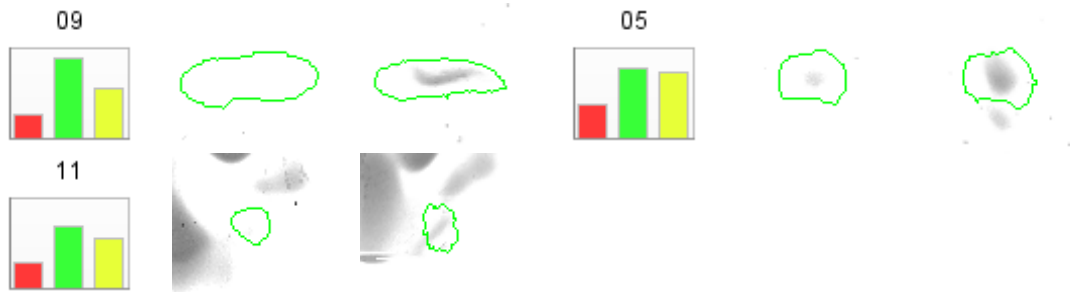




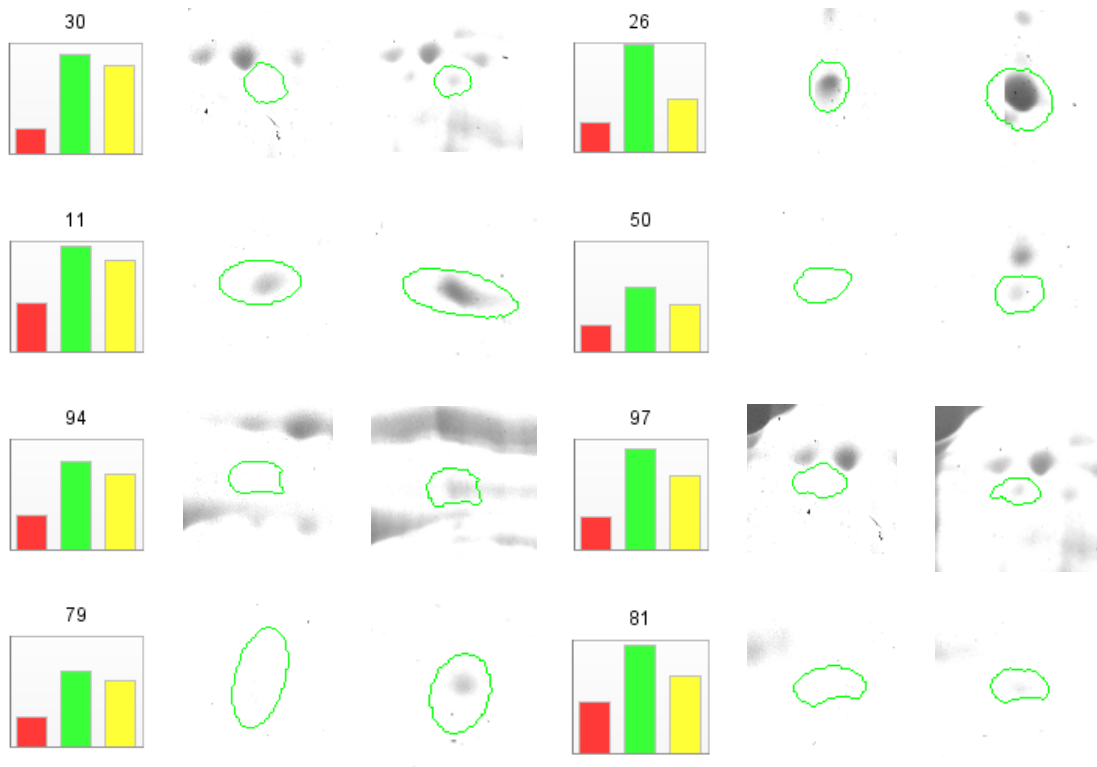
pH 0,5 t= 40 min



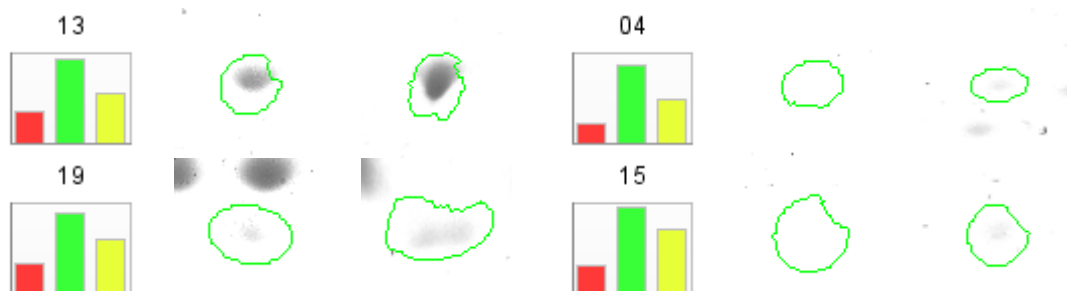
pH 0,5 t= 130 min

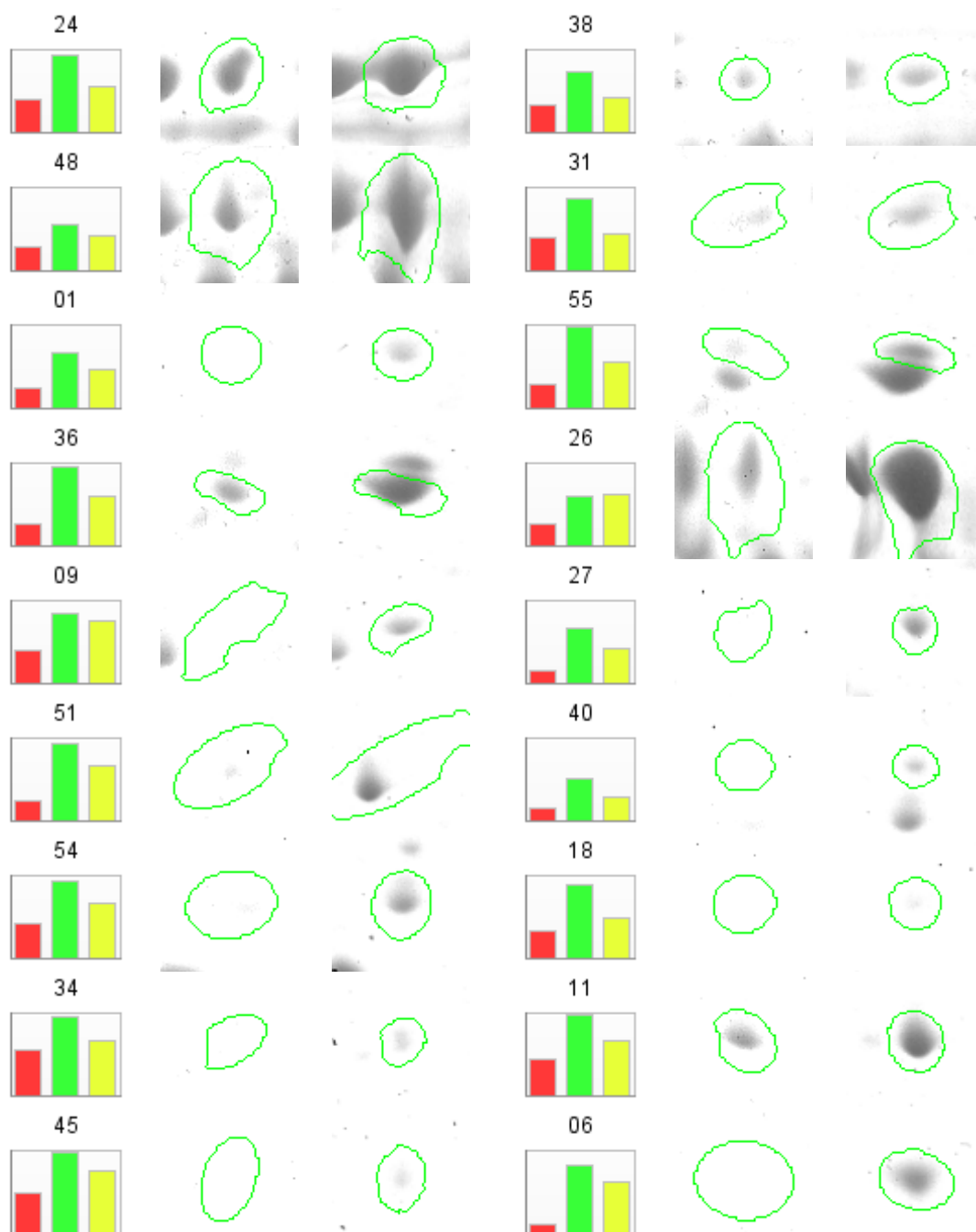


pH 1,8 t= 10 min

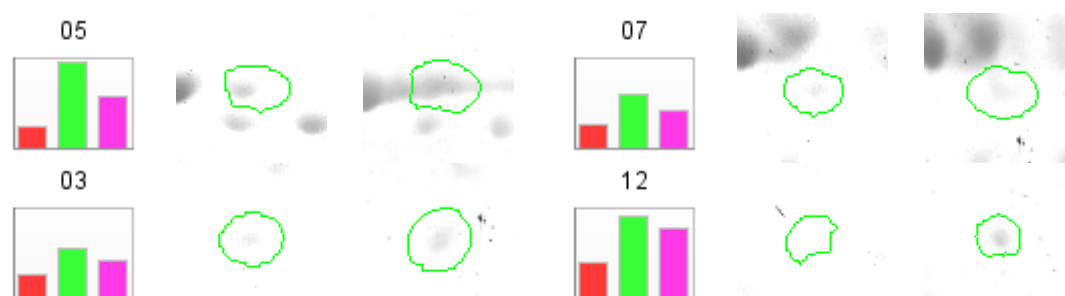


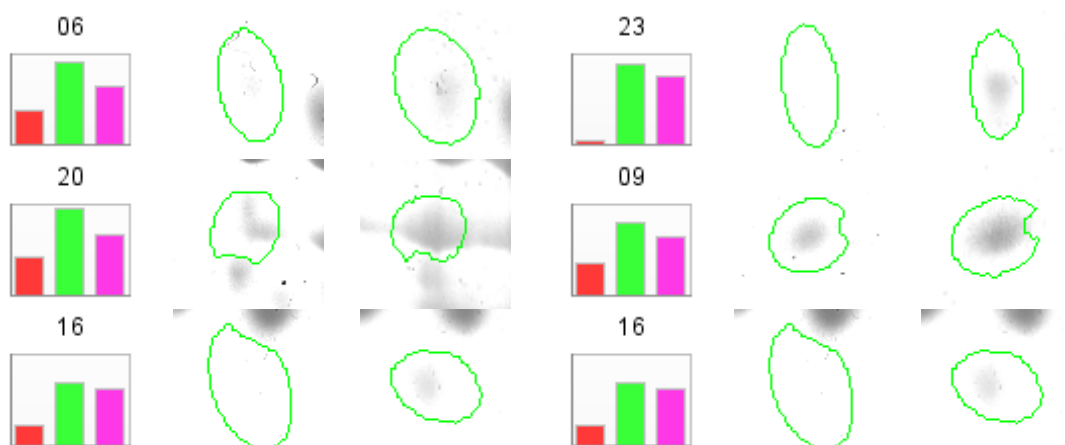
pH 1,8 t= 40 min



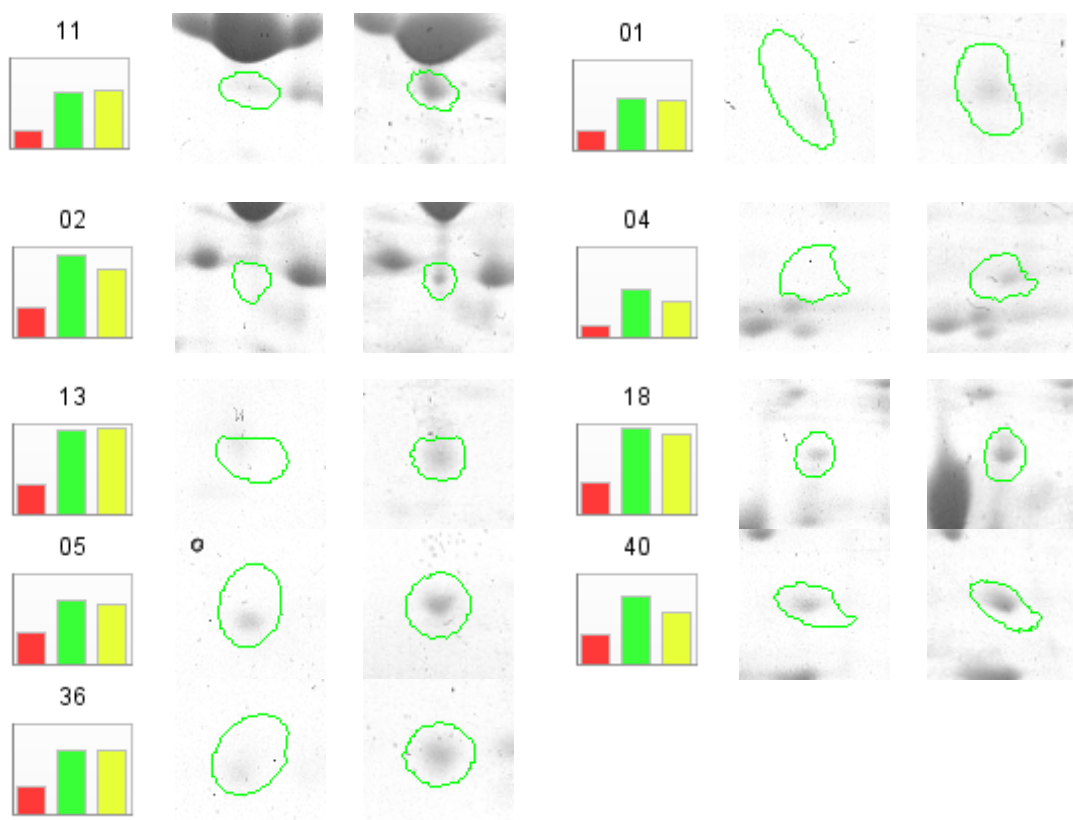


pH 1,8 t= 130 min

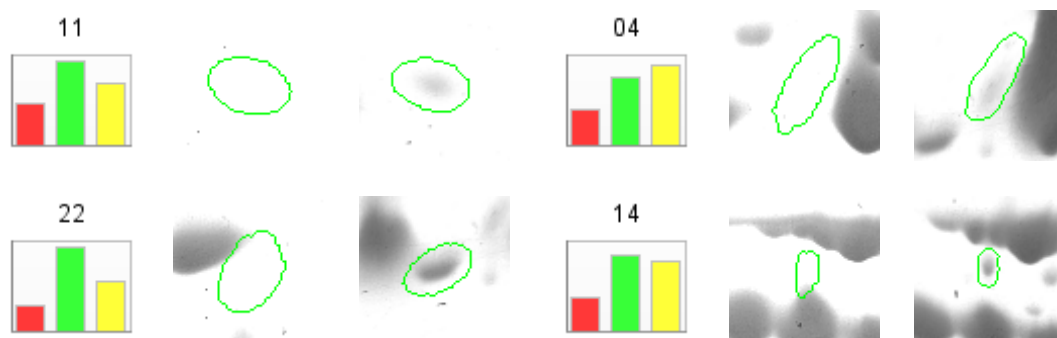


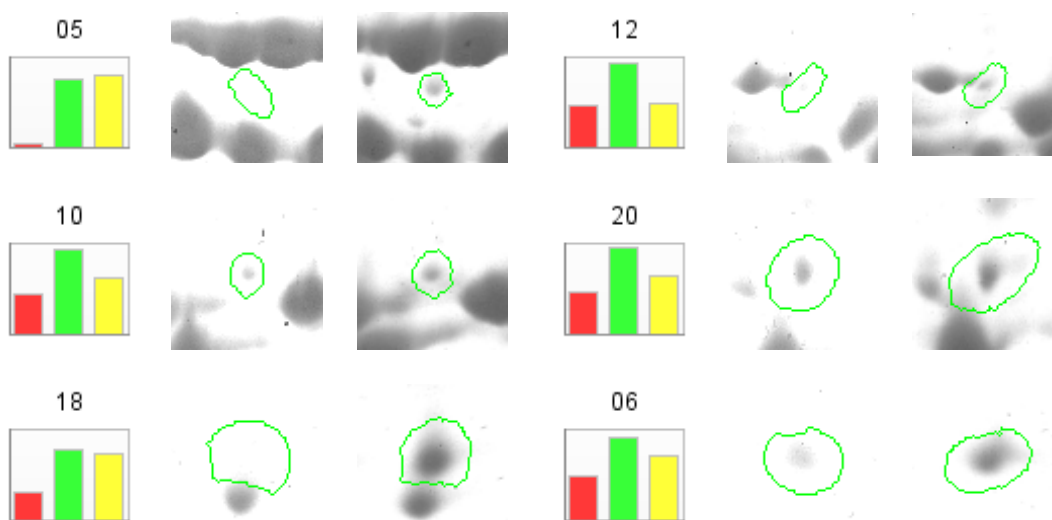


50°C t= 125 min

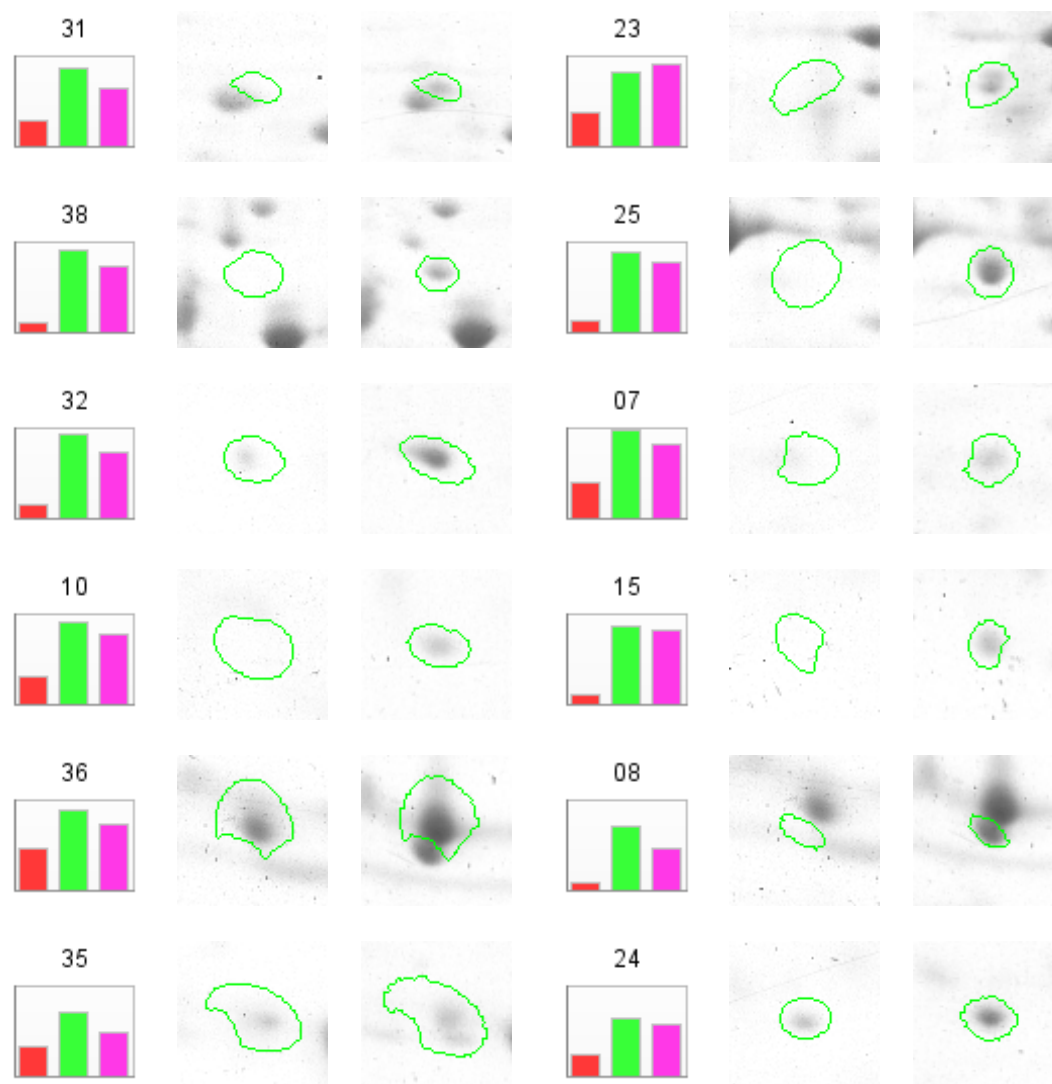


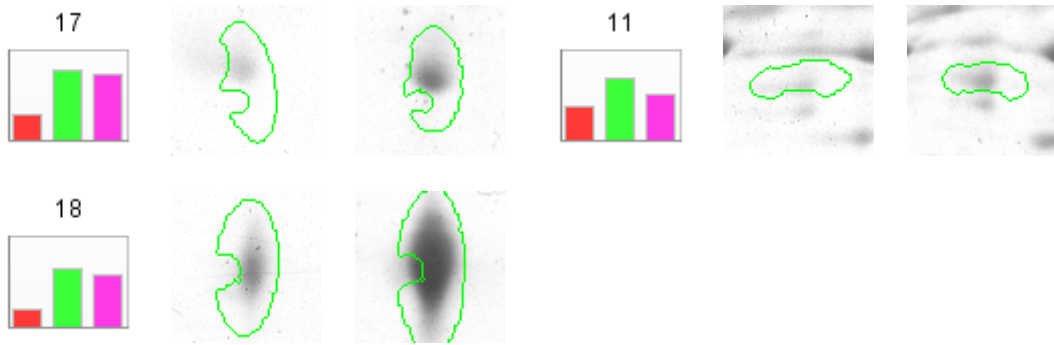
70°C t= 35 min





70°C t= 125 min





DANKSAGUNG

Ein ganz großes Dankeschön gilt **Prof. Wolfgang Liebl**, der mir durch die Vergabe dieses interessanten Themas die Möglichkeit gegeben hat, mich in vielen Bereichen der Molekularbiologie weiterzuentwickeln.

Prof. G. Gottschalk danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Ein ebenso großes Dankeschön gilt meinem Betreuer **Angel**. Zwischen Pipette und einer Traube von Leuten um ihn herum hatte er trotzdem immer ein offenes Ohr für mich und stand mir während der gesamten Arbeit mit hilfreichen Gesprächen zur Seite.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen **Eltern und Schwestern**. Sie waren jederzeit für mich da, entweder direkt vor Ort, oder auch aus meiner 500 km entfernten Heimat. Dabei geht an extra Dank an meinen persönlichen Diplom-Philologen bei der Korrektur der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe für die nette Arbeitsatmosphäre bedanken: bei den Leuten, mit denen ich angefangen habe und dir mir den Start in der neuen Stadt Göttingen sehr angenehm gestaltet haben: **Meike, Christel, Sonja, Christian, Jörg und Volker**, bei denen, die nur kurzzeitig die Laborluft erfrischt haben: **Judith, Katharina und Daniela** und bei denen, mit denen ich viel Freude bis zum Ende meiner Arbeit hatte: **Silja, Jörn, Michael, Milad, Heiko, Julia und Markus**. Dabei geht ein besonderer Dank an **Angel, Jörn und Silja** für das schnelle Korrekturlesen der Arbeit. Ein spezieller Dank geht an unsere Laborfee **Meggie**, denn durch sie war das Labor nur halb so chaotisch.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei dem Labor von **Rolf Daniel**. Die Zusammenarbeit mit **Carola, Steffi, Christiane (ein Dank extra als Formatierungschefin), Jörg und Tanja** war immer sehr angenehm und hat mir sehr viel Freude bereitet.

Dem Labor von **Prof. Hecker**, vor allem **Birgit Voigt** danke ich, dass sie mich so nett ihr Labor in Greifswald aufgenommen haben. **Heiko L.** danke ich für seine Hilfe bei bioinformatischen Auswertungen dieser Arbeit.

* * *

Meinem Freund **Jörg** danke ich für seine Unterstützung während meiner gesamten Arbeit. Selbst nach Arbeitsschluss blieb die Arbeit oft nicht außerhalb der Wohnungswände, was zum einen zwar auch mal anstrengend war aber dank Jörg war so mancher Frust gleich nur noch halb so schlimm, und zum anderen kamen auch oft sehr hilfreiche Gespräche zu Stande.

Ich bin froh, dass es dich gibt, ich liebe Dich!

* * *

CURRICULUM VITAE

persönliche Daten

Name, Vorname	Thürmer, Andrea
Geburtsdatum	04.09.1980
Geburtsort	Rostock
Familienstand	ledig, ohne Kinder
Nationalität	deutsch

Berufserfahrung

seit September 2007	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Geologischen Institut der Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung Geobiologie
September 2004 – August 2007	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie und Genetik

Promotion

September 2004 – August 2007	experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Arbeit
------------------------------	---

Studium

Oktober 1999 – Mai 2004	Studium der Biologie an der Universität Kassel Abschluss : Diplom – Biologe Schwerpunkt : Biochemie/Genetik Diplomarbeit : Funktion der cAMP-abhängigen Proteinkinase in Mensch und <i>Dictyostelium</i> Note : „sehr gut“
-------------------------	--

Schule

Juni 1999	Abitur am Richard-Wossidlo-Gymnasium, Ribnitz-Damgarten
-----------	---

Praktika/Weiterbildungen

Januar 2006 – Februar 2006	Weiterbildung für Proteomarbeiten an der Universität Greifswald, Labor Prof. M. Hecker
September 2002 – Oktober 2002	Praktikum in der DNA-Diagnostik Nord GmbH, Rostock-Warnemünde
Februar 2002 – April 2002	Praktikum im staatlichen Medizinal- und Lebensmitteluntersuchungsamt, Kassel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Angabe der verwendeten Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Andrea Thürmer

Göttingen, den