

---

# Proteomanalysen an *Halobacterium salinarum*

Christian Klein

---



München 2005



---

# **Proteomanalysen an *Halobacterium salinarum***

**Christian Klein**

---

Dissertation  
an der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Christian Klein  
aus Gelsenkirchen

München, den 27.01.2005



## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. D. Oesterhelt betreut.

### **Ehrenwörtliche Versicherung:**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 26.01.2005

Christian Klein

Dissertation eingereicht am 11. September 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. N. A. Dencher

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Januar 2005



## Publikationsliste

Kokoeva, M.V., Storch, K.-F., Klein, C., Oesterhelt, D. (2002) A novel mode of sensory transduction in archaea: binding protein-mediated chemotaxis towards osmoprotectants and amino acids. *EMBO*, 21 (10), 2312-2322

Zischka, H., Gloeckner, C. J., Klein, C., Willmann, S., Swiatek de Lange, M., Ueffing, M. (2004) Improved mass spectrometric identification of gel-separated hydrophobic membrane proteins after sodium dodecyl sulphate removal by ion-pair extraction. *Proteomics*, 4 (12), 3776-3782

Tebbe, A.\* , Klein, C.\* , Bisle, B., Siedler, F., Scheffer, B., Garcia-Rizo, C., Wolfertz, J., Hickmann, V., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D. (2005) Analysis of the Cytosolic Proteome of *Halobacterium salinarum* and its implication for genome annotation. *Proteomics*, 5 (1), 168-179

(\* contributed equally)

Klein, C., Garcia-Rizo, C., Bisle, B., Scheffer, B., Zischka, H., Pfeiffer, F., Siedler, F., Oesterhelt, D. (2005) The Membrane Proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics*, 5 (1), 180-197

Garcia-Rizo, C., Pfeiffer, F., Klein, C., Siedler, F., Oesterhelt, D. (in preparation) Improvement of proteomic data analysis and its application to *Halobacterium salinarum*.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Vorkommen und Einordnung von halophilen Archaea</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Halophilie</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Halobakterielle Retinalproteine</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 Aufbau der Zellhülle von halophilen Archaea</b> .....	<b>6</b>
1.4.1 Struktur des S-Layers von halophilen Archaea .....	7
1.4.2 Struktur des Bilayers von halophilen Archaea.....	8
1.4.2.1 Phospholipide .....	8
1.4.2.2 Glykolipide .....	9
1.4.3 Die Purpurmembran .....	10
<b>1.5 Flagellen und Flagellarmotor</b> .....	<b>11</b>
<b>1.6 Theorie der Elektrophorese</b> .....	<b>14</b>
1.6.1 Theorie der elektrischen Doppelschicht eines geladenen Teilchens.....	14
1.6.2 Bewegung von Polyionen im elektrischen Feld.....	15
1.6.3 Theorie der isoelektrischen Fokussierung .....	16
1.6.4 Entwicklung der isoelektrischen Fokussierung.....	18
1.6.5 SDS-Elektrophorese .....	19
1.6.6 Die zweidimensionale Elektrophorese.....	19
<b>1.7 Proteomics und Membranproteine</b> .....	<b>20</b>
<b>1.8 Zielsetzung</b> .....	<b>22</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Material, Geräte, Programme und Abkürzungen</b> .....	<b>23</b>
2.1.1 Material .....	23
2.1.2 Geräte .....	24
2.1.3 Programme .....	25
2.1.4 Abkürzungen .....	25
<b>2.2 Mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.2.1 Anzucht von <i>Halobacterium salinarum</i> .....	27
2.2.1.1 Einzelkolonien .....	27
2.2.1.2 Vorkultur (35 ml).....	27
2.2.1.3 Kultur (700 ml).....	27
2.2.1.4 Fermentor (10 Liter) .....	27
2.2.1.5 Fermentor (100 Liter).....	27

<b>2.3 Biochemische Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Zellaufschlüsse .....	28
2.3.1.1 Zellernte .....	28
2.3.1.2 Zellaufschluss mittels Dialyse .....	28
2.3.1.3 Zellaufschluss mittels French-Press .....	28
2.3.1.4 Zellaufschluss mittels Sonifizieren .....	29
2.3.1.5 Zellaufschluss mittels Freeze/Thaw .....	29
2.3.1.6 Zellaufschluss mittels Taurodeoxycholat .....	29
2.3.1.7 Zellaufschluss mittels Gefriertrocknung .....	30
2.3.1.8 Zellaufschluss mittels isopyknischer Aufarbeitung .....	30
2.3.1.9 Übersichtsdiagramm der Zellaufschlüsse und Aufarbeitungen .....	31
2.3.2 Membranreinigung .....	32
2.3.2.1 Diskontinuierlicher Dichtegradient .....	32
2.3.2.2 Kontinuierlicher Dichtegradient .....	32
2.3.2.3 Partielle Solubilisierung mit Triton X-100 .....	32
2.3.2.4 Phasenseparation mittels Triton X-114 .....	32
2.3.2.5 Carbonat-Extraktion .....	33
2.3.2.6 Chloroform/Methanol-Extraktion .....	33
2.3.3 Cytosolgewinnung .....	33
2.3.3.1 Cytosolfraktionierung mittels Gelchromatographie .....	33
2.3.3.2 Cytosolfraktionierung mittels Ammoniumsulfat-Fällung .....	34
2.3.4 Motorisolierung .....	35
2.3.4.1 Motorisolierung nach Kupper <i>et al.</i> .....	35
2.3.4.2 Motorisolierung mittels Bacitracin .....	35
2.3.4.3 Motorisolierung mittels EDTA .....	35
2.3.4.4 Motorisolierung mittels Direktsolubilisierung in C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> .....	36
2.3.4.5 Motorisolierung mittels Direktsolubilisierung in Taurodeoxycholat .....	36
2.3.4.6 Motorisolierung mittels Dialyse und Dichtegradient .....	36
2.3.5 Proteinbestimmung .....	36
2.3.5.1 Proteinbestimmung nach Warburg .....	36
2.3.5.2 Proteinbestimmung mittels BCA .....	37
2.3.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford .....	37
2.3.6 Proteindenaturierung .....	38
2.3.6.1 Acetonfällung .....	38
2.3.6.2 Modifizierte Acetonfällung nach Mastro und Hall .....	38
2.3.6.3 Chloroform/Methanol-Fällung .....	38
2.3.6.4 TCA-Fällung .....	39
2.3.7 Proteinsolubilisierung .....	39
2.3.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF) .....	39
2.3.8.1 IEF in immobilisierten pH-Gradienten .....	39
2.3.8.2 IEF in flüssigen Agarose-Gelen .....	41

2.3.8.3 IEF in Polyacrylamid-Gelen mit freien Carrier-Ampholyten (nach Klose) .....	42
2.3.8.4 IEF in trägerfreiem Gradienten mittels Free-Flow-Elektrophorese .....	44
2.3.9 SDS-PAGE und Transfer .....	46
2.3.10 Kationische/anionische Trennung .....	47
2.3.11 Gelfärbungen und Fluoreszenzmarkierung .....	49
2.3.11.1 Coomassie-Färbung .....	49
2.3.11.2 Kolloidale Coomassie-Färbung .....	49
2.3.11.3 Zink/Imidazol-Färbung .....	49
2.3.11.4 Fluoreszenz-Färbung mit Sypro-Ruby .....	49
2.3.11.5 Modifizierte Silberfärbung nach Heukeshoven .....	50
2.3.11.6 Silberfärbung nach Vorum .....	50
2.3.11.6 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen .....	51
2.3.12 Immunodetektion .....	51
2.3.12.1 Membrantransfer .....	51
2.3.12.2 Detektion mittels Antikörper (Immunologische Entwicklung) .....	52
2.3.13 SDS-Entfernung aus Gelen .....	52
2.3.14 Ausschneiden aufgetrennter Proteine .....	52
2.3.15 Enzymatische Proteinspaltung und Peptidaufarbeitung .....	53
2.3.15.1 Tryptische in-Gel Spaltung .....	53
2.3.15.2 Tryptische in-Lösung Spaltung .....	54
2.3.16 Chemische Proteinspaltung .....	54
<b>2.4 Massenspektrometrische Methoden .....</b>	<b>55</b>
2.4.1 Prinzip der Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) .....	55
2.4.2 Matrixpräparationen .....	55
2.4.2.1 Dried-Droplet HCCA .....	56
2.4.2.2 Dried-Droplet DHB/MHB .....	56
2.4.2.3 Dünnschicht HCCA .....	56
2.4.2.4 Dünnschicht DHB/Nitrocellulose .....	57
2.4.2.5 Targetbehandlung .....	57
2.4.3 Probenentsalzung .....	57
2.4.3.1 Probenentsalzung mittels ZipTip .....	57
2.4.3.2 Probenentsalzung in Poros-Säulchen .....	58
2.4.4 Fingerprint-Messung .....	58
2.4.4.1 Peptid-Standard .....	58
2.4.4.2 Messparameter MALDI-Fingerprint .....	59
2.4.5 Post-Source Decay-Messung (PSD-MALDI) .....	59
2.4.6 LC-MS/MS-Messungen (Q-TOF) .....	60
2.4.7 Auswertung der Massenspektren .....	61
<b>2.5 Elektronenmikroskopische Methoden .....</b>	<b>62</b>
2.5.1 Herstellung von beschichteten Kupferplättchen .....	62

2.5.1.1 Formvar beschichtete Kupferplättchen .....	62
2.5.1.2 Graphit beschichtete Kupferplättchen.....	62
2.5.2 Probenauftrag, Fixierung und negative Färbung .....	62
2.5.3 Kohle-Platin Beschattung .....	63
2.5.4 Messung.....	63
<b>2.6 Bioinformatische Methoden .....</b>	<b>64</b>
2.6.1 Datenfluss .....	64
2.6.2 Validierung massenspektrometrischer Ergebnisse .....	65
2.6.3 Vergleich zweidimensionaler Gele.....	66
<b>2.7 Chemische Methoden.....</b>	<b>67</b>
2.7.1 Detergenssynthese .....	67
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>68</b>
<b>3.1 Flagellarmotor .....</b>	<b>68</b>
3.1.1 EM und AFM-Aufnahmen von <i>H. salinarum</i> .....	68
3.1.2 Isolierung der Polarkappen nach Kupper.....	69
3.1.3 Behandlung der Zellen mit Bacitracin .....	73
3.1.4 Alternative Isolierungsversuche .....	74
3.1.5 Vergleich der beobachteten EM-Strukturen .....	78
<b>3.2 Cytosolproteom .....</b>	<b>79</b>
3.2.1 Übersicht des cytosolischen Proteininventars von <i>H. salinarum</i> .....	79
3.2.2 Gesamtcytosolauftrennung .....	80
3.2.3 Cytosolsubfraktionierung mittels Gelchromatographie .....	82
3.2.4 Cytosolsubfraktionierung mittels Ammoniumsulfat-Fällung .....	84
3.2.5 Überblick der Identifizierungen.....	84
<b>3.3 Membranproteom .....</b>	<b>86</b>
3.3.1 Membranproteine von <i>H. salinarum</i> .....	87
3.3.2 IEF-SDS Auftrennung nach Dialyse gegen Niedrigsalz.....	88
3.3.3 IEF-SDS Auftrennung von Dichtegradienten-Fractionen .....	90
3.3.4 IEF-SDS Auftrennung nach French-Press-NS.....	92
3.3.5 Verlust der Transducerproteine bei Niedrigsalzbehandlung.....	94
3.3.6 Vergleich unterschiedlicher Membranaufarbeitungen/Präparationen.....	95
3.3.7 IEF-SDS Auftrennung nach French-Press-HS.....	96
3.3.8 Verlust von Membranproteinen beim IEF-SDS-Transfer.....	101
3.3.9 IEF in Agarose-Matrix.....	103
3.3.10 IEF mittels Free-Flow Elektrophorese.....	104
3.3.11 Zweidimensionale Auftrennung mittels BAC/SDS .....	107
3.3.11.1 Vergleichende Analyse mittels BAC/SDS.....	108
3.3.12 LC-MS/MS Analysen eindimensionaler Auftrennungen.....	114
3.3.12.1 Analyse einer mittels SDS-PAGE aufgetrennten Membranfraktion.....	114

3.3.12.2 Analyse einer IEF-IPG aufgetrennten Membranfraktion .....	117
3.3.13 Identifizierte Membranproteine in Schlüsselfunktionen .....	118
3.3.13.1 ABC-Typ Transport Systeme .....	118
3.3.13.2 Transducerproteine .....	119
3.3.13.3 Atmungskette .....	119
3.3.13.4 Halocyanine .....	122
3.3.14 Verlust hydrophober Membranproteine durch Lösungsmittel .....	123
<b>3.4 Proteinanalytik .....</b>	<b>124</b>
3.4.1 Hochdurchsatz-Spaltung von Proteinen .....	124
3.4.2 Sensitivitätsbestimmung MALDI .....	125
3.4.3 Analyse der MALDI-identifizierten Peptide .....	126
3.4.4 Analyse der LC/MS/MS-identifizierten Peptide .....	127
3.4.5 Entfernung von SDS aus silbergefärbten Gelen .....	128
3.4.6 Spaltung und Identifizierung von Bakteriorhodopsin .....	130
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>132</b>
<b>4.1 Das Motorproteom .....</b>	<b>132</b>
4.1.1 Modelle zum archaealen Flagellarkomplex .....	132
4.1.2 Homologien der Flagelline von <i>H. salinarum</i> zu anderen Archaea .....	133
4.1.3 Glykosylierung der Flagelline .....	135
4.1.4 Energiequelle der Motorrotation .....	135
4.1.5 Modell des Flagellarmotors .....	137
<b>4.2 Cytosolproteom .....</b>	<b>140</b>
4.2.1 Übersicht des Proteininventars von <i>H. salinarum</i> .....	140
4.2.2 Vergleich des Proteininventars zu anderen Organismen .....	142
4.2.3 Peptidanalyse der Proteine von <i>H. salinarum</i> .....	143
<b>4.3 Membranproteom .....</b>	<b>145</b>
4.3.1 Übersicht zur Gewinnung und Auftrennung von Membranproteinen .....	145
4.3.2 Von der Zelle zur Membranfraktion .....	146
4.3.3 Theoretische Abschätzung der Membranproteinmenge .....	149
4.3.4 Membranproteine von <i>H. salinarum</i> .....	153
4.3.5 Membranhophilie .....	154
4.3.6 Isoelektrische Fokussierung von Membranproteinen .....	159
4.3.7 Alternative Auftrennungen und Visualisierung .....	163
4.3.7.1 Zweidimensionale Größenauftrennung im BAC/SDS-System .....	163
4.3.7.2 Eindimensionale SDS-Auftrennung zur Vorfraktionierung .....	164
4.3.8 Spaltung von Membranproteinen und massenspektrometrische Identifizierung .....	165
4.3.9 LC/MS/MS-Analysen der Membranfraktion .....	169
4.3.10 Die Problematik der TM-Helices und basische Membranproteine .....	170
4.3.11 Perspektiven der Membranproteomanalyse .....	174

<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>176</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>178</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>193</b>
<b>7.1 Detergenzien .....</b>	<b>193</b>
<b>7.2 Struktur von Bakteriorhodopsin .....</b>	<b>194</b>
<b>7.3 Homologievergleich archaealer Flagelline.....</b>	<b>195</b>
<b>7.4 Tabelle der Spots nach Triethylaminbehandlung.....</b>	<b>196</b>
<b>7.5 Identifizierte Proteine des Cytosolproteoms.....</b>	<b>197</b>
<b>7.6 Identifizierte Proteine der LC-MS/MS-Analyse .....</b>	<b>219</b>
<b>7.7 Aminosäurezusammensetzung der Membranproteine.....</b>	<b>230</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>231</b>
<b>Curriculum vitae.....</b>	<b>233</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Vorkommen und Einordnung von halophilen Archaea

Extrem halophile Archaea sind salzliebende Mikroorganismen, die optimales Wachstumsverhalten zwischen 2 und 4,5 M Natriumchlorid zeigen. Bedingungen mit solch hohen Salzkonzentrationen findet man im Toten Meer, in Salinen und in hypersalinen Seen aller Kontinente (Dundas, 1977).

Es gibt zwei grundlegende Strategien zur Anpassung an diese hohen äußeren Salzkonzentrationen: (1) Die Herstellung oder Akkumulation von niedermolekularen Verbindungen mit einem osmotischen Potential (kompatible Osmolyte) oder (2) die Kompensation durch eine ähnlich hohe Natrium-/Kaliumchloridkonzentration im Innern der Zelle (Kushner, 1988), welche bei den meisten anderen Organismen zu Denaturierung und Präzipitation der Proteine führt (Lanyi, 1974; Dym *et al.*, 1995). In Niedrigsalz und beim Entfernen bivalenter Kationen ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) kommt es zur osmotischen Lyse der Zellen (Oesterhelt und Stoeckenius, 1971).

Halophile Archaea bilden zusammen mit den methanogenen Archaea einen Ast des Urreiches der Archaea, die wiederum neben Bacteria und Eucarya eine eigene monophyletische Gruppe bilden (Woese, 1987), wobei als Kriterium die vergleichende Analyse der 16S-rRNA herangezogen wurde (Woese und Fox, 1977).

Diese Einteilung wird durch weitere Beobachtungen unterstützt:

Erstens sind die archaealen Lipide Phytanylether des Glycerins (und keine Fettsäureester wie bei Bacteria und Eucarya) (Langworthy und Pond, 1986), zweitens wird die Zellwand durch ein S-Layer aus Glykoprotein gebildet (keine Peptidoglykan-Zellwand) (König, 1988) und drittens ähneln die archaealen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen in ihrer DNA-Sequenz (vor allem in Regionen von funktioneller Bedeutung wie Zinkfinger und Substrat-Bindungsstelle) mehr den RNA-Polymerasen II der Eucarya als denen der einfacher aufgebauten Bacteria (Zillig *et al.*, 1988).

Halophile Archaea werden in 10 Gattungen unterteilt: *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halorobrum*, *Halobaculum* und *Halococcus*, die bei neutralem pH wachsen, sowie *Natronobacterium*, *Natronomonas*, *Natrialba* und *Natronococcus*, die alkalische Bedingungen bevorzugen (Grant und Larsen, 1989, Kamekura, 1998).

Das Genom von *Halobacterium salinarum* R1 (DSM671) hat eine Größe von 2,67 Mbp, welches sequenziert und annotiert vorliegt (Genom-Projekt Abteilung Oesterhelt, MPI Martinsried). Es besteht aus einem Chromosom (2 Mbp) und 4 Megaplasmiden von 284, 194,

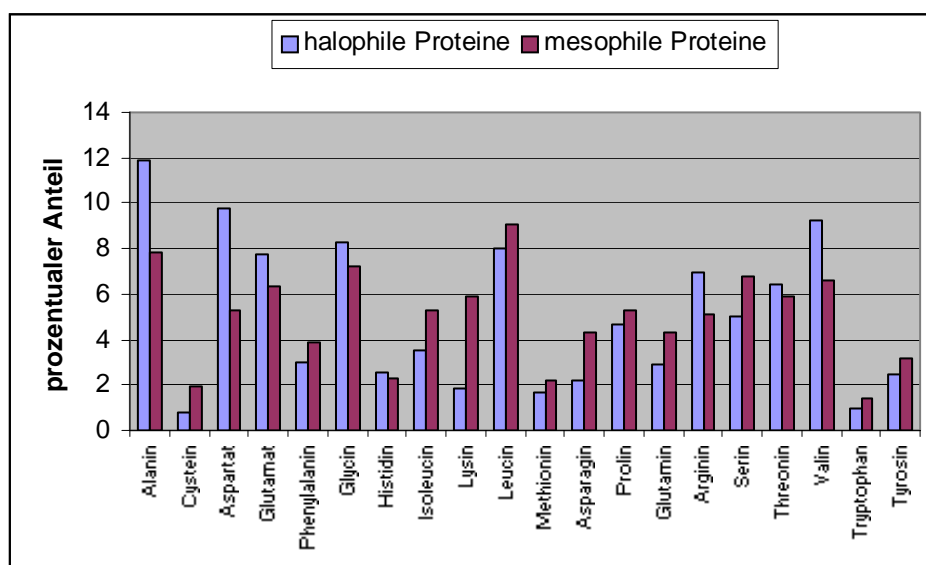
147 and 40 kbp. Auffallend ist ein GC-Gehalt von 68%, ein starker Dinukleotid-Bias (CG>GC; TA<AT) und die geringe Zahl von Stop Codons. Die 2774 für reale Proteine gehaltenen offenen Leserahmen (ORF's) decken 93% des Genoms ab. Insgesamt hat *H. salinarum* jedoch 9305 ORF's mit mindestens 100 Codons. Im Vergleich dazu hat das Genom von *E. coli* K-12 eine Größe von 4,639 Mbp (Blattner *et al.*, 1997), welches 4269 Open-reading-frames enthält (Link *et al.*, 1997).

Die halophilen Archaeen nutzen verschiedene Möglichkeiten zur Energiegewinnung: Neben der oxidativen Phosphorylierung können sie als Anpassung an die anaeroben Bedingungen, die wegen der geringen Löslichkeit von Sauerstoff in Gewässern mit hoher Salzkonzentration und hohen Temperaturen herrschen, anstelle von Sauerstoff auch Nitrat oder Fumarat als Endelektronenakzeptoren einsetzen, oder aber ATP durch Fermentation von Arginin produzieren (Hartmann *et al.*, 1980).

Von besonderer Bedeutung bei *Halobacterium salinarum* ist die Energiegewinnung durch einen retinalabhängigen Photosyntheseprozess, in dem das membranständige Protein Bakteriorhodopsin (BR) als lichtgetriebene Protonenpumpe fungiert.

## 1.2 Halophilie

Ein halophiles Protein wird als ein Protein definiert, welches in einem halophilen Organismus vorkommt (Kushner, 1988, Kushner und Kamekura 1988), der sein osmotische Gleichgewicht im Cytoplasma durch entsprechende Salzkonzentration, nicht jedoch durch sogenannte kompatible Osmolyte aufrecht erhält (Kempf und Bremer, 1998; Martin *et al.*, 1999). Diese halophilen Lebensbedingungen stehen im direkten Bezug zu Eigenarten der Primärsequenz der Proteine, die einen hohen Anteil saurer Aminosäuren besitzen, und damit auch zu den Eigenschaften der Proteine, wie Hydrophobizität und Stabilität der Struktur (Dennis und Shimmin, 1997).



**Abb. 1.1:** Vergleich der Aminosäurenverteilung von mesophilen Proteinen (Voet *et al.*, 1999) und den halophilen Proteinen von *H. salinarum*, wobei die Berechnung aus einem Datensatz der 1500 wahrscheinlichsten Proteine ermittelt wurde (F. Pfeiffer und J. Wolfertz).



Im Vergleich zu mesophilen Proteinen ist ein deutlich höherer Anteil an Aminosäuren mit negativ geladenen Seitenketten, vor allem Aspartat, aber auch Glutamat, und ein deutlich geringerer Anteil an positiv geladenen Lysinresten vorhanden. Demgegenüber steht ein verstärkter Einbau von Arginin (möglicherweise bedingt durch den hohen GC-Gehalt), dessen Seitenkette häufig an der Bildung von Salzbrücken innerhalb eines Proteins beteiligt ist. Bezüglich der hydrophoben Aminosäuren ist ein verstärkter Einbau der kleineren, sterisch weniger anspruchsvollen, Aminosäuren Valin und Alanin zu beobachten. Diese Ergebnisse entsprechen denen aus anderen halophilen Organismen (Madern *et al.*, 1995).

Die Oberflächenladung von halophilen Proteinen ist deutlich negativer als die von mesophilen Proteinen, wie Berechnungen aus Strukturvorhersagen, basierend auf Homologien, ergaben. Bei einer durchschnittliche Oberflächenverteilung von *H. salinarum* kommen je ein Aspartat und Glutamat auf eine Fläche von  $247 \text{ \AA}^2$ , bei *E. coli* jedoch nur auf  $364 \text{ \AA}^2$  (Essen, unveröffentlicht). Diese negativen Seitenketten sorgen zudem für eine verstärkte Hydratisierung, da Glutamat und Aspartat 7,7 bzw. 6 Wassermoleküle binden, Lysin hingegen nur 4,3 Wassermoleküle, gemessen bei  $-35^\circ\text{C}$  (Kuntz, 1971).

Neben dieser Wasserbindung werden auch signifikante Bindungen von Salzen an die native Struktur beobachtet (Pundak und Eisenberg, 1981, Bonnete *et al.*, 1993), ein Effekt, der bei nicht-halophilen Proteinen unbekannt ist.

Am besten untersucht ist die Malat Dehydrogenase von *Haloarcula marismortui* (*Hm* MalDH), die bei einer Verringerung der Salzkonzentration in einer Kinetik 1. Ordnung deaktiviert wird (Pundak *et al.*, 1981). Die Temperaturabhängigkeit der Deaktivierungskinetik führte zu der Annahme, dass halophile Proteine sich an unterschiedliche Umgebungen adaptieren, indem sie entropische und enthalpische Effekte kompensieren (Bonnete *et al.*, 1994). Eine Konsequenz daraus ist, dass bei Temperaturerniedrigung unter aussalzenden Bedingungen die Stabilität erniedrigt wird (Privalov *et al.*, 1986).

Eine Erklärung dieser Beobachtungen gibt das Solvatisierungs-Stabilisierungs-Modell (Zaccai *et al.*, 1989, Zaccai und Eisenberg, 1990):

In 1.5 M Kaliumphosphat wird die Struktur durch Aussalzen stabilisiert, die hydrophoben Wechselwirkungen werden im Proteininneren verstärkt, die geringe Hydrophobizität an der Oberfläche des Proteins verhindert eine Präzipitation. Bei einer Konzentration von 2 bis 4 M KCl hingegen kann das Protein nicht mit der Salzlösung um Wassermoleküle konkurrieren, jedoch wird nun die *Hm*MalDH stabilisiert durch ein Netzwerk von Interaktionen der Carboxylgruppen der Oberfläche mit hydratisierten Salz-Ionen, wodurch das Salz/Wasser-Verhältnis höher ist als das in der Umgebung.

Bei einer Erniedrigung der Salzkonzentration diffundieren die Salzionen aus der Struktur, es kommt zu einer Denaturierung der Struktur.

### 1.3 Halobakterielle Retinalproteine

Es gibt vier halobakterielle Retinalproteine: Bakteriorhodopsin (BR), Halorhodopsin (HR), Sensorrhodopsin I (SR I) und Sensorrhodopsin II (SR II).

Alle vier sind strukturell ähnliche 7- transmembran  $\alpha$ -helikale Proteine, bei denen der Chromophor Retinal über die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes in der siebten Helix kovalent an das Apoprotein gebunden ist (Lembke und Oesterhelt, 1981). Während beim Sehvorgang der hohen Eukarya der Übergang von der 11-*cis*-Form zum all-*trans*-Isomeren erfolgt (Wald, 1968), liegt bei den halobakteriellen Retinalproteinen das Retinal im Grundzustand in der all-*trans*-Form vor, das nach Absorption eines Photons zur 13-*cis*-Form isomerisiert.

Die Retinalproteine sind homolog mit einer 32% Sequenzidentität zwischen BR und HR (Blanck und Oesterhelt, 1987), mit 26% zwischen BR und SR I, mit 32% zwischen BR und SR II (Seidel *et al.*, 1995), mit 33% zwischen SRI und SR II und mit 23% zwischen HR und SR I (Blanck *et al.*, 1989).

**Bakteriorhodopsin** ist ein Protein mit 248 Aminosäuren und einer apparenten molekularen Masse von 26 kD. Es transportiert im Licht Protonen aus der Zelle und erzeugt dabei eine elektrochemische Potentialänderung (Oesterhelt und Stoeckenius, 1973). Dieser Protonengradient wird sowohl von einer membranständigen ATP-Synthase zur ATP-Synthese genutzt (Hartmann und Oesterhelt, 1977), als auch von einem Natrium/Protonen Antiporter (Lanyi und MacDonald, 1976), der den Protonengradienten in einen Natriumgradienten umwandelt. Dieser kann dann wiederum von sekundären Transportsystemen wie Natrium/Aminosäure-Symportern genutzt werden (MacDonald *et al.*, 1977).

BR liegt als integrales Membranprotein in einem distinkten Bereich der Zellmembran vor, der Purpurmembran genannt wird (Stoeckenius und Rowen, 1967; Blaurock und Stoeckenius, 1971). Hier bildet es zusammen mit Lipiden als Trimer hochgeordnete zweidimensionale Kristalle aus (Henderson *et al.*, 1990).

Wie aus der Struktur bekannt ist, bilden die sieben transmembranen  $\alpha$ -Helices eine Pore, an deren Innenwand das Retinal als protonierte Schiff'sche Base an Lys<sub>216</sub> gebunden ist und die Pore in einen extrazellulären Protonenkanal (EC-Kanal) und einen cytoplasmatischen Protonenkanal teilt (CP-Kanal) (Oesterhelt *et al.*, 1992).

Der katalytische Photozyklus ist durch die Sequenz spektroskopisch unterscheidbarer Intermediate BR  $\rightarrow$  J  $\leftrightarrow$  K  $\leftrightarrow$  L  $\leftrightarrow$  M<sup>I</sup>  $\rightarrow$  M<sup>II</sup>  $\leftrightarrow$  N  $\leftrightarrow$  O  $\rightarrow$  BR charakterisiert.

Beim Übergang von BR nach J isomerisiert das Retinal von der all-*trans*-Form zum 13 *cis*-Retinal und relaxiert über die Intermediate K und L. Durch diese Isomerisierung wird der  $pK_a$ -Wert der Schiff'schen Base erniedrigt, was einen Protonentransfer auf Asp<sub>85</sub> (im EC-Kanal) ermöglicht und so zur deprotonierten Schiff'schen Base ( $M^I$ ) führt. Durch die Protonierung von Asp<sub>85</sub> wird das Protonenbrückensystem im EC-Kanal veranlasst, ein Proton an das Außenmedium abzugeben. Um einen vektoriellen  $H^+$ -Transport zu gewährleisten, muss sich die Zugänglichkeit der Schiff'schen Base ändern, damit sie ausschließlich von Asp<sub>96</sub> (im CP-Kanal) protoniert wird, wobei das N-Intermediat entsteht. Dieser irreversible Übergang  $M^I \rightarrow M^{II}$  wird als Schalter des Proteins bezeichnet. Nach Reisoomerisierung des Retinals zur all-*trans*-Form und Reprotonierung von Asp<sub>96</sub> von der cytoplasmatischen Seite entsteht das O-Intermediat, welches dann nach Deprotonierung des Protonenakzeptors und Änderung der Zugänglichkeit der Schiff'schen Base zum Ausgangszustand zurückkehrt (Krebs und Koharana, 1993; Oesterhelt *et al.*, 1992; Lanyi, 1993).

**Halorhodopsin** besteht aus 274 Aminosäuren und hat ein apparentes Molekulargewicht von 27.000. Es ist insbesondere im Bereich der Retinalbindungstasche dem Bakteriorhodopsin ähnlich, pumpt jedoch unter Belichtung  $Cl^-$ -Ionen in die Zelle.

Dieser Anionentransport ist nötig, um während des Wachstums der Zelle isotonische Bedingungen aufrechtzuerhalten. Während Kationen entsprechend dem negativen inneren Membranpotential passiv aufgenommen werden können, muss für Anionen ein aktives Transportsystem vorhanden sein. Halorhodopsin durchläuft ähnlich wie BR einen Photozyklus, der sich jedoch dadurch unterscheidet, dass die Schiff'sche Base mit dem Retinal nicht deprotoniert wird, was durch das Fehlen von beteiligten  $H^+$ -Akzeptoren bedingt ist (Oesterhelt und Tittor, 1989). Dadurch können im Normalfall keine Protonen gepumpt werden, wohl aber andere Anionen wie Bromid, Jodid und Nitrat, nicht aber Fluorid (Bamberg *et al.*, 1984; Duschl *et al.*, 1990). Die Struktur konnte von Kolbe bei einer Auflösung von 1,8 Å gelöst werden (Kolbe *et al.*, 2000).

**Sensorrhodopsin I**, aus 240 Aminosäuren bestehend und mit einem apparenten Gewicht von 25.000, ist ein Lichtrezeptor, der über eine Transduktionskette phototaktische Reize an den Flagellarmotor übermittelt. Dies kann sowohl zu einer positiven Phototaxis hin zu gelbem, der für BR optimalen Wellenlänge, als auch zu einer photophobischen Reaktion gegenüber UV/Blau Licht führen (Spudich und Bogomolni, 1988; Spudich, 1993).

**Sensorrhodopsin II** ist ein zweiter Photorezeptor, bestehend aus 236 Aminosäuren und mit einem apparenten molekularen Gewicht von 23.000. Er vermittelt eine photophobische

## 1. Einleitung

Reaktion der Zelle auf Blaulich (Takahashi *et al.*, 1985; Marwan und Oesterhelt, 1987; Marwan und Oesterhelt, 2000).

Ein fundamentaler Unterschied der beiden Sensorrhodopsine zu BR und HR besteht darin, dass hier die Konformationsänderung eine Signalweiterleitung vermittelt, jedoch unter physiologischen Normalbedingungen keinen Ionentransport. In vitro konnte jedoch ein Protonentransport nach aussen nachgewiesen werden, der bei Orangelicht aus einem 1-Photon Prozess, bei Blaulich aus einem 2-Photonen Prozess (Haupts *et al.*, 1996). Die Signaltransduktion wird durch die Generierung eines aktiven Signalzustandes gestartet (Spudich, 1993). Zusammen mit einem Transduktormolekül, HtrI bzw. HtrII (halobacterial transducer of sensory rhodopsin), bilden die Sensorrhodopsine SRI und SRII heterodimere Komplexe (Ferrando-May *et al.*, 1993, Zhang und Spudich, 1998) die drei wesentliche Funktionen erfüllen: Absorption des Lichtes (Photorezeption), Aktivierung der Signalkette (Excitation) und Abschalten der aktivierenden Konformation (Adaption) (Marwan *et al.*, 1995).

Diese Transduktionsproteine haben wie die Chemorezeptoren der Bacteria eine homologe Signaldomäne, die von zwei Methylierungsdomänen flankiert wird. Es fehlt jedoch die extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, da im Phototransduktionskomplex der halophilen Archaea diese durch ein Retinalprotein ersetzt ist.

Neben den an der Phototaxis beteiligten Transduktionsproteinen HtrI und HtrII sind weitere Transduktionsproteine an folgenden Signalprozessen beteiligt: Aerotaxis (HtrVIII/Htr8 und HemAT/Htr10, Hou *et al.*, 2000), Chemotaxis (BasT/Htr3 und Car/Htr11, Kokoeva und Oesterhelt, 2000; Storch *et al.*, 1999) und Osmotaxis (CosT/Htr5, Kokoeva *et al.*, 2002)

Die Steuerung des Flagellarmotors verläuft in allen Fällen über spezifische Phosphorylierungsschritte unter Beteiligung von weiteren Che-Proteinen, die den entsprechenden Proteinen der Signaltransduktion für Chemotaxis in *E. coli* homolog sind (Rudolph und Oesterhelt, 1995), sowie über den Schalfaktor Fumarat, der als sekundärer Botenstoff dient (Marwan *et al.*, 1990 für *H. salinarum*; Montrone *et al.*, 1996 für *E. coli*).

### **1.4 Aufbau der Zellhülle von halophilen Archaea**

Die Zellhülle (cell envelope) der Archaea besteht aus einer von Phospho- und Glykolipiden gebildeten Doppelschicht (Bilayer), und einer darüberliegenden kristallinen Oberflächenschicht (S-Layer, Surface-Layer).

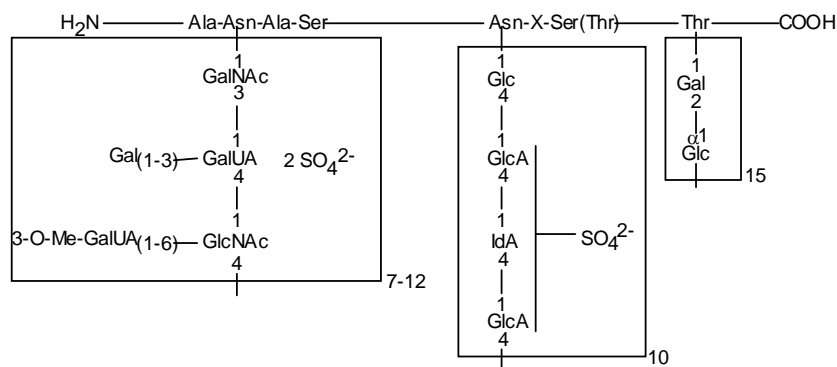
Diesem S-Layer kommt, im Gegensatz zu den Bakteria, bei den halophilen Archaea eine formstabilisierende Funktion zu; halophile Archaea besitzen eine Stäbchenform mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,5 µm und einer Länge von 4-10 µm (Stoeckenius *et*

*al.*, 1979). Der Begriff Zellwand ist bei halophilen Archaea nicht anzuwenden, da dieser beschränkt ist auf die formstabile Schicht einer einzelnen Zelle, die auch nach der Behandlung mit Detergenzien als sogenannter Sakkulus ihre Form behält (Kandler und König, 1993). Demgegenüber genügt der Entzug von Magnesiumionen, um die kristalline Struktur zu zerstören (Oesterhelt und Stockenius, 1974).

#### 1.4.1 Struktur des S-Layers von halophilen Archaea

Die Oberflächenschicht von halophilen Archaea besteht aus Molekülen eines Glykoproteins (Mescher und Strominger, 1976), mit einem Molekulargewicht von 89.700 (Protein) und 30.000 (Zuckerreste) (Lechner und Sumper, 1987). Die Zucker des Glykoproteins sind an drei verschiedene Peptidmotive geknüpft:

- (1) Ein sulfatisiertes Glykosaminoglykan, bestehend aus N-Acetylgalaktosamin, Galakturonsäure, Galaktose, N-Acetylglukosamin, und 3-O-Methylgalakturonsäure, ist über N-Acetylgalaktosamin an Asparagin geknüpft (Paul *et al.*, 1986).
- (2) Eine zehnfach sich wiederholende Abfolge von Glukose und jeweils sulfatisierter Glukuronsäure, Iduronsäure und Glukuronsäure ist mit dem Protein mittels der N-glukosidischen Bindungseinheit Asparaginyglukose verbunden (Wieland *et al.*, 1983).
- (3) Ungefähr 15 Disaccharide, bestehend aus Glukose und Galaktose, sind O-glukosolisch mit Threonin verknüpft (Mescher und Strominger, 1976).



**Abb. 1.2:** Schematischer Aufbau des Glykoproteins.

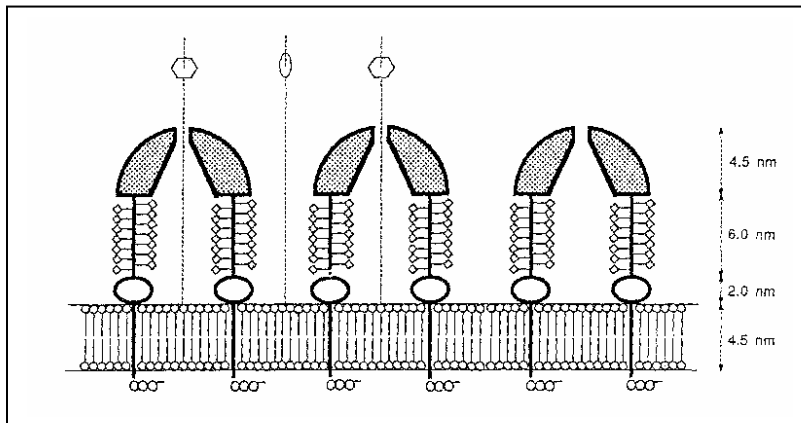
Die Polypeptidkette des Glykoproteins besitzt einen einzigen hydrophoben Bereich aus 21 Aminosäuren, welcher als Membrananker fungieren kann (Lechner und Sumper, 1987).

Eine Besonderheit des Glykoproteins besteht in seiner außergewöhnlichen Acidität, die dadurch bedingt ist, dass erstens mehr als 20% seiner Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure sind (Mescher und Strominger, 1976), zweitens ein Mol des Glykoprotein 40 bis 50 Mol Uronsäure und seiner Glykokonjugate enthält (Paul *et al.*, 1986) und drittens 40

## 1. Einleitung

bis 50 Mol Sulfatreste pro Mol Glykoprotein an die Zucker gebunden sind (Wieland *et al.*, 1980).

Die dreidimensionale Struktur des S-Layers des halophilen Archaeon *Halobacterium volcanii* besteht aus einem P6-symmetrischen Gitter mit einem Abstand von 16,8 nm von Zentrum zu Zentrum. Es werden dabei 4,5 nm hohe kuppelförmige Komplexe gebildet, die die Form von umgedrehten Trichtern haben, die eine Pore an deren jeweiligen Wendepunkten besitzen.

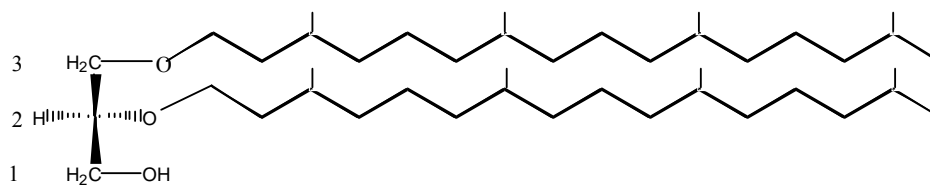


**Abb. 1.3:** Dreidimensionales Modell des Glykoproteins von *H. volcanii* (nach Kessel *et al.*, 1988).

### 1.4.2 Struktur des Bilayers von halophilen Archaea

Die polaren Lipide der extremen Halophilen bestehen aus einem Haupt-Phospholipid und einem Haupt-Glykolipid, sowie weiteren Neben-Phospho- bzw. Glykolipiden.

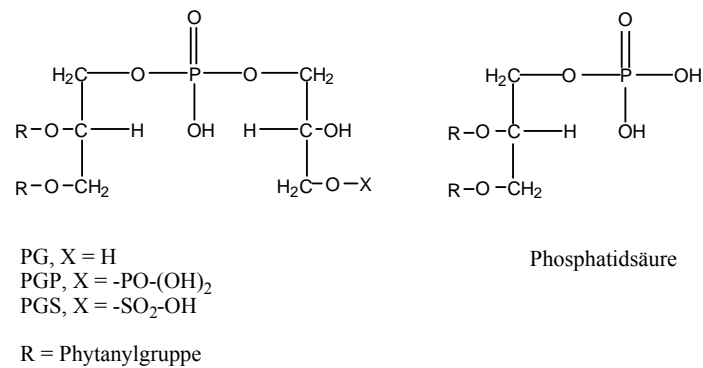
Alle Membranlipide sind Derivate eines C<sub>20</sub>-C<sub>20</sub>-Diacylglycerol-Diethers, des *sn*-2,3 Diphytanylglycerol-Diethers (Archaeol) (Kates, 1978).



**Abb. 1.4:** *sn*-2,3 Diphytanylglycerol-Diether (Archaeol).

#### 1.4.2.1 Phospholipide

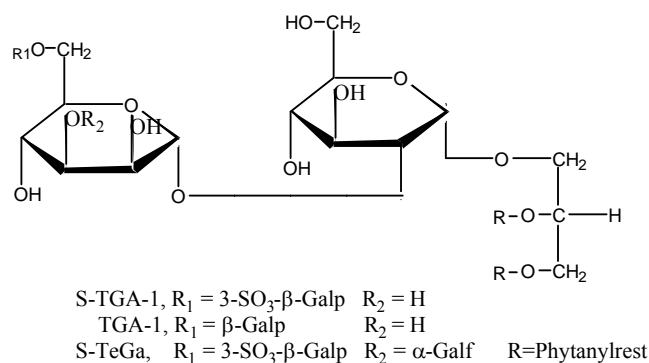
Die Phospholipide der halophilen Archaea bestehen aus der Hauptkomponente PGP (Phosphatidylglycerol-phosphat), und den Nebenkomponenten PG (Phosphatidylglycerol), PGS (Phosphatidylglycerol-sulfat) und PA (Phosphatidsäure) (Lanzotti *et al.*, 1989; Moldoveanu *et al.*, 1990).



**Abb. 1.5:** Phospholipide von *Halobacterium salinarum*.

#### 1.4.2.2 Glykolipide

Die Glykolipide bestehen hauptsächlich aus S-TGA-1 (sulfatisiertes Triglykosylarchaeol) sowie TGA-1 (Triglykosylarchaeol) und S-TeGA (sulfatisiertes Tetraglykosylarchaeol). Die Galaktosereste können sowohl als Furanose (Galf) oder Pyranose (Galp) vorliegen.



**Abb. 1.6:** Glykolipide von *Halobacterium salinarum*.

Dieser ungewöhnliche Lipidaufbau kann als Anpassung (oder Entwicklung) an die Lebensbedingungen der Archaea interpretiert werden:

- (1) Die Alkyletherstruktur, im Gegensatz zu der bei Eukarya and Prokarya vorkommenden Acylester-Struktur, bedeutet eine Stabilisierung der Lipide über einen größeren pH-Bereich.
- (2) Die gesättigten Alkylseitenketten verleihen eine höhere Unempfindlichkeit gegenüber oxidativer Schädigung, was speziell bei den luft- und lichtausgesetzten Halophilen von Bedeutung ist.
- (3) Die ungewöhnliche *sn*-2,3 Konfiguration des Glyceringerüsts kann diesem vermutlich einen erhöhten Widerstand gegenüber Phospholipasen anderer Organismen verleihen (Kates, 1992).

Eine spezielle Funktion kommt dem S-TGA-1 zu, welches ausnahmslos in der extrazellulären Schicht des Bilayers vorhanden ist.

### 1.4.3 Die Purpurmembran

In der Zellmembran von halophilen Archaea lassen sich inselförmige Membranbereiche mit einem Durchmesser von ca. 0,5  $\mu\text{m}$  nachweisen, die zu 75% (w/w) aus Bakteriorhodopsin und zu 25% (w/w) aus Lipiden, entsprechend zehn Lipidmolekülen auf ein Protein, bestehen (Sumper *et al.*, 1976, Jonas *et al.*, 1990) und aufgrund ihrer Farbe Purpurmembranen benannt wurden (Stoeckenius und Rowen, 1967).

Von *H. salinarum* ist bekannt, dass Zellen, deren Wachstum nicht durch mangelnde Sauerstoffzufuhr limitiert wird, jedoch keine Purpurmembran synthetisieren (Oesterhelt und Stoeckenius, 1973).

Durch Dichtegradientenzentrifugation lassen sich neben der Purpurmembran noch zwei weitere Membranfraktionen erhalten, eine sogenannte Rote Membran und eine Braune Membran.

Untersuchungen zur Biosynthese der Purpurmembran führten zu dem Ergebnis, dass schon in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen (vor der BR-Synthese) alle Lipide der Purpurmembran vorhanden sind und dass die Braune Membran, die Bakterioopsin (retinalfreies BR) enthält, eine Vorstufe der Purpurmembran ist und erst nach Reaktion mit Retinal zu dieser auskristallisieren kann (Sumper *et al.*, 1976).

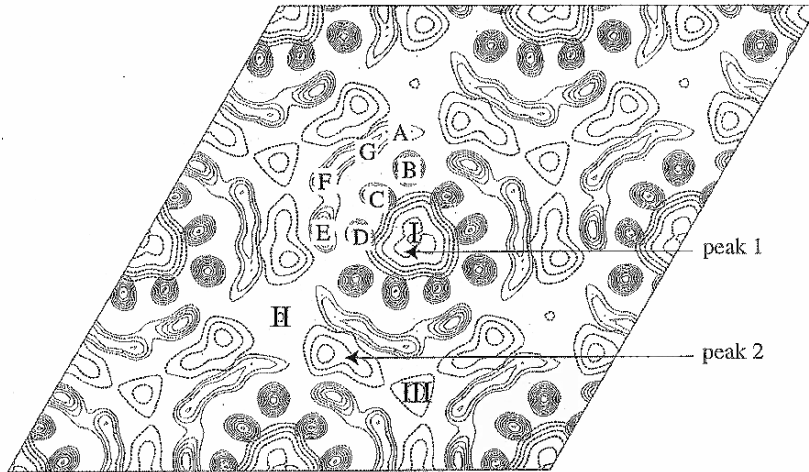
Diese Anordnung als Trimer in einem hexagonalen Gitter wird dabei sowohl durch Protein-Protein-Wechselwirkungen als auch durch Protein-Lipid-Wechselwirkungen bedingt.

Die Beteiligung von Protein-Protein-Wechselwirkungen konnte durch den Austausch von Aminosäuren gezeigt werden, die für Wechselwirkungen der Helix D und der benachbarten Helix B eines weiteren Bakteriorhodopsins verantwortlich sind. Die Mutationen I117A, I117F und G113L (zur Struktur von BR siehe Abschnitt 9.2) führten dabei zu einer verminderten Ausbildung der Gitterstruktur (Krebs *et al.*, 1997).

Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Seitenketten von Tryptophanresten und Kohlenhydraten, denen allgemein eine bedeutende Rolle bei Zucker-Protein-Wechselwirkungen zukommt (Qian *et al.*, 1995), sind jedoch bei Stabilisierung der Trimerenbildung von BR nicht beteiligt.

Durch In-Vivo-Markierung der Kopfgruppe von S-TGA-1, welches ausschließlich auf der extrazellulären Membranseite vorkommt (Essen *et al.*, 1998), mit  $^2\text{H}_7$ -Glucose konnten diese in PM-Proben mittels Neutronenbeugung lokalisiert werden (Weik *et al.*, 1998). Die aus elektronenmikroskopischen Messungen lokalisierten Phytanyl-Seitenketten und Tryptophanreste (Grigorieff *et al.*, 1996) wurden mit diesen korreliert (Weik *et al.*, 1998).





**Abb. 1.7:** Differenz-Fourier-Karte zwischen markierten und unmarkierten PM-Proben. Positive Differenzen (gestrichelte Linien) korrelieren mit den deuterium-markierten Positionen von S-TGA-1 (Peak 1 und 2). A-G entsprechen den sieben Helices von BR. Die Punkte I-III entsprechen  $C_3$ -Achsen im PM-Gitter (nach Weik *et al.*, 1998).

Abbildung 1.7 zeigt hierbei die Sicht von der cytoplasmatischen Seite, die 7 Helices eines BR Monomers (A-G) sind eingezeichnet. Zu erkennen ist die Lokalisation von S-TGA-1 Kopfgruppen im Zentrum eines BR-Trimers (Peak 1), sowie eine weitere Kopfgruppen zwischen den Symmetrieachsen II und III. Eine Interaktion der aromatischen Seitenketten von BR mit den Phytanylketten ist für die Ausbildung der Trimerstruktur (W80, nicht jedoch Y64, Peak 1) und des Gitters (W12-W10 und vermutlich F135-Y131, Peak 2) von Bedeutung, wie durch eine Kristallstruktur des BR-Trimers (Essen *et al.*, 1998) sowie eine Zerstörung der nativen PM-Struktur bei einer W80 Mutation gezeigt wurde (Besir und Oesterhelt, unpubliziert).

Die Funktion der kristallinen Gitterstruktur der Purpurmembran besteht in einer Stabilisierung des Chromophors, welcher im Rahmen des Photozyklus eine spezifische Konformationsänderung von der all-*trans*-Form zum 13-*cis*-Retinal eingeht. Bei Belichtung von BR-Molekülen, die nicht in einer Gitterstruktur vorliegen, kann das 9-*cis*-Retinal gebildet werden, welches von der Schiff'schen Base (Lys<sub>216</sub>) als Retinal abgespalten wird.

### 1.5 Flagellen und Flagellarmotor

Die Fortbewegung erfolgt bei den halophilen Archaea über ein polar insertiertes Geißelbündel von fünf bis zehn Flagellarfilamenten, welche sich distinkt am Pol der stäbchenförmigen Zelle befinden (Kupper *et al.*, 1994). Bei Drehung im Uhrzeigersinn (CW) der rechtsgedrehten helikalen Flagellarfilamente bewegen sich die Zellen vorwärts, bei Drehung gegen den Uhrzeigersinn (CCW) rückwärts. Ohne äußere Reize ändern sie spontan alle 20 bis 30 Sekunden ihre Schwimmrichtung, bei Reizeinfluss wird der zeitliche Abstand verkürzt oder verlängert, was Photo- und Chemotaxis ermöglicht (Alam und Oesterhelt, 1984). Während im Wildtyp eine Gleichverteilung der Rotationsrichtungen beobachtet wird, führen die Deletionen von *cheA* und *cheY* zu einem nicht schwarmfähigen Phänotyp (99% -100%

## 1. Einleitung

CW), im Einklang mit der Erwartung eines 2-Komponenten-Signaltransduktion-Weges wie in *E. coli*; jedoch wird zusätzlich bei der Deletion von *cheJ* (in *E. coli* nicht vorhanden) ein Verhältnis von 88% CW beobachtet (Rudolph und Oesterhelt, 1996).

Die Flagellen der Archaea unterscheiden sich in folgenden Punkten von denen der Bakterien: (1) sie sind im allgemeinen dünner (10-13 nm) als die der Bakterien (Jarrel und Koval, 1989; Pyatibratov *et al.*, 1993) (2) sie sind aus verschiedenen Flagellinen aufgebaut (Alam und Oesterhelt, 1984; Kalkmakoff *et al.*, 1992; Pyatibratov *et al.*, 1993) (3) die meisten archaealen Flagelline weisen eine Glykosylierung ähnlich der der Zellhülle auf (Wieland *et al.*, 1985; Southam *et al.*, 1990; Bayley *et al.*, 1993), wobei diese Glykosylierung extrazellulär erfolgt (Sumper, 1987) (4) Flagelline aller Archaea haben einen hochkonservierten hydrophoben N-Terminus (Kalkmakoff *et al.*, 1990; Jarrel *et al.*, 1996) (5) die Flagelline der Archaea haben Homologien mit den bakteriellen TypIV-Pilinen, nicht aber den bakteriellen Flagellinen (Faguy *et al.*, 1994).

Bei *Halobacterium salinarum* liegen die Flagelline A1, A2, A3 und B1, B2 auf zwei ungefähr 40 kbp entfernten Operons (A und B). Während die *flgA*<sup>-</sup>-Mutanten (*flgA1-A3*<sup>-</sup>) kurze, gebogene Flagellen besitzen, die auf der gesamten Zelloberfläche verteilt sind, produzieren *flgA2*<sup>-</sup>-Mutanten gerade Flagellen, die hauptsächlich an den Polen lokalisiert sind. Die *flgB*<sup>-</sup>-Mutanten (*flgB1-B2*<sup>-</sup>) bilden normale Flagellen aus, die jedoch einen ungewöhnlichen Auswuchs zeigen, welcher mit Polkappen gefüllt zu sein scheint (Tarasov *et al.*, 2000).

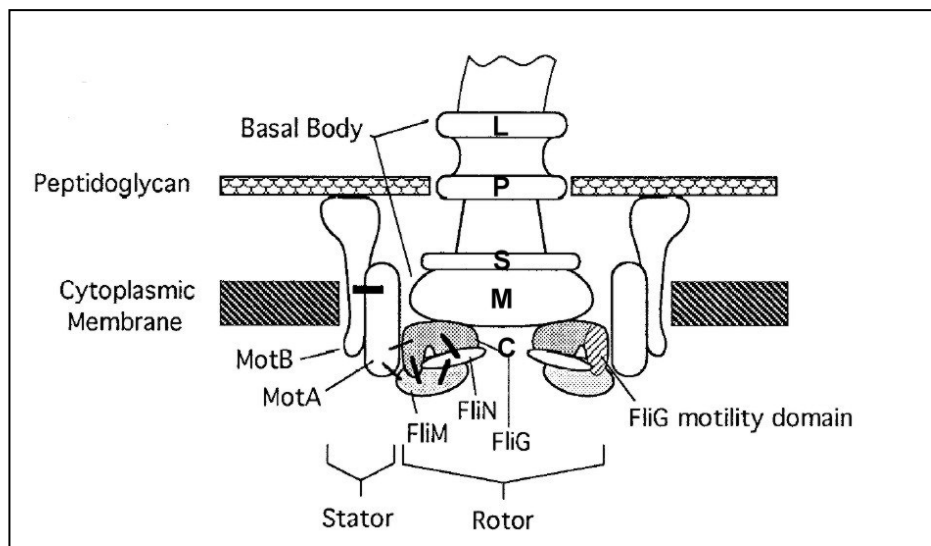
Die Flagelle bestehen in ihrer Struktur aus einem dichten Kern von 3,3 nm, einem Mantel geringerer Dichte von 1,8 nm und einer äusseren Schicht von 10 hochdichten Eklipsen. In einer  $\alpha$ -helikalen Anordnung drehen sich diese Untereinheiten um 108° bei einem Anstieg von 0,58 nm, wobei eine helikale Einheit bei einer Länge von 104,1 nm aus 179 Untereinheiten besteht. Während bei den Bakterien die Verlängerung der Flagellen durch einen Transport der Flagelline in einem Kanal im Inneren der Flagelle zur Spitze erfolgt, muss bei den Archaea ein anderer Mechanismus für das Flagellenwachstum vorhanden sein (Cohen-Krausz und Trachtenberg, 2002).

Ein aus 9 offenen Leserahmen bestehendes Gen-Cluster (*htpIX* und *flaD-K*) ist in direkter Nähe zum *flgB*-Operon lokalisiert. Das *flaK* besitzt Homologien zu bakteriellen Genen, die an der Regulation der Flagellarproteine beteiligt sind und *flaI* und *flaJ* verfügen über 2 Bereiche, die denen des bakteriellen Typ II Sekretionsmotivs ähnlich sind.

Deletionsmutanten von *flaI* bilden keine Flagellen aus, jedoch findet die Transkription der Flagelline weiterhin statt, was *flaI* eine Rolle in der Biosynthese, Transport oder Assemblierung der Flagelline zuweist (Patenge *et al.*, 2001).

Über Aufbau und Zusammensetzung eines archaealen Motors ist bisher kaum etwas bekannt. Einzige Information ist die Existenz einer 300–500 nm großen, scheibenförmigen Polkappe, an der die Flagellen gebunden sind (Kupper *et al.*, 1994). Diese verläuft in einem Abstand von 20 nm parallel zur Cytoplasmamembran und besteht aus verschiedenen, membranartigen Schichten (Speranskii *et al.*, 1996). Im Vergleich dazu ist der bakterielle Motor sehr gut beschrieben, er besteht aus einem Basalkörper, der mittels eines Hakens (Hook) mit der Flagelle verbunden ist, und zusammen mit einem C-Ring den Rotor bildet, und einem membranverankerten Stator.

Der Basalkörper besteht aus verschiedenen Ringstrukturen, der L-Ring ist in der äußeren Membran lokalisiert, der P-Ring in der Peptidoglykanschicht, und der S-Ring stellt einen Sockel dar, welcher sich über dem in der inneren Membran liegenden M-Ring befindet. (Gram-positive Bakteria verfügen über keinen L und P-Ring) (DeRosier, 1998).



**Abb.1.8:**  
Schematische Darstellung des bakteriellen Flagellarmotors (nach Tang *et al.*, 1996).

Der C-Ring ist der aktiv an der Drehung beteiligte Rotor-Ring, er setzt sich aus fliM, fliN und fliG zusammen, in dem der N-Terminus von fliM die Binde-Domäne für den Responsregulator CheY darstellt (Bren und Eisenbach, 1998). Der Stator wird aus den miteinander verbundenen Proteinen MotA und MotB gebildet, jedoch interagiert nur MotA mit FliM und FliG (Tang *et al.*, 1996).

Obwohl die Bindedomäne von fliM in den Bakteria hochkonserviert ist und cheY von *E. coli* und *H. salinarum* zu 32% identisch sind, sind alle bisherigen Versuche entsprechende archaeale Homologe zu finden ergebnislos geblieben.

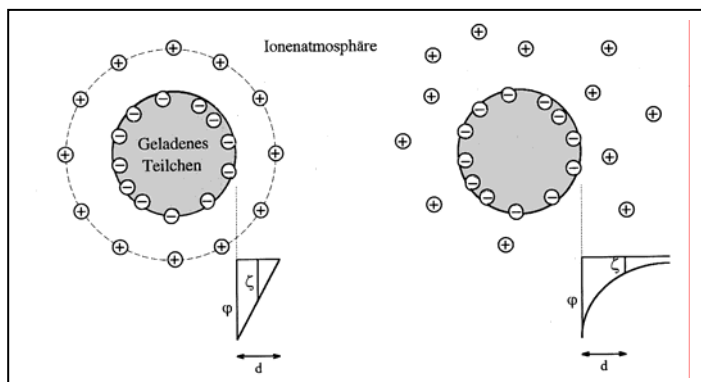
## 1.6 Theorie der Elektrophorese

Das Wort Elektrophorese setzt sich aus den altgriechischen Wörtern  $\epsilon\lambda\epsilon\kappa\tau\rho\nu$  (Bernstein), der im Altertum mit Elektrizität verbunden wurde, und  $\phi\omicron\rho\epsilon\iota\nu$  (tragen) zusammen und bedeutet in freier Übersetzung Bewegung von geladenen Teilchen. Heute wird die Elektrophorese als Trennung von gelösten und geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld definiert, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Wechselwirkungen mit dem Trennmedium verursacht wird (Michov, 1995).

### 1.6.1 Theorie der elektrischen Doppelschicht eines geladenen Teilchens

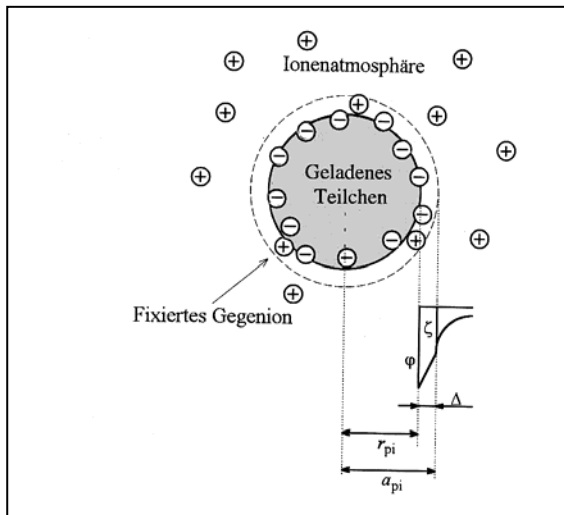
Durch Dissoziation von Proteinen in Lösung entstehen geladene Teilchen (Polyionen), die in elektrostatischen Wechselwirkungen mit entgegengesetzt geladenen Ionen stehen. Die Oberfläche eines geladenen und solvatisierten Ions oder Polyions und seine aus Gegenionen bestehende Ionenatmosphäre bauen eine elektrische Doppelschicht auf (Quincke, 1859, 1861).

Das erste Modell der elektrischen Doppelschicht von Helmholtz (1879) und Perrin (1904) geht von einem konstanten Abstand der Gegenionen zu der geladenen Oberfläche aus, so dass die elektrische Doppelschicht als ein aus zwei konzentrischen Sphären bestehender Kugelkondensator beschrieben werden kann, dessen elektrisches Potential linear mit der Entfernung von der geladenen Oberfläche sinkt.



**Abb. 1.9:** Modell von Helmholtz und Gouy/Chapman zur Ionenatmosphäre (nach Michov, 1995).

Gouy (1910) und Chapman (1913) konnten später beweisen, dass die im Helmholtz'schen Modell angenommene fixierte Anordnung der Gegenionen nicht zutreffend ist, da diese nicht nur von den Zentralionen angezogen werden, sondern sich auch durch gegenseitiges Abstoßen und Diffusion in Bewegung befinden. Dadurch sinkt die Zahl der Gegenionen und damit das elektrische Potential der Doppelschicht exponentiell mit der Entfernung von der Oberfläche des geladenen Teilchens.



**Abb. 1.10:** Modell von Stern zur Ionenatmosphäre (nach Michov, 1995).

Stern (1924) vereinigte die Modelle von Helmholtz und Gouy-Chapman, indem er die Ionenatmosphäre aus einem fixierten, internen Teil und einem diffusen, externen Teil beschreibt.

Der fixierte Teil ist aus hydratisierten Gegenionen aufgebaut, die auf der hydratisierten geladenen Oberfläche absorbiert sind, der diffuse Teil besteht aus den übrigen Gegenionen, die ebenso hydratisiert sind. Die Ionen des diffusen Teils bewegen sich frei, wobei ihre Konzentration exponentiell mit der Entfernung

von der geladenen Oberfläche sinkt. Der fixierte Teil der Ionenatmosphäre bewegt sich in einem elektrischen Feld zusammen mit dem geladenen Teilchen, während die Gegenionen des diffusen Teils sich in einem elektrischen Feld vom fixierten Teil lösen und zum entgegengesetzten Pol bewegen. Infolgedessen sinkt das elektrische Potential des geladenen Teilchens zunächst linear bis zur Grenze zwischen dem fixierten und dem diffusen Teil der Ionenatmosphäre, dann aber exponentiell.

### 1.6.2 Bewegung von Polyionen im elektrischen Feld

Für die Mobilität eines Teilchens in unendlich verdünnter Lösung gilt

$$\mu_{\infty} = \frac{v_{\infty}}{E} \quad \text{bzw.} \quad \mu_{\infty} = \frac{ze}{6\pi\eta r},$$

wobei  $\mu_{\infty}$  die absolute Mobilität des Teilchens (in  $\text{m}^2/(\text{sV})$ ),  $v_{\infty}$  die Geschwindigkeit des geladenen Teilchens (in  $\text{m/s}$ ),  $E$  die Stärke des elektrischen Feldes (in  $\text{V/m}$ ),  $z$  seine Nettoladungszahl,  $e$  die Zahl seiner Elektronenladung,  $\eta$  die dynamische Viskosität des Lösungsmittels (in  $\text{Pa s}$ ) und  $r$  der Radius des geladenen Teilchens (in  $\text{m}$ ) ist.

Da sich das geladene Teilchen aber nicht in einer unendlich verdünnten Lösung bewegt, sondern zusammen mit dem auf seiner Oberfläche gebundenen Teil der Ionenatmosphäre, vermindert sich die Mobilität des Ions  $i$  zu

$$\mu_i = \frac{v_i}{E}.$$

Aus der Gleichung von Smulochowski (1903, 1921)  $\mu = \frac{\zeta\epsilon}{\eta}$

und der Gleichung von Hückel (1924)

$$\mu = \frac{\mu_{\infty}}{1 + \kappa a} = \frac{\zeta\epsilon}{1,5\eta}$$

## 1. Einleitung

in denen  $\zeta$  das elektrokinetische Potential, unter dem das Potential an der Grenze zwischen dem Teilchen mit den absorbierten Gegenionen und dem diffusen Teil der Ionenatmosphäre zu verstehen ist,  $\varepsilon$  die Dielektrizitätspermeabilität des Lösungsmittels,  $\kappa$  der Reziprokwert der Dichte der Ionenatmosphäre und  $a$  der Radius des geladenen Teilchens ist folgt, dass das  $\zeta$ -Potential sowohl von der Ladung des Teilchens als auch von der Konzentration des Puffers abhängt (Jako und Hitzig, 1974).

Henry (1931, 1948) fügte dann die von ihm abgeleitete Funktion  $f(\kappa a)$  in die Gleichung von

Hückel ein: 
$$\mu = \frac{\zeta \varepsilon}{1,5 \eta} f(\kappa a),$$

wobei wenn  $\kappa a \rightarrow \infty$ , dann  $f(\kappa a) \rightarrow 1,5$  (Smulochowski) und wenn  $\kappa a \rightarrow 0$ , dann  $f(\kappa a) \rightarrow 1,0$  (Hückel) und zeigte damit, dass die Polyionenmobilität auch vom Radius des geladenen Teilchens  $a$  abhängt.

Kataphorese (entsteht durch Bewegung des diffusen Teiles der Ionenatmosphäre gegen das Polyion im elektrischen Feld und verursacht damit zusätzlich Reibung) und Relaxation (Umstrukturierung der Polyion-Ionenatmosphäre durch entgegengesetzte Wanderung des Polyions und seiner Ionenatmosphäre während der Elektrophorese und damit verbundene Polarisierung des Komplexes) werden bei niedrigen Ionenstärken durch die Gleichung von Onsager (1926, 1933) beschrieben:

$$\mu_i = \mu_{\infty i} - (\mu_{\text{kat}} + \mu_{\text{rel}}) = \mu_{\infty i} - z_i s_i I^{1/2},$$

wobei  $\mu_{\infty i}$  die absolute Mobilität des Ions ist,  $\mu_{\text{kat}}$  bzw.  $\mu_{\text{rel}}$  seine Kataphorese- bzw. Relaxationsmobilität,  $z_i$  die Zahl seiner Protonenladungen,  $s_i$  die Steigung der Onsagerschen Eichgraden (ionenspezifischer Quotient aus der Leitfähigkeit des Elektrolyten und der Wurzel der Ionenstärke), und  $I$  die Ionenstärke der Lösung ist.

Bei höheren Werten der Ionenstärke (bis 0,1 mol/l) gilt die Gleichung nach Robinson und

Stokes (1965): 
$$\mu_i = \mu_{i\infty} - \frac{s_i I^{1/2}}{1 + \kappa a}$$

### 1.6.3 Theorie der isoelektrischen Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung ist eine Elektrophorese in einem pH-Gradienten, in dem die amphoteren Polyionen ihre Nettoladung allmählich verlieren, bis sie an ihrem isoelektrischen Punkten zum Stillstand kommen.

Proteine können in einem elektrischen Feld aufgrund der Nettoladungen ihrer sauren und basischen Aminosäurereste getrennt werden. Die pK-Werte der einzelnen Aminosäuren-Seitenketten liegen hierbei zwischen 3,90 (Asparaginsäure) und 12,48 (Arginin) (Dawson *et al.*, 1969). Der pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Proteins Null ist, und daraus folgernd

seine Mobilität im elektrischen Feld ebenfalls Null beträgt (siehe Abschnitt 1.6.2), wird als isoelektrischer Punkt pI bezeichnet.

Die Theorie der isoelektrischen Fokussierung wurde von Svensson (1961, 1962) (später Ribbe) entwickelt, nach der die Breite einer Proteinbande

$$\sigma = \sqrt{\frac{D}{(d\mu/dpH)(dpH/dx)}} \text{ ist,}$$

wobei  $\sigma$  gleichzeitig die Standardabweichung (in  $(Vm)^{1/2}$ ) ist, D der Diffusionskoeffizient des Proteins (in  $m^2/s$ ),  $d\mu/dpH$  die Mobilitätssteigerung am pH(I)-Wert (in  $m^2/(sV)$ ) und  $dpH/dx$  der Anstieg des pH-Gradienten an der Bande (in  $m^{-1}$ ).

Mittels der Beziehung 
$$\Delta pH(I) = 3,07 \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

beschreibt Svensson die Auflösung zwischen zwei Proteinen, wobei  $\Delta pH(I)$  der benötigte Unterschied zwischen den pH(I)-Werten beider Proteine ist, um sie voneinander zu trennen, und E die Stärke des elektrischen Feldes bei den pH(I)-Werten.

Für die Praxis der isoelektrischen Fokussierung bedeutet dies, dass sich die Auflösung erhöht (also  $\Delta pH(I)$  kleiner wird), wenn die Parameter den Proteineigenschaften angepasst werden.

Der Diffusionskoeffizient, Maß für eine Bewegung innerhalb eines Konzentrationsgradienten, ist für die Proteine selbst nicht beeinflussbar, wohl aber für die sie umgebenden Reagenzien, weshalb die Fokussierung der Proteine in einem Medium ähnlicher Zusammensetzung wie der Probenpuffer erfolgen sollte.

Der Anstieg des pH-Gradienten wird möglichst klein gehalten. Dies kann erreicht werden, indem entweder nur ein relativ kleiner pH-Bereich untersucht wird, oder ein nichtlinearer pH-Gradienten eingesetzt wird, der einen starken pH-Anstieg in weniger interessanten pH-Bereichen aufweist (üblicherweise den stark sauren und stark basischen Bereichen).

Durch die Wahl einer möglichst hohen elektrischen Feldstärke kann theoretisch zwar die Auflösung verbessert werden, jedoch stellen elektroosmotische Effekte (Bewegung des Lösungsmittels durch geladene Träger und damit verbundene Hydratisierung der Kathode und Dehydratisierung der Anode) einen Störfaktor dar, der eine Abstimmung der Qualität des Lösungsmittels bzw. Trennmediums und der angelegten Feldstärke verlangt.

Die maximale Zahl der auftrennbaren Polyionen lässt sich nach

$$\eta = \frac{L}{4} \sqrt{\frac{FE(dQ/dpH)(dpH/dx)}{RT}} \text{ berechnen (Giddings und Dahlgren, 1971),}$$

wobei L die Länge der Trennstrecke (in m), F die Faradaysche Konstante (in C/mol), Q die Ladung (in C), R die molare Gaskonstante (in J/(mol K)) und T die Temperatur (in K) ist.

## 1. Einleitung

Unter optimalen Bedingungen können so Protein-Polyionen mittels IEF getrennt werden, deren isoelektrische Punkte sich um 0,0025 pH-Einheiten voneinander unterscheiden (Allen *et al.*, 1974).

### 1.6.4 Entwicklung der isoelektrischen Fokussierung

Die schon seit langem bekannte Ausbildung eines pH-Gradienten bei der Elektrolyse von Proteinhydrolysaten (Ikeda und Suzuki, 1912) wurde von Kolin derart modifiziert, dass er einen instabilen pH-Gradienten in den Diffusionszonen zwischen Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten entwickelte. Die zu trennende Probensubstanz wurde in einer Tiseliusapparatur zwischen einem sauren und einen basischen Puffer plaziert und nach einer gewissen Diffusionszeit ein elektrisches Feld angelegt, so dass scharfe Proteinbanden erhalten werden konnten (Kolin, 1954, 1958). Entscheidender Nachteil dieser Methodik jedoch war der durch Diffusion entstandene pH-Gradient, der sehr schnell nach Anlegen eines elektrischen Feldes sowohl durch Wanderung der Puffersubstanzen als auch durch Migration der zu trennenden Ionen zerstört wurde.

Diese sogenannte erste Generation wurde mit der Entwicklung von Carrier-Ampholyten (CA) (Vesterberg, 1968, 1969) mit puffernden Carboxyl- und Aminogruppen entscheidend verändert: Zum einen sind sie amphoter, d.h. sie erreichen während der Separation ein Fließ-Gleichgewicht, zum anderen „tragen“ sie sowohl den Strom (sind also gute Leiter), als auch den pH, sind also auch gute Puffer (zweite IEF-Generation). Bei diesem System liegen die Carrier-Ampholyte und die zu trennende Probe zusammen in einem Trennmedium vor. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die unterschiedlich geladenen amphoteren CA bis sie ihren pI erreicht haben und bilden so einen pH-Gradienten aus. Dieser bleibt stabil und ermöglicht den Proteinen, sich innerhalb des von den CA ausgebildeten pH- und Puffersystems gemäß ihren isoelektrischen Punkten zu trennen. Mittels dieses Verfahrens, durchgeführt in Kapillargelen, kann so ein Transfer der isoelektrisch getrennten Proteine in ein weiteres System, wie Trennung mittels SDS-Elektrophorese, erfolgen (siehe Abschnitt 1.6.6). Wesentlicher Nachteil dieser Technik bereitete die Reproduzierbarkeit der Proteinauftrennung, da der ausgebildete pH Gradient sich durch Elektroosmose mit der Zeit veränderte (zweite Generation).

Die dritte IEF-Generation schließlich bestand aus einem immobilisierten pH-Gradienten, der aus unterschiedlichen sauren und basischen Acrylamidderivaten generiert wurde (Gasparic *et al.*, 1975; Dossi *et al.*, 1983; Gianazza *et al.*, 1983). Durch diesen immobilisierten pH-Gradienten wurde die Trennung von Proteinen wesentlich verbessert, erlaubte aber durch seine feste Matrix auch einen problemloseren Transfer in eine zweite Dimension. Ferner wird



die Kathodendrift, wie sie bei der CA-IEF auftritt, ausgeschlossen und der kovalent am Gel gebundene pH-Gradient bei längeren Fokussierzeiten nicht geändert.

Als vierte Generation (mixed-bed carrier ampholyte-Immobiline, auch Hybrid-IEF, IPG-CA) wird die Kombination aus immobilisiertem pH-Gradienten und Trägerampholyten bezeichnet (Rimpalain und Righetti, 1985). Die Tendenz, dass Protein-Polyionen vom immobilisierten pH-Gradienten absorbiert werden, wird durch Trägerampholyte weitgehend verringert (Rabilloud *et al.*, 1987; Fawcett *et al.*, 1988).

### 1.6.5 SDS-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Auftrennung von Proteinen beruht auf der proportionalen Anlagerung von Dodecylsulfatanionen an die Proteine, bei der das Masse/Ladungsverhältnis konstant bleibt (1 SDS Molekül pro 2 Aminosäurereste). Gleichzeitig werden die Proteine vollständig denaturiert und können daher im Gel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden, indem die negativen geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern.

Das Migrationsverhalten der Makromoleküle hängt dabei von der Stärke des angelegten Feldes, der Nettoladung, der Form, der Größe und der Ionenstärke der Makromoleküle, sowie der Porengröße und der Temperatur der verwendeten inerten Matrix ab. In Polyacrylamidgelen wird die Porengröße durch den Vernetzungsgrad bestimmt. Der Vernetzungsgrad des Kopolymers von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid kann mittels Änderung der Acrylamidkonzentration variiert werden. Die zwei gebräuchlichsten Gelsysteme sind die von Weber und Osborn (1969), bei der ein einheitlich zusammengesetztes Gel zum Einsatz kommt, sowie das Laemmli-System (1979), bei der die aufzutragenden Proben zunächst in einer Sammelschicht aufkonzentriert werden, und von dort in das eigentliche Trenngel hineinwandern. Die Auflösung der Laemmli-Gele ist besser als die eines kontinuierlichen Systems.

### 1.6.6 Die zweidimensionale Elektrophorese

Bei der 2-D-Elektrophorese werden die Proteine in einer ersten Dimension durch die isoelektrische Fokussierung nach ihren isoelektrischen Punkten getrennt, die eine Funktion ihrer Ladungen sind. Anschließend werden die fokussierten Proteinbanden in einer zweiten Dimension, senkrecht zur ersten Dimension, durch die SDS-Elektrophorese nach ihren Massen getrennt. Als Resultat entsteht ein zweidimensionales Pherogramm von Proteinflecken (Spots).

Die 2-D Elektrophorese wurde in den 70er Jahren als eine Kombination zwischen einer isoelektrischen Fokussierung mit Trägerampholyten in vertikalen Rundgelen (1. Dimension) und

## 1. Einleitung

einer SDS-Elektrophorese in vertikalen Flachgelen (2. Dimension) entwickelt (O'Farrell, 1975; Klose, 1975). Hiernach wurde die Proteinprobe zuerst mittels isoelektrischer Fokussierung in einem Gel mit 8-9 M Harnstoff, einem nichtionischen Detergens und Dithiothreitol getrennt. Diese Zusammensetzung bewirkt eine vollständige Denaturierung der Proteine. Bei einer nicht-denaturierenden 2-D Gelelektrophorese (O'Farrell, 1975; Manabe *et al.*, 1979) ist die Auflösung im Vergleich zu denaturierenden Bedingungen geringer.

Heute verläuft die IEF in horizontalen, auf Folie polymerisierten Flachgelstreifen (verhindert Längenveränderungen bei der Übertragung), die anschließend in einem SDS-haltigen Puffer für die zweiten Dimension äquilibriert werden. Nachfolgend findet eine Separierung nach der Masse statt (Michov, 1995).

Der Nachweis der Proteinspots kann dann über Coomassie-Brilliantblau-Färbung (de Fazekas *et al.*, 1963; Meyer und Lambert, 1965; Diezel *et al.*, 1972), Silberfärbung (Switzer *et al.*, 1979; Heukeshoven und Dernick, 1989), Fluoreszenzfärbung (Lopez *et al.*, 2000), oder, bei radioaktiv markierten Proteinen, mittels Autoradiographie (O'Farrell, 1975; Scheele, 1975) erfolgen.

### 1.7 Proteomics und Membranproteine

„Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible?“ (Review-Titel, Santoni *et al.*, 2000).

Das Proteom einer Zelle oder eines Gewebe ist definiert als die Gesamtheit ihrer Proteine unter definierten Bedingungen. Aufgrund der Komplexität des Proteingemisches und der unterschiedlichen Expression werden im allgemeinen Subfraktionen einer Zelle mittels multidimensionaler Auftrennung untersucht. Hierbei hat sich vor allem die Kombination aus IEF und SDS-PAGE für eine Proteomdarstellung durchgesetzt. Nach anschließender Spaltung in Peptidfragmente können die Proteine in Hochdurchsatzverfahren massenspektrometrisch identifiziert werden.

Membranproteine sind allgemein Proteine, die mit der Membran assoziiert sind. Man unterscheidet zwischen (1) integralen Membranproteinen, die aus einer oder mehreren transmembranen  $\alpha$ -Helices oder einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien) bestehen können, (2) Proteinen, die mittels eines Lipidankers mit der Membran oder hydrophoben Wechselwirkungen mit einem Monolayer verbunden sind (3) Proteinen, die elektrostatisch mit der Membran assoziiert sind (periphere Membranproteine) und (4) Proteine, die Teil eines Membrankomplex sind, jedoch nach Zerlegung des Komplexes löslich sind.

Ein Maß für die Hydrophobizität eines Proteins stellt der GRAVY-Index (Grand Average of Hydrophobicity) dar, bei dem der Mittelwert der Hydrophobizitätswerte aller Aminosäuren eines Proteins gebildet wird (nach Kyte und Doolittle, 1982).

Im Vergleich von vorhergesagten Proteinen aus Genomsequenzierungsprojekten (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*) zu bisher identifizierten Proteinen aus 2-D Gelen zeigte sich, dass Proteine mit einem hydrophoben Charakter (GRAVY-Index  $> 0$ ) nahezu vollständig auf den Gelen fehlen (Wilkins *et al.*, 1998). Da bei diesen Systemen sowohl mit CA als auch mit IPG gearbeitet wurde, konnten hydrophobe Interaktionen mit basischen Acrylamid-Derivaten (Rimpilainen und Righetti, 1985; Righetti *et al.*, 1987) als nicht allein verantwortlich für die Absenz der Membranproteine gemacht werden. Um deren Löslichkeit zu erhöhen, wurde sowohl das stärkere Chaotrop Thioharnstoff eingeführt (Rabilloud *et al.*, 1997) als auch stärkere zwitterionische Detergenzien synthetisiert (Chevallet *et al.*, 1998).

Ein weiteres Problem gerade intrinsischer Membranproteine bei der Trennung durch IEF besteht darin, dass sie (1) sehr oft auch noch in Detergens negativ geladene Lipide gebunden haben und (2) teilweise zusätzliche Sulfatgruppen durch post-translational Glykosilierung tragen können. Diese zusätzlichen negativen Ladungen erschwert eine distinkte Auftrennung nach dem pI.

Zu den hydrophobsten Proteinen, die bisher in einem Proteingemisch identifiziert wurden, gehört bei tierischen Zellen und Geweben das Bande III-Protein (GRAVY +0,2) (Rabilloud, 1999), bei Pflanzen und Hefe ein Wasserkanal (GRAVY +0,4) (Chevallet *et al.*, 1998), bei den Bakterien jedoch das „Major OMP“ mit einem GRAVY von nur -0,15 (Bini *et al.*, 1996).

## 1.8 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Proteininventar der Archaeons *H. salinarum* untersucht werden. Dieser Organismus bietet ein vergleichsweise übersichtliches Transduktionsnetzwerk, bei dem äußere Reize von den in der Membran lokalisierten Rezeptoren über die Transducerproteine in lediglich zwei Zielstrukturen enden, dem Genom und dem Flagellarapparat. Dieses Netzwerk wird daher über 3 Teilprojekte der Analyse zugänglich gemacht, dem Flagellarmotorproteom, dem Cytosolproteom und dem Membranproteom.

Bezüglich des Flagellarmotors liegen elektronenmikroskopische Aufnahmen einer gereinigten Fraktion vor, bei der Membranpreparation ist ein Zellaufschluss mittels Niedrigsalzdialyse etabliert.

Der zu verfolgende Proteomansatz geht von einer kartierenden Strategie aus, bei dem zuerst unter definierten Bedingungen eine größtmögliche Anzahl von Proteinen identifiziert werden soll. Hierdurch soll sowohl die Annotation des Genoms unterstützt werden, als auch die Grundlagen geschaffen werden, Parameterveränderungen des Zellwachstums mittels „Spotkorrelation“ direkt identifizierten Proteinen zuordnen zu können. Besonders die Membranproteine als Reizvermittler sind dabei von besonderem Interesse.

Für die Auftrennung von komplexen Proteingemischen zu Einzelproteinen hin erscheint die hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese geeignet, für die anschließende Identifizierung ist ein MALDI-Massenspektrometer vorgesehen. Die Etablierung dieser Methode kann nach der Fertigstellung der Genomsequenzierung und Annotation begonnen werden.

Im Rahmen dieser Proteinanalytik soll so eine Hochdurchsatz-Strategie entwickelt werden, die es ermöglicht, innerhalb kurzer Zeitspannen eine möglichst hohe Identifizierung auf Proteinebene zu erreichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material, Geräte, Programme und Abkürzungen

#### 2.1.1 Material

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure	Sigma
1,4-Butansulton	Fluka
10 $\mu$ l Diamand Precisions Tips	Gilson
16-BAC	Sigma
1-Butanol	Merck
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Aldrich (Sigma)
2-Butanol	Merck
2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure(MHB)	Fluka (Sigma)
3-Dimehtylamino-1-propylamin	Fluka
Aceton	Riedel-de-Haen
Acetonitril	Merck
Acrylamid Proto Gel	nationaldiagnostic
ACTH (1-17)	Sigma
ACTH (18-39)	Sigma
Agarose	Gibco
Ameisensäure 98-100%	Merck
Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka
Ammoniumperoxidisulfat	BioRad
Angiotensin 1Acetat Human	Sigma
Angiotensin 2Acetat Human	Sigma
BCA-Reagenz	Pierce
Bombesin	Sigma
Bradykinin Fragment 1-7	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	Fluka
C <sub>18</sub> -Poros Material	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Chloroform	Merck
Citronensäure-Monohydrat	Merck
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva
Cover-Fluid	Amersham Bioscience
Cy <sup>TM</sup> 5 minimal dye	Amersham Bioscience
Dithiothreitol	Merck
DMF	Sigma Aldrich
DNase I	Fluka
Drystrip Cover Fluid (plus one)	Amersham Biosciences
ECL-Kit	Pierce
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol absolut	Riedel de Haen
Formaldehyd 37%	Merck
Formvar	Fluka
Glutaraldehyd	Serva
Glycerin	Roth
Glycin	Merck
Harnstoff	Amesham Biosciences
Hydroxypropyl-Methyl-Cellulose (HPMC)	Aldrich (Sigma)
Iodacetamid	Fluka
Ionenaustauscher (IWT TMD8)	Aldrich (Sigma)
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Fluka
Kerosin	Fluka

## 2. Material und Methoden

Magnesiumsulfat-heptahydrat	Merck
Methanol	Merck
Myristinsäure	Aldrich (Sigma)
N, N'-Methylenbisacrylamid (Bis)	BioRad
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumthiosulfat-pentahydrat	Merck
Nitrocellulose	BioRad
Orange G	Amersham Biosciences
Pepton	Oxid
Pharmalyte (pH 3,5-5,5)	Amersham Biosciences
Pharmalyte (pH 3-10)	Amersham Biosciences
Phosphorsäure	Merck
PVDF-Membran	Millipore
Pyridin	Merck
Pyronin Y	Sigma
Safe lock Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Salzsäure	Riedel-de-Haen
Saran-Film	Roth
SDS, 2 x krist.	Serva
Siedespeisesalz	Saline Bad Friedrichshall - Bad Reichenhall
Silbernitrat	Riedel-de-Haen
Substance P	Sigma
Teflon Enghalsflasche FEP 60 ml	Nalgene
TEMED	BioRad
Thioharnstoff	Sigma
Trichloressigsäure	Riedel-de-Haen
Trifluoressigsäure	Perkin Elmer
tri-Natriumcitrat-dihydrat	Merck
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel de Haen
Trypsin, Modified Sequencing Grade	Promega
Zinkacetat Dihydrat	Fluka

### 2.1.2 Geräte

Äkta-System	Amersham Biosciences
Äquilibrierkassette	Amersham Biosciences
Autoklav, großer	Varioklav 500
Autoklav, klein	MELAG 23
Bidestillationsanlage	Fistream Fisons Scientific Equipment
Cup-Holder	Amersham Biosciences
Elektronenmikroskop	Philips CM12
Faltenfilter	Schleicher & Schuell
Film-Entwickler	Agfa
Free-Flow-Elektrophorese-Apparatur	Dr. Weber GmbH
Octopus	
Gefriertrockner	Christ Alpha 2-4
IEF-Elektroden	Amersham Biosciences
IEF-Elektrodenstreifen	Amersham Biosciences
IEF-Kapillar Elektrophorese-Apparatur	Werkstatt MPI Eigenbau
IEF-Sample-Cups	Amersham Biosciences
Magnetrührer	Heidolph MR 2000
MALDI-Massenspektrometer Reflex III	Bruker-Daltonics
MALDI-Präparationsroboter	Bruker-Daltonics
Nadelsonifizierer	Branson Sonifier
	Cell Disrupter B15
Pipetten	Eppendorf Research 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
Power Supply (PAGE, Blot)	Amersham Biosciences Electrophoresis Power Supply

	EPS 1000 XL
Power-Supply (IEF)	Amersham Biosciences Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL
Rehydratisierkassette	Amersham Biosciences
Reinstwasseranlage	Millipore
Röntgen-Film	Agfa
SDS-Elektrophorese-Tank Protean	BioRad
Semi-Dry-Blot-Apparatur	Werkstatt MPI Eigenbau
Smart-System	Amersham Biosciences
Spotpicker ProteineerSp	Bruker-Daltonics
Sypro-Ruby	BioRad
Tisch-Ultrazentrifuge	Beckmann TL-100
Tischzentrifuge	Eppendorf 5417R
Typhoon™ 9400 Scanner	Amersham Biosciences
Ultraschallbad	Elma Laboson
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1170
Vortex	Bender & Hobein AG Vortex Genie 2
Whatman-Papier	
Zentrifuge	Sorvall RC5C
Zentrifuge, groß	Hettich Roto Silenta/RP

### 2.1.3 Programme

Adobe Photoshop  
CorelDraw 8

ImageQuant™ V 5.0  
Mascot  
Microsoft Excel  
Microsoft Word 7.0  
PDQuest  
ProteomWeaver

### 2.1.4 Abkürzungen

1/4BS	Basalsalz, 1:4 mit Wasser verdünnt
2-D	zweidimensional
16-BAC	Benzylidimethyl-n-hexadecyl- ammoniumchlorid
ACN	Acetonitril
al	aliphatischer Index
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASB-14	Amidosulfobetain-14
BCA	Bichinoninsäure
BR	Bacteriorhodopsin
BS	Basalsalz (4,3 M NaCl, 81 mM MgSO <sub>4</sub> , 27 mM KCl, 10 mM Citrat)
BSA	Bovine Serum Albumine
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	Octaethylenglycol-monododecylether
CBB	Coomassie-Brilliant-Blau
DD	DriedDroplet
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DTT	1,4- Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
French-Press-HS	Zellaufschlussmethode French-Press, welche nach Dichtegradientenzentrifugation dreimal in 1 M NaCl pelletiert/resuspendiert wurde
French-Press-LS	Zellaufschlussmethode French-Press, welche nach Dichtegradientenzentrifugation dreimal

## 2. Material und Methoden

	in 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pelletiert/resuspendiert wurde
GMF	Gesamtmembranfraktion
h	Stunde(n)
HCCA	α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
HOAc	Essigsäure
HPMC	Hydroxypropyl-Methylcellulose
HR	Halorhodopsin
IAA	Iodacetamid
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG-DALT	Hochauflösende isoelektrische Fokussierung in immobilisierten pH-Gradienten
<i>i</i> -Prop	Isopropanol
L	Liter
LC/MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit anschließender MS/MS-Messung
MALDI	Matrix assisted Laser Desorption/Ionisation
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MilliQ	Millipore Wasser
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MSDB	Proteinsequenz-Datenbank des Proteomics Department am Hammersmith Campus vom Imperial College, London
m/z	Massen-Ladungsverhältnis
NAOMI	Now All Opsins Missing (Mutante von <i>H. salinarum</i> )
NS-BS	Niedrig-Basalsalz, 58 ml BS + 942 ml Wasser
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PAA	Polyacrylamid
pI	Isoelektrischer Punkt
R1	Wildtyp von <i>H. salinarum</i>
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S9	Stamm von <i>H. salinarum</i> , der BR überproduziert
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
SR	Sensorrhodopsin
TBST	Tris buffers Saline plus Tween
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TL	Thin-Layer
TOF	Time-of-flight (MS-Messungen)
TOM	Two Opsins Missing (Mutante von <i>H. salinarum</i> )
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Tx-100	Triton X-100
Tx-114	Triton X-114
Zn/Im	Zink/Imidazol



## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Anzucht von *Halobacterium salinarum*

Zellen des Wildtyps R1 und der benutzen Mutanten TOM (Two Opsins missing, BR<sup>-</sup>, HR<sup>-</sup>) und NAOMI (Now All Opsins Missing, BR<sup>-</sup>, HR<sup>-</sup>, SRI<sup>-</sup>, SRII<sup>-</sup>, HtrI<sup>-</sup>, HtrII<sup>-</sup>) wurden im Vollmedium (für 1 Liter: 250 g NaCl, 20 g MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 2 g KCl, 3 g Tri-Na-Citrat, 10 g Oxoid-Pepton, pH 7,0) angezogen (Oesterhelt und Krippahl, 1983).

#### 2.2.1.1 Einzelkolonien

Eine Kultur in der stationären Phase wurde 1:1.000.000 mit Basalsalz (Vollmedium ohne Pepton) verdünnt und 20 µl davon auf eine 10 cm Durchmesser Agarplatte gestrichen (Vollmedium mit 0,15% Bacto-Agar). Diese wurden dann für 7-10 Tage bei 40°C inkubiert.

#### 2.2.1.2 Vorkultur (35 ml)

Eine 35 ml Vorkultur in einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurde mit 1 ml aus einer bereits bestehenden Vorkultur oder einer Einzelkolonie angeimpft. Die Kolben wurden im Brutschrank bei 37°C mit 100 rpm geschüttelt, bis die Kultur die stationäre Phase erreichte (OD<sub>600</sub> größer 1, 4-5 Tage).

#### 2.2.1.3 Kultur (700 ml)

Ein 2 Liter Erlenmeyerkolben mit 1 Liter Medium wurde mit einer 35 ml Vorkultur angeimpft und im Brutraum bei 37°C mit 100 rpm geschüttelt, bis die Kultur die stationäre Phase erreichte.

#### 2.2.1.4 Fermentor (10 Liter)

Ein 10 Liter Fermentor wurde mit 1 Liter Kultur angeimpft und im 37°C temperiertem Wasserbad bei 300 rpm und 180 Liter Luft/h inkubiert.

#### 2.2.1.5 Fermentor (100 Liter)

Ein 100 Liter Fermentor wurde mit 5 Liter Kultur angeimpft und bei 37°C, 100 rpm und 180 Liter Luft/h inkubiert.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Zellaufschlüsse

Im Rahmen dieser Arbeit benutzten Zellaufschlüsse und Aufarbeitungen sind in einem Übersichtsdiagramm in Abschnitt 2.3.1.9 dargestellt.

#### 2.3.1.1 Zellernte

10 Liter Zellkulturen in der stationären Phase ( $OD_{600}$  über 1) wurden in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert (4 krpm, 45 min, 10°C) und anschließend abhängig vom Zellaufschluss in unterschiedlichen Volumina Basalsalz (BS) resuspendiert.

#### 2.3.1.2 Zellaufschluss mittels Dialyse

Die pelletierten Zellen wurden in 100 ml BS resuspendiert, eine Spatelspitze DNase zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Die Suspension wurde in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht gegen 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 dialysiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (SS-34, 5,4 krpm, 10 min, 4 °C) entfernt und der Überstand ultrazentrifugiert (Ti45, 40 krpm, 1 h, 4°C). Das Pellet wurde in 100 ml 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 resuspendiert, gepottert und erneut ultrazentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, das finale Pellet (Gesamtmembranfraktion, GMF) in 10 ml 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ausbeute (aus 10 L Kulturen, BCA-Bestimmung): 54 mg

#### 2. 3.1.3 Zellaufschluss mittels French-Press

Die pelletierten Zellen wurden in möglichst wenig BS resuspendiert, dann in 4 x 30 ml Corex-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (SS-34, 5,4 krpm, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit 40 ml 1/4BS (BS 1:4 mit Wasser verdünnt), Protease-Inhibitor und DNase homogenisiert und gepottert. Die Suspension wurde auf Eis gekühlt, und die Zellen durch 3 Durchläufe in einer French-Press aufgeschlossen. Die entstandene Suspension wurde auf 240 ml mit 1/4BS aufgefüllt und 3 mal ultrazentrifugiert (Ti45, 40 krpm, 1 h, 4°C), dazwischen jeweils gepottert. Das letzte Pellet wurde dann in 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 oder 1/4 BS (French-Press-HS) aufgenommen und erneut dreimal ultrazentrifugiert. Das daraus entstandene Pellet (GMF) wurde in 10 ml 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 bzw. 1/4 BS resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ausbeute French-Press-NS (aus 10 L Kulturen, BCA-Bestimmung): 10 mg

#### 2.3.1.4 Zellaufschluss mittels Sonifizieren

Die pelletierten Zellen wurden in möglichst wenig BS resuspendiert, dann in 4 x 30 ml Corex-Röhrchen gegeben und erneut zentrifugiert (SS-34, 5,4 krpm 30 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit 40 ml 1/4BS homogenisiert und in ein Glasgefäß mit rundem Boden gegeben. Die Sonifizierung erfolgte gepulst bei 50% Duty Cycle für 3 x 5 min auf Eis. Wenn unter dem Mikroskop nahezu keine Zellen mehr zu erkennen waren, wurde kurz zentrifugiert (SS-34, 5,4 krpm, 10 min, 4°C). Die entstandene Suspension wurde auf 240 ml mit 1/4BS versetzt und 3 mal ultrazentrifugiert (Ti45, 40 krpm, 1 h, 4°C), dazwischen jeweils gepottert. Das letzte Pellet wurde dann in 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 aufgenommen und erneut dreimal ultrazentrifugiert. Das daraus entstandene Pellet (GMF) wurde in 10 ml 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ausbeute (aus 10 L Kulturen, BCA-Bestimmung): 10 mg

#### 2.3.1.5 Zellaufschluss mittels Freeze/Thaw

Die pelletierten Zellen wurden in möglichst wenig BS resuspendiert, dann in 4 x 30 ml Corex-Röhrchen gegeben und erneut zentrifugiert (SS-34, 5,4 krpm, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit 30 ml 1/4BS und DNase homogenisiert und in ein 50 ml Falcon-Tube gegeben. Anschließend wurde dieses in flüssigem Stickstoff für 10 min schockgefroren und in einem Wasserbad (20°C) aufgetaut. Die Prozedur wurde noch zweimal wiederholt. Die entstandene Suspension wurde auf 240 ml mit 1/4BS aufgefüllt und dreimal ultrazentrifugiert (Ti45, 40 krpm, 1 h, 4°C), dazwischen jeweils gepottert. Das letzte Pellet wurde dann in 10 mM Phosphatpuffer aufgenommen und erneut dreimal ultrazentrifugiert. Das daraus entstandene Pellet (GMF) wurde in 10 ml 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ausbeute (aus 10 L Kulturen, BCA-Bestimmung): 16 mg

#### 2.3.1.6 Zellaufschluss mittels Taurodeoxycholat

Die pelletierten Zellen wurden in BS in einer 1:10-Verdünnung des ursprünglichen Zellkulturvolumens aufgenommen. Anschließend wurden 16,7 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, eine Spatelspitze DNase und 10 ml einer 0,075% Natriumtaurodeoxycholatlösung (alle Lösungen in Wasser) zugegeben. Die Zellen wurden 75 min ohne Rühren bei RT stehen gelassen, dann für weitere 30 min mit einem Rührfisch langsam gerührt. Die Zellhüllen wurden zentrifugiert (GSA, 12,5 krpm, 45 min, 4°C), der Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Die Zellhüllen wurden in 30 ml BS aufgenommen und über Nacht gegen NS-BS, 10 mM Tris, pH

## 2. Material und Methoden

6,8 dialysiert (NS-BS: 58 ml BS mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt, entsprechen 250 mM NaCl). Das Dialysat wurde mit NS-BS auf 120 ml aufgefüllt und dreimal ultrazentrifugiert (Ti45, 40 krpm, 1 h, 4°C), die Niederschläge wurden in 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 aufgenommen und gepottert. Das daraus entstandene Pellet (GMF) wurde in 10 ml 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ausbeute (aus 10 L Kulturen, BCA-Bestimmung): 42 mg

### 2.3.1.7 Zellaufschluss mittels Gefriertrocknung

Die pelletierten Zellen wurden in 100 ml BS resuspendiert, in 4 x 50 ml Falcon-Tubes gegeben und zentrifugiert (5,4 krpm, 45 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren (10 min), dann mindestens über Nacht lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit 40 ml 1/4BS homogenisiert und in ein Glasgefäß mit rundem Boden gegeben. Die Sonifizierung erfolgte gepulst bei 50% Duty Cycle für 3 x 5 min auf Eis, anschließend wurde zentrifugiert (5 krpm, 10 min, 4°C). Die entstandene Suspension wurde auf 240 ml mit 1/4BS aufgefüllt und dreimal ultrazentrifugiert (Ti45, 40 krpm, 1 h, 4°C), dazwischen jeweils gepottert.

Das letzte Pellet wurde dann in 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 aufgenommen und erneut dreimal ultrazentrifugiert. Das daraus entstandene Pellet wurde in 10 ml 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ausbeute (aus 10 L Kulturen, BCA-Bestimmung): 27 mg

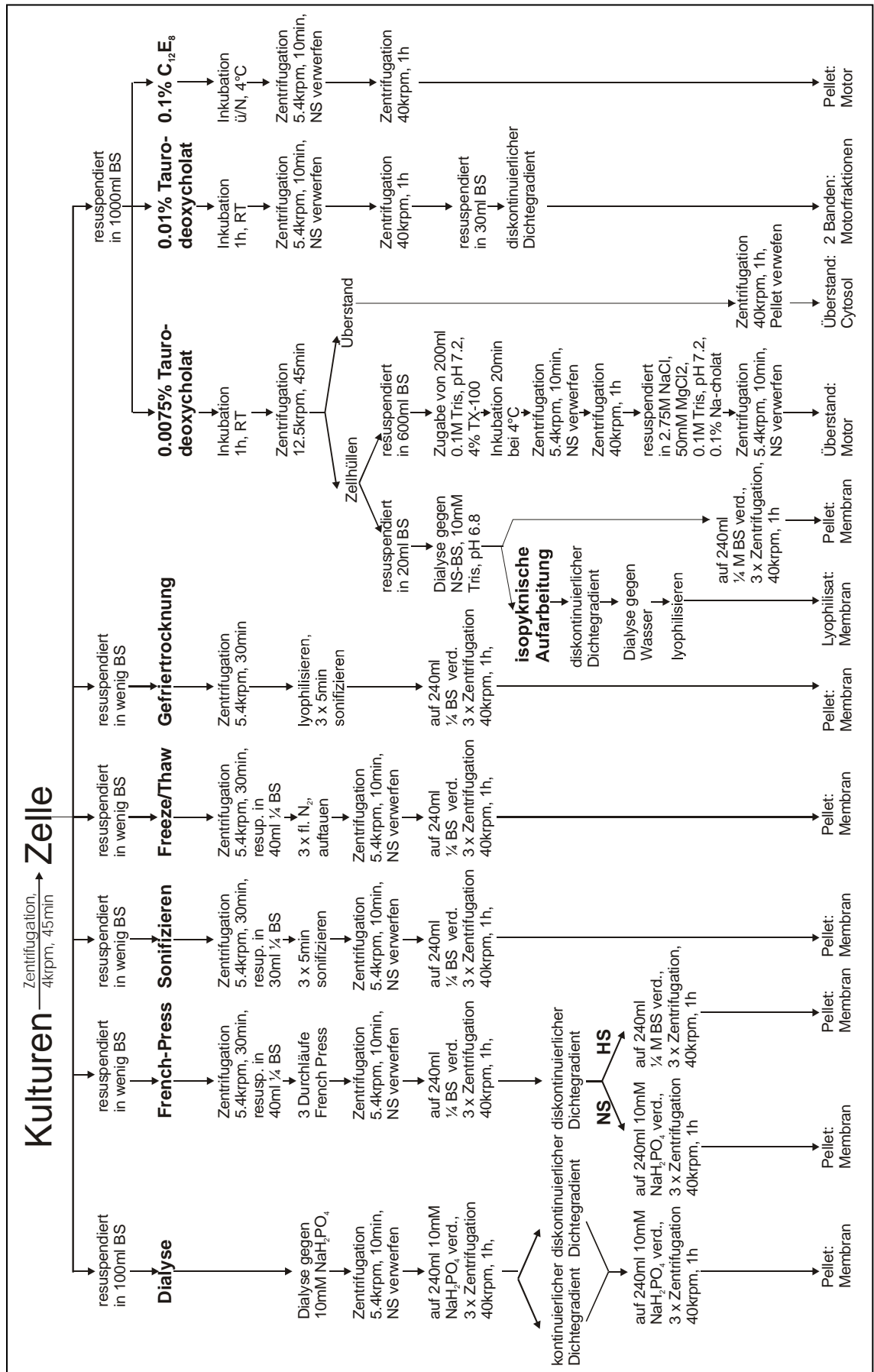
### 2.3.1.8 Zellaufschluss mittels isopyknischer Aufarbeitung

Die pelletierten Zellen wurden in BS in einer 1:10-Verdünnung des ursprünglichen Zellkulturvolumens aufgenommen. Anschließend wurden 16,7 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, eine Spatelspitze DNase und 10 ml einer 0,075% Natriumtaurodeoxycholatlösung (alle Lösungen in Wasser) zugegeben. Die Zellen wurden 75 min ohne Rühren bei RT stehen gelassen, dann für weitere 30 min mit einem Rührfisch langsam gerührt. Die Zellhüllen wurden zentrifugiert (GSA, 12,5 krpm, 45 min, 4°C), der Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Die Zellhüllen wurden in 20 ml BS aufgenommen und über Nacht gegen NS-BS, 10 mM Tris, pH 6,8 dialysiert. Das Dialysat wurde vollständig auf 12 Stufengradienten (je 30 ml) aufgetragen (10% Sucrose (w/w) und 50% Sucrose (w/w) in 1/4BS), und zentrifugiert (TST28, 25 krpm, 4h, 10°C). Die Interphase (GMF) wurde abgenommen, über Nacht gegen Wasser dialysiert, und dann in einer Lyophilisator gefriergetrocknet.

Ausbeute (aus 10 L Kulturen, BCA-Bestimmung): 341 mg

2.3.1.9 Übersichtsdiagramm der Zellaufschlüsse und Aufarbeitungen

Abb. 2.1: Übersicht der Zellaufschlüsse und Aufreinigungen.



### 2.3.2 Membranreinigung

Die bei den Zellaufschlüssen erhaltene Gesamtmembranfraktion wurde nachfolgend weiter gereinigt, um sowohl cytosolische Proteine abzureichern (mittels Dichtegradienten), als auch periphere Proteine von der Membran abzulösen (mittels Detergenzien oder pH-Änderung). Für die Fraktionierung von Membranfraktionen wurde ein kontinuierlicher Dichtegradient benutzt.

#### 2.3.2.1 Diskontinuierlicher Dichtegradient

In ein 30 ml Swing-Out Zentrifugengefäß wurden 10 ml einer 50% (w/w) Sucroslösung (10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 oder 1 M NaCl, 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2) vorgelegt und langsam mit 18 ml einer 20% (w/w) Sucroslösung (gleiche Salz- und Pufferbedingungen wie oben) überschichtet. Anschließend wurden 5 ml einer Membranfraktion aufpipettiert und in einem Tst28 Rotor zentrifugiert (25 krpm, 12 h, 10°C). Die Membranproteine wurden isopyknisch in der Interphase aufkonzentriert und konnten mittels einer Pasteurpipette abgenommen werden.

#### 2.3.2.2 Kontinuierlicher Dichtegradient

Bei kontinuierlichen Dichtegradienten wurde mittels eines Gradientenmischers ein linearer Gradient zwischen 20% (w/w) und 50% (w/w) Sucrose generiert und Membranen mittels ihrer spezifischen Dichte im gesamten Gradientenbereich aufgetrennt. Puffer- und Zentrifugationbedingungen sind mit denen des diskontinuierlichen Gradienten identisch. Beim Wildtyp R1 entstanden Banden unterschiedlicher Färbung, die direkt abgenommen werden konnten. Bei den Mutanten TOM und NAOMI wurden unterschiedliche Fraktionen gewonnen, indem der Gradient von unten angestoßen und nach Volumen fraktioniert wurde.

#### 2.3.2.3 Partielle Solubilisierung mit Triton X-100

Zu einer Membranfraktion (100 µl bis 400 µl Volumen) wurde Triton X-100 zugegeben (0,2% Finalkonzentration), 10 min bei 4°C inkubiert und ultrazentrifugiert (Tisch-UZ, 120.000 g, 45 min, 4°C). Das Pellet wurde im entsprechendem Puffer aufgenommen und erneut unter den vorherigen Bedingungen ultrazentrifugiert (Santoni *et al.*, 2000).

#### 2.3.2.4 Phasenseparation mittels Triton X-114

Eine Membranfraktion (100 µl bis 400 µl Volumen) mit einer Konzentration von 4 mg/ml wurde mit eiskalter Tx-114 Lösung versetzt (2% Finalkonzentration) und für 15 min auf Eis inkubiert, danach bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 37°C

inkubiert, anschließend bei 1.000 g für 10 min zentrifugiert. In der unteren Tx-114 Phase wurden die hydrophoben Membranproteine angereichert (durch die Temperaturerhöhung über den Cloud-Point des Detergens), welche nachfolgend mit Aceton gefällt wurden (Bordier, 1981).

#### 2.3.2.5 Carbonat-Extraktion

Eine pelletierte Membranfraktion wurde mit 200 µl 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> verdünnt und bei 0°C für 30 min inkubiert, dann ultrazentrifugiert (Tisch-UZ, 120.000 g, 45 min, 4°C). Das Pellet wurde in 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2 resuspendiert und erneut ultrazentrifugiert (Fujiki *et al.*, 1982).

#### 2.3.2.6 Chloroform/Methanol-Extraktion

0,1 ml einer Membransuspension (in 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2) wurde mit 0,9 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisch (8:1) versetzt und 15 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde 20 min bei 12.000 g, 4°C zentrifugiert und der Überstand in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet (Santoni *et al.*, 2000).

#### 2.3.3 Cytosolgewinnung

Abhängig von der Art der späteren Auftrennung wurde das Cytosol entweder mittels Taurodeoxycholat (Gelchromatographie) oder durch Sonifizieren (Ammoniumsulfat-Fällung) gewonnen, wobei in beiden Fällen der Aufschluss unter Erhalt der nativen Komplexe in Basalsalz erfolgte.

##### 2.3.3.1 Cytosolfractionierung mittels Gelchromatographie

Das mittels Taurodeoxycholat-Aufschlusses gewonnene Cytosol wurde erneut ultrazentrifugiert (Ti45, 1 h, 40 krpm, 4°C), sterilfiltriert (0,45 µm Durapore Membran) und auf 10 mg/ml (BCA-Bestimmung) in 10 kD-Ausschluss Filtrationsgefäßen aufkonzentriert (SS-34, 5000 g, 10°C).

Aufgrund der Hochsalzbedingungen wurde die in 20% Ethanol gelagerte Säule zunächst mit Wasser äquilibriert, bevor in einem zweiten Äquilibrierungsschritt mit BS, 10 mM Tris, pH 7,2 gespült wurde.

Die Auftrennung wurde in zwei Systemen durchgeführt, für analytische Probenmengen im Smart-System, für präparative Trennung im Äkta-System.

### 1. Analytische Trennung

50 µl (500 µg) dieser Cytosolfraction wurden dann mittels Gelchromatographie im Smart-System nach der nativen Größe der Proteinkomplexe aufgetrennt.

Für die dann erfolgende Fraktionierung wurden folgende Bedingungen verwendet:

Parameter der Chromatographie:	
Gerät:	Smart, µPeak Monitor
Säule:	Sephadex G-200 PC 3.2/30
Probe:	50 µl (500 µg) Cytosol
Applikation:	100 µl Sample-Loop
Medium:	BS, 10 mM Tris/HCl, pH 7.2
Fluss:	40 µl/min
Fraktionierung:	80 µl, Auto-Sampler

Die Probe wurde in einen 100 µl Loop injiziert und bei einem Fluss von 40 µl/min in einer Sephadex G-200 PC 3.2/30 Säule getrennt. Das Laufmedium bestand aus BS, 10 mM Tris/HCl, pH 7,2. Fraktionen von 80 µl wurden in einem Autosampler gesammelt und anschließend den

entsprechenden Absorptionssignalen (gemessen bei Wellenlängen von 205 nm und 280 nm) gemäß vereinigt.

### 2. Präparative Trennung

Bei größeren Probenmengen wurde eine Auftrennung mittels des Äkta-Systems benutzt. Hierbei wurden 2 ml des Cytosols (20 mg) mittels einer Superdex 200 prep grade HiLoad 26/60 Säule getrennt.

Parameter der Chromatographie:	
Gerät:	Äkta, µPeak Monitor
Säule:	Superdex 200 prep grade HiLoad 26/60
Probe:	2 ml (20 mg) Cytosol
Applikation:	10 ml Super-Loop
Medium:	BS, 10 mM Tris/HCl, pH 7.2
Fluss:	0,2 ml/min
Fraktionierung:	4 ml, Auto-Sampler

Das Laufmittel bestand analog des Smart-Systems aus Basalsalz, 10 mM Tris pH 7,2 (entgast, filtriert), die Flussrate lag bei 0,2 ml/min. Die Fraktionsgröße betrug 4 ml, das Gesamttrennvolumen bestand aus insgesamt 420 ml.

#### 2.3.3.2 Cytosolfractionierung mittels Ammoniumsulfat-Fällung

Das durch Sonifizieren gewonnene Cytosol wurde gegen 1/4BS, 50 mM Citronensäure, pH 4,5 und aufsteigende Ammoniumsulfat-Konzentrationen dialysiert und die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation abgetrennt (SS-34, 5,4 krpm, 20 min, 20°C). Die Anfangsvolumina betragen dabei 100 ml für die Proteinlösung und 4 Liter für die Dialysierlösung. Gegen folgende Ammoniumsulfat-Konzentrationen wurde dabei für jeweils 3h dialysiert: 20%, 40%, 60%, 80% und 95% (England und Seifert, 1990). Die ungefallenen Proteine wurden dann im letzten Schritt mittels TCA gefällt.



### 2.3.4 Motorisolierung

#### 2.3.4.1 Motorisolierung nach Kupper *et al.*

Zellhüllen aus 10 Liter Kulturen in der stationären Phase wurden durch Taurodeoxycholataufschluss gewonnen und in 600 ml eiskaltem BS resuspendiert. Anschließend wurden 200 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,2, 4% Tx-100 zugegeben und auf Eis für exakt 20 min geschüttelt. Danach wurden unlösliche Bestandteile und nicht-dissoziierte Zellhüllen zentrifugiert (SS-34, 5,4 krpm, 10 min, 10°C), der Überstand dann ultrazentrifugiert (Ti45, 2 h, 40 krpm, 4°C). Der entstandene Niederschlag wurde im Elutionspuffer (2,75 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris, pH 7,2, 0,1% Natriumcholat) resuspendiert und erneut zentrifugiert (SS-34, 5,4 krpm, 10 min, 10°C).

Parameter der Chromatographie:	
Gerät:	FPLC, $\mu$ Peak Monitor
Säule:	Sepharose Cl-4B XK26/70
Probe:	10ml Motorfraktion
Applikation:	10ml Super-Loop
Medium:	Elutionspuffer
Fluss:	2.5 ml/min
Fraktionierung:	5ml, Auto-Sampler

Der Überstand wurde mit FPLC über eine Sepharose Cl-4B Säule (XK 26/70) chromatographiert. Die Polkappen mit anhängenden Flagellen wurden im Ausschlussvolumen eluiert (Kupper *et al.*, 1994).

#### 2.3.4.2 Motorisolierung mittels Bacitracin

Die Zugabe von Bacitracin zum Medium führt bei *H. salinarum* zu einem Zellwachstum mit inhibierter Glykoproteinsynthese. Bei einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml Bacitracin im Medium liegen die Zellen bereits 36,5 Stunden nach dem Animpfen nahezu vollständig in Sphaeroblastenform vor (Mescher und Strominger, 1975).

10 Liter des unter Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Mediums wurden mit 50 mg Bacitracin versetzt und mit 700 ml einer Vorkultur angeimpft. Die Zellernte erfolgte analog der unter Abschnitt 2.3.1.1 beschriebenen Methode, die Motorisolierung wie unter 2.3.4.1.

#### 2.3.4.3 Motorisolierung mittels EDTA

10 Liter Zellkultur in der stationären Phase wurden in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert (4 krpm, 45 min, 10°C) und anschließend in 500 ml Sphaeroblastenpuffer (2 M NaCl, 25 mM KCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,75) auf einem Schüttler vorsichtig resuspendiert. Zu dieser Lösung wurden 25 ml einer 0,5 M EDTA Lösung tropfenweise zugegeben. Die Sphaeroblasten wurden zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge, 4 krpm, 45 min, 10°C) und der Überstand ultrazentrifugiert (Ti45, 40 krpm, 1 h, 4°C). Das Pellet nach der Ultrazentrifugation enthielt Flagellen, der Überstand wurde verworfen.

### 2.3.4.4 Motorisolierung mittels Direktsolubilisierung in C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>

Zellen aus 10 Liter Zellkultur wurden wie unter 2.3.1.1 beschrieben zentrifugiert und in 1 Liter Basalsalz resuspendiert. Es wurden 10 ml einer DNase-Lösung (kleine Spatelspitze DNase gelöst in Wasser) und eine 10%-ige C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>-Lösung tropfenweise bis zu 0,1% Finalkonzentration zugegeben und die Lösung anschließend über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4°C inkubiert. Unlösliche Bestandteile und nicht-dissoziierte Zellen wurden zentrifugiert (SS-34, 5,4 krpm, 10 min, 10°C), der Überstand dann ultrazentrifugiert (Ti45, 40 krpm, 2 h, 4°C).

### 2.3.4.5 Motorisolierung mittels Direktsolubilisierung in Taurodeoxycholat

Zellen einer 5 Liter Kultur wurden wie unter 2.3.1.1 beschrieben zentrifugiert und in 500 ml Basalsalz resuspendiert. Es wurden 10 ml einer DNase-Lösung und eine 1%-ige Taurodeoxycholat-Lösung tropfenweise bis zu 0,01% Finalkonzentration zugegeben und die Lösung anschließend 1 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Unlösliche Bestandteile und nicht-dissoziierte Zellen wurden durch Zentrifugation (SS-34, 5,4 krpm, 10 min, 10°C) entfernt, der Überstand dann ultrazentrifugiert (Ti45, 40 krpm, 2 h, 4°C). Der Niederschlag wurde in 15 ml Basalsalz resuspendiert und auf 3 kontinuierliche Dichtegradienten (30% - 60% Sucrose (w/w) in Basalsalz) geladen. Nach Zentrifugation (Tst28, 25 krpm, 12 h, 10°C) wurden eine bräunliche Bande und eine darunterliegende weißliche Bande erhalten. In beiden Fraktionen wurden Bestandteile des Flagellarmotors mittels Elektronenmikroskopie entdeckt.

### 2.3.4.6 Motorisolierung mittels Dialyse und Dichtegradient

Zellhüllen aus 10 Liter Kulturen in der stationären Phase wurden nach dem Taurodeoxycholataufschluss gewonnen und in 50 ml Basalsalz resuspendiert. Anschließend wurde über Nacht gegen NS-BS dialysiert und das gesamte Gemisch auf 6 diskontinuierliche Dichtegradienten verteilt (20% bzw 50%-ige Sucroselösung (w/w) in NS-BS). Nach Zentrifugation (Tst28, 25 krpm, 12 h, 10°C) bestand das Pellet fast ausschließlich aus einer Flagellarfraktion.

## 2.3.5 Proteinbestimmung

### 2.3.5.1 Proteinbestimmung nach Warburg

Zur Proteinbestimmung nach Warburg (Fischer, 1998) wurde die Absorption bei den Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen und die Proteinmenge mittels der Formel

$$\text{Proteinmenge} = 1,45 \times (\text{Absorption } 280 \text{ nm}) - 0,75 (\text{Absorption bei } 260 \text{ nm})$$

bestimmt.

### 2.3.5.2 Proteinbestimmung mittels BCA

Eine weitere Möglichkeit zur quantitativen Proteinbestimmung ist die Farbreaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) (Smith *et al.* 1985).

Proteine bilden mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion), gleichzeitig werden die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert. Diese bilden dann mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, der bei 562 nm sein Absorptionsmaximum aufweist.

50 Volumenanteile von Lösung A (1 % BCA- $\text{Na}_2$ , 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,16%  $\text{Na}_2$ -tartrat, 0,4 % NaOH, 0,95 %  $\text{NaHCO}_3$ , eingestellt auf pH 11,25) wurden mit 1 Volumenanteil von Lösung B (4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) vermischt und zu 1 ml dieses Gemisches 50  $\mu\text{l}$  der zu analysierenden Probe gegeben. Die Probe wurde für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend die Absorption bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration aus dem Vergleich mit einer BSA-Eichgeraden (0,1-1,0 mg/ml) ermittelt. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Salzen und Detergenzien. Die Temperatur muss jedoch sehr genau eingehalten werden.

### 2.3.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode von Bradford (Bradford, 1976) auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau an Arginyl-Reste von Proteinen. Die kationische Form des Farbstoffes, die in der sauren Reagenzlösung hauptsächlich vorliegt, besitzt ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. In dem Farbstoff-Protein-Komplex liegt vor allem die anionische Form mit einem Absorptionsmaximum von 595 nm vor. Durch Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge kann man die Menge des gebundenen Farbstoffes quantifizieren. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer Eichkurve (BSA, 0,1-1,0 mg/ml) ermittelt.

Zur Herstellung der Reagenzlösung wurden 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G250 in 50 ml 90%-igem Ethanol gelöst und nach Zugabe von 100 ml 85%-iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$  mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Das Reagenz wurde filtriert und in einem braunen Glasgefäß bei Raumtemperatur gelagert.

10  $\mu\text{l}$  Proteinlösung wurden mit 990  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz versetzt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 gemessen.

### 2.3.6 Proteindenaturierung

Ziel der Proteindenaturierung ist es, Proteine sowohl zu konzentrieren, als auch im Falle von Membranproteinen diese zu delipidieren. Dies ermöglicht eine effektive Solubilisierung und entfernt negativ geladene Lipide, welche in der IEF die Proteine zur Anode ziehen würden.

#### 2.3.6.1 Acetonfällung

Bei der klassischen Acetonfällung wurde eine Proteinlösung mit einem 10-fachen Überschuss an  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton versetzt und 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min in einer Tischzentrifuge für 15 min bei 16 krpm,  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Enthielt die Proteinlösung eine Salzkonzentration von mehr als 100 mM, wurden zwei weitere Waschschrte mit eiskaltem 50 % Aceton in Wasser durchgeführt, wobei die Niederschläge in einem Ultraschallbad vollständig gelöst wurden. Die nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 15 min, 16 krpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) erhaltenen Überstände wurden verworfen.

#### 2.3.6.2. Modifizierte Acetonfällung nach Mastro und Hall

Die oben genannte Acetonfällung wurde modifiziert, indem statt eines 10-fachen Überschusses an Aceton ein 14-facher Überschuss einer  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Mischung aus Methanol/Aceton/Tributylphosphin (1:12:1) zugeben wurde. Tributylphosphin soll dabei die Stabilität von Membranproteinen erhalten, deshalb können keine weiteren Waschschrte durchgeführt werden (Mastro und Hall, 1999).

#### 2.3.6.3 Chloroform/Methanol-Fällung

Bei der  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  -Fällung wurde 0,1 ml Proteinlösung mit 0,4 ml Methanol versetzt, geschüttelt und anschließend mit 0,1 ml Chloroform versetzt und geschüttelt. Nach Zugabe von 0,3 ml Wasser und Zentrifugation für 1 min bei 9000 g reichern sich die Proteine in der Interphase des Phasengemisches an.

Die obere Phase wurde abgenommen, zu dem verbliebenen Gemisch wurden 0,4 ml Methanol zugegeben und für 3 min bei 9000 g zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde verworfen und der Proteinniederschlag in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (Wessel und Flügge, 1984).

### 2.3.6.4 TCA-Fällung

Eine Proteinlösung wurde mittels einer 20%-igen (w/v) Trichloressigsäure auf eine Finalkonzentration von 2% TCA gebracht, 30 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (15 min, 20 krpm, 4°C). Der entstehende Überstand wurde verworfen und der Proteinniederschlag in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

### 2.3.7 Proteinsolubilisierung

Für 1-D Gele nach dem Laemmli-System wurde zur Solubilisierung der normale Auftragspuffer verwendet (50 mM Tris/HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycerol), jedoch wurden speziell bei Membranproteinen die Probe nicht bei 95°C inkubiert, sondern 10 min im Ultraschallbad solubilisiert. Die Proteinkonzentrationen lagen bei der Solubilisierung bei 1 µg/µl bis 10 µg/µl, die Volumina beim Probenauftrag betragen zwischen 10 µl und 15 µl.

Bei der Solubilisierung für die isoelektrische Fokussierung, bei der kein SDS verwendet werden kann, wurden Chaotrope (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff) eingesetzt (Rabilloud *et al.*, 1997), und die Solubilisierungsbedingungen verstärkt. Die Proben wurden für 30 min bei RT geschüttelt, anschließend für 10 min im Ultraschallbad inkubiert und zuletzt für 30 sec mit einem Mikrotip-Sonifizierstab kontinuierlich beschallt (Output Einstellung 4). Die Proben wurden hierbei zur Wärmeabführung in einem Wasserbad auf 20°C gehalten.

### 2.3.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

#### 2.3.8.1 IEF in immobilisierten pH-Gradienten

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden immobilisierte pH-Gradienten im Bereich pH 3-6, pH 3-10 (BioRad) und pH 4-5 (Amersham Biosciences) verwendet. Diese bestehen aus Acrylamidderivaten mit unterschiedlichen pKa Werten, die mit Acrylamid kopolymerisiert wurden. Zur Verstärkung der erhaltenen Matrix ist diese hydrophob an eine Folie gebunden.

Die getrockneten Streifen (18 cm Länge von Amersham Biosciences, 17 cm Länge von BioRad) wurden in einer Rehydratisierkammer mit 350 µl bzw. 300 µl Rehydratisierpuffer auf ihr ursprüngliches Volumen über Nacht zurückgequollen. Der Rehydratisierpuffer bestand aus 7-8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1-2% Detergens, 0,5 % Ampholyte pH 3-10 und 15 mM DTT. Um während des Quellvorganges die Verdunstung von Wasser zu unterbinden, wurden die Streifen mit Cover-Fluid überschichtet. Die dann rehydratisierten Streifen wurden zuerst mit MilliQ abgespült, und kurz zwischen zwei befeuchtete Whatmanpapieren gelegt,

## 2. Material und Methoden

um Harnstoffkristalle zu entfernen. Diese hätten sowohl die IEF als auch die SDS-PAGE gestört (leere Spuren auf dem Gel).

Als Reduktionsmittel wurde Dithiothreitol verwendet, welches jedoch als schwache Säure während der Fokussierung in Richtung Anode wandert. Im basischen Bereich tritt daher eine Verarmung an Reduktionsmittel auf, was zu Redoxvorgängen an den Cysteinresten der Proteine führen kann, wodurch sich ihr pI verändert und in einer unscharfen Fokussierung resultiert. Da im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich im sauren pH-Bereich 3-6 gearbeitet wurde, ist dieser Effekt vernachlässigt worden.

Bei Gelen im Basischen wurde zusätzlich zum DTT 1 mM Tributylphosphin (TBP) zugesetzt, welches diesen Wanderungseffekt nicht zeigt (Herbert *et al.* 1998), ferner wurde der kathodische Elektrodenstreifen in 3,5% DTT getränkt.

Der Probenauftrag erfolgte mittels aufgesetzter Tröge (Sample Cups) entweder kathodisch oder anodisch, wobei der Probenpuffer dem Rehydratisierpuffer entsprach, jedoch keine Ampholyte enthielt und die DTT Konzentration auf 50 mM erhöht wurde. Ferner konnte die Probe auch direkt in den Streifen rehydratisiert werden (in-Gel Auftrag), wobei lediglich im Rehydratisierpuffer die DTT Konzentration auf 50 mM erhöht wurde (Rabilloud *et al.*, 1994).

Die isoelektrische Fokussierung wurde bei der Sample Cup Methode in der Multiphor III (Amersham Biosciences) in Kombination mit aufgesetztem DryStrip Kit durchgeführt, die in-Gel Methode wurde in der IPG-Phor (Amersham Biosciences) vorgenommen.

Bei der Fokussierung in der Multiphor III wurden die Elektrophoresekammern mit Wasser gefüllt und die Löcher im Deckel mit Klebeband verschlossen, um eine Wassersättigung der Luft während der IEF zu gewährleisten. Der DryStrip Kit wurde nach Aufpipettieren von 4 ml Kerosin auf die Kühlplatte der Multiphor gelegt, ein entsprechender Aligner für die IEF-Streifen nach Aufpipettieren von 10 ml Cover Fluid eingelegt.

Die IEF-Streifen wurden mit der sauren Seite zur Anode in die Apparatur gelegt und die Elektroden aufgesetzt, wobei an beiden Enden ein feuchtes Elektrodenpapier zwischen IEF-Streifen und Platinelektrode gelegt wurde. Nach Aufsetzen der Probentröge und Probenauftrag wurden die Streifen mit CoverFluid überschichtet und ein Plastikschildchen mit 5-10 NaOH Plätzchen danebengestellt, um Kohlendioxid zu binden, welches sonst die Proteine carboxylieren könnte. Die Fokussierung wurde mit einem leicht ansteigenden Gradienten begonnen, um eine Aufkonzentrierung der Proteine am Probenauftrag und damit eine mögliche Präzipitation zu verhindern. Diese wurde bei 20°C durchgeführt.

Phase 1: 150 V	1 min -steigend	Phase 5: 500 V	1 h - steigend
Phase 2: 150 V	1 h - halten	Phase 6: 500 V	4 h - halten
Phase 3: 300 V	1 h - steigend	Phase 7: 3500 V	5 h - steigend
Phase 4: 300 V	1 h - halten	Phase 8: 3500 V	8,34 h - halten

In der IPG-Phor können Spannungen bis 8000 V angelegt werden, was neben kürzeren Fokussierzeiten auch zu schärferen Fokussierungen führen sollte.

Bei dieser Methode wurden die IEF-Streifen nach in-Gel Auftrag mit der Gelseite nach unten in Keramikscheffchen gelegt und mit 1 ml CoverFluid überschichtet. Der Einlaufgradient wurde bei der in-Gel Auftragung verkürzt, da die Proteine gleichmäßig im Streifen verteilt sind. Nach einer Niedrigvoltphase (1 h bei 150 V), wurde die Spannung zunächst linear auf 600 V erhöht (1 h) und nach einer weiteren Stunde linear über 2 h auf 8000 V erhöht. In der letzten Stufe wurde dann für 5 h bei 8000 V fokussiert ( $T = 20^{\circ}\text{C}$ )

Die fokussierten Probenstreifen wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.3.8.2 IEF in flüssigen Agarose-Gelen

Bei der IEF in flüssigen Agarose-Gelen handelt es sich um eine trägerfreie Elektrophorese, bei der der pH-Gradient ausschließlich über Ampholyte generiert wird. Im Gegensatz zu Polyacrylamid -oder anderen festen Matrices- sollten keine Interaktionen mit den Proteinen stattfinden. Bei dieser Methode wurde ein System eingesetzt, indem die Agarose bei RT flüssig ist, nach Abkühlung auf unter  $0^{\circ}\text{C}$  aushärtet, und bei anschließender Erwärmung auf RT fest bleibt.

0,1 g Agarose IEF wurden mit 1,20 g D-Sorbitol und 5,80 ml MilliQ auf  $100^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die Lösung wurde nach Schmelzen der Agarose auf  $70^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und 3,60 g Harnstoff und 0,76 g Thioharnstoff zugegeben. Direkt nach deren Zugabe wurde die Lösung in ein  $50^{\circ}\text{C}$  warmes Wasserbad gegeben, um eine Zersetzung des Harnstoffes zu vermeiden. Zu dieser Lösung wurden 1 ml Ampholyte (pH 3-6 bzw. pH 3-10) und entsprechendes Detergens (auf 1% Finalkonzentration) gegeben. 0,5 ml dieser Lösung wurde dann mittels eines eingeführten Schlauches in eine mit einer Dialysemembran nach unten hin abgeschlossene Glaskapillare pipettiert (0,5 ml Glaspipette, oben und unten abgeschnitten, Länge 18 cm ). Um Luftblasen zu vertreiben, wurde die gefüllte Kapillare in einer Zentrifuge kurz zentrifugiert (Hettich, 100 rpm, 2 min). Diese wurde anschließend in eine Kapillar-Elektrophoreseapparatur eingespannt. Der kathodale Puffer bestand beim pH-Bereich 3-10 aus 100 mM NaOH (in 6 M Harnstoff, 1 M Thioharnstoff), beim pH-Bereich 3-6 aus 100 mM Glutaminsäure (in 6 M Harnstoff, 1 M Thioharnstoff) und der anodale Puffer aus 100 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (in 6 M Harnstoff, 1 M Thioharnstoff). Die Probe wurde mittels einer Hamiltonspritze vorsichtig über die Kapillarlösung aufgetragen. Alternativ wurde auch ein in-Gel Auftrag getestet, bei dem die Proteinlösung vor dem Einfüllen mit der Agaroselösung vermischt wurde.

## 2. Material und Methoden

Die Elektrophorese wurde bei 400 V, 2 mA, 5 W für 18 Stunden durchgeführt und ein pI - Farbmarker benutzt. Nach der Elektrophorese wurde die Kapillare über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für den Transfer auf ein SDS-Gel (1,5 mm Dicke) wurde die Kapillare mit der erhärteten Matrix für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend konnte die Agarose-Matrix mittels leichten Luftdruckes aus der Kapillare gedrückt werden. Wegen der Instabilität der Matrix wurde auf eine Äquilibration mit SDS und DTT verzichtet und der Streifen direkt auf das SDS-Gel gelegt und mit einer auf  $50^{\circ}\text{C}$  erwärmten 0,5%-igen Agaroselösung (in Elektrophoresepuffer, 2% SDS, Bromphenolblau) fixiert (modifiziert nach Oh-Ishi *et al.*, 2000). Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers: 1 g/L SDS, 12 g/L Tris, 57,6 g/L Gycin

### 2.3.8.3 IEF in Polyacrylamid-Gelen mit freien Carrier-Ampholyten (nach Klose)

Bei dieser Art der isoelektrischen Fokussierung wurde analog dem Agarose-System eine abgeschnittene 0,5 ml Glaspipette benutzt.

Das kathodische Gelende wurde mittels eines Cap-Geles verschlossen, um ein Eindringen des basischen Puffers (und daraus resultierender Gradientenzerstörung) zu verhindern. Das saure Gelende wurde mit einer Sephadex-Lösung überschichtet, um Präzipitationen der einlaufenden Proteine durch Konzentrierung am Probenauftrag zu vermeiden, über diese Lösung wurden dann 10  $\mu\text{l}$  der Proteinprobe gegeben, die zuletzt noch mit einer Sample-Protection Lösung überschichtet wurde. Folgende Lösungen wurden dazu hergestellt:

#### 1. Gellösung:

Bestandteile	Stocklösung	Menge	Finale Konzentration
Acrylamid		1,75 g	3,5%
Piperazin-diacrylamid		0,15 g	0,30%
Carrier Ampholyt-Gemisch	6,4 ml	5,0 ml	10%
Harnstoff		27,0 g	54% (9 M)
Glycerol	14,3 g/50 ml	8,75 ml	5%
TEMED	60,0 $\mu\text{l}$ /10 ml	5,0 ml	0,06%

Die Gellösung (Gesamtvolumen 48,75 ml) wurde in 975  $\mu\text{l}$  Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2. Cap-Gel

Das Cap-Gel hatte die gleiche Zusammensetzung wie die Gellösung, jedoch wurden 6,0 g Acrylamid und 65 mg Piperazin-diacrylamid eingewogen, die resultierende Lösung wurde in 390  $\mu\text{l}$  Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 3. Carrier-Ampholyt Gemisch

Das Carrier Ampholyt Gemisch bestand aus 0,8 ml Ampholyte 3-10, 0,8 ml Sinulyte 3-10, 2,4 ml Sinulyte 3-6, 1,6 ml Sinulyte 5-8, 0,8 ml Rotolyte 7-9.



#### 4. Sephadex-Stock-Suspension

2 g Sephadex G-200 superfine wurden in 50 ml Millipore Wasser bei 90°C 5 h unter Rückfluss gequollen. Der Überstand wurde verworfen und die Sephadex-Suspension mit 100 ml 25 %-igen Glycerol mittels eines KPG-Rührers 2 h gerührt, wobei die Glycerollösung nach 1 h ausgetauscht wurde. Der Glycerolüberstand wurde mittels eines Büchner-Trichters von der Sephadex-Suspension abgetrennt, und diese dann in Aliquots von 8 g bzw. 272 mg bei -20°C eingefroren.

#### 5. Sephadex-Suspension

Vor der Fokussierung wurden 272 mg der Sephadex-Stock-Lösung mit 270 mg Harnstoff, 25 µl Carrier-Ampholyt Gemisch und 25 µl DTT-Lösung versetzt und direkt eingesetzt.

#### 6. Sample-Protection Lösung

6 g Harnstoff und 1 ml Glycerol wurden mit Wasser auf 19 ml aufgefüllt. 7,6 ml dieser Lösung wurden mit 0,4 ml Servalyt 2-4 versetzt und in 50 µl Aliquots bei -20°C eingefroren.

#### 7. Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung

80 mg Ammoniumpersulfat wurden in 10 ml Wasser gelöst und in 100 µl Aliquots bei -20°C eingefroren.

#### 8. IEF-Elektrodenpuffer

Der Anodenpuffer bestand aus 25 ml 95%-iger Phosphorsäure und 90 g Harnstoff in 500 ml Wasser.

Der Kathodenpuffer wurde aus 20 ml Ethylendiamin, 216 g Harnstoff und 20 g Glycerol in 400 ml Wasser hergestellt.

#### Herstellung der IEF-Gele:

390 µl der Cap-Gel-Lösung wurden mit 10 µl APS-Lösung versetzt und in den Deckel eines Falcon Röhrchens gegeben. Die Glaskapillare wurde mit der Unterseite kurz auf die Oberfläche der Lösung aufgesetzt, so dass sich die Lösung ungefähr 5 mm in die Kapillare zog.

Nachdem die Lösung auspolymerisiert war, wurden die Unterseite mit Saranfolie verschlossen und diese mit Dichtungsringen an die Kapillare fixiert.

975 µl der Gellösung wurden mit 25 µl APS-Lösung versetzt und in eine Spritze aufgezogen. Anschließend wurde die Lösung mittels eines 20 cm lange Teflonschlauches in die Kapillare eingefüllt. Entstehende Luftblasen wurden durch kreisförmiges Schleudern der Kapillare entfernt. Cap-Gel und Gel-Lösung hatten insgesamt ein Volumen von 420 µl. Die Kapillare wurde oben mit Parafilm verschlossen und exakt 72 h bei RT zum Auspolymerisieren stehen gelassen.

## 2. Material und Methoden

Vor der Fokussierung wurden die Kapillaren (ohne Parafilm und Saranfolie) in die Kapillarelektrophoreseapparatur eingebaut und mit Agarose (1% in Wasser) abgedichtet.

Überschüssiges Wasser wurde mit einer Hamiltonspritze abgezogen und mittels einer Pasteur-Pipette 2 mm der Sephadex-Lösung auf das Gel pipettiert. Auf diese Lösung wurden dann 10 µl Proteinprobe aufgegeben und diese wiederum mit 5 mm der Sample-Protection-Lösung überschichtet.

Nachdem Kathoden- und Anodenpuffer eingefüllt worden waren, wurden entstehende Luftblasen (anodisch und kathodisch in der Kapillare) entfernt und die Fokussierung mit folgendem Gradienten durchgeführt:

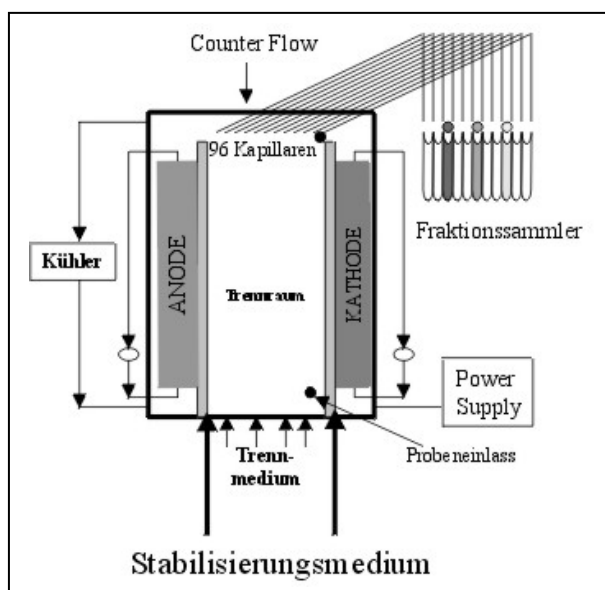
Phase 1: 100 V	1 h	Phase 5: 1000 V	30 min
Phase 2: 200 V	1 h	Phase 6: 1500 V	10 min
Phase 3: 400 V	17,5 h	Phase 7: 2000 V	5 min
Phase 4: 650 V	1 h		

Nach beendeter Fokussierung wurden die Gele mittels Druckluft vorsichtig aus den Kapillaren herausgelöst und für 10 min in der Äquibrierlösung (125 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8, 40 % Glycerol, 65 mM DTT, 3 % SDS, Bromphenolblau) inkubiert.

Anschließend wurden die Gele auf 1,5mm dicke, 12%-ige Acrylamidgele transferiert und mit 0,5 % Agarose in Elektrophoresepuffer überschichtet (Klose und Kobalz, 1995).

### 2.3.8.4 IEF in trägerfreiem Gradienten mittels Free-Flow-Elektrophorese

Mittels der Free-Flow Elektrophorese können Proteine in einem kontinuierlichen Fluss nach ihrem pI aufgetrennt werden.



**Abb. 2.2:** Schematischer Aufbau der Octopus-FFE-Apparatur.

Die Trennkammer besteht bei dieser Methode aus einer 50 cm langen, 10 cm breiten Kammer, an deren Seiten die Elektroden mit entsprechenden Puffern umspült werden. Diese sind wiederum vom dazwischen fließenden Medium über jeweils eine Membran und Elektrodenpapier getrennt.

Das Medium wird über 7 Einlassschläuche am unteren Ende der Trennkammer kontinuierlich zugeführt und verlässt diese 2 cm vor dem oberen Ende über 96 dicht nebeneinander liegende Kapillaren.

Um Blasenbildung und Vermischen an den Kapillareingängen zu vermeiden, wird zusätzlich vom oberen Ende der Kammer ein Gegenfluß (Counter-Flow) mit ähnlichem Volumenstrom zugeführt.

Die Probenlösung wird entweder konzentriert über eine separate Schlauchpumpe oder verdünnt im Trennmedium am unteren Ende der Kammer zugegeben. Nach erfolgter Trennung im orthogonal anliegenden elektrischen Feld werden die Fraktionen in einer Mikrotiterplatte aufgefangen.

### 1. Pufferzusammensetzungen für native IEF:

Anodenpuffer:	100 mM NaOH in H <sub>2</sub> O
Kathodenpuffer:	100 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O
Anodale Randstabilisierung:	100 mM NaOH in Trennmedium
Kathodale Randstabilisierung:	100 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in Trennmedium
Trennmedium:	22,5% Glycerin 0,2% HPMC 0,5% Ampholyte pH 3-10
Counterflow:	Trennmedium ohne Ampholyte und HPMC

### 2. Pufferzusammensetzungen für denaturierende IEF:

Anodenpuffer:	100 mM NaOH in H <sub>2</sub> O
Kathodenpuffer:	100 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O
Anodale Randstabilisierung:	100 mM NaOH in Trennmedium
Kathodale Randstabilisierung:	100 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in Trennmedium
Trennmedium:	7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff 12,5% Glycerin 0,2% HPMC 0,5% Ampholyte pH 3-10
Counterflow:	Trennmedium ohne Ampholyte und HPMC

Soweit nicht anders beschrieben, wurde über Einlass 1 die anodale Randstabilisierung, über Einlässe 2-5 das Trennmedium und über die Einlässe 6 und 7 die kathodale Randstabilisierung zugegeben (Fluss 7 ml/h). Die Probe wurde über den kathodalen Probeneinlass zugegeben (1 ml/h).

Nachdem die Apparatur aufgebaut worden war, wurde diese zuerst in horizontaler Lage mit Wasser gespült, anschließend mit Harnstofflösung äquilibriert und ein Streifen fest durchgeführt. Hierbei wird der rote Farbstoff SPADNS in Harnstoff über die Einlässe 2, 4 und 6 zugegeben, die gesammelten Fraktionen in einer Mikrotiterplatte auf ihre Symmetrie überprüft. Stimmt diese (ungefähr 13 Fraktionen alternierend farblos, rot) wurden die Trennpuffer zugegeben und Spannung angelegt, wodurch sich ein pH-Gradient vorbildete.

Unter diesen Leerbedingungen wurde für 46 min (2 Trennkammerdurchläufen) fokussiert, anschließend wurde die aufzutrennende Probe zugegeben.

### 2.3.9 SDS-PAGE und Transfer

Die eindimensionale SDS-Auftrennung wurde nach dem System vom Laemmli (1979) durchgeführt, bei dem die Dimensionen des Trenngels 0,75 mm Dicke, 80 mm Breite, 70 mm Höhe betragen. Auf das Trenngel wurde nach dessen Auspolymerisieren ein 5 mm hohes Sammelgel gegossen.

Für 2 Standardgele wurden folgende Lösungen hergestellt:

<b>Sammelgel (3%)</b>	
H <sub>2</sub> O	3,78 ml
Tris (2 M, pH 6,8)	0,63 ml
SDS (10%)	100 µl
Acrylamid (30%)	0,5 ml
APS (10%)	25 µl
TEMED	10 µl

<b>Trenngel (12,5%)</b>	
H <sub>2</sub> O	3,844 ml
Tris (2 M, pH 8,8)	1,889 ml
SDS (10%)	100 µl
Acrylamid (30%)	4,167 ml
APS (10%)	150 µl
TEMED	5 µl

10 µl der Probe wurden mit 2,5 µl eines fünffach-konzentrierten Probenpuffers vermischt und 10 min im Ultraschallbad solubilisiert. Auf ein Erhitzen der Probe wurde verzichtet, da dies bei Membranproteinen zu Präzipitationen führt.

Der Auftragspuffer (50 ml, fünffach konzentriert) hatte folgende Zusammensetzung:

50 mM Tris/HCl (pH 6,8)	6,25 ml (2 M Stock)
100 mM DTT	1,925 g
2% SDS	5 g
0,1% Bromphenolblau	250 mg
10% Glycerol	28,75 ml (87% Lsg.)

Nach dem Probenauftrag wurden das Gel mit Elektrophoresepuffer (1 g/L SDS, 12 g/L Tris, 57,6 g/L Gycin) überschichtet und die Elektrophorese bei maximal 130 V und 20 mA/Gel durchgeführt.

Für Proben, die aus FFE-Experimenten stammten, wurden Modifikationen eingeführt, da das im Trennmedium enthaltene HPMC den Probeneinlauf maßgeblich störte:

Die Probe wurde mit Ameisensäure versetzt (Finalkonzentration 2%) und 5 min im Ultraschallbad inkubiert, da die Cellulose bei diesem Schritt in kleinere Zuckerketten gespalten wird. Eine nachfolgende Acetonfällung mit zweimaligem Waschen mit 50% Aceton entfernte sowohl die Zucker als auch Harnstoff und Ampholyte. Der erhaltene Niederschlag wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in einfach-konzentriertem Auftragspuffer solubilisiert.

Für den Transfer in die 2-D SDS-PAGE wurden die IPG-Sreifen nach der isoelektrischen Fokussierung in zwei Schritten äquilibriert. Um elektroosmotische Effekte beim Proteintransfer zu verhindern und den gelösten Zustand der Probe zu verstärken, enthielten die Äquilibrierungslösungen Glycerol und Harnstoff (30% Glycerol, 6 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 2 % SDS).

Im ersten Äquilibrierungsschritt wurde dem Puffer zusätzlich 65 mM DTT zugesetzt (Reduktion der Disulfidbrücken), im zweiten Schritt 260 mM Iodacetamid (irreversible Carbamidomethylierung der Cysteinreste) und etwas Bromphenolblau zur Lauffronterkennung. Beide Schritte wurden für 15 min in einer Äquilibrierungskassette unter leichtem Schütteln für 15 min durchgeführt. Nach der Äquilibrierung wurde die restliche Lösung von den Streifen mit MilliQ ab gespült und die Streifen hochkant für jeweils 1,5 min auf jeder Seite auf feuchtes Whatmanpapier gestellt. Anschließend wurden die Streifen auf die Gele transferiert und mit 50°C warmer 0,5% -iger Agaroselösung in Elektrophoresepuffer (1g/L SDS, 12 g/L Tris, 57,6 g/L Gycin) überschichtet. Nachdem die Agaroselösung fest geworden war (5 min) wurden die Gele in die Apparatur eingebaut und je nach Acrylamid-Konzentration der Gele die Elektrophorese zwischen 25 – 40 mA/Gel ( $T = 4^{\circ}\text{C}$ ) durchgeführt. Die Auftrennung wurde gestoppt, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

Bei den Gelen handelte sich standardmäßig um 9-16%-ige Gradientengele, die mittels eines Gradientenmischers in einem Gelgießblock gegossen wurden, wobei die Lösung von unten durch einen Einlass eingefüllt wurde.

Gelzusammensetzung für 14 x 9-16% Gradientengele bzw. 10% uniprozentuale Gele (Sandwich, 0,75 mm Dicke, 170 mm Breite, 195 mm Höhe)

	<b>9%</b>	<b>16%</b>	<b>10%</b>
Acrylamid (ProtoGel)	75 ml	133,33 ml	166,66 ml
1,5M Tris/HCl pH8,8	63 ml	63 ml	126 ml
MilliQ	112 ml	54 ml	207,33 ml
10% APS-Lsg.	958 $\mu\text{l}$	958 $\mu\text{l}$	1,916 ml
TEMED	95,8 $\mu\text{l}$	95,8 $\mu\text{l}$	192 $\mu\text{l}$

Die Lösungen wurden bis auf APS und TEMED zusammengegeben, sterilfiltriert und entgast. Nach deren Zugabe und dem Giessen der Gele wurden diese zuerst mit Wasser-gesättigtem 2-Butanol für 1 h überschichtet, bis die Gele polymerisiert waren. Anschließend wurde die wassergesättigte 2-Butanol-Lösung durch Elektrophoresepuffer ersetzt. Zur vollständigen Polymerisierung wurden die Gele über Nacht in einen Kühlraum ( $4^{\circ}\text{C}$ ) gestellt.

Um die Bildung von SDS-Acrylamid Micellen zu vermeiden, was zu einer Anlagerung von Acrylamid an die Proteine führen kann, wurde den 2-D Gelen kein SDS zugesetzt.

### 2.3.10 Kationische/anionische Trennung

Eine weitere Methode zur zweidimensionalen Auftrennungen ist die Methode nach Macfarlane (Macfarlane, 1983, Macfarlane; 1989, Hartinger *et al.*, 1996). Sie beruht auf dem unterschiedlichen Migrationsverhalten von Proteinen bei anionischer bzw. kationischer Solubilisierung. Speziell bei Membranproteinen, für die ein höheres apparentes

## 2. Material und Methoden

Molekulargewicht bei anionischer Trennung beschrieben ist, sollte bei dieser Methode eine gute Auftrennung zu erwarten sein. Ferner wird die mögliche Präzipitation im isoelektrischen Punkt umgangen.

Die Probe (max. 1 M NaCl) wurde mit einem doppeltkonzentrierten Probenpuffer versetzt und kurz beschallt. 50 µl der Probe wurden anschließend auf ein kationisches Trenngel geladen und die Trennung bei 20 mA/Gel bis zum Einlauf in das Trenngel, dann bei 50 mA/Gel bis die Lauffront die Gelunterkante erreicht, durchgeführt. Die Proteine migrieren in diesem System zur Kathode.

10 ml des doppeltkonzentrierten Laufpuffers bestanden aus 4,5 g Harnstoff, 1 g 16-BAC, 1 ml Glycerol (87%), 4 ml H<sub>2</sub>O, 1,5 ml DTT (1,5 M) und 100 µl Pyronin Y (5%). Der Puffer wurde frisch hergestellt und bis zum Gebrauch bei 60°C aufbewahrt.

Die Gele hatten Dimensionen von 18 cm x 20 cm x 0,75 mm, das Trenngel hatte eine Länge von 16 cm.

<b>Trenngel (10%) 40 ml</b>		<b>Sammelgel (4%) 10 ml</b>	
Harnstoff	7,2 g	Harnstoff	1 g
Acrylamid (30%)	13,33 ml	Acrylamid (30%)	1,33 ml
Kaliumphosphat, pH 2,1 (300 mM)	10 ml	Kaliumphosphat, pH 4,1 (500 mM)	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	8,67 ml	H <sub>2</sub> O	1,3 ml
BIS (1,7% w/v)	2,73 ml	BIS (1,7% w/v)	1,38 ml
Ascorbinsäure (80 mM)	2 ml	Ascorbinsäure (80 mM)	0,5 ml
Eisensulfat (5 mM)	64 µl	Eisensulfat (5 mM)	8,5 µl
16-Bac (250 mM)	0,4 ml	16-Bac (250 mM)	70 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%, 1:2000 verd.)	1,6 ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%, 1:750 verd.)	0,5 µl

Der Elektrodenpuffer bestand aus 16-BAC (2,5 mM), Glycine (150 mM) und Phosphorsäure (50 mM).

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 6 x 15 min in *i*-Prop/HOAc/H<sub>2</sub>O (3,5:1:5,5) fixiert, danach für eine Stunde mit Coomassie (0,15% CBB-R250 in Fixierer) gefärbt. Nach Entfärbung in der Fixierlösung wurde die Spuren mit einem Skalpell ausgeschnitten und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

Für die anschließende Äquilibration wurde der entfärbte Streifen 2 x 10 min in 100 mM Tris/HCl, pH 8,8. inkubiert, dann jeweils 1 x 10 min im Äquilibrationpuffer analog des IEF-SDS-Transfers mit DTT/IAA, und zuletzt dann 1 x 10 min in Äquilibrationpuffer, pH 6,8 inkubiert.

Der Streifen wurde nachfolgend auf ein 1,5 mm dickes SDS-Gradientengel (6-14%) mit 4% Sammelgel transferiert und bei 25 mA/Gel die Elektrophorese durchgeführt.

### 2.3.11 Gelfärbungen und Fluoreszenzmarkierung

#### 2.3.11.1 Coomassie-Färbung

Die Gele wurden nach der Elektrophorese für mindestens 1 h in der Färbelösung inkubiert (0,1% Coomassie R-250 in H<sub>2</sub>O/MeOH/HOAc (45:45:10)), und anschließend unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung (*i*-Prop/HOAc/H<sub>2</sub>O (12,5:10:77,5)) ungebundener Farbstoff entfernt. Bei der Entfärbung mittels *i*-Propanol bleibt das Coomassie an den Proteinen gebunden.

#### 2.3.11.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

Bei der kolloidalen Coomassie-Färbung wurde das Gel ohne Fixierung in der Färbelösung (0,08% Coomassie G-250 in 1,6% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 8% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20% MeOH) über Nacht gefärbt. Die anschließende Entfärbung wurde in Wasser durchgeführt (Neuhoff *et al.*, 1985).

#### 2.3.11.3 Zink/Imidazol-Färbung

Die Zink/Imidazolfärbung ist eine negative Färbung, bei der die Gelmatrix gefärbt wird, Bereiche mit Proteinen hingegen ungefärbt bleiben.

Das Gel wurde für 5 min in 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> inkubiert, dann für 25 min in einer 200 mM Imidazol, 0,1% SDS-Lösung geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen für 30 sec in Wasser wurde das Gel in einer 0,1 M Zinkacetatlösung (gefiltert) unter kräftigem Schütteln gefärbt (Ferrerias *et al.*, 1993).

#### 2.3.11.4 Fluoreszenz-Färbung mit Sypro-Ruby

Die Fluoreszenz-Färbung mittels Sypro-Ruby beruht auf der Anbindung des Fluoreszenz-Farbstoffes an basische Aminosäuren. Bei dem Farbstoff liegt das Anregungsmaximum bei 300 nm und das Emissionsmaximum bei 618 nm, kann also zur schnellen visuellen Kontrolle über einen UV-Schirm betrachtet werden.

Das Gel wurde dabei zuerst für 30 min in 10% Methanol, 7% Essigsäure gewaschen und anschließend für 3 h bis über Nacht in der Sypro-Ruby Lösung gefärbt. Hierbei wurde das 10-fache Gelvolumen an Sypro-Ruby-Lösung eingesetzt, die Färbung fand in einer Plastikschaale statt. Zur Reduzierung des Hintergrundes wurde erneut für 30 min in 10% Methanol, 7% Essigsäure gewaschen, bevor das Gel anschließend in einem Fluoreszenzscanner eingescannt wurde (Lopez *et al.*, 2000).

## 2. Material und Methoden

### 2.3.11.5 Modifizierte Silberfärbung nach Heukeshoven

Die Silberfärbung (Heukeshoven und Dernick, 1985) wurde in Glasschalen durchgeführt um eine Hintergrundfärbung der Gele zu vermeiden. Sie zeichnet sich durch hohe Sensitivität aus, da der Hintergrund durch Zugabe von Natriumthiosulfat im Inkubationsschritt reduziert wurde (Blum *et al.*, 1987).

Fixieren	Über Nacht in: 40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Inkubation	90 min in: 30% (v/v) Ethanol 0,5 M Natriumacetat 0,2% (w/v) Natriumthiosulfat 0,5% (v/v) Glutaraldehyd
Waschen	4 x 10 min mit ddH <sub>2</sub> O
Sensibilisieren	45 min in: 0,1% (w/v) AgNO <sub>3</sub> 0,02% (v/v) Formaldehyd
Waschen	10 sec mit MilliQ
Entwickeln	10-15 min in: 2,5% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,01% (v/v) Formaldehyd
Stoppen	1 min in 0,5% (w/v) Glycin

### 2.3.11.6 Silberfärbung nach Vorum

Im Gegensatz zu der oben genannten Silberfärbung nach Heukeshoven wird die Färbung nach Vorum (Celis *et al.*, 1994) ohne Zusatz von Glutaraldehyd durchgeführt, wodurch einerseits zwar die Sensitivität erniedrigt wird, andererseits wegen Nichtvernetzung der Proteine eine anschließende Identifizierung möglich ist.

Fixieren I	2 x 30 min: 50% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure
Fixieren II	3 x 20 min in: 50% (v/v) Ethanol (absolut)
Inkubation	1 min in 200 mg/ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Waschen	2 x 1 min in MilliQ
Sensibilisieren	20 min in: 0,2% (w/v) AgNO <sub>3</sub> 0,0375% (v/v) Formaldehyd
Waschen	10 sec mit ddH <sub>2</sub> O
Entwickeln	10-15 min in: 6% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,025% (v/v) Formaldehyd
Stoppen	5 min in 10% HOAc

Die Gele konnten dann bis auf weiteres in 1% HOAc im Kühlschrank gelagert werden.

Zur Archivierung wurden die Gele zwischen 2 Cellophanfolien (eingespannt in einen Rahmen) luftgetrocknet, nachdem sie für einen Tag in 20%EtOH, 2% Glycerin äquilibriert wurden.



### 2.3.11.6 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Die delipidierte French-Press HS Membranfraktion (250 µg Protein, BCA-Bestimmung) wurde im 2-D Sample-Buffer resuspendiert (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1% w/v ASB-14 (w/v), 1% Triton X-100 (w/v), 10 mM Tris/HCl pH 8,5) und beschallt (3x 10 sec auf Eis, gepulst). Cyanine dye (Cy<sup>TM</sup>5 minimal dye) wurde in getrocknetem DMF gelöst und in einem Verhältniss von 400 pmol CyDye/50 µg Protein zugegeben. Nach Inkubation auf Eis im Dunkeln für 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mM Lysin (1 µl/400 pmol Farbstoff) durch Inkubation für weitere 10 min auf Eis gestoppt. Vor der isoelektrischen Fokussierung wurde die markierte Probe mit einem gleichen Volumen an 2-fach konzentriertem Sample Buffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1% w/v ASB-14 (w/v), 1% Triton X-100 (w/v), 130 mM DTT, 1% (v/v) Pharmalytes 3-10) versetzt. Die markierten Proteine wurden über einen Typhoon<sup>TM</sup> 9400 Scanner visualisiert, indem ein 633 nm Laser und ein 670 nm BP30 Emissionsfilter bei 200µm Auflösung benutzt wurde. Die Bilder wurden zuerst mittels des Programmes ImageQuant<sup>TM</sup> V 5.0 auf die Gelfläche beschnitten und anschließend mit dem gleichen Programm die Fluoreszenzsignale detektiert.

### 2.3.12 Immunodetektion

Die Detektion von Proteinen mittels Antikörper wird erreicht, indem die Proteine aus dem Gel auf eine Membran transferiert werden und diese anschließend mit einer Lösung eines spezifischen Antikörpers gegen das Protein von Interesse inkubiert wird. Dieser Antikörper wird von einem zweiten Antikörper, welcher mit einer Peroxidase-Funktion gekoppelt ist, erkannt. Bei Inkubation mit Luminol-Derivaten und Peroxid wird eine Chemilumineszenz-Reaktion ausgelöst, welche wiederum auf einem Photofilm detektiert werden kann.

#### 2.3.12.1 Membrantransfer

Dieses Protokoll der Firma Millipore zeichnet sich durch hohe Ausbeuten aus und basiert auf dem Semi-Dry-Blot Prinzip, arbeitet jedoch mit 3 Puffern.

Das Gel wurde 15 min in Kathoden-Puffer, die Membran (PVDF) für 15 sec in 100% MeOH, dann 2 min in Milli-Q und anschließend für 5 min in Anoden-Puffer II äquilibriert.

Der Aufbau der Semi-Dry-Blot Apparatur erfolgt von der Anode aus wie folgt: 2 Whatman-Papiere in Anoden-Puffer I, 1 Whatman-Papier in Anoden-Puffer II, Membran, Gel und dann 3 Whatman-Papiere im Kathoden-Puffer.

## 2. Material und Methoden

Der Transfer erfolgte dann für 2 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Membran für eine Fixierung der Proteine auf der Membran entweder über Nacht getrocknet oder für 1 h bei 37°C inkubiert.

Transferpuffer:

Anoden-Puffer I	0,3 M Tris, 10% MeOH, pH 10,4
Anoden-Puffer II	25 mM Tris, 10% MeOH, pH 10,4
Kathoden-Puffer	25 mM Tris, 40 mM 6-Amino-n-Caprinsäure, 10% MeOH, pH 9,4

### 2.3.12.2 Detektion mittels Antikörper (Immunologische Entwicklung)

Der getrocknete Blot wurde für 10 sec in 100 % MeOH inkubiert und dann zur Verdünnung des Methanols für 2 min in Milli-Q gewaschen. Der Blot wurde für 2 h in TBST (2,4 g Tris, 8 g NaCl, 1 ml Tween-20, pH 7,6, ad 1 Liter) und 5 % BSA abgesättigt, dann für 1 h in TBST und 5% BSA und 1. AK (1:5000 verdünnt) geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBST wurde der Blot für 45 min in TBST und 2. AK (1:10.000 verdünnt) inkubiert. Ungebundener 2. AK wurde durch 3 x 5 min Waschen in TBST entfärbt, anschließend wurde nach Herstellerangaben die Chemilumineszenzreaktion mittels eines ECL-Kits (Pierce) ausgelöst. Hierbei wurden für kleine Gele jeweils 1 ml von Lösung A und B, bei großen Gelen jeweils 2 ml eingesetzt.

Die Lösungen wurden nach 1 min Inkubation vom Blot abgetupft, der Blot in Saranfolie eingewickelt und ein Photofilm für jeweils 1 min, 3 min und 5 min aufgelegt.

### 2.3.13 SDS-Entfernung aus Gelen

Rückstände von SDS, welches an hydrophobe Proteine gebunden ist und die spätere Analytik stört, kann durch eine Ionenpaarbildung entfernt werden (Henderson *et al.*, 1979). Das silbergefärbte Gel wurde 2 mal 20 min in 50% Aceton, 5% HOAc, 5% Triethylamin inkubiert, dann 2 x 20 min in 50% Aceton gewaschen und vor dem Ausschneiden der Spots 2 x 20 min in Wasser äquilibriert. Bei dem ersten Schritt bildet sich aus Triethylamin und dem SDS ein acetonlösliches Ionenpaar.

### 2.3.14 Ausschneiden aufgetrennter Proteine

Im Gel visualisierte Proteine wurden je nach Auftrennung zur anschließenden Analyse unterschiedlich aus dem Gel ausgeschnitten:

Bei 1-D Gelen wurde die ganze Bande mittels eines Skalpells ausgeschnitten, während bei allen zweidimensionalen Auftrennungen die Proteine entweder mittels eines angeschliffenen Metallrohres (Durchmesser 1,7 mm) oder automatisch mittels eines „Spot-Pickers“ ausgeschnitten wurden. Bei letzterem wurde von dem Gel mittels integriertem Durchlichtscanner eine Abbildung in der Steuersoftware des Roboters erzeugt. Diese erlaubt

die manuelle Markierung der gewünschten Spots, gleichzeitig werden deren x- und y-Koordinaten registriert. Nach erfolgtem Start fährt der Roboter die Spotkoordinaten an, sticht mit einem Schneidewerkzeug (1,5 mm Innendurchmesser) den Spot aus, sichert ihn durch Unterdruck auf dem Weg zu einer vorgelegten Mikrotiterplatte, in der er durch einen kurzen Wasserstoß abgelegt wird. Auf diese Weise können bis zu 4 Mikrotiterplatten (96-er Format) vollautomatisch beschickt werden.

### 2.3.15 Enzymatische Proteinspaltung und Peptidaufarbeitung

#### 2.3.15.1 Tryptische in-Gel Spaltung

Standardmäßig wurde eine tryptische In-Gel Proteinspaltung aus Silbergelen nach IEF-SDS Auftrennung durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die Silberspots über eine Oxidation von  $\text{Ag}^0$  nach  $\text{Ag}^+$  entfärbt. Hierbei wurden 30  $\mu\text{l}$  eines 1:1 Gemisch aus 30 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) und 100 mM Natriumthiosulfat zu den Silberspots gegeben und unter Schütteln solange inkubiert, bis visuell keine Färbung mehr zu erkennen war. Nach Zentrifugation der Lösung durch die Filtermembran wurden 100  $\mu\text{l}$  Wasser zugegeben, zentrifugiert und zweimal für 5 min in 100  $\mu\text{l}$  MilliQ gewaschen (Gharahdaghi *et al.*, 1999).

In einem modifizierten Verdauprotokoll nach Shevchenko (Shevchenko *et al.*, 1996) wurden dann abwechselnd für jeweils 10 min 50% Acetonitril, 50 mM Ammoniumbicarbonat, 50% Acetonitril, 50 mM Ammoniumbicarbonat zugegeben (Volumina bei allen Schritten: 100  $\mu\text{l}$ ). Die Proteine wurden über Nacht (mind. 6 h) bei 37°C in 25  $\mu\text{l}$  Trypsinlösung (20  $\mu\text{g}$  Trypsin gelöst in 20  $\mu\text{l}$  Storage-Puffer, auf 5,2 ml mit 50 mM Ammoniumbicarbonat aufgefüllt) gespalten. Um eine Verdunstung der Lösungen zu verhindern, wurden die Mikrotiterplatten in Saranfolie gewickelt.

Der Überstand wurde nach der Spaltung in eine neue Mikrotiterplatte zentrifugiert, und die Peptide in drei weiteren Schritten mittels MilliQ, 50% Acetonitril und 50% Acetonitril, 0,1% TFA eluiert (jeweils 50  $\mu\text{l}$  für 20 min unter Schütteln). Die vereinigten Eluate wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Peptide wurden anschließend bis zur Salzfreiheit in jeweils 100  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen, eingefroren und erneut getrocknet (zweimal).

Bei eindimensionaler Trennung, bei der die Cysteinreste nicht carbamidomethyliert sind (erfolgt bei zweidimensionaler Auftrennung im Äquilibrierungsschritt) wurde das Protokoll wie folgt modifiziert:

## 2. Material und Methoden

Nach Entfärbung der Gelbanden wurde je zweimal im Wechsel mit 50% Acetonitril, 50 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen, anschließend fand eine 30 minütige Inkubation bei 56°C in 50 µl 10 mM DTT, 50 mM Ammoniumbicarbonat statt. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurden die Proteine für 45 min im Dunkeln in 50 µl 55 mM Iodacetamid, 50 mM Ammoniumbicarbonat inkubiert. Anschließend wurde erneut je zweimal im Wechsel mit 50% Acetonitril, 50 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen, bevor dann die Trypsinlösung zugegeben wurde (s.o.). Ferner wurden die Gelstücke vor der DTT-Inkubation und der Trypsinzugabe in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

### 2.3.15.2 Tryptische in-Lösung Spaltung

Bei der tryptischen in-Lösung-Spaltung wurde 1 nmol Protein in 85 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat gelöst. Nach Zugabe von 1 µl 45 mM DTT und Inkubation für 15 min bei 56°C wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und 1 µl 100 mM Iodacetamid zugegeben und erneut für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 13 µl Trypsinlösung (Gewichtsverhältnis Enzym: Protein ist 1:50) wurden zugegeben und die Lösung für 24 h bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde anschließend durch Zugabe von 5 µl 10% TFA inhibiert, die Lösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet.

### 2.3.16 Chemische Proteinspaltung

Eine Purpurmembranfraktion wurde mit 70%-iger Ameisensäure auf eine Konzentration von 1 µg/65 µl verdünnt. Zu 65 µl wurden dann 35 µl Bromcyan-Lösung (100 mg/ml in 70% Ameisensäure) gegeben und über Nacht bei 20°C geschüttelt.

Die Ameisensäure, Bromcyan und entstandene Blausäure wurden im Wasserstrahlvakuum durch eine 2 M KOH Lösung abgezogen, da so die Blausäure als Kaliumcyanid gebunden wird.

## 2.4 Massenspektrometrische Methoden

### 2.4.1 Prinzip der Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)

Die massenspektrometrische Methode MALDI-TOF ermöglicht eine große Zahl von Proteinen innerhalb kurzer Zeit zu identifizieren. Peptide, die entweder aus der Proteinspaltung mittels spezifischer Endopeptidasen oder einer chemischen Spaltung erhalten wurden, werden dazu gemeinsam mit einer Matrix, die aus kleinen, das Laserlicht absorbierenden organischen Molekülen (üblicherweise  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure oder 2,5-Dihydroxy-Benzoessäure), kokristallisiert und auf einem Stahltarget dem Spektrometer zugeführt. Durch Photonenbeschuss kommt es zur Übertragung der Lichtenergie von den Matrixmolekülen auf die Peptide der Probe, die daraufhin in einem Schritt ionisiert und aus dem Kokristalliat desorbiert werden. Nach kurzer Beschleunigung in einem elektrischen Feld wird die Zeit gemessen, die die Ionen zum Durchfliegen einer bestimmten Wegstrecke bis zum Detektor benötigen (Time-of-Flight, TOF). Durch Vergleich mit einem bekannten Standardpeptidgemisch kann die Flugzeit mit der Masse der Ionen korreliert werden. Das erhaltene Massenspektrum stellt den sogenannten „Peptide Fingerprint“ dar, einen Satz von Peptidmassen, die im Idealfall einem einzigen Protein entstammen und somit den Rückschluss auf seine Identität erlauben. Zu diesem Zweck wird *in silico* eine Proteindatenbank, die zuvor aus dem sequenzierten Genom abgeleitet wurde, in Peptide gespalten und die resultierenden Peptidmassen mit den gemessenen verglichen. Das Ergebnis ist für jede analysierte Probe eine Rangliste, die gestaffelt nach Wahrscheinlichkeit die möglichen Identitäten des Proteins angibt. Bei optimaler Probenpräparation wird ein Protein erhalten, das so weit von den folgenden abgesetzt ist, dass es mit großer Sicherheit als identifiziert gewertet werden kann.

Der große Vorteil der Methode liegt in der verhältnismäßig einfachen Automatisierbarkeit. Mittels eines Pipettierroboters kann ein Stahltarget mit 384 Proben in etwa 3 h Stunden präpariert werden, die anschließend über Nacht vom Spektrometer vermessen werden (Jensen *et al.*, 1997, Gobom *et al.*, 2000). Die anschließende Annotation der Spektren und die Datenbankrecherche zur statistischen Auswertung läuft ebenfalls vollautomatisch (Perkins *et al.*, 1999).

### 2.4.2 Matrixpräparationen

Bei denen in dieser Arbeit verwendeten Matrixpräparationen handelte sich um Kombinationen von eingesetzter Matrix ( $\alpha$ -Cyano-2-Hydroxy-Zimtsäure oder 2,5-

## 2. Material und Methoden

Dihydroxybenzoesäure), angewandter Auftragsmethode (DriedDroplet oder Dünnschicht) und benutztem Target (Stahltarget oder Ankertarget).

### 2.4.2.1 Dried-Droplet HCCA

7,5 mg  $\alpha$ -Cyano-2-Hydroxy-Zimtsäure (HCCA) wurden für 5 min im Ultraschallbad in 1 ml 40% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) gelöst, Nichtgelöstes dann durch Zentrifugation für 2 min bei 12 krpm entfernen, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmal für 2 min bei 12 krpm zentrifugiert. Der finale Überstand wurde in Spezialgefäße für den Pipettierroboter überführt.

Die Proben in der 96-Mikrotiter-Platte wurden in je 10  $\mu$ l 33% ACN, 0,1% TFA-Lösung im Ultraschallbad für 30 sec gelöst und anschließend erneut zentrifugiert.

9  $\mu$ l der Peptid- Standardlösungen wurden mit 36  $\mu$ l 33% ACN, 0,1% TFA-Lösung verdünnt und in Spezialgefäße für den Pipettierroboter überführt.

Matrixlösung, Standardlösung und Mikrotiterplatte wurden anschließend mit einer Aluminiumfolie verschlossen.

0,5  $\mu$ l Probe (oder Standardlösung) wurden dann mit 0,5  $\mu$ l Matrixlösung gemischt und auf das Target pipettiert. Bei manueller Präparation wurde das Mischen in einem Reaktionsgefäß durchgeführt, bei automatischer Präparation wurden Matrix und Probe auf dem Target gemischt (Methode MAPControl, Präparation DriedDroplet (DD)).

### 2.4.2.2 Dried-Droplet DHB/MHB

900  $\mu$ l einer 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Lösung (20 mg/ml DHB in 20% ACN, 0,1% TFA) wurden mit 100  $\mu$ l einer 2-Hydroxy-5-Methoxy-Benzoesäure-Lösung (20 mg/ml MHB in 20% ACN, 0,1 % TFA gelöst, nichtgelöste Bestandteile nach Zentrifugation für 2 min bei 12 krpm vom Überstand getrennt) gemischt.

Proben- und Standardpräparation erfolgten dann analog der HCCA-Präparation, jedoch erfolgte der Targetauftrag manuell.

### 2.4.2.3 Dünnschicht HCCA

8 mg HCCA wurden in 1 ml 99% Aceton, 0,2% TFA gelöst. Mittels Kapillarkräften wurde die Lösung in Eppendorf GelLoader Tips hochgezogen und durch kurze Berührung mit dem Ankertarget auf die entsprechenden Positionen überführt. Durch den hohen Anteil an Aceton trocknet die HCCA-Lösung sehr schnell ein, wobei sich ein dünner Kristallrasen bildet (Dünnschicht). Anschließend wurden 2  $\mu$ l Probe (in 0,2% TFA gelöst) auf die Dünnschicht pipettiert, aber nicht eintrocknen gelassen. Bei diesem Schritt adsorbieren die Peptide stärker

an die Matrix als z.B. Salze. Die Lösung wurden nach ungefähr 3 Minuten abgezogen. Salze, die dennoch an die Matrix gebunden adsorbiert wurden, konnten weiter entfernt werden, indem erneut 2 µl Wasser auf die Probe pipettiert wurden und nach 3 Minuten abgezogen wurden (Gobom *et al.*, 2001).

#### 2.4.2.4 Dünnschicht DHB/Nitrocellulose

1 ml einer HCCA-Lösung (12 mg/ml in Aceton) wurden mit 200 µl einer Nitrocellulose-Lösung (20 mg/ml in Aceton) vermischt und mittels eines GelLoader Tips analog 2.4.2.3 auf ein 600-er Ankertarget überführt. Der Probenauftrag erfolgte ebenfalls nach den Bedingungen aus dem vorherigen Abschnitt 2.4.2.3, jedoch wurde zusätzlich zweimal mit Wasser gewaschen.

#### 2.4.2.5 Targetbehandlung

Das Stahltarget wurde kurz mit Methanol gewaschen, dann für 15 Minuten in Wasser im Ultraschallbad inkubiert und anschließend trocknen gelassen. In einem zweiten Spülschritt wurde dann mit Isopropanol gespült und das Target dann für weitere 15 Minuten in Isopropanol im Ultraschallbad inkubiert. Nach dem Abspülen wurde es dann entweder für 2 h bei 100°C oder über Nacht trocknen gelassen.

Das Ankertarget wurde mit Aceton vorsichtig abgewischt, dann für 10 Minuten in 50% Methanol im Ultraschallbad inkubiert. Nachfolgend wurde das Target zuerst mit 50% Methanol und zuletzt mit Wasser abgespült, um dann über Nacht zum Trocknen aufgestellt zu werden.

#### 2.4.3 Probenentsalzung

Salze sind bei den verschiedenen massenspektrometrischen Analysen ein gravierender Störfaktor. Neben der bei MALDI- und ESI-Messungen auftretenden Ionensuppression stören sie zudem die Kokristallisation von Matrix und Peptiden (MALDI). Bei der Probenvorbereitung für die MALDI-Messung wurde teilweise die ZipTip-Methode benutzt, bei den ESI-Messungen auf der Q-TOF die Poros-Säulchen.

##### 2.4.3.1 Probenentsalzung mittels ZipTip

Ein ZipTip-C<sub>18</sub>-Säulchen (Millipore) wurde auf eine 10 µl Pipette aufgesteckt und mittels Durchfluss (auf- und ab pipettieren) von 2 x 10 µl 50% ACN benetzt. Die anschließende Äquilibrierung erfolgte durch Durchfluss von 2 x 10 µl 0,1% TFA. Die Peptidanbindung an das C<sub>18</sub>-Material erfolgte mit 5-maligen Durchfluss der Probe (in 10 µl 0,1% TFA vorliegend),

## 2. Material und Methoden

deren nachfolgende Entsalzung durch 2 x 10 µl 0,1% TFA. Die salzfreien Peptide wurden dann durch 5-maligen Durchfluss von 50% ACN, 0,1% TFA in ein neues Reaktionsgefäß eluiert.

Im Falle der automatischen Präparation wurde dies an eine DriedDroplet HCCA-Methode gekoppelt, die Elution fand hier durch eine 5 mg/ml HCCA-Lösung in 50% Aceton statt.

### 2.4.3.2 Probenentsalzung in Poros-Säulchen

Eine Suspension aus C<sub>18</sub>-Poros Material in Isopropanol wurde in eine am Ende zusammengedrückte Eppendorf-GelLoader Pipettenspitze pipettiert. Mittels eines leichten Überdruckes wurde das Poros-Material in das Ende der GelLoader-Spitze gedrückt, so dass ein etwa 8 mm hohes Gelbett entstand. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 5 µl Isopropanol gewaschen.

Nach der Konditionierung der Säulchen (analog der ZipTip Konditionierung, vgl. 2.4.3.1) wurde die eingetrocknete Peptid-Probe in 5 µl 1% Ameisensäure resuspendiert und auf die Säule aufgetragen. Nach zweimaligem Waschen mit 1% Ameisensäure wurden die entsalzten Peptide mit 66% Acetonitril, 1% Ameisensäure eluiert und erneut eingetrocknet.

### 2.4.4 Fingerprint-Messung

#### 2.4.4.1 Peptid-Standard

Als Peptid-Standardlösung wurde ein Gemisch aus folgenden Peptiden (Konzentration jeweils bei 100 pmol/µl) hergestellt:

Bradykinin Fragment 1-7 (757,3998 g/mol), Angiotensin 2 Acetat Human (1046,542 g/mol), Angiotensin 1Acetat Human (1296,6853 g/mol), Substance P (1347,7361 g/mol), Bombesin (1619,823 g/mol), ACTH (1-17) (2093,0868 g/mol), ACTH (18-39) (2465,199 g/mol), Somatostatin 28 (3147,4714 g/mol), Insulin Chain B Oxidized f. Bovine (3494,651 g/mol).

Die Peptid-Standardlösung wurde in 3 µl Aliquots bei -20°C eingefroren.

Für die automatische Messung wurden 3 µl mit 12 µl 33 % Acetonitril verdünnt und 0,5 µl (bei der Dried-Droplet Methode auf einem Stahltarget) mit 0,5 µl Matrix vermischt und aufgetragen.

Um Abweichungen der Messung bei dieser externen Kalibrierung möglichst gering zu halten, wurden jeweils 8 Proben um diesen Standard pipettiert.



#### 2.4.4.2 Messparameter MALDI-Fingerprint

MALDI-Fingerprint Spektren wurden fast ausschließlich aus einer HCCA-DriedDroplet Methode auf einem Stahltarget aufgenommen, wobei Messung und Annotation der Spektren vollautomatisch erfolgte.

Wichtige Parametereinstellung der Messung waren die Einschaltung der Fuzzy control, die anfängliche Abschwächung des Lasers war 85% und die minimale Abschwächung 60%. Für ein Einzelspektrum wurden 200 „Schüsse“ summiert, gleichzeitig betrug die maximale Schuss-Summe auf einer Position 20. Die Detektorspannung lag bei einem neuen Detektor bei 1600 V und wurde nach 1,5 Jahren auf 1800 V erhöht.

#### 2.4.5 Post-Source Decay-Messung (PSD-MALDI)

Die Gewinnung von Sequenzinformation über MALDI ist durch PSD-Messungen möglich. Im Gegensatz zu einer prompten Fragmentierung, die direkt in der Quelle unmittelbar beim Ionisierungsprozess stattfindet, handelt es sich bei der metastabilen Fragmentierung um einen Zerfall in der feldfreien Driftstrecke nach dem Passieren der Beschleunigungsstrecke.

Die entstandenen PSD-Ionen, die alle mit der gleichen Geschwindigkeit fliegen, können mittels eines Reflektors aufgrund ihrer unterschiedlichen kinetischen Energie ( $E_{\text{kin}}=1/2 mv^2$ ) und damit Eindringtiefe in das Reflektorfeld getrennt werden. Da die PSD-Ionen über ein breites Energiespektrum verfügen, ist der Einsatz einer variablen Reflektorspannung für ihre Abbildung auf den Detektor nötig. Für ein vollständiges Fragmentierungsmuster werden die bei stufenweise geänderter Spannung aufgenommenen Teilspektren rechnerisch kombiniert. Aus einem Peptidgemisch können mittels einer Ablenkelektrode durch zeitlich begrenztes Anlegen einer Spannung nur Ionen eines sehr engen  $m/z$ -Bereiches durchgelassen werden (Eckerskorn, 1998).

Für die PSD-Messung wurde als Präparationsmethode die DHB/Nitrocellulose-Dünnschicht auf einem Ankertarget benutzt (vgl. Abschnitt 2.4.2.4). Die Messung wurde vollautomatisch auf der Reflex III (Bruker Daltonics) durchgeführt, wobei eine Peakbegrenzung von 25 Dalton gewählt wurde und insgesamt 11 Einzelspektren zu einem PSD-Fragmentspektrum zusammengesetzt wurden.

Die Parametereinstellungen waren denen der Fingerprint-Messung ähnlich, jedoch wurde die Fuzzy control ausgeschaltet, die anfängliche Abschwächung des Lasers war 70%, die minimale Abschwächung 65% und für ein Einzelspektrum wurden 400 Schüsse summiert. Die Annotation der Peaks erfolgte manuell.

### 2.4.6 LC-MS/MS-Messungen (Q-TOF)

Bei der LC-MS/MS-Messung handelt es sich um ein kombiniertes Online-Verfahren, bei dem Peptide chromatographisch aufgetrennt werden und das Eluat direkt massenspektrometrisch vermessen wird. Hierbei wird neben den MS-Spektren zusätzlich nach definierten Auswahlkriterien von bestimmten Peaks eine Fragmentierung vorgenommen, die dann MS/MS-Daten des Peptides generiert.

Die Ionisierung der Peptide erfolgt bei der ESI-Methode (Elektrospray-Ionisation) mittels Nano-Elektrospray durch eine goldüberzogene Glaskapillare mit einer sehr geringen Flussrate. Die genauen Vorgänge bei der Elektrospray-Ionisation sind bis heute umstritten. Nach dem gängigen Modell entstehen durch das Versprühen im elektrischen Feld geladene Mikrotröpfchen, deren Oberfläche mit positiven Ladungen angereichert ist. Diese Tröpfchen zerfallen aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels und damit steigender Abstoßung gleicher Ladungen in viele kleine Tröpfchen von wenigen Nanometer Durchmesser (Coulomb-Explosion). Es verbleiben zuletzt vom Lösungsmittel befreite, „nackte“ Analytionen.

Diese werden durch gestaffelt angeordnete elektromagnetische Linsen und Hexapole beschleunigt und fokussiert, so dass sie stark fokussiert in den ersten Quadrupol (Q1) eintreten. Im standardmäßig durchgeführten MS-Scan (sogenannter Survey-Scan) ist Q1 auf Durchgang geschaltet. Entspricht ein Massensignal den Anforderungen für eine Fragmentierung (Intensity Threshold) wird Q1 als Massenfilter zur Auswahl des Vorläuferions verwendet. Anders als im MALDI-PSD Experiment ist dies mit einer hohen Präzision möglich ( $\pm 1\text{Da}$ ).

Als nächstes treten die Ionen in einen weiteren Quadrupol (Q2), die Kollisionszelle, ein. Gegenüber dem Hochvakuum im restlichen Teil des Spektrometers sorgt hier vorhandenes Helium-Gas für die Möglichkeit der Fragmentierung. Während im Survey-Scan die Ionen diesen Bereich sehr langsam durchfliegen, erfolgt im MS/MS-Scan eine starke Beschleunigung der ausgewählten Vorläuferionen, wodurch eine effektive Fragmentierung durch harte Stöße mit den Helium-Molekülen hervorgerufen wird.

Die Analyse der Ionen, im Survey-Scan die gesamte Probe, im MS/MS-Scan die Fragmente, ermöglicht der abschließende TOF-Analysator. Aus dem kontinuierlichen Ionenstrom werden auf elektromagnetischem Weg „Ionenpakete“ orthogonal herausgepulst und ihre Masse durch Flugzeitmessung mit einem Reflektor (analog 2.4.5) bestimmt (Eckerskorn, 1998).

Das erhaltene Peptidgemisch aus dem tryptischen Verdau wurde über Poros-Säulchen entsalzt (vgl. Abschnitt 2.4.3.1) und entweder in 5  $\mu\text{l}$  0,1% Ameisensäure (1-D-SDS-Proben) oder in

5% Ameisensäure (IPG-Proben) resuspendiert. Das Gemisch wurde dann mittels eines Auto-Samplers auf die Vorsäule der CapLC (Waters) geladen, mittels einer Säulenschaltung konzentriert und bei einem Fluss von 200 nl/min auf einer Nano-RP-Säule (selbst gepackt, Materialien vgl. unten) analysiert. Die Elution erfolgte über einen Acetonitrilgradienten (1-D) bzw. einen Methanolgradienten (IPG).

#### Acetonitrilgradient

Zeit [min]	Prozentualität A [%]
0,01	100
20	100
25	90
100	60
110	50
120	0
125	0
135	100
145	0
155	100
175	100

#### Methanolgradient

Zeit [min]	Prozentualität A [%]
0,01	100
20	100
25	85
95	50
120	0
125	100
130	0
135	100
150	100

Die Gradientenkonzentrationen betragen bei diesen Versuchen:

A: 1%Acetonitril, 0,1% Ameisensäure      bzw.    2% Methanol, 5% Ameisensäure

B: 80% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure      bzw.    90% Methanol, 5% Ameisensäure

Die Dimensionen der Vorsäule waren eine Länge von 2,5 cm und einem Innendurchmesser von 300 µm, die Dimensionen der analytischen Säule 15 cm Länge und 75 µm Innendurchmesser.

Bei den 1-D-SDS-Proben bestand die Vor- und Hauptsäule aus einem C<sub>18</sub>-Material (Reprosil 120 ODS-3), bei den IPG-Proben aus einem C<sub>4</sub>-Material (Reprosil 300).

#### 2.4.7 Auswertung der Massenspektren

Die Auswertung der MALDI-Fingerprint-Spektren erfolgte in einem ersten Schritt vollautomatisch. Über das Programm Xmas (Version 5.1.7, Bruker Daltonics) wurde die Annotation der Spektren vorgenommen. Eine daraus resultierende Peakliste stellt die Grundlage der Recherche dar, die über die Oberfläche BioTools (Bruker Daltonics) auf einem Mascot-Server (Matrix Science) erfolgte.

Die statistische Zuordnung der Peaks zu einem Protein ist in Abschnitt 2.6.1 näher erklärt, die darauffolgende Validierung in Abschnitt 2.6.2.

Bei Spektren, die keine ausreichend eindeutige Proteinidentifizierung lieferte, erfolgte eine manuelle Nachbearbeitung. Dies konnte entweder auf der Ebene der Annotation (nicht erkannte Peaks, falsch zugeordnete monoisotopische Masse) oder auf der Ebene des Intensitätsvergleiches erfolgen.

## **2.5 Elektronenmikroskopische Methoden**

### **2.5.1 Herstellung von beschichteten Kupferplättchen**

Die Absorption von Biomolekülen an eine Matrix findet aufgrund hydrophiler Wechselwirkungen mit dieser statt. Die Matrix, welche entweder aus einem Kunststoff-Film (Formvar) oder einer Graphitschicht bestand, wurde in beiden Fällen auf ein Kupfernetzchen (Grid) aufgetragen.

#### **2.5.1.1 Formvar beschichtete Kupferplättchen**

Formvarlösung in 1,2-Dichlorethan wurde unter dem Abzug in ein hohes 50 ml Becherglas gefüllt und ein Objektträger kurz in die Lösung eingetaucht. Der so mit Formvar beschichtete Objektträger wurde bei RT getrocknet, die Kanten mit einem Skalpell angekratzt und die ungefähr 30 nm dicke Formvarschicht durch Eintauchen des Glases in ein zweites Becherglas (gefüllt mit Wasser) abgelöst. Auf den (auf der Oberfläche schwimmenden) Film wurden dann Kupfernetzchen (400 Maschen) gelegt, so dass die raue Seite den Kontakt zum Film hatte. Film und Plättchen wurden anschließend mit einem Filterpapier von oben aus dem Glas herausgenommen und getrocknet.

#### **2.5.1.2 Graphit beschichtete Kupferplättchen**

Für die Beschichtung der Kupfernetzchen mit einem Kohlefilm wurde dieser zuerst auf eine Glimmeroberfläche aufgedampft. Mit einer Elektronenstrahlverdampferkanone wird ein 10 nm dicker Film erzeugt, die Filmdicke wird mit einem Schwingungsquarz bestimmt. Die Parameter während des Verdampfungsprozesses betragen 2400 V Spannung und 90 mA Stromstärke. Der entstandene Film wurde in bidestilliertem Wasser abflotiert, auf die darunter liegenden Kupfernetzchen transferiert und anschließend auf Filterpapier getrocknet.

Da dieser Graphitfilm hydrophobe Eigenschaften besitzt, wurden die Kupfernetzchen kurz vor dem Probenauftrag für eine Minute in einem PlasmaCleaner im Vakuum hydrophilisiert.

### **2.5.2 Probenauftrag, Fixierung und negative Färbung**

6 µl Probenlösungen wurden auf das beschichtete Kupfernetzchen pipettiert und nach 1,5 min mit einem Filterpapier abgezogen. Die Fixierlösung (0,4% Glutaraldehyd in Probenpuffer) wurde aufpipettiert und erneut nach 1,5 min mit einem Filterpapier abgezogen. Anschließend wurde das Kupfernetzchen zur Entfernung von Salzen dreimal für 15 sec mit 6 µl Wasser gewaschen, bevor 6 µl einer 2%-igen Uranylacetatlösung in Wasser zugegeben wurde. Diese

wurde ebenfalls nach 1,5 min vollständig abgezogen und das Kupfernetzchen auf Filterpapier bei RT trocknen gelassen.

### 2.5.3 Kohle-Platin Beschattung

Einen dreidimensionalen Eindruck von Makrostrukturen kann man mittels der Beschattung gewinnen. Dabei wird ein Film unter einem flachen Winkel auf die Probe bedampft, so dass aufgrund der Höhe der Struktur ein Schatten aus nicht bedampfter Fläche entsteht.

Die Bedampfung erfolgte analog der Bedampfung der Kupfernetzchen, wobei der Kohle/Platin Film mit einem Winkel von  $25^\circ$  erzeugt wurde. Die Spannung betrug 160 V, die Stromstärke 70 mA. Dieser Film wurde nachfolgend mittels eines 20-50 nm dicken Kohlefilms stabilisiert.

### 2.5.4 Messung

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Transmissions-Elektronenmikroskops (Philips CM12) gemacht. Die Spannung in dem benutzten Lantan-Hexaborid Filament betrug 120kV.

Die Dokumentation erfolgte über eine Photometrix CCD-Kamera mit einer Pixelgröße von 24  $\mu\text{m}$ . Die jeweiligen Vergrößerungen sind mit den Abbildungen im Ergebnisteil angegeben.

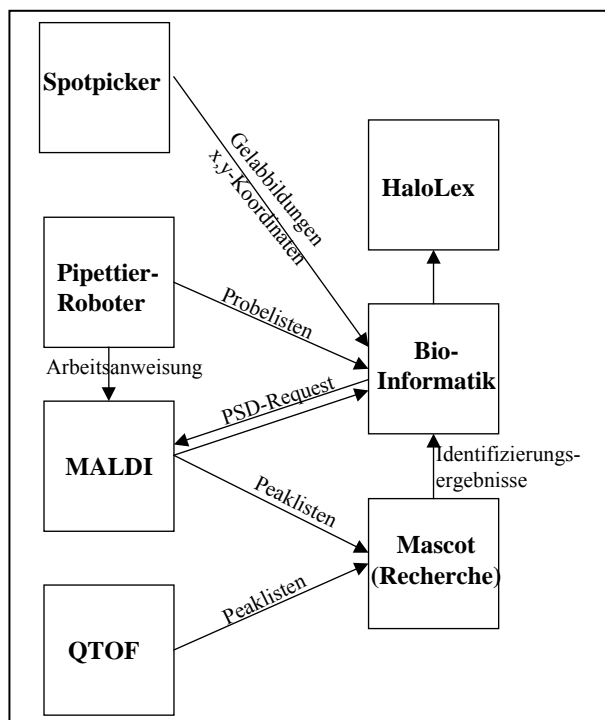
## 2.6 Bioinformatische Methoden

### 2.6.1 Datenfluss

Zur Speicherung und sinnvollen Vernetzung aller den Organismus *H. salinarum* betreffenden Daten wurde von Dr. Friedhelm Pfeiffer und Mitarbeiter (Bioinformatik-Arbeitsgruppe der Abteilung Membranbiochemie, MPI Martinsried) das Datenbanksystem HaloLex erstellt.

Das auf einem Großrechner des Rechenzentrums Garching der Max-Planck-Gesellschaft angesiedelte System erlaubt dem Benutzer Web-basierten Zugriff auf alle abgelegten Daten. Der Umfang der Auswertungswerkzeuge wird laufend erweitert und den Bedürfnissen der Experimentatoren ständig angepaßt.

Im Zeitraum der Erstellung dieser Arbeit war es vordringliches Ziel, Proteomdaten in das System einzubeziehen und mit den bereits vorhandenen Genomdaten zu vernetzen. Proteomdaten im hier behandelten Sinne sind die Vorgeschichte der Probe, Abbildungen der erhaltenen Gelmuster, die Koordinaten der ausgeschnittenen Spots, die Peaklisten der folgenden Massenspektrometrie und letztlich die Ergebnisse der Identifizierungsrecherchen. Den Fluß der Daten zeigt schematisch Abbildung 2.3.



**Abb. 2.3:** Übersicht über den Datenfluss bei der Proteomanalyse. Die Daten aus verschiedenen Experimentschritten werden über die Bioinformatik zusammengeführt.

Den ersten Schritt bildet der Spotpicker, welcher über den angeschlossenen Scanner eine digitalisierte Gelabbildung generiert. Neben der Gelabbildung erzeugt der Spotpicker beim Ausschneiden der selektierten Spots x- und y-Koordinaten, welche in einer Excel-Tabelle verwaltet werden. Diese ist wiederum der bioinformatischen Verarbeitung zugänglich, die somit auf Koordinatenebene die ausgeschnittenen Spots verwalten kann. Die tryptisch gespaltenen Proteine werden auf einem Pipettierroboter mit der für die MALDI-Messung benötigten Matrix auf das Target pipettiert, wobei auch hier ein Excel-Programm zur Steuerung des Roboters

benutzt wird. Diese Tabelle enthält neben den Pipettieranweisungen auch die Parameter zur Messung der Proben, welche in einem zweiten Schritt dem Steuerungscomputer des Massenspektrometers überliefert werden. Während die Rohdaten der Messung auf dem

Rechner des MALDI-Computers verbleiben, wird auf einem Auswerterechner mittels des vom Pipettierroboter generiertem Exel-Files die anschließende Recherche durchgeführt. Hierbei wird das Program Mascot benutzt, welches auf eine interne Datenbank aller vorhergesagten Open-Reading-Frames von *H. salinarum* im FASTA-Format zugreift. Die recherchierten Daten werden mittels eines Scoring-Algorithmus sortiert und nach einer Umwandlung in ein btr-Format wiederum der bioinformatischen Analyse zugänglich gemacht. Diese Daten werden über die im Abschnitt 2.6.3 erläuterte Prozessierung validiert. Proben von besonderem Interesse (z.B. mögliche post-translationale Modifikationen) werden aufgrund einer bioinformatischen Recherche erkannt und können, während sich das Target noch im Massenspektrometer befindet, nachgemessen werden.

Diese Nachmessung kann auch mittels PSD durchgeführt werden, so dass eine direkte Sequenzinformation des entsprechenden Peaks erhalten würde (PSD-Request).

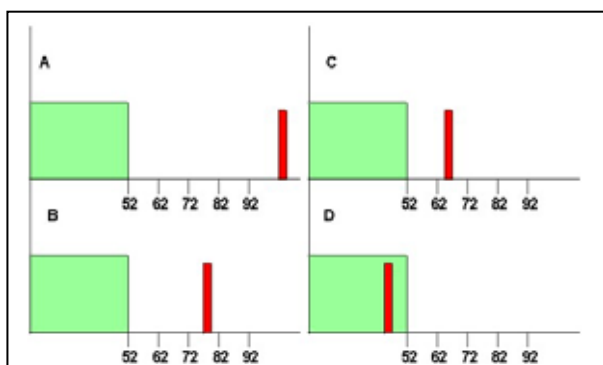
Ein ähnlicher Verlauf findet auch bei den Q-TOF Messungen statt, jedoch kann hier nicht auf ein Exel-File zurückgegriffen werden, sondern die Informationen zur Probe werden manuell im Rahmen der Recherche eingeführt.

Weiterhin sind alle die Probe und den Probenablauf betreffenden Parameter in einem Gelverzeichnis (Exel) zusammengefasst. Dies bedeutet, dass in der Oberfläche HaloLex neben den digitalen Daten auch alle Informationen, die zu ihrer Entstehung führten, enthalten sind.

### 2.6.2 Validierung massenspektrometrischer Ergebnisse

Für die Protein-Identifizierung wurden die von Mascot generierten Scores als Grundlage verwendet, um feinere Kriterien zur Validierung anzulegen. Dies wurde im Zusammenarbeit mit der Bioinformatikgruppe von Dr. F. Pfeiffer entwickelt (Abbildung 2.4).

Ein Protein gilt demnach erst als „trusted“ identifiziert, wenn der Mascot Score größer als 92 ist. Diese Schwelle liegt 40 Punkte über dem von Mascot für die *H. salinarum*-Proteindatenbank errechneten Cut-Off (Grenze für zufällige Treffer). Ein als „insecure“ identifiziertes Protein muß einen Score zwischen 72 und 92 aufweisen.



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung der neuen Validierungskriterien. Abb. A zeigt ein als trusted identifiziertes Protein, Abb. B ein als insecure identifiziertes Protein, Abb. C ein als questionable gewertetes Protein nach Kriterium 1 und Abb. D ein unknown Protein.

## 2. Material und Methoden

Proteine bekommen die Bezeichnung „questionable“, wenn eins der folgenden Kriterien zutrifft: (1) der Mascot-Score liegt zwischen 62 und 72, (2) es werden mehr als 4 Peptide des Proteins gefunden oder (3) nur 3 oder weniger Peptide eines Proteins werden nach theoretischer Spaltung nicht gefunden. Dies ist vor allem für kleinere Proteine von Bedeutung, da hier die Anzahl der möglichen Peptide sehr gering ist. In den Fällen (2) und (3) werden auch Proteine berücksichtigt, deren Score unter 52 liegt. Ein Protein wird als unknown bewertet, wenn keines der genannten Kriterien zutrifft. Eine weitere Datenprozessierung findet mit solchen Proteinen nicht statt.

Nach manueller Nachbearbeitung kann ein als „questionable“ bewertetes Protein den Status „believed“ bekommen, wenn weitere Daten wie hohe Intensitäten der zugeordneten Peaks und gute Korrelation zwischen experimentell bestimmtem und theoretisch vorhergesagtem pI-Wert hinzukommen.

### 2.6.3 Vergleich zweidimensionaler Gele

Zum Vergleich zweidimensionaler Gele wurden die Software-Programme PDQuest (BioRad) und ProteomWeaver (Definiens) eingesetzt. Beide Programme arbeiteten vollautomatisch auf der Grundlage von 8-bit tiff-Abbildungen. Die PDQuest Software wurde zur Generierung eines Standard-Gels benutzt, die ProteomWeaver Software zum Vergleich der BAC-Gele.

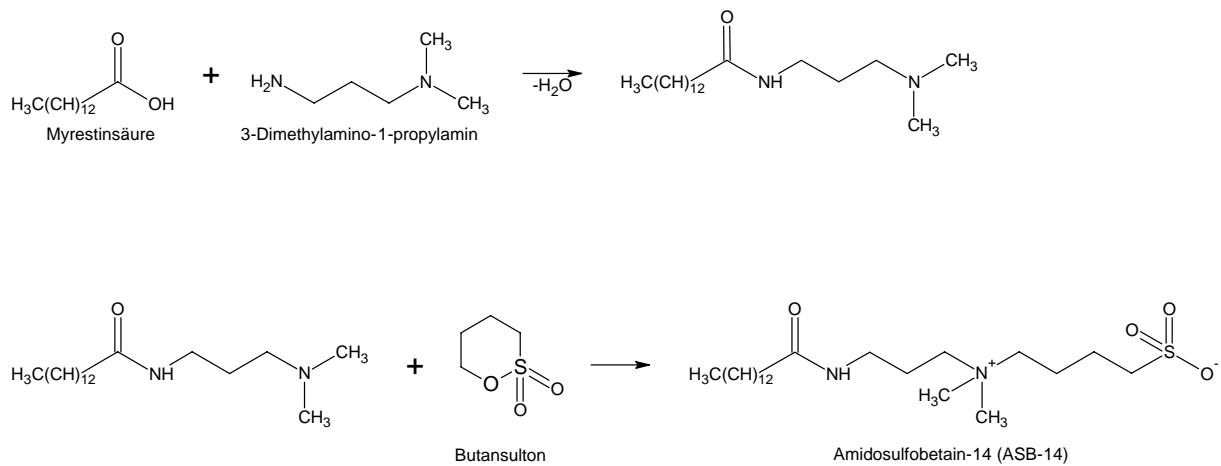
Unterschieden sich die optischen Intensitäten auf beiden Gelen identischer Spots um mehr als den Faktor 3, wurde dies als signifikant bewertet. Bei beiden Programmen musste jedoch aufgrund der Multi-Spot-Problematik eine manuelle Nachannotation erfolgen, da entweder ein Spot als zwei Spots gewertet wurde oder umgekehrt.



## 2.7 Chemische Methoden

### 2.7.1 Detergensynthese

Reaktionsschemata:



Zur Synthese von Amidosulfobetain-14 (ASB-14) wurde das Protokoll von Rabilloud (Rabilloud *et al.*, 1990, Chevallet *et al.*, 1998) benutzt.

100 g Myristinsäure (438 mMol) wurden in 88 ml Toluol gelöst und mit 1,5 fachen molaren Überschuss an 3-Dimethylamino-1-propylamin (67,1 g, 657 mMol) versetzt. Das Gemisch wurde mit einem KPG-Rührer 24 h unter Rückfluss erhitzt, entstandenes Wasser über einen Wasserabscheider abgetrennt. Nachdem das Gemisch abgekühlt war, wurde überschüssiges Amin und Toluol über einen Rotationsverdampfer abgezogen. Das Zwischenprodukt wurde in 700 ml Hexan aufgelöst und über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  umkristallisiert, die Kristalle über einen Büchnertrichter filtriert und im Excicator im Wasserstrahlvakuum getrocknet (Ausbeute: 90%).

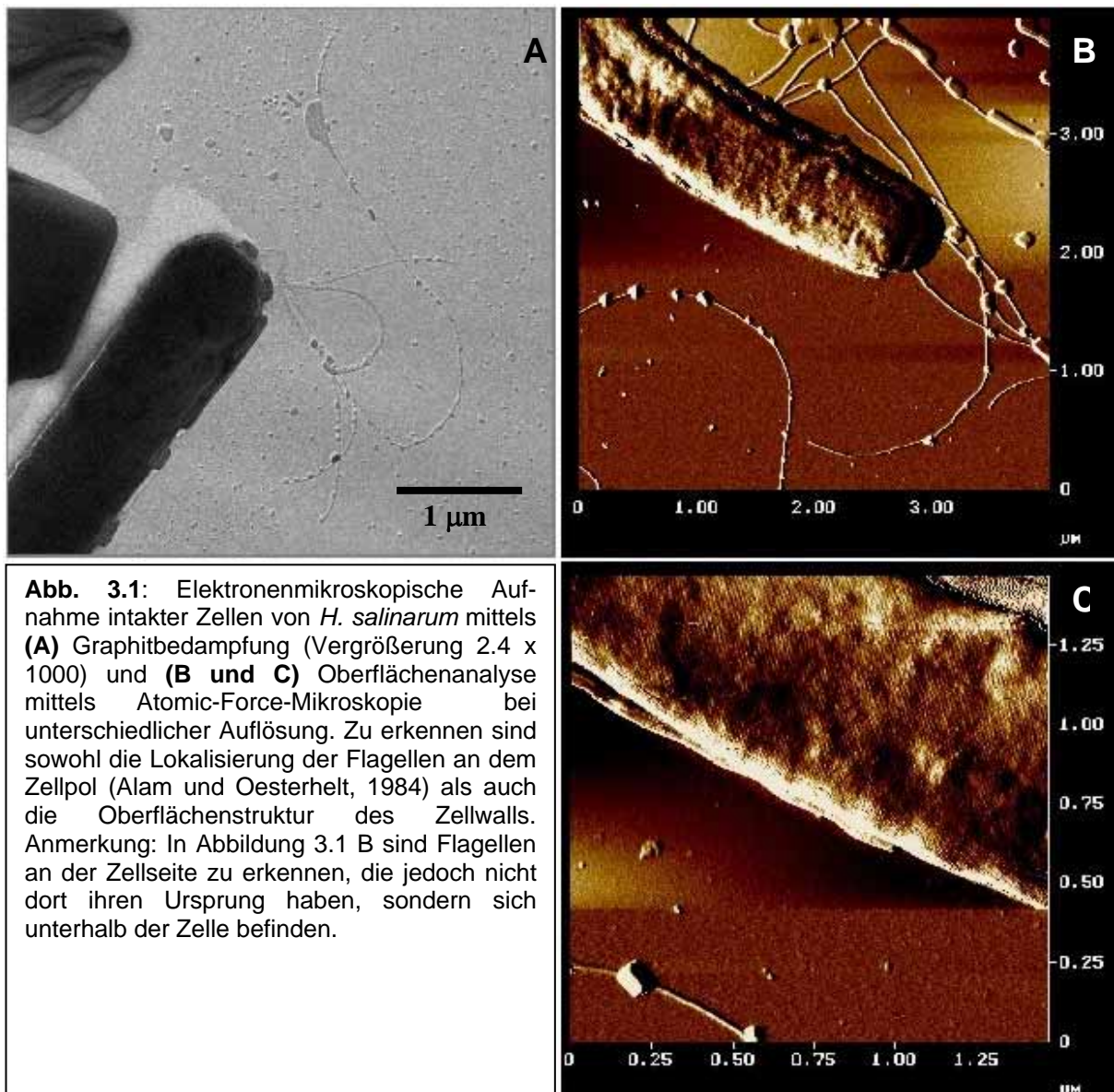
123,68 g (396 mM) des Zwischenproduktes wurden in 500 ml  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (1:1) gelöst und dann im äquimolaren Verhältnis 53,69 g (396 mMol) 1,4-Butansulton über einen Tropftrichter zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nachdem die Lösung anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 250 g Ionenaustauscher (IWT TMD8) zugegeben und 4 h gerührt, um verbliebenes Amin und Hydroxybutylsulfonat abzutrennen. Die Lösung wurde über einen Büchnertrichter abfiltriert und der Ionenaustauscher mit 250 ml 50% Ethanol gewaschen. Vereinigtes Filtrat und Waschlösungen wurden zuerst unter Atmosphärendruck bei  $80^\circ\text{C}$  im Rotationsverdampfer eingengt, anschließend der Rückstand mit gleichem Volumen an 1-Butanol versetzt und unter Vakuum zur Trockene eingedampft (Ausbeute: 80%).

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Flagellarmotor

#### 3.1.1 EM und AFM-Aufnahmen von *H. salinarum*

Zellen von *H. salinarum* können unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden, jedoch reicht dessen Auflösung nicht aus, um nähere Strukturaussagen zu den Flagellen zu treffen. Da über die Zusammensetzung des archaealen Flagellarmotors nichts bekannt ist, sind aber die Flagellen die einzigen Markerstrukturen. Sie erlauben somit bei der Isolierung des Motorkomplexes eine Zuordnung sichtbarer Substrukturen zum Flagellarapparat, als auch durch deren charakteristische Bandenverteilung auf SDS-Gelen (23,5 kD, 26,5 kD und 31,5 kD apparente Molekularmasse, Alam und Oesterhelt, 1984) eine Kontrolle der im Rahmen der Aufarbeitung entstehenden Fraktionen.



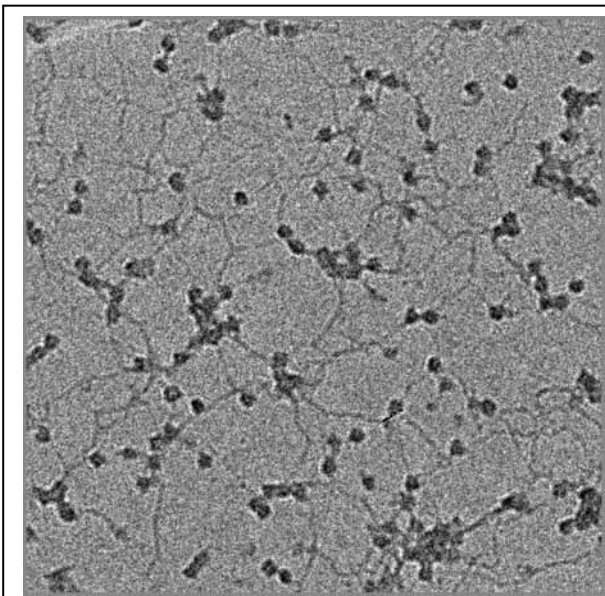
In Abbildung 3.1 A ist deutlich das Flagellarbündel am Polende der stäbchenförmigen Zelle zu sehen, welches in diesem Fall aus 6 Flagellen besteht. Abbildung 3.1 B und 3.1 C zeigen Aufnahmen derselben Zellen, betrachtet mittels AFM. Die hohe Auflösung des Atomkraftmikroskopes lässt auch Aussagen über die Oberflächenstruktur des Zellwalls zu. Dieses liegt als zweidimensionale Gitterstruktur über der Plasmamembran und ist für die Form und Stabilität der Zelle verantwortlich (Mescher und Strominger, 1976). Die zu erkennende hexagonale Struktur gleicht der von *H. volcanii* (Kessel *et al.*, 1988)

Diese Stabilität ist von entscheidender Bedeutung bei der Separierung der Cytosolfraction, da durch Zusatz von 0,0075% Taurodeoxycholat die Zellhülle in seiner Form zwar intakt bleibt, jedoch durch partielle Solubilisierung Löcher in der Membran entstehen, durch die lösliche Proteine in den extrazellulären Raum diffundieren können.

Das über ein Transmembranhelix mit der Membran verankerte Glykoprotein verliert beim Entzug von bivalenten Kationen (mittels EDTA) seine kristalline Anordnung und lässt die Zellen sich deshalb abrunden. Bei einer Verringerung der Salzkonzentrationen auf unter 1 M NaCl dissoziiert es von der Membran ab (Oesterhelt und Stoeckenius, 1974). In den Membranpräparationen unter Niedrigsalzbedingungen (Abschnitt 3.3) konnte es nicht nachgewiesen werden.

### 3.1.2 Isolierung der Polarkappen nach Kupper

Mittels der Vorschrift von Kupper *et al.* (1994) wurden die Polkappen von *H. salinarum* isoliert. Abbildung 3.2 zeigt die erhaltenen Strukturen nach Cytosolentfernung mittels Taurodeoxycholat, 20 min Solubilisierung mit 1% Triton X-100 und resuspendiertem



Niederschlag nach Ultrazentrifugation.

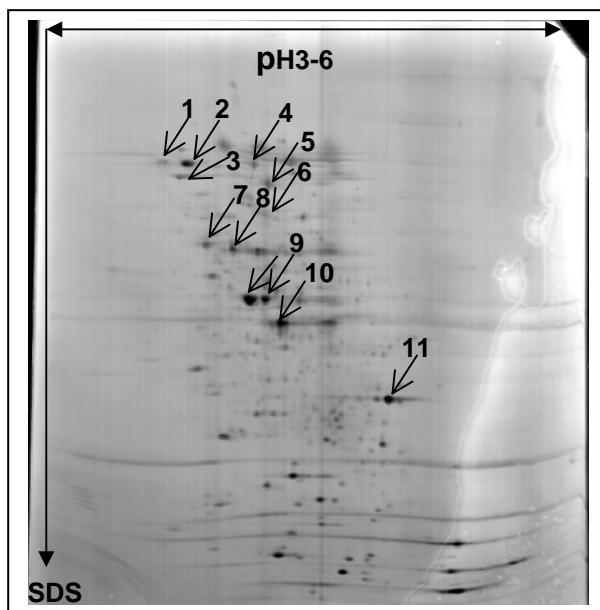
Zu erkennen sind nach negativer Färbung mit Uranylacetat sowohl die Flagellen als auch runde Strukturen von ungefähr 500 nm Durchmesser, die in Form und Größe den beschriebenen Polarkappen entsprechen.

**Abb. 3.2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der Polar-Cap Strukturen nach Färbung mit 2% Uranylacetat. Zu erkennen sind runde Strukturen, an denen sich mehrere Flagellen befinden.

### 3. Ergebnisse

Allgemein ist dieser Schritt der Präparationskontrolle experimentell schwer zu kontrollieren, weil die Strukturen unter Niedrigsalzbedingungen, wie sie beim Färben benutzt werden, dissoziieren und deshalb die EM-Aufnahmen kaum Rückschlüsse auf eine intakte Polarkappenisolierung zulassen.

Ein Teil dieser Fraktion wurde anschließend mittels Acetonfällung präzipitiert und im 2-D Lysepuffer (8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 50 mM DTT, 0,5% Pharmalyte pH 3-10, 2% C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) denaturierend solubilisiert. Mittels anodaler Auftragung in „Sample-Cups“ wurden die Proteine im IEF/SDS-System zweidimensional aufgetrennt. Abb. 3.3 zeigt die Proteine nach Zink/Imidazolfärbung.



**Abb. 3.3:** 2-D Gel der Motorpräparation nach Kupper. Der Niederschlag nach Tx-100 Solubilisierung und Ultrazentrifugation wurde acetongefällt und im pH Bereich 3-6 aufgetrennt, Visualisierung mittels Zn/Im-Färbung.

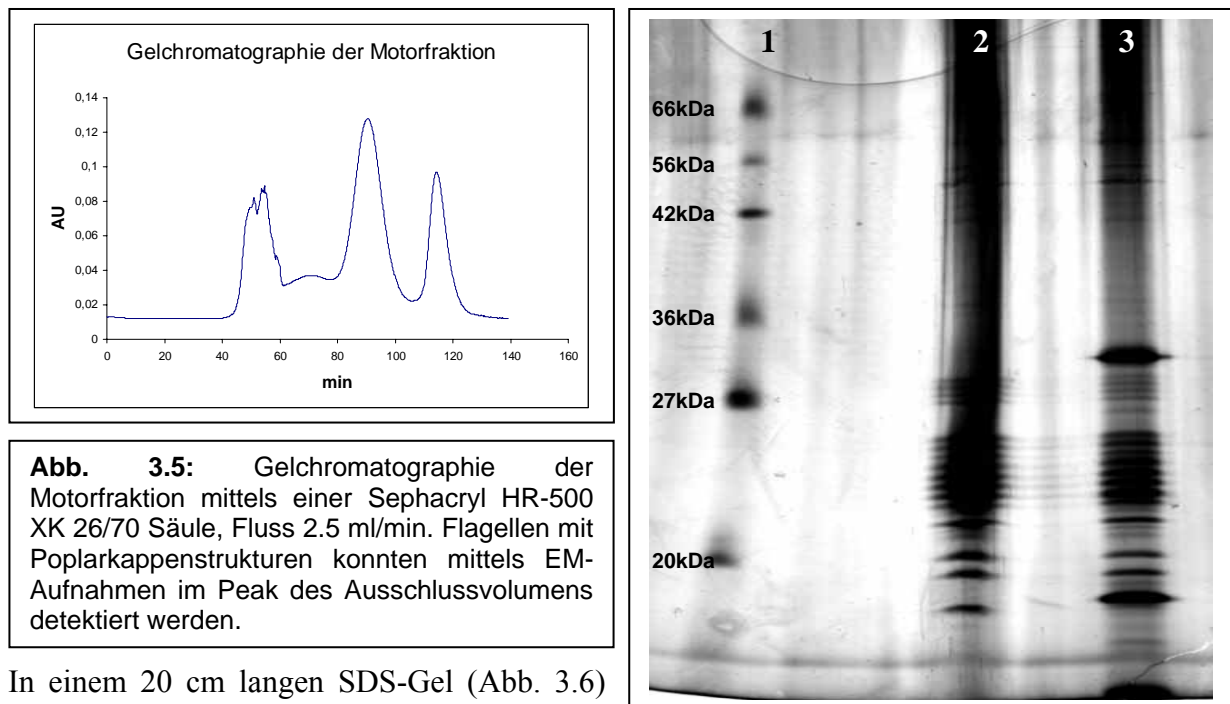
Spot-Nr.	Protein	OE-Name
1	H <sup>+</sup> -transp. ATP-synthase alpha chain	OE3985R
2	thermosome beta chain	OE3925R
3	thermosome alpha chain	OE4122R
4	Malate dehydrogenase (decarboxylating)	OE3308F
5	2-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase alpha chain	OE2623R
6	Cell division protein cdch homolog	OE3122R
7	H <sup>+</sup> -transp. ATP-synthase beta chain	OE3984R
8	Glutamate-ammonia ligase glnA	OE3922R
9	Conserved hypothetical membrane protein	OE1490R
10	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) E1 beta chain	OE4114F
11	Ribosomal protein L4.er	OE3389F

**Abb. 3.4:** Identifizierte Proteine des 2-D Geles aus Abb. 3.3. Proteinflecken mit den höchsten Signalintensitäten sind lösliche Kontaminationen innerhalb der Präparation.

Die Identifizierung von dominanten Spots mittels MALDI-MS zeigte jedoch, dass zahlreiche Proteine entweder aus dem Citrat-Zyklus entstammen, ribosomalen Ursprungs sind oder Untereinheiten der H<sup>+</sup>-ATPase bilden (Abb. 3.4). Dies deutet auf maßgebliche Kontaminationen hin, die eine Identifizierung der unbekanntenen Motorproteine so nicht zulassen würde.

Da der Motorkomplex mit den sich daran befindlichen Flagellen eine signifikant andere Größe haben sollte als andere Komplexe, wurde versucht, diesen durch Gelchromatographie weiter zu reinigen. Abbildung 3.5 zeigt die Auftrennung einer Motorpräparation in einer Sephacryl HR-500 Gelmatrix.

Flagellen mit anhängenden Strukturen waren nach dieser Auftrennung ausschließlich im Ausschlussvolumen der Säule im ersten Peak vorhanden.



**Abb. 3.5:** Gelchromatographie der Motorfraktion mittels einer Sephacryl HR-500 XK 26/70 Säule, Fluss 2.5 ml/min. Flagellen mit Poplarkappenstrukturen konnten mittels EM-Aufnahmen im Peak des Ausschlussvolumens detektiert werden.

**Abb. 3.6:** 1-D SDS Auftrag (12.5% PAA) von Peak 1 aus Abb. 3.5, Spur 1: Marker, Spur 2: Direkt-auftrag, Spur 3: ConA-Aufreinigung.

In einem 20 cm langen SDS-Gel (Abb. 3.6) wurden die vereinigten Fraktionen des ersten Gipfels aufgetragen, und alternativ noch ein weiterer Reinigungsschritt mittels

Concanavalin A durchgeführt. Concanavalin A (in diesem Versuch an Sepharose-Kugeln gebunden) bindet reversibel glykosylierte Proteine, die nach Zugabe von Mannose wieder eluiert werden können.

Spur 2 zeigt das Material nach Konzentrierung über Ultrazentrifugation und direkt auf das Gel aufgetragen, Spur 3 ein Aliquot gleicher Proteinmenge, welches über Concanavalin A weiter gereinigt wurde (Abbildung 3.6). Deutlich sind die aufgelösten Flagelline zu erkennen, welchen den Großteil der zu erkennenden Banden ausmachen. Die dominante Bande bei 30 kDa in Spur 3 entspricht vermutlich nicht vollständig abgetrenntem Concanavalin A, eine Bande an der Gelunterkante kann durch Proteolyseprodukte während der Aufarbeitung erklärt werden. Da kein wesentlicher Unterschied durch die Concanavalin A Behandlung zu erkennen war, wurde mit der aus der Gelchromatographie erhaltenen Fraktion weitergearbeitet.

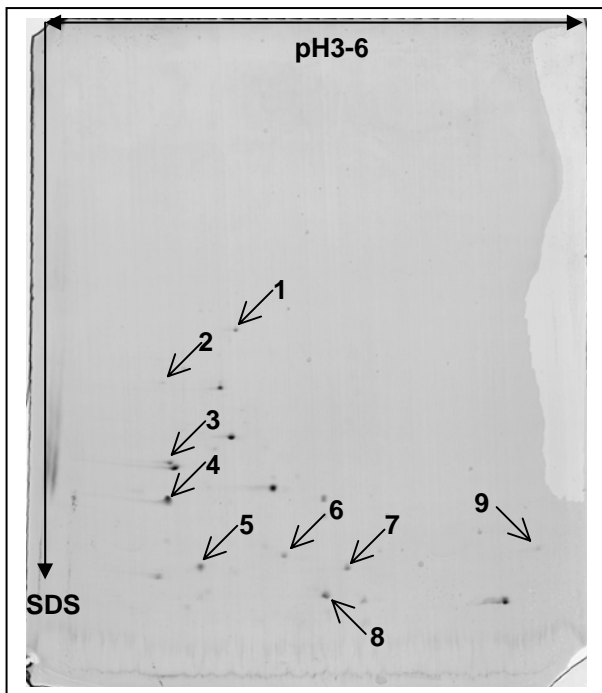
Eine um Faktor 20 im Vergleich zur eingesetzten Menge beim 1-D Auftrag konzentriertere Fraktion wurde acetongefällt und im 2-D Lysepuffer solubilisiert.

Nach Zugabe von 40 mM Essigsäure präzipitierten die Flagelline, die nach anschließender Ultrazentrifugation abgetrennt werden konnten. Diese Abreicherung ermöglichte es, die auf 1-

### 3. Ergebnisse

D Ebene nur schwach zu erkennenden Banden selektiv anzureichern und mit zweidimensionaler IEF/SDS-Elektrophorese zu analysieren (Abb. 3.7)

Hauptsächlich besteht die erhaltene Fraktion aus ribosomalen Proteinen (Abb. 3.8), welche sich auch nach weiteren Abreicherungsversuchen nicht entfernen ließen. Es wurde versucht, die Ribosomen sowohl vor der Gelchromatographie mittels RNase in die kleineren Untereinheiten zu spalten, als auch nach der Gelfiltration über einen Dichtegradienten abzutrennen. Die erhaltenen Proteinmuster waren jedoch bei erneuter zweidimensionaler Auftrennung gleich.



**Abb. 3.7:** 2-D Gel der Polarkappenaufreinigung nach Kupper mit anschließender Gelchromatographie, Visualisierung mittels Coomassie-Färbung.

Spot-Nr.	Protein	OE-Name
1	gas-vesicle protein gvpC2	OE5127F
2	ribosomal protein L1	OE2602R
3	conserved protein	OE1490R
4	ribosomal protein L30	OE3416F
5	ribosomal protein L23	OE3390F
6	ribosomal protein L13	OE2633F
7	ribosomal protein S8	OE3410F
8	ribosomal protein S8	OE3410F
9	ribosomal protein L21.eR	OE2679R

**Abb. 3.8:** Identifizierte Proteine des 2-D Geles aus Abb. 3.7. Die Fraktion ist deutlich mit ribosomalen Proteinen kontaminiert. Einige Proteinflecken konnten trotz hoher Signalintensität nicht mittels MALDI-TOF-Fingerprint identifiziert werden.

Auf dem Gel sind jedoch zusätzlich weitere Proteinflecken zu erkennen, die nicht identifiziert werden konnten. Spätere Untersuchungen zum Membranproteom führten jedoch zu dem Ergebnis, dass Membranproteine nur schwer mittels MALDI-TOF-Fingerprint zu identifizieren sind. Möglicherweise sind bei diesen Versuchen membranständige Komponenten des Flagellarmotors zwar aufgetrennt worden, waren jedoch einer Identifizierung nicht zugänglich. Die Analyse eines 1-D SDS-Auftrages (vgl. Abbildung 3.6) mittels LC/MS/MS führte neben den Flagellinen zur Identifizierung der Proteine OE1490R (conserved protein), OE2648F (conserved protein), OE4740R (DNA directed RNA polymerase chain A) und OE4757R (hypothetical protein), welches im Genom in direkter Nachbarschaft zum Glykoprotein der Oberfläche lokalisiert ist und 2 Transmembranhelices



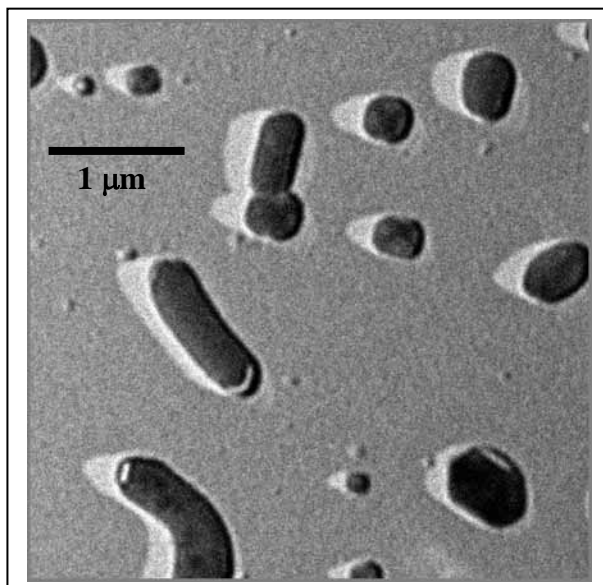
besitzt. Da jedoch alle identifizierten Proteine entweder im Rahmen des Cytosolproteoms oder in verschiedenen Membranpräparationen identifiziert wurden, ist ein Zusammenhang mit dem Flagellarmotor unwahrscheinlich.

### 3.1.3 Behandlung der Zellen mit Bacitracin

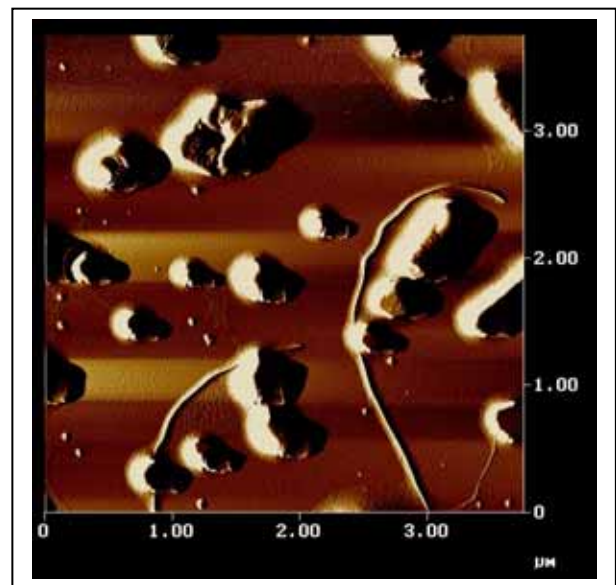
Um eine effektive Solubilisierung der Membran zu erreichen und mögliche Artefakte durch unspezifische Anbindung an die Glykoproteinstruktur der Zellhülle zu vermeiden, wurde versucht, diese zu entfernen.

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass Inkubation der Zellen mit Bacitracin während des Zellwachstums zu einer Sphaeroblastisierung führt. Grund dafür ist die Inhibierung des Dolicholpyrophosphat-Weges, der für die Glykosilierung des Glykoproteins der Zellhülle wichtig ist (Sumper, 1987). Bei Zellen von *Halobacterium cutirubrum* wurde ferner eine Inhibierung der Lipidbiosynthese beschrieben (Basinger und Oliver, 1979, Moldoneavu und Kates, 1989).

In elektronenmikroskopischen und AFM-Aufnahmen (Abbildung 3.9 und 3.10) konnte dies bestätigt werden, die Zellen haben ihre Stäbchenform verloren und haben stattdessen die rundliche Form von Sphaeroblasten.



**Abb. 3.9:** EM-Aufnahme von *H. salinarum*, die mit Bacitracin behandelt wurden (Vergrößerung 2.4 x 1000). Zu erkennen sind sowohl kleinere Zellen unter Bacitracinbehandlung, als auch das Fehlen von Flagellen.



**Abb. 3.10:** AFM-Aufnahme von *H. salinarum*, die mit Bacitracin behandelt wurden. Entsprechend Abb. 3.9 sind die Zellen deutlich kleiner. Die sichtbare Flagelle stammt wahrscheinlich vom Inokulum.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 3.1) ist auf den AFM-Aufnahmen zu erkennen, dass keine geordnete Struktur des Glykoproteins mehr vorhanden ist. Es lässt sich jedoch keine eindeutige Aussage darüber treffen, ob das Fehlen dieser geordneten Struktur

### 3. Ergebnisse

auf (1) eine mangelnde Glykosilierung des Glykoproteins und damit verbundener Magnesium-Komplexierung zurückzuführen ist oder aber (2) eine verringerte Translation des Glykoproteins vorliegt.

Weiterhin konnte durch diese Aufnahmen gezeigt werden, dass die Flagellar-Biosynthese unterbunden wird. Die Glykosilierung der Flagellen entspricht zwar in ihrem Aufbau dem des Glykoproteins, jedoch hätten nicht-glykosilierte Flagellen, falls existent, erkannt werden müssen. Das Fehlen der Flagellen bedeutet jedoch, dass die Marker der Präparation nicht vorhanden sind, und sowohl über EM-Aufnahmen, als auch SDS-Gelelektrophorese keine Präparationskontrolle mehr möglich ist.

Diese EM-Aufnahmen erklären somit, warum eine Polar-Cap Isolierung aus Bacitracin-behandelten Kulturen nicht möglich war. Der (unwahrscheinliche) Verlust der Flagellen während des Zellwachstums wurde überprüft, indem (1) sowohl der Zellüberstand mittels Elektronenmikroskopie analysiert wurde, als auch (2) versucht wurde, mögliche Superflagellen zu isolieren. In beiden Versuchen konnten jedoch keine Flagellen detektiert werden.

Ob die Polarkappen als vermuteter Ort der Flagellarbiosynthese und Verankerung unter den Bacitracinbedingungen überhaupt gebildet werden, kann durch die durchgeführten Experimente nicht geklärt werden, da bei einer Präparation der Bacitracin-behandelten Kulturen nach Kupper lediglich kontaminierende ribosomale Proteine identifiziert werden konnten.

#### 3.1.4 Alternative Isolierungsversuche

Eine weitere Möglichkeit zur Sphaeroblastenbildung besteht in der Inkubation der Zellen mit EDTA. Hierbei werden Magnesiumionen komplexiert, was zu einer Auflösung der kristallinen Struktur des Glykoproteins führt. Nach anschließender Zentrifugation wurden die Flagellen jedoch im Sphaeroblasten-Überstand detektiert (1-D SDS-Gel, EM-Aufnahmen). Da keine anderen Banden auf dem Gel und auch keine größeren Strukturen mittels Elektronenmikroskopie zu erkennen waren, muß daraus geschlossen werden, dass die Flagellen unter EDTA-Behandlung vom Basalkörper abgetrennt werden. Eine weitere Präparationskontrolle ist damit nicht mehr möglich, eine eventuell noch vorhandene Polar Cap Struktur kann damit weder durch Elektronenmikroskopie oder Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Die Abtrennung des Glykoproteins kann auch durch eine Verringerung der Ionenkonzentration auf unter 1 M NaCl erreicht werden. Gleichzeitig kommt es zur Lyse der Zellen. Bei der Dialyse gegen 250 mM NaCl und Auftrag auf einen diskontinuierlichen

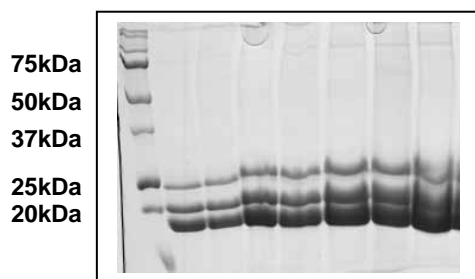


Dichtegradienten (20% und 50% Sucrose, w/w) wurden so lösliche Proteine und Membranproteine von einem Pellet abgetrennt.

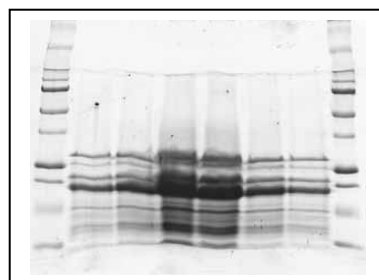
Dieses Pellet bestand ausschließlich aus Flagellen (Abbildung 3.11).

Ein Aliquot dieser Fraktion wurde zentrifugiert und der Niederschlag zur Dissoziation eventuell anhängender Motorproteine in 10 mM Phosphatpuffer unter Sonifizierung resuspendiert.

Die anschließende Abreicherung der Flagelline mittels Concanavalin A führte zu einer neuen Fraktion, die hauptsächlich aus kleineren Proteinen bestand (Abbildung 3.12).



**Abb. 3.11:** Flagelline nach Dialyse und Sucrosegradient (12.5% PAA). Auftrag von unterschiedlichen Mengen.



**Abb. 3.12:** Flagelline nach Dialyse und Sucrosegradient, ConA behandelt. Auftrag von unterschiedlichen Mengen.

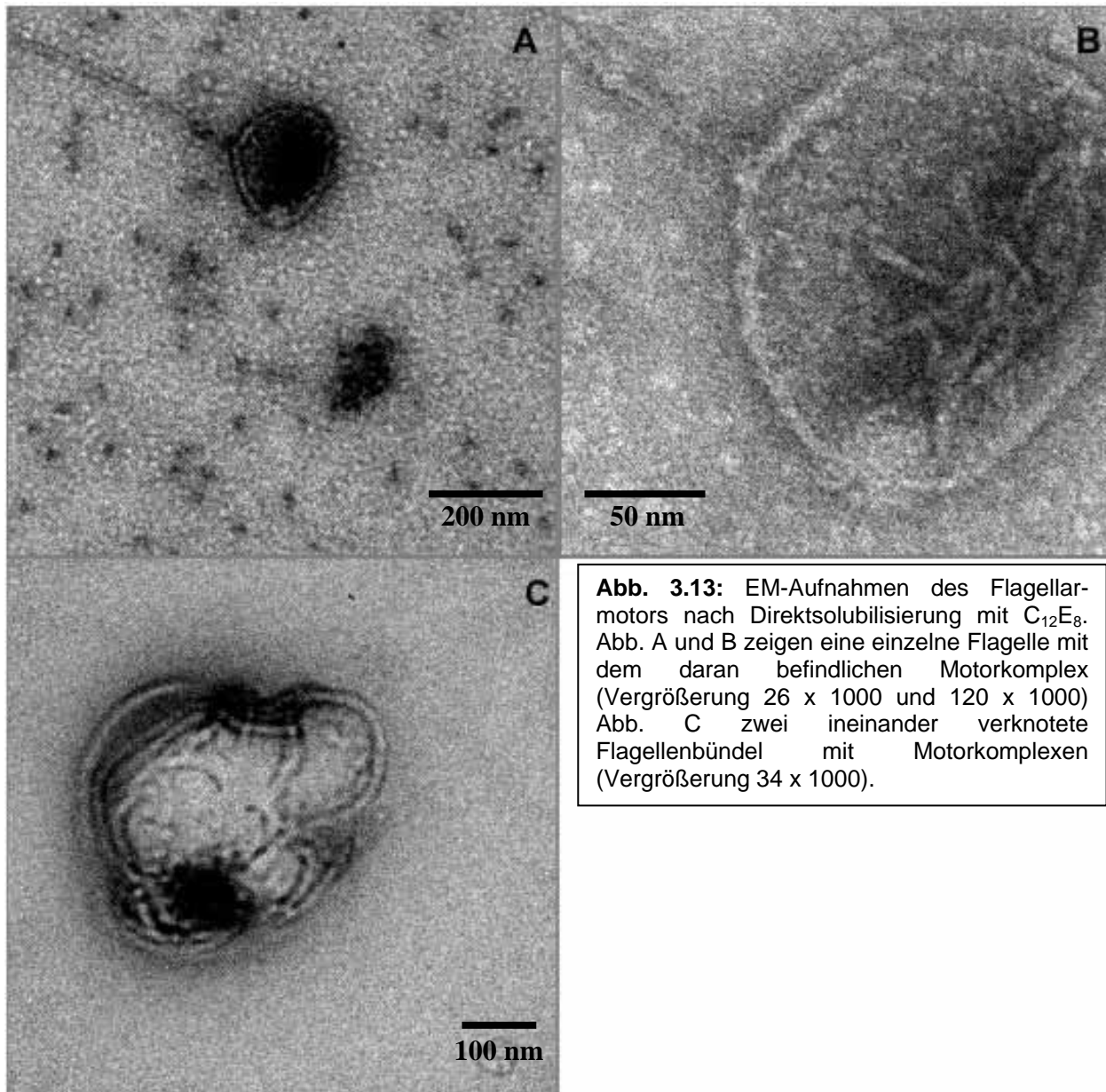
Die Identifizierung mittels MALDI-MS-Fingerprint führte jedoch zu dem Ergebnis, dass es sich hier um Abbauprodukte der Flagelline handelt.

In einem weiteren Experiment zur

Isolierung des Flagellarmotors wurde eine Solubilisierung der Zellen mittels des Detergens  $C_{12}E_8$  versucht. Nach Resuspension der Zellen in Basalsalz wurde über Nacht mit 0,1%  $C_{12}E_8$  solubilisiert. Aufgrund der Dichte von Basalsalz ( $\delta=1,13 \text{ g/cm}^3$ ) können bei differentieller Zentrifugation nicht solubilisierbare Membranbereiche nicht pelletieren, Polysomen wurden aber durch Zugabe von RNase in ihre ribosomalen Untereinheiten dissoziiert. Nach Ultrazentrifugation wurde der Niederschlag in Basalsalz resuspendiert und nach Negativfärbung elektronenmikroskopisch analysiert (Abbildung 3.13).

In Abbildung 3.13 A ist eine Flagelle zu erkennen, die in einer runden Struktur endet. Bei dieser handelt es sich vermutlich um den Flagellarmotor, der von einem zusätzlichen Ring ähnlicher Dimension wie die Flagelle vermutlich umgeben ist. In Abbildung 3.13 B ist diese Struktur in größerer Auflösung zu sehen. In der Verlängerung der Flagelle zum Mittelpunkt der Struktur scheint sie in einer flachen Scheibe zu enden, an die sternförmig weitere Strukturelemente gebunden sind. Eine weitere Aufnahme (Abbildung 3.13 C) zeigt wiederum im oberen Teil den Ring aus Abbildung 3.13 A, an dem hier jedoch mehrere Flagellen gebunden sind, die im Mittelpunkt ihren Ursprung zu haben scheinen.

Während die Struktur aus Abbildung 3.13 A/B sehr häufig beobachtet werden konnte, handelt es sich bei der Aufnahme aus Abbildung 3.13 C um eine einzige Aufnahme.

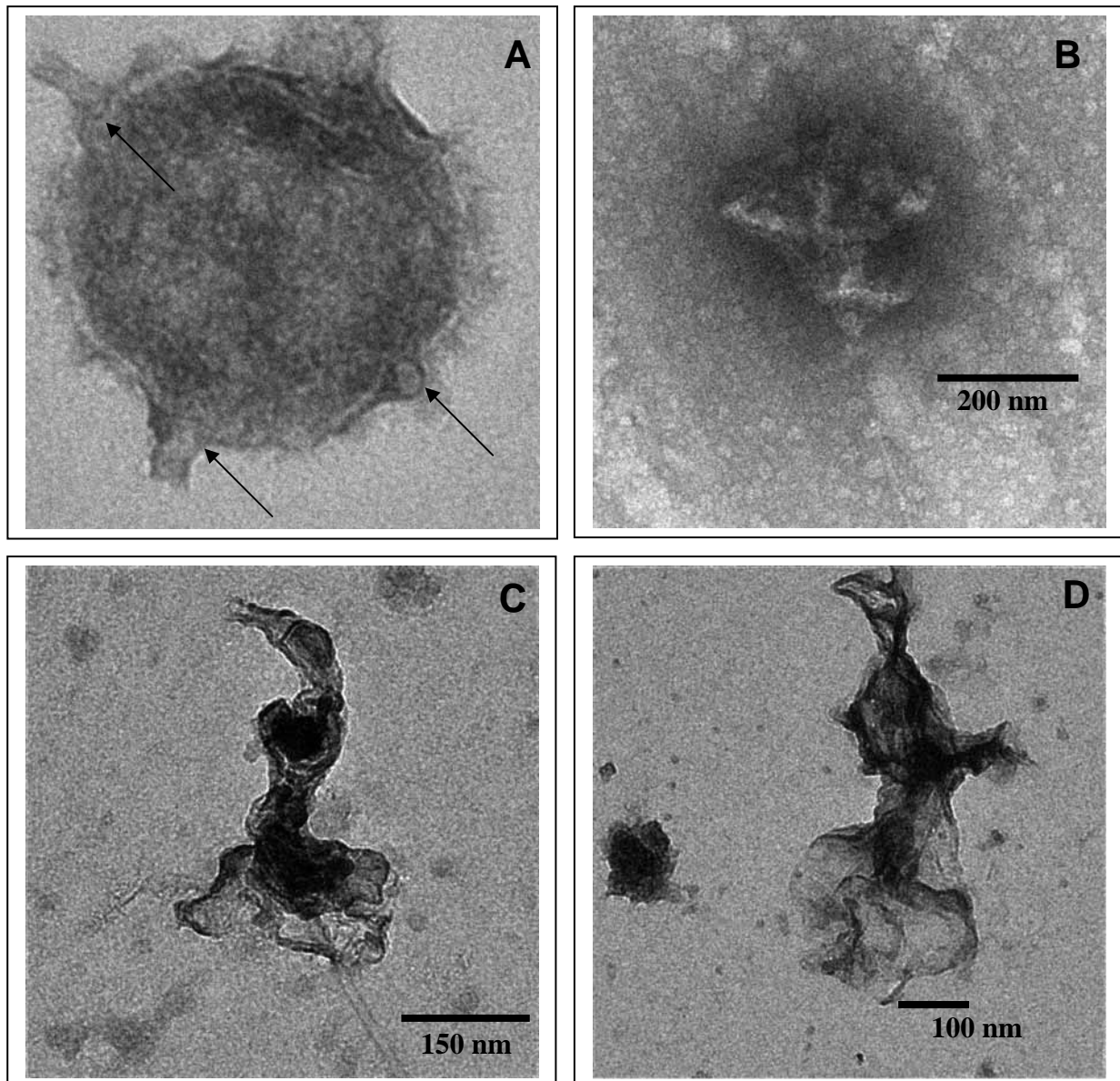


**Abb. 3.13:** EM-Aufnahmen des Flagellarmotors nach Direktsolubilisierung mit  $C_{12}E_8$ . Abb. A und B zeigen eine einzelne Flagelle mit dem daran befindlichen Motorkomplex (Vergrößerung 26 x 1000 und 120 x 1000) Abb. C zwei ineinander verknottete Flagellenbündel mit Motorkomplexen (Vergrößerung 34 x 1000).

Ein weiterer Versuch der Motorisolierung bestand in einer milden Solubilisierung der Mutante flx37 mittels 0,01% Taurodeoxycholat und anschließender Trennung in einem kontinuierlichen Sucrosegradienten. Hierbei wurden 2 Banden erhalten, eine bräunliche Bande in der Mitte des Gradienten und eine knapp darunter befindliche weiße Bande. Elektronenmikroskopische Aufnahmen beider Banden sind in Abbildung 3.14 A (weiße Bande) und 3.14 B (braune Bande) dargestellt.

In der weißen Bande sind neben zahlreichen Flagellen (nicht abgebildet) erneut ringförmige Strukturen zu erkennen, an denen Ansätze von Flagellen zu erkennen sind. In der bräunlichen Bande hingegen ist eine größere Struktur vorhanden, die aus zwei übereinanderliegenden Ringen besteht. Die Form des kleineren Ringes entspricht der gefundenen Struktur aus Abbildung 3.13 B. Ferner ist eine Flagelle zu erkennen, die sowohl am kleineren als auch am

größeren Ring mit deren Außenkanten verbunden ist. Während die Strukturen in Abbildung 3.13 A häufig zu finden waren, gelang die Aufnahme aus Abbildung 3.13 B nur einmalig. Da selbst bei diesem milden Detergensaufschluss Dissoziation der Motorstruktur eintritt, wurde die Methode nach Kupper *et al.* mit der Mutante *flx37* und verkürzter Triton X-100 Solubilisierung (10 min) angewandt. Zu erkennen ist eine längliche Struktur, an deren unteren Ende sich eine Flagelle befindet (Abbildung 3.14 C). Eine andere Struktur, ohne herausragende Flagelle, zeigt Abbildung 3.14 D.



**Abb. 3.14:** EM-Aufnahmen von Motorpräparationen: **(A)** Weiße Bande nach Dichtegradienten, **(B)** Braune Bande nach Dichtegradienten (A und B nach Aufschluss mittels Taurodeoxycholat), **(C)** und **(D)** Präparation nach Kupper *et al.* mit verkürzter Triton X-100 Solubilisierung.

#### 3.1.5 Vergleich der beobachteten EM-Strukturen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene Strukturen der Polar Cap mit Elektronenmikroskopie beobachtet werden. Die Reproduktion der EM-Aufnahmen von Kupper zeigte eine runde Struktur mit mehreren sich daran befindenden Flagellen. Mittels der alternativen Aufarbeitungen mit niedriger Detergensbehandlung (0,1% C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> bzw. 0,1% Taurodeoxycholat) wurden zwei Strukturen mit mehr Details gefunden, an denen mehrere Flagellen gebunden sind. Abbildung 3.13 C zeigt eine runde Struktur mit einem Durchmesser von 110 nm, Abbildung 3.14 A eine Struktur von 290 nm Durchmesser. Während in der kleineren Struktur die Flagellen einen Durchmesser von 14,6 nm besitzen, betragen die Durchmesser in der größeren Struktur 29 nm.

Eine Erklärung für diesen Sachverhalt stellt die Abbildung 3.14 B dar. Zu erkennen ist eine Struktur, die aus zwei übereinanderliegenden Ringen besteht. Der größere, untere, Ring besitzt einen Durchmesser von 283 nm, was sehr genau dem Ring aus Abb. 3.14 A entspricht. Der kleinere, obere, Ring besitzt mit 138 nm eine ähnliche Dimension wie die Struktur aus Abb. 3.13 C.

Der Abstand der beiden Ringe untereinander beträgt 68 nm. Diese Dimension korreliert nicht mit den von Speranskii (Speranskii *et al.*, 1996) gemessenen 20 nm Abstand von Polar Cap und Membran. Dies kann entweder mit einer Dissoziation der in dieser Arbeit beobachteten Struktur erklärt werden, oder aber mit der Präparationsweise der Dünnschnitte von Speranskii, die auf lysierten Zellen beruhte.

Unter der Annahme, dass die 68 nm dem tatsächlichen Abstand entsprechen, beträgt die Länge des Flagellenbereiches aus Abb. 3.14B, der die beiden Ringe miteinander verbindet, ungefähr 90 nm.

Diese Dimension entspricht der Länge des Hooks, der bei *M. voltae* (Thomas *et al.*, 2001) beschrieben ist. Sollte es sich bei der Verbindung von Polar Cap und membranständiger Struktur um die Hook-Region handeln, könnte damit die Beobachtung der variablen Hook-Längen von *M. thermolithotrophicus* (Cruden *et al.*, 1989) erklärt werden. Je nach Abstand der Polar Cap von der Membran und Krümmung des Hooks können Längendifferenzen dieses Bereiches auftreten, die bei Bakterien nicht beobachtet worden sind. Bei diesen ist der Hook-Bereich jedoch extrazellulär lokalisiert und stellt die Verbindung zwischen der äußersten Ringstruktur und der Flagelle dar.

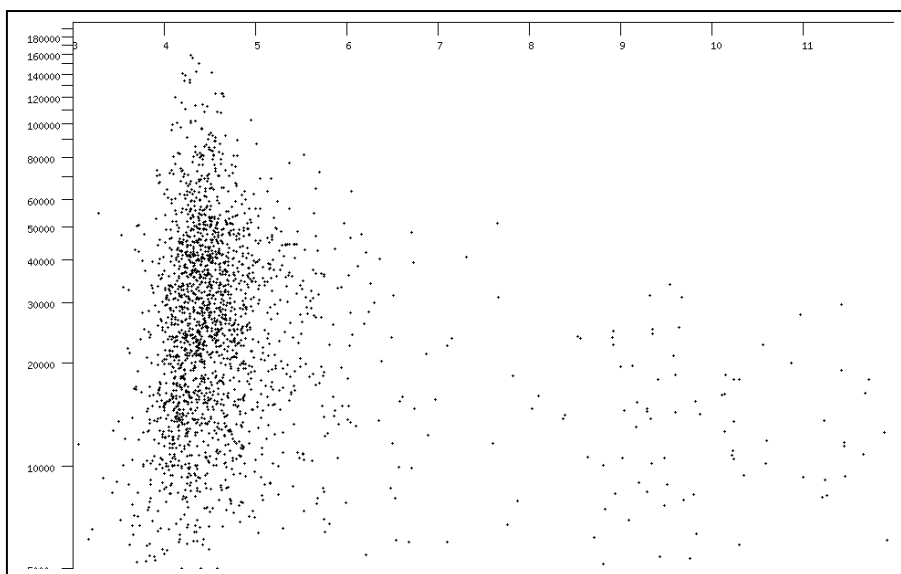
Weitere Ausführungen dazu im Diskussionsteil dieser Arbeit, indem ein neues Modell zum Flagellarapparat beschrieben wird, welches vor allem auf der Beobachtung der beiden Ringstrukturen beruht, welche beide mit Flagellen verbunden sind.

### 3.2 Cytosolproteom

Im Rahmen des Cytosolproteoms sollten möglichst viele Proteine identifiziert werden, um die von der Genomsequenzierung vorausgesagten, offenen Leserahmen (Open Reading Frames, ORF's) durch massenspektrometrische Identifizierungen zu bestätigen. Diese sind im Fall von *H. salinarum* umso nötiger als fast viermal soviel mögliche ORF's als vermutliche Gene gefunden werden. Durch die Eliminierung falsch vorhergesagter ORF's gewinnt die Annotation des Genoms durch Proteomversuche an Qualität. Dies ist u.a. für Transkriptom-Projekte von maßgeblicher Bedeutung, da so spezifische Sonden hergestellt werden können.

#### 3.2.1 Übersicht des cytosolischen Proteininventars von *H. salinarum*

Aus der Genom-Sequenzierung von *H. salinarum* wurden 2783 ORF's ermittelt, die wahrscheinlich für Proteine codieren. 2213 ORF's besitzen keine vorhergesagte Transmembrandomäne und werden im folgenden als cytosolische Proteine betrachtet. Aus den theoretisch ermittelten pI-Werten und Molekulargewichten wurde von der Bioinformatikgruppe um Dr. F. Pfeiffer ein theoretisches Cytosol-2-D Gel erstellt (Abbildung 3.15).



**Abb. 3.15:** Theoretisches Cytosol- 2-D Gel von *H. salinarum* im pI-Bereich 3-12 und Massenbereich 5 kDa bis 200 kDa. 76% aller cytosolischen Proteine befinden sich zwischen pH 4-5, bedingt durch die hohe Anzahl von Aspartat und Glutamat.

Eine genauere Analyse der Proteine zeigt, dass 2070 Proteine (94%) ihren pI im Bereich 3-6 haben, 1677 Proteine (76%) im Bereich zwischen 4-5. Der durchschnittliche pI aller Proteine beträgt 4,2. Diese starke Azidität der halophilen Proteine ist eine direkte

Anpassung an die extreme Umgebung. Die Anreicherung von Glutamat und Aspartat an der Oberfläche, die bei einem cytosolischem pH Wert von 7,2 negativ geladen sind, führt zu einer Stabilität der Proteinstruktur unter Hochsalzbedingungen (vgl. Abschnitt 1.2). Von insgesamt 282 Proteinen, die einen pI zwischen 7-12 besitzen, sind lediglich 99 Proteine cytosolischen Ursprungs, von denen wiederum 13 als ribosomal und 45 als hypothetisch charakterisiert sind.

### 3. Ergebnisse

Bezüglich der Molekularmassen liegen die Proteine (pI 3-12) wie folgt verteilt vor:

5-10 kDa:	221 (10%)	30-40 kDa:	351 (16%)
10-20 kDa:	622 (28%)	40-50 kDa:	265 (12%)
20-30 kDa:	468 (21%)	50-250 kDa:	284 (13%)

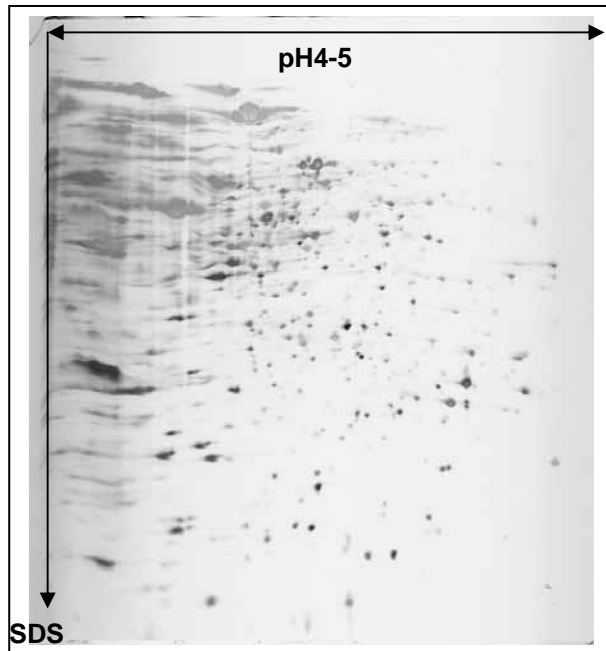
843 cytosolische Proteine (38%) liegen somit im Massenbereich von 5-20 kDa, der schwer über 2-Dimensionale Gelelektrophorese und MALDI-TOF Fingerprint Analyse zugänglich ist.

#### 3.2.2 Gesamtytosolauftrennung

Zellen von *H. salinarum* wurden in der stationären Phase ( $OD_{600}=1,0$ ) zentrifugiert und mittels Taurodeoxycholat-Inkubation mit anschließender Ultrazentrifugation in Cytosol und Zellhüllen separiert.

Das Cytosol wurde nachfolgend acetongefällt, entsalzt und im 2-D-Lysepuffer solubilisiert (Endkonzentration 250  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ).

Mittels zweidimensionaler Auftrennung (IEF/SDS) wurden die Proteine in einem pH Intervall von pH 4-5 aufgetrennt und über eine Silberfärbung visualisiert (Abbildung 3.16).



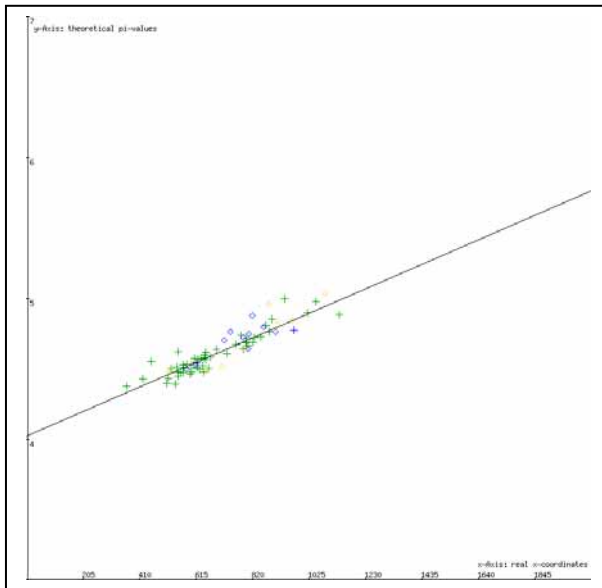
**Abb. 3.16:** 2-D Auftrennung einer Gesamtytosolauftrennung nach Taurodeoxycholat-Inkubation.

Von 96 mit Hilfe eines Spot-Pickers ausgeschnittenen Spots wurden bei automatischer MALDI-Messung mittels DriedDroplet auf einem Stahltarget 53 Spots als trusted identifiziert, 12 Spots als insecure und 12 Spots als questionable. (Die Definitionen dieser Bewertungskriterien sind in Abschnitt 2.4.3 näher erläutert).

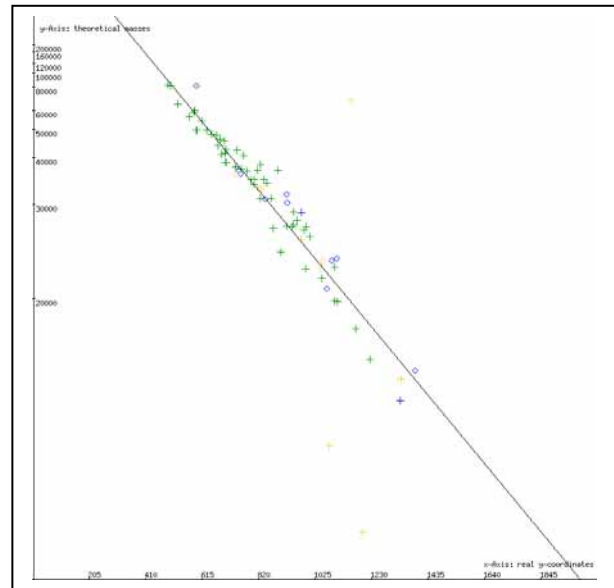
Im Rahmen der Ansteuerung des Spot-Pickers generiert das Programm x- und y-Koordinaten der ausgeschnittenen Spots. Diese liegen als Pixel-Daten vor und stehen somit in einer linearen Beziehung zu der metrischen Dimension der Auftrennung. Da es sich bei dieser Auftrennung um einen

linearen pH-Gradienten handelte, konnten die theoretischen isoelektrischen Punkte mit den experimentell gefundenen Werten korreliert werden.

Abbildung 3.17 zeigt diese Korrelation, bei der die grünen Koordinatenpunkte den als trusted gewerteten Spots entsprechen, die Blauen den insecure Spots und die Gelben den als questionable Spots gewerteten.



**Abb. 3.17:** Korrelation von theoretischem und experimentellem pI.



**Abb. 3.18:** Korrelation von theoretischem und apparentem Molekulargewicht.

In einer zweiten Korrelation wurde das theoretische Molekulargewicht gegen das apparente Molekulargewicht aufgetragen. Analog der pI-Korrelation wurden die y-Werte des Spot-Pickers genommen. Die Achsenskalierung erfolgte nach einer logarithmischen Auftragung, da es sich in der SDS-Dimension um ein uniprozentuales Gel gehandelt hat (Abbildung 3.18).

Bei beiden Korrelationen ist zu erkennen, dass sowohl die trusted Spots als auch die insecure Spots sehr gut den theoretisch vorausgesagten Werten entsprechen. Bezüglich des isoelektrischen Punktes ist die maximale Abweichung 0,01 pH-Einheiten, die Molekulargewichte hingegen variieren deutlicher. Die Abweichung bezüglich des Molekulargewichts können mit der Halophilie der löslichen Proteine erklärt werden, die allgemein ein höheres apparentes Molekulargewicht aufweisen (Madern *et al.*, 2000).

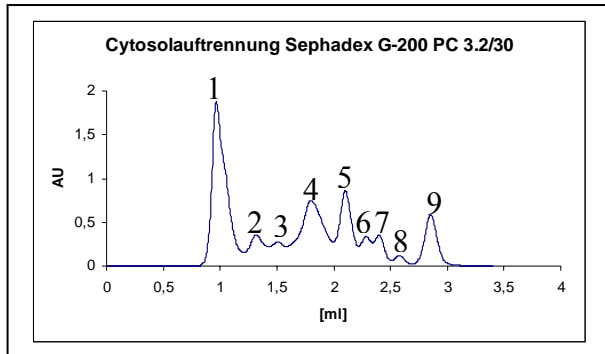
Bei den nicht-identifizierten Spots handelte es sich fast ausschließlich um Spots geringerer Intensität, die unter den Bedingungen der MALDI-Messungen nicht mehr detektiert werden konnten. Die Sensitivitätsgrenzen werden im Abschnitt 3.4.2 näher beschrieben.

Eine höhere Beladung der Gele ist aufgrund des Sample-Cup Auftrages nicht möglich, ein in-Gel Auftrag mit höheren Proteinmengen führte zu einer schlechteren Auftrennung.

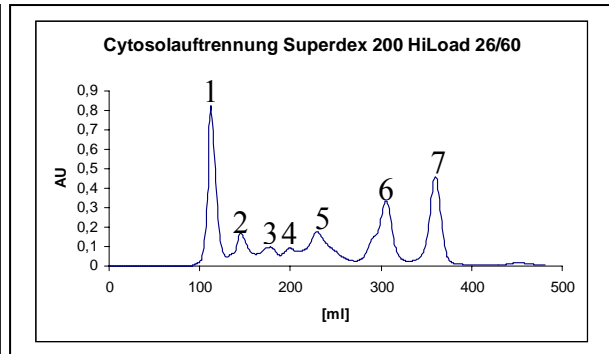
Um eine höhere Identifizierungsquote zu erhalten, wurde das Cytosol subfraktioniert und die einzelnen Fraktionen zweidimensional aufgetrennt.

### 3.2.3 Cytosolsubfraktionierung mittels Gelchromatographie

In Vorversuchen wurden zunächst 500 µg einer Cytosolfraktion mittels einer Sephadex G-200 PC 3.2/30 Säule in Basalsalz getrennt. Sehr gut reproduzierbar wurden hierbei 9 Fraktionen erhalten (Abbildung 3.19).



**Abb. 3.19:** Gelchromatographische Auftrennung von 500 µg Gesamtytosol mittels einer analytischen Sephadex G-200 PC3.2/30 Säule.



**Abb. 3.20:** Gelchromatographische Auftrennung von 20 mg Gesamtytosol mittels einer präparativen Superdex 200 prep grade HiLoad 26/60 Säule.

Auffallend ist die Größe des ersten Peaks im Ausschlussvolumen der Säule. Dies deutet darauf hin, dass ein großer Teil der halobakteriellen Proteine in Komplexen von mehr als 200 kDa vorliegt. Für die anschließende zweidimensionale Auftrennung erwies sich hingegen die Proteinmenge als problematisch, da die Auftragsmenge pro Fraktion 250 µg betragen sollte. Die gesammelten Peakfraktionen wurden demnach aus zehn Läufen vereinigt, acetongefällt und entsalzt. Nach Aufnahme im 2-D Lyse-Puffer (2% ASB-14) wurden diese zweidimensional aufgetrennt (Abbildung 3.21).

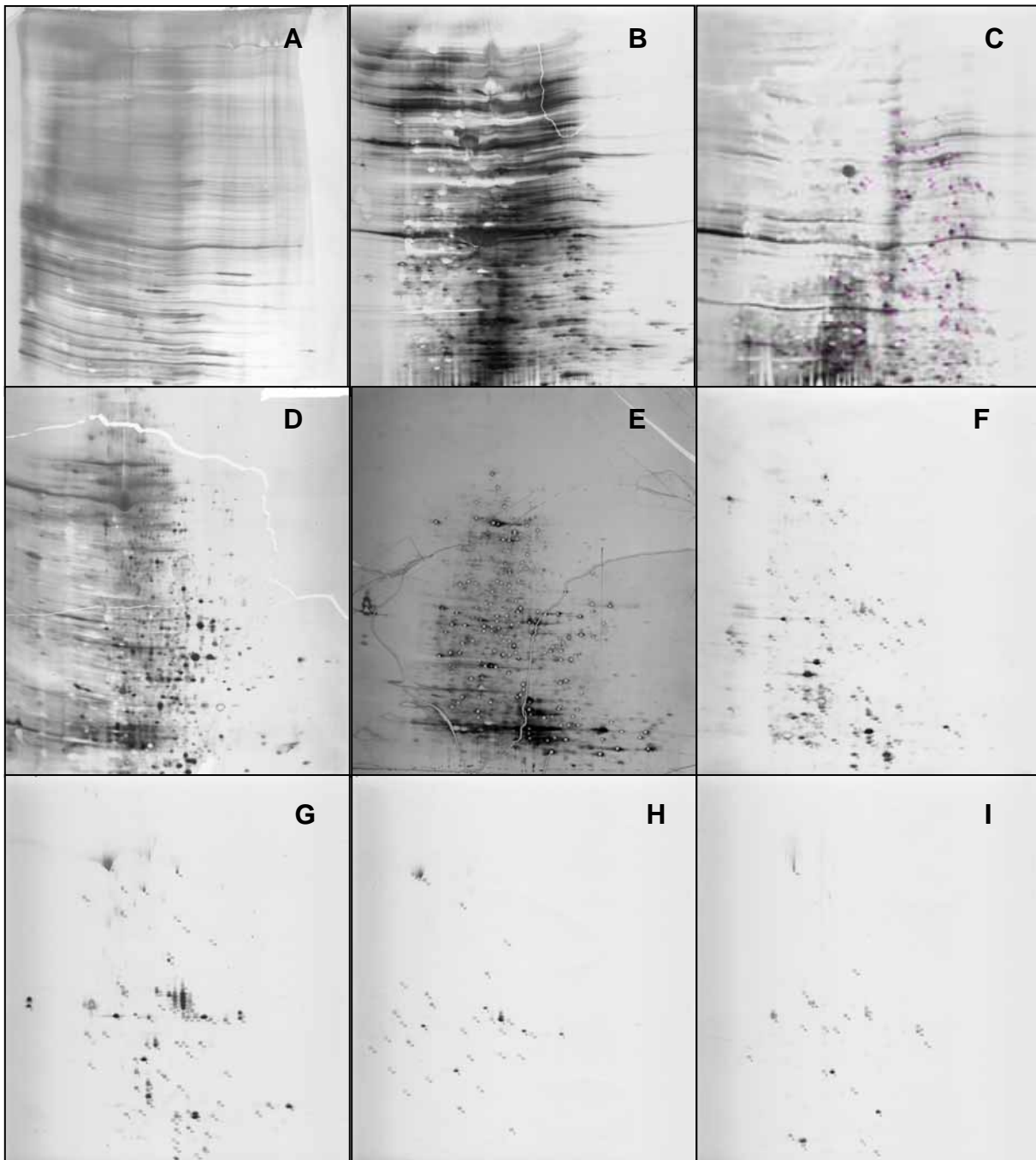
In einem präparativen Ansatz wurden auf einer Superdex 200 prep grade HiLoad 26/60 Säule 20 mg Gesamtytosol aufgetrennt (Abbildung 3.20). Es konnten 7 Fraktionen separiert werden, wobei wiederum im Ausschlussvolumen der Hauptteil der Proteinmenge eluiert wurde. Diese Fraktionen wurden anschließend gegen Wasser dialysiert und in einem Lyophilisator getrocknet. Nach Aufnahme im 2-D Lyse-Puffer (4% CHAPS) wurden die Fraktionen zweidimensional aufgetrennt.

Die Auftrennung im präparativen Maßstab unterschied sich nicht signifikant von der analytischen Auftrennung, hatte jedoch den Vorteil einer höheren Mengenauftrennung.

Eine systematische Untersuchung aller Proteinflecken wurde bei dieser Gelauftrennung nicht vollzogen, da zeitgleich eine Verbesserung der Gesamtytosolauftrennung von A. Tebbe (Tebbe und Klein *et al.*, 2004, accepted) mit einer Auflösung von mehr als 1800 Proteinen verfolgt wurde. In diesem systematischem Ansatz wurden alle detektierbaren Spots aus überlappenden pI-Bereichen (pH 3,5-4,5, pH 4,0-5,0, pH 4,5-5,5 und pH 5-8) aus zwei



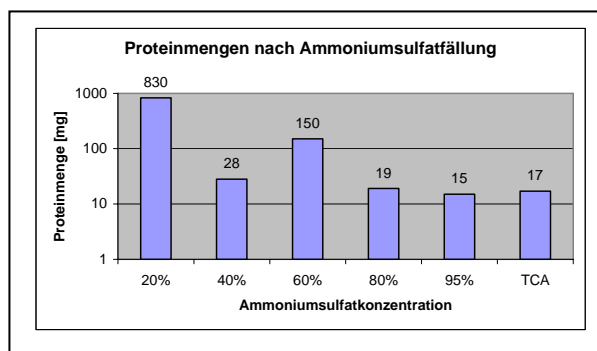
identischen Gelen zweifach ausgeschnitten, gespalten und jeder dieser zweifach ausgeschnitten Spots doppelt über MALDI-TOF-Fingerprint analysiert.



**Abb. 3.21:** Zweidimensionale Auftrennung der Peakfraktionen aus der analytischen Sephadex G-200-Auftrennung. Abbildungen A bis I entsprechen den erhaltenen Peaks 1-9, die aus zehn Läufen vereinigt wurden, acetongefällt und entsalzt wurden. Die getrockneten Niederschläge wurden in 300  $\mu$ l 2-D Lyse Puffer (2% ASB-14) aufgenommen (Proteinkonzentration 250 $\mu$ g/300 $\mu$ l, Berechnung nach Integralbestimmung der Säulenpeaks, nach Warburg modifiziert) und mittels in-Gel Rehydratisierungen auf 18 cm lange IPG-Streifen, pH 4-5, über Nacht aufgetragen. Nach 45 kWh Fokussierung wurden die Streifen äquilibriert und die Proteine in einem 9-16% PAA-SDS-Gel aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mittels Silberfärbung. Deutlich zu erkennen ist eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen.

### 3.2.4 Cytosolsubfraktionierung mittels Ammoniumsulfat-Fällung

Nach den theoretischen Berechnungen haben 843 lösliche Proteine (38% des Cytosolinventars von 2213 Proteinen) eine molekulare Masse von unter 20 kDa. Die aus den Gelchromatographie-Fractionen (Abbildung 3.21 H und I) erhaltenen Gele zeigten jedoch nur wenige Proteinflecken, wohingegen in den Anfangsfraktionen (Abbildung 3.21A-C) fast keine Abreicherung von Proteinen zu erkennen war. Unter der Annahme, dass die Proteine mit geringerem Molekulargewicht in Komplexen vorliegen, wurde eine größenunabhängige Fraktionierung mittels Ammoniumsulfat-Fällung untersucht. Ein unterschiedliches Präzipitationsverhalten der nativen Proteine bzw. Komplexe unter steigender Ammoniumsulfatkonzentration sollte zu einer Reduzierung der Proteinvielfalt in den einzelnen Fraktionen führen.



**Abb. 3.22:** Proteinmengen der Ammoniumsulfat-Fractionen in logarithmischer Auftragung. Die meisten Proteine fallen bei pH 4,5 bereits bei 20% Ammoniumsulfat aus.

Zellen aus der stationären Phase ( $OD_{600} = 0,95$ ) wurden mittels Sonifizieren geöffnet, das Cytosol durch Abtrennen der Vesikel durch Ultrazentrifugation gewonnen. Dieses wurde dann jeweils 3 Stunden gegen aufsteigende Ammoniumsulfatkonzentrationen bei pH 4,5 (20%, 40%, 60%, 80% und 95%) dialysiert, das Präzipitat vor dem nächsten Dialyseschritt zentrifugiert. Der letzte Überstand wurde dann mit TCA gefällt.

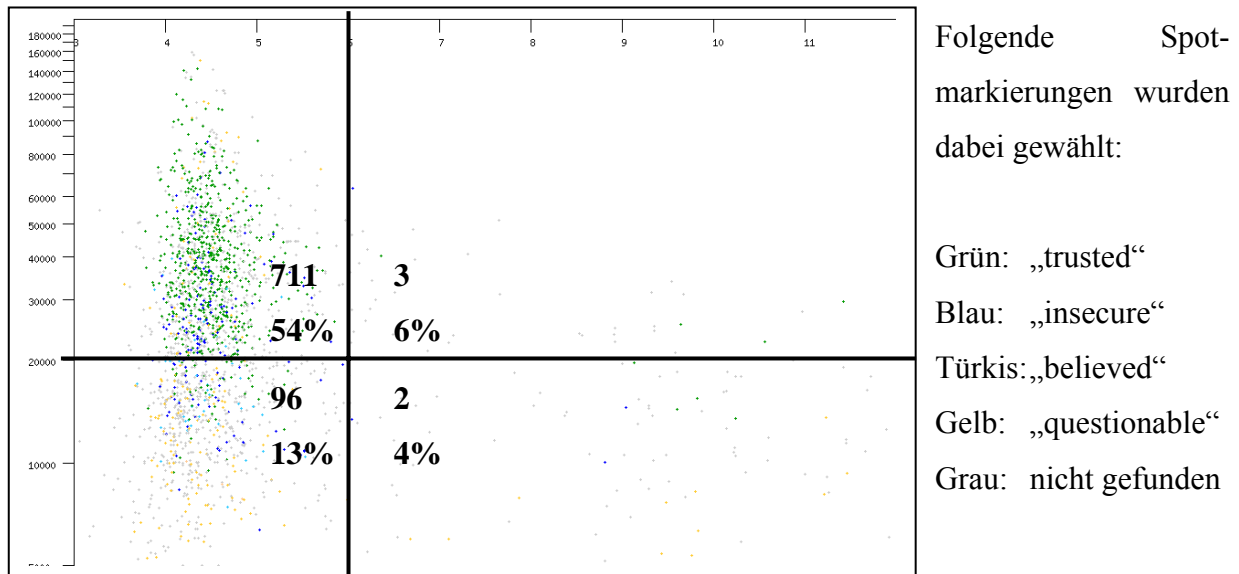
Abbildung 3.22 zeigt die Proteinmengen der erhaltenen Fraktionen. Der Großteil der Proteine fällt zwar beim ersten Präzipitationsschritt, jedoch sind in den anderen Fraktionen noch ausreichende Proteinmengen vorhanden.

In einer 1-D SDS-Auftragung war jedoch kein signifikanter Unterschied in den einzelnen Fraktionen zu erkennen, auf eine weitere Analyse wurde aufgrund der Ergebnisse der Gesamtcytosolauftrennung verzichtet.

### 3.2.5 Überblick der Identifizierungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus den verschiedenen Cytosol-, Flagellarmotor und Membrangelen (IEF/SDS) 825 Proteine über MALDI-TOF Fingerprint identifiziert. Aufgrund der erhaltenen Scores teilen sich diese Identifizierungen in 603 trusted Proteine, 150 insecure und 72 believed Proteine. In einer weiteren Klasse fallen 583 questionable Proteine, auf die eines der unter Abschnitt 2.6.2 erläuterten Kriterien zutrifft.

Eine Übersicht bisher gefundener cytosolischen Proteine ist in Abbildung 3.23 dargestellt, die auf dem theoretischen Gel (vgl. Abb. 3.15) beruht.



**Abb. 3.23:** Darstellung der analysierten cytosolischen Proteine auf einem theoretischem 2-D Gel, Farbmarkierung siehe Text rechts. Während im Sektor pH 3-6, >20 kDa, 54% der vorhergesagten ORFs identifiziert werden konnten, liegt die Identifizierungsrate in den anderen Sektoren deutlich niedriger.

Das Gel wurde in 4 Sektoren unterteilt, größer und kleiner pH 6 sowie größer und kleiner 20 kDa. Die innerhalb dieser Sektoren identifizierten Proteine und deren prozentuales Vorkommen bezüglich des Sektors sind ebenfalls in Abbildung 3.23 angegeben. Die genaue Identifizierungsrate innerhalb dieser Bereiche ist in Tabelle 3.1 dargestellt, wobei in dieser Statistik alle Proteine, einschließlich der Membranproteine, berücksichtigt sind.

**Tab. 3.1:** Identifizierungen der vorhergesagten cytosolischen Proteine in verschiedenen 2-D Bereichen.

Bereich	Proteine gesamt	Proteine trusted	Proteine insecure	Proteine believed	Proteine identifiziert	Proteine questionable
pH 3-6, >20 kDa	1323	598	102	11	711 (54%)	49
pH 3-6, <20 kDa	764	38	47	11	96 (13%)	49
pH 6-12, >20 kDa	45	2	1	0	3 (6%)	15
pH 6-12, <20 kDa	107	1	1	0	2 (4%)	0

Es ist eine deutliche Diskrepanz der Identifizierungen in den 4 Sektoren zu erkennen, lediglich der pH-Bereich 3-6 mit Molekularmassen größer 20 kDa ist in einem hohen Umfang charakterisiert. Im basischem Bereich (pH 6-12) sind lediglich 14% der löslichen Proteine lokalisiert. Bezüglich aller vorhergesagten 2784 ORFs von *H. salinarum* bedeutet dies, dass 30% aller möglichen Proteine auf Proteinebene identifiziert wurden. Diese Zahl stellt die bisher höchste Abdeckung des Proteininventars mittels 2-D Gelelektrophorese einer Zelle dar, im Vergleich konnten bei *B. subtilis* 346 Proteine (8,4%) von 4100 ORFs identifiziert werden (Büttner *et al.*, 2001).

### 3.3 Membranproteom

Bei der Bearbeitung des Membranproteoms musste gleichzeitig an drei wesentlichen Kriterien gearbeitet werden, um eine Identifizierung der Membranproteine zu ermöglichen: Probenpräparation, Proteinauftrennung und Analyse über Massenspektrometrie. Lediglich die Identifizierung von Membranproteinen (oder Kontaminationen) ließ damit Rückschlüsse auf die Probenpräparation oder des benutzten Auftrennungssystems zu. In dieser Arbeit wurden somit Membranfraktionen aus verschiedenen Zellaufschlüssen (zur Übersicht vgl. Abschnitt 2.3.9) im klassischen IEF/SDS-System aufgetrennt (Dialyse, Abschnitt 3.3.2, Dialyse und Dichtegradientenzentrifugation, Abschnitt 3.3.3 und French-Press-NS, Abschnitt 3.3.4).

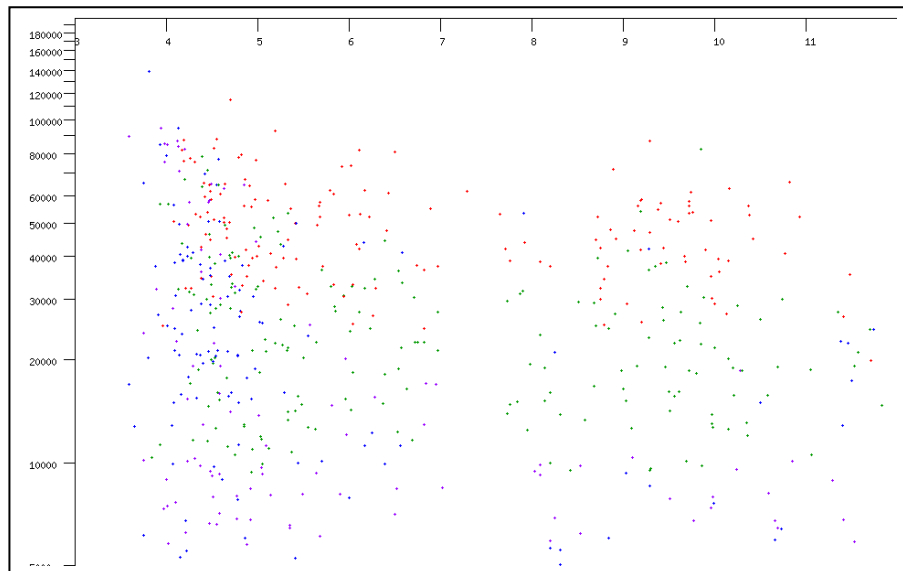
Aufgrund qualitativer (Abschnitt 3.3.5) und quantitativer (Abschnitt 3.3.6) Verluste von Membranproteinen in Niedrigsalz wurde ein Hochsalzaufschluss mittels French-Press etabliert (French-Press-HS, Abschnitt 3.3.7), über den zahlreiche Membranproteine mittels MALDI-MS-Fingerprint identifiziert werden konnten. Für integrale Membranproteine jedoch ist das klassische IEF/SDS-Trennsystem unzureichend, was mittels einer Fluoreszenzmarkierung (Abschnitt 3.3.8) nachgewiesen wurde. Alternativen zum IPG-IEF System zeigten jedoch die Limitationen einer Auftrennung nach dem pI in der ersten Dimension (Abschnitt 3.3.9 und 3.3.10).

Über pI-unabhängige Auftrennungen wurden dann mittels BAC/SDS integrale Membranproteine qualitativ und quantitativ aufgetrennt (Abschnitt 3.3.11). Ein weiteres pI-unabhängiges zweidimensionales Verfahren ermöglichte schließlich eine Identifizierung von 20% des Membranproteoms von *H. salinarum* über Gel-LC/MS/MS (Abschnitt 3.3.12).

Aus der geringen Identifizierungsrate von alkalischen Membranproteinen wurde in einem Kontrollexperiment zur Färbung ein Fixierschritt als weitere Verlustquelle identifiziert (Abschnitt 3.3.13).

### 3.3.1 Membranproteine von *H. salinarum*

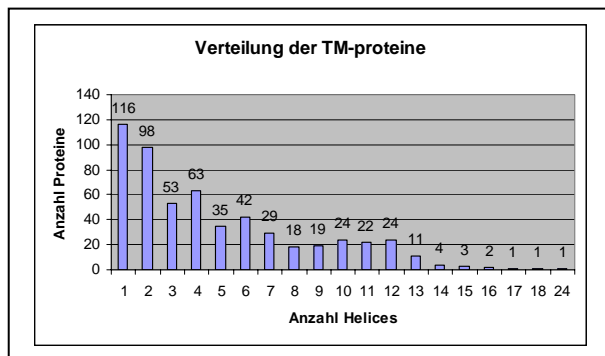
Analog dem Cytosol-Proteom wurde von der Bioinformatikgruppe ein theoretisches 2-D-Membranprotein-Gel berechnet (Abbildung 3.24). Dieses entstand erst im Verlauf dieser Arbeit und konnte im Gegensatz zu dem Cytosolproteom nicht als Grundlage der Experimentplanung eingesetzt werden.



#### Farbmarkierung:

1 TMD:	blau
2 TMD:	lila
3-6 TMD:	grün
7+ TMD:	rot

Auffallend ist die Verteilung der 566 vorhergesagten Membranproteine bezüglich der Anzahl von Proteinen in Abhängigkeit der vorhergesagten Transmembran-Domänen (Abbildung 3.25) und deren pI-Eigenschaften (dargestellt in Tabelle 3.2).



**Abb. 3.25:** Anzahl der Membranproteine in Abhängigkeit der Helicesanzahl.

**Tab. 3.2:** Verteilung der Membranproteine nach Größe und pI

Anzahl TM-Domäne	pH 3-12	pH 3-6	pH 6-12
<b>1-2 gesamt</b>	213	159	54
1-2 >20 kDa	92	85	7
1-2 <20 kDa	121	74	47
<b>3-6 gesamt</b>	<b>193</b>	<b>91</b>	<b>104</b>
3-6 >20 kDa	105	56	49
3-6 <20 kDa	88	35	55
<b>7+ gesamt</b>	<b>159</b>	<b>79</b>	<b>80</b>
7+ >20 kDa	158	79	79
7+ <20 kDa	1	0	1
<b>1-24</b>	<b>565</b>	<b>327</b>	<b>238</b>

(Anmerkung zur Tab. 3.2: Ein Protein mit 1 TM hat einen pI von größer 12, taucht deshalb im Gegensatz zu Abb. 3.25 nicht auf.)

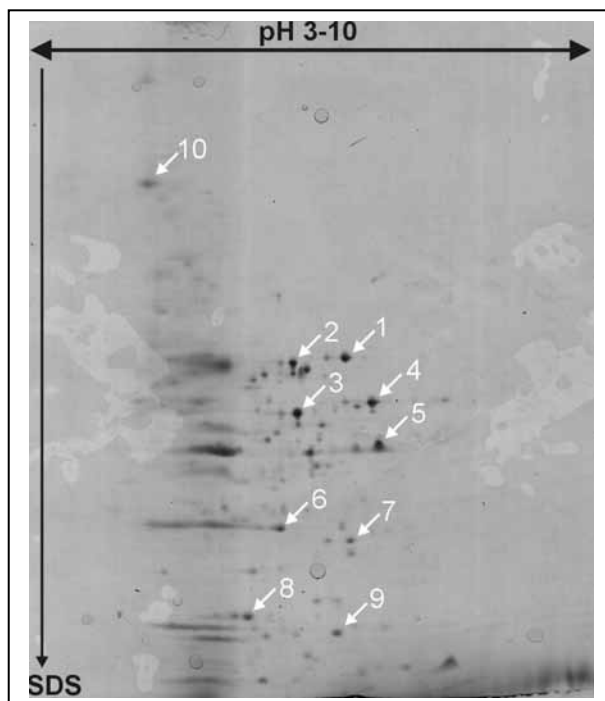
58% aller Membranproteine befinden sich im sauren pI Bereich zwischen pH 3-6, außerdem variiert diese Verteilung auch bezüglich zunehmenden Heliceszahl (1-2 TM: 75%, 3-6 TM: 47%, 7+: 50%). Lediglich die Verteilung der gering-helikalen Membranproteine entspricht dem bei anderen Organismen üblichen pI-Bereich, wohingegen bei *B. subtilis*

### 3. Ergebnisse

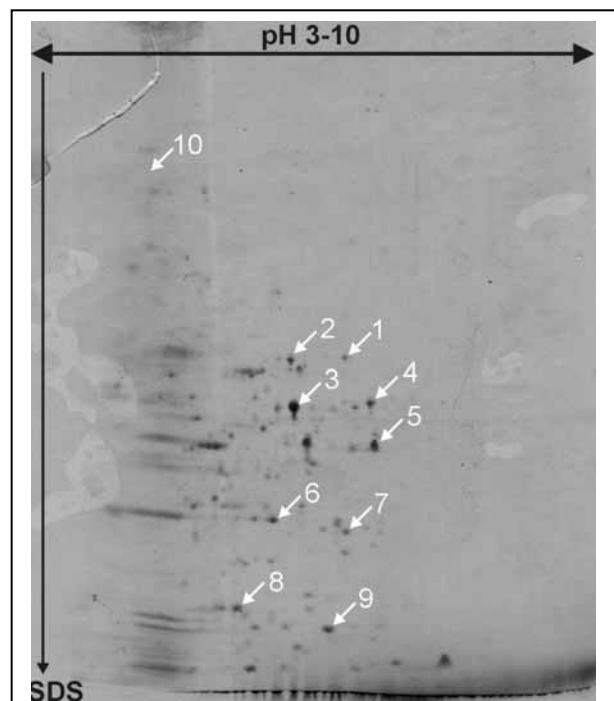
Membranproteine mit mehr als 3 Helices fast ausschließlich im pI-Bereich 9-11 lokalisiert sind (Büttner *et al.*, 2001).

#### 3.3.2 IEF-SDS Auftrennung nach Dialyse gegen Niedrigsalz

Zellen von TOM und NAOMI (letzterem fehlen die Membranproteine SRI, SRII, HtrI und HtrII) wurden parallel in der stationären Phase mittels Dialyse und differentieller Zentrifugation aufgearbeitet. Die erhaltenen Membranfraktionen (1 mg) wurden acetongefällt, im 2-D Lysepuffer (1% C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) solubilisiert und mittels in-Gel Rehydratisierung auf einen IPG-Streifen, pH 3-10, aufgetragen. Nach 45 kWh Fokussierung mit einem Einlaufgradienten wurde der Streifen auf ein 9-16%-iges SDS-Gel transferiert und anschließend Coomassie gefärbt (Abbildungen 3.26 und 3.27).



**Abb. 3.26:** Membranfraktion von TOM nach Dialyse, solubilisiert im 2-D Lysepuffer (1% C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) und zweidimensional aufgetrennt (pH 3-10, 9-16% PAA). Die Visualisierung erfolgte mittels Coomassie-Färbung.



**Abb. 3.27:** Membranfraktion von NAOMI nach Dialyse, solubilisiert im 2-D Lysepuffer (1% C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) und zweidimensional aufgetrennt (pH 3-10, 9-16% PAA). Die Visualisierung erfolgte mittels Coomassie-Färbung.

Aus dem Gel der TOM-Membranfraktion wurden 10 Spots ausgeschnitten, tryptisch gespalten und die Peptide über eine reversed-phase HPLC separiert. Diese wurden dann von der Arbeitsgruppe Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried) mittels Edmann-Sequenzierung identifiziert. Die Identifizierung der Proteine ist in Tabelle 3.3 zusammengefaßt. Das membranständige Transducerprotein HtrI (2 TMD) konnte so identifiziert werden. In der NAOMI-Membranfraktion fehlt dieses Protein erwartungsgemäß

auf dem Gel. Diese Identifizierung wurde ebenfalls mittels Immunodetektion gegen einen spezifischen Antikörper gegen HtrI bestätigt. Alle anderen identifizierten Proteine sind jedoch ribosomalen Ursprunges und stellen somit eine Kontamination der Membranfraktion dar. Diese ribosomalen Proteine sind ferner die dominantesten Proteine in so isolierten Membranfraktionen, zudem liegen die isoelektrischen Punkte der ribosomalen Proteine nicht so tief wie die anderer sichtbarer Proteine.

Spot-Nr.	OE-Name	Protein	Sequenz
1	OE3388F	ribosomal protein L3	AGEFTDAAGITK
2	OE3388F	ribosomal protein L3	KPLTEVWADDTHES
3	OE3388F	ribosomal protein L3	LYEDTPYGK
4	OE3388F	ribosomal protein L3	VGGGTLADR
5	OE3392F	ribosomal protein L2	DATIVE
6	OE3414F	ribosomal protein L18	HVTAQLVTTGPDGDE
7	OE4735R	ribosomal protein S7	DAFDIVHER
8	OE1859R	halocyanin hcpF	EYTHTFDGPTGEYNY
9	OE2632F	ribosomal protein L18.eR	YASEDETVIVPGK
10	OE3347F	transducer protein HtrI	RADLEETQAEAETAR

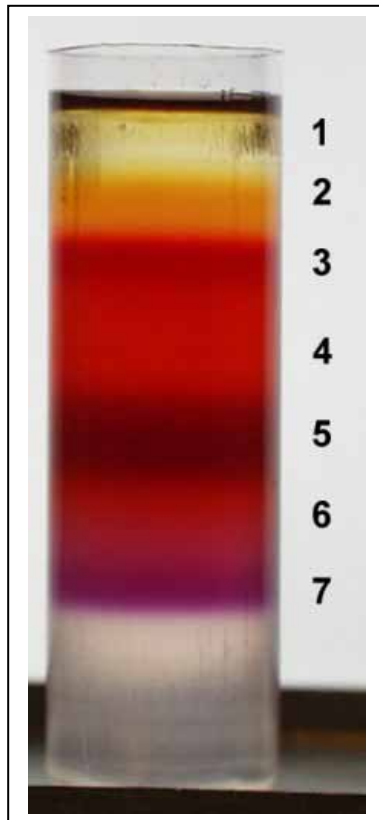
**Tab. 3.3:** Liste der mittels Edman-Sequenzierung identifizierten Proteine der TOM-Membranfraktion aus Abb. 3.26.

Das viermalige Auftreten des ribosomalen Proteins L3 (Spot 1-4) ist nur durch post-translationale Modifikationen zu erklären, da bei den Aufarbeitungen mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail gearbeitet wurde. Eine genauere Analyse der parallel aufgenommenen MALDI-Fingerprint-Spektren zeigte, dass bei Spot 1 und 4 sowohl der N-Terminus (MPQPNR, jedoch mit Methioninabspaltung) als auch der C-Terminus (YVSTASNQG) vorhanden sind, die deutliche Molekulargewichtsabweichung also nicht auf einen Protease-Einfluss zurückzuführen ist. Bei den Spots 2 und 3 konnte der N-Terminus nicht gefunden werden, und nur bei Spot 4 wurde der C-Terminus detektiert. Jedoch muss bei MALDI-Fingerprint Spektren berücksichtigt werden, dass eine gewisse Varianz der Peakwiedererkennung üblich ist, lediglich das Vorhandensein eines Peaks ein eindeutiges Ergebnis darstellt.

Eine Abreicherung der ribosomalen Proteine mittels eines diskontinuierlichen Dichtegradienten (20 und 50% Sucrose, w/w) gelang nicht, auf zweidimensionalen Gelen einer so gereinigten Membranfraktion war das gleiche Fleckenmuster zu sehen.

### 3.3.3 IEF-SDS Auftrennung von Dichtegradienten-Fractionen

Membranfraktionen lassen sich aufgrund ihres unterschiedlichen Protein-Lipid-Verhältnisses in Dichtegradienten auftrennen.



Lediglich nach einem Zellaufschluss mittels Natriumchlorid-Dialyse entstehen dabei distinkte Membranbereiche, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden.

Abbildung 3.28 zeigt die Auftrennung einer Membranfraktion von R1, dem Wildtyp von *H. salinarum*. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionen der Ruberine lassen sich die separierten Membranbereiche farblich unterscheiden. Die Bande 7, die wegen ihres hohen Protein:Lipidverhältnisses die höchste Dichte besitzt, besteht aus der Purpurmembran, deren einziges Protein Bakteriorhodopsin ist.

**Abb. 3.28:** Auftrennung der Membranbereiche einer Membranfraktion von R1 nach Zellaufschluss über Dialyse gegen 10mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und isopyknischer Zentrifugation in einem kontinuierlichen Sucrosegradienten (25% - 45%-Sucrose (w/w) in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Fraktion 7 ist die Purpurmembran, die aufgrund des hohen Protein/Lipid-Verhältnisses die unterste Bande des Dichtegradienten darstellt.

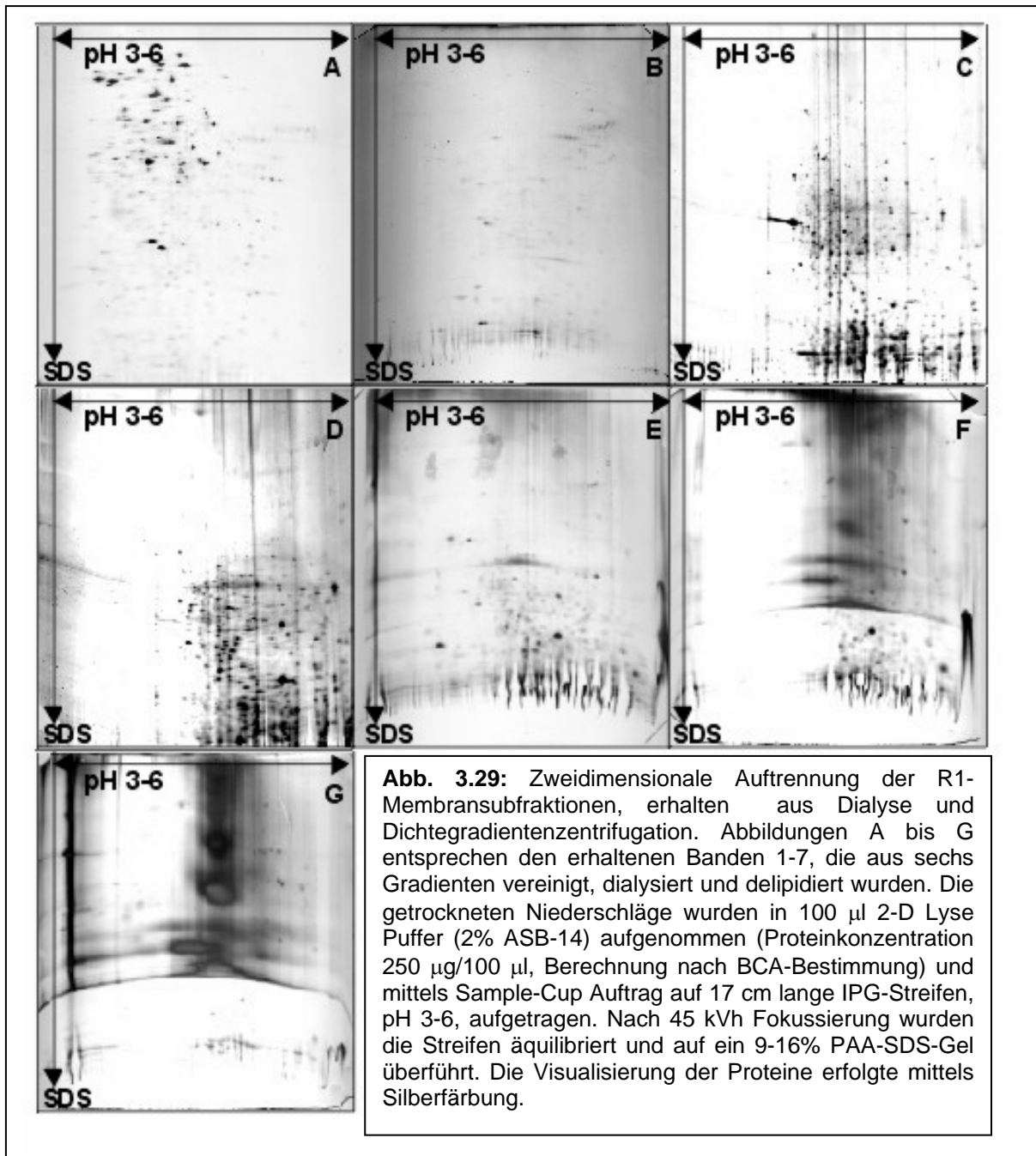
Die Fraktionen von 6 Dichtegradienten (10 Liter Kulturansatz) wurden vereinigt, gegen 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer dialysiert, mittels  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  delipidiert und im 2-D Lysepuffer solubilisiert (2%-ASB-14). Die zweidimensionale Auftrennung der Fraktionen ist in Abbildung 3.29 dargestellt.

Lediglich aus den Dichtegradienten-Fractionen 3 und 4 konnten jedoch Proteine identifiziert werden, eine Auflistung ist in Tabelle 3.4 gezeigt.

Die Bande 7, Abbildung 3.29 G, sollte nur aus Bakteriorhodopsin bestehen. In der Gelabbildung ist auch nur ein einziges Protein zu erkennen, welches neben dem Monomer in weiteren Multimeren vorliegt. Eine Identifizierung mittels MALDI-Fingerprint gelang jedoch nicht, kein Peptid nach theoretischer tryptischer Spaltung von Bakteriorhodopsin konnte mit den erhaltenen Massenpeaks korreliert werden.

Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass bei BR eine besondere Spaltungs- und Identifizierungsproblematik vorliegt. Lediglich eine in-Lösung-Spaltung mit BrCN und anschließende PSD-Messung konnten BR massenspektrometrisch zugänglich machen (vgl. Abschnitt 3.4.6).





**Tab. 3.4:** Identifizierte Proteine der mittels Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Fraktionen.

Fraktion	OE-Name	Protein	Lokalisation
3	OE1545F	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (cis-retinol dehydrogenase homolog)	-
3	OE2276F	conserved protein	-
3	OE5208R	arginine deiminase (EC 3.5.3.6)	-
3	OE4330F	probable phosphoesterase (EC 3.1.-.-)	-
3	OE4427R	DNA-binding protein dpsA	-
3	OE4721R	translation elongation factor aEF-1 alpha chain	-
3	OE4365F	protein OE4365F	-
3	OE6230R	conserved protein (nonfunctional, N-terminal part, interrupted by ISH2)	-
3	OE4551F	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	LAGC, Membran

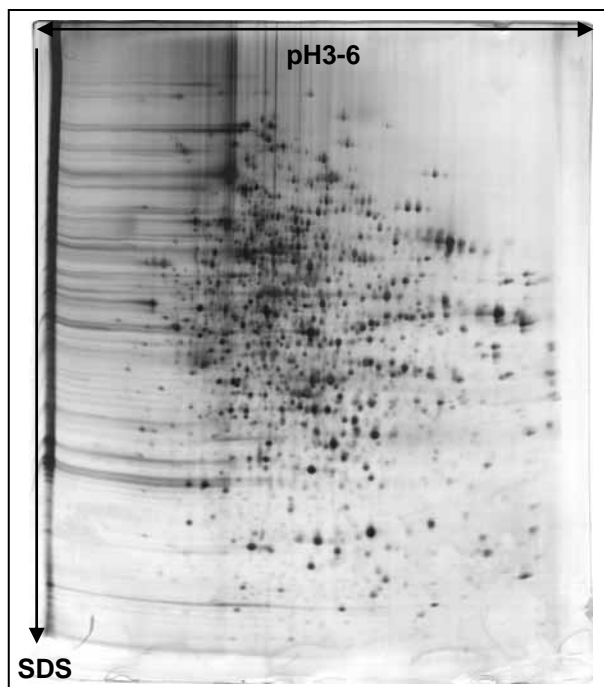
### 3. Ergebnisse

3	OE4753R	transcription regulator homolog	-
3	OE4562R	N-carbamoylsarcosine amidase homolog	-
3	OE3415F	ribosomal protein S5	-
3	OE4466R	DNA repair protein	-
3	OE2628F	ribosomal protein S4	-
3	OE3374R	protein OE3374R	-
4	OE5187R	probable hydrolase	-
4	OE3415F	ribosomal protein S5	-
4	OE2276F	conserved protein	-

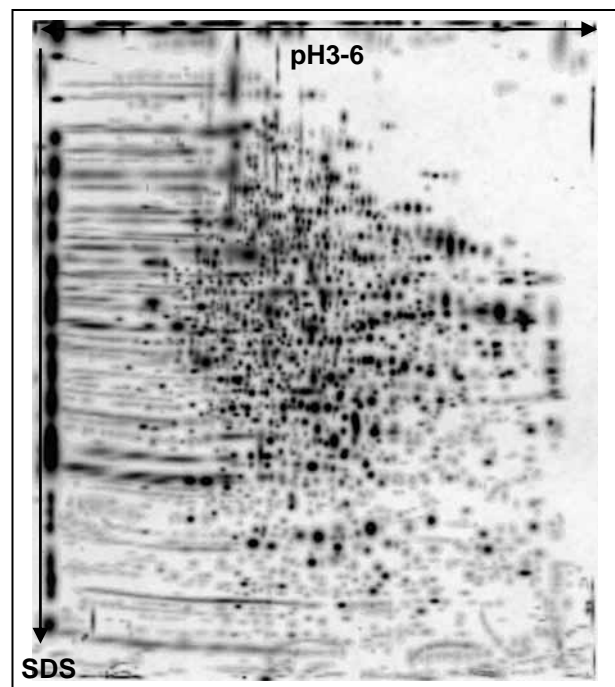
Da analog der einfachen Dialyse gegen Niedrigsalzpuffer fast ausschließlich lösliche Proteine identifiziert werden konnten (Ausnahme OE4551F, welches über einen Lipidanker mit der Membran verbunden ist), wurde diese Auftrennung nicht weiter verfolgt.

#### 3.3.4 IEF-SDS Auftrennung nach French-Press-NS

Die Verunreinigung der Gesamtmembranfraktion mit ribosomalen Proteinen konnte mittels einer Hochsalzreinigung vermieden werden. Hierbei wurden die Zellen in 1 M NaCl mittels French-Press geöffnet und die nach differentieller Zentrifugation erhaltenen Membranbereiche über einen diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten (20% und 50% Sucrose, w/w) gereinigt. Nach anschließender Dialyse gegen 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7,2 wurden die erhaltenen Membranbereiche erneut differentiell in einer Ultrazentrifuge pelletiert. Eine Übersicht der Zellaufschlüsse ist in Abschnitt 2.3.9 dargestellt.



**Abb. 3.30:** Zweidimensionale Auftrennung einer Membranfraktion nach French-Press NS, die direkt im 2-D Lyse-Puffer (1% C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) solubilisiert wurde. Weitere Aufarbeitung wie bei Abb. 3.29.



**Abb. 3.31:** Zweidimensionales Standardgel, generiert von PDQuest aus 16 Gelen von 4 Zellaufarbeitungen, die analog der Aufarbeitung des Einzelgels von Abb. 3.30 erfolgten.

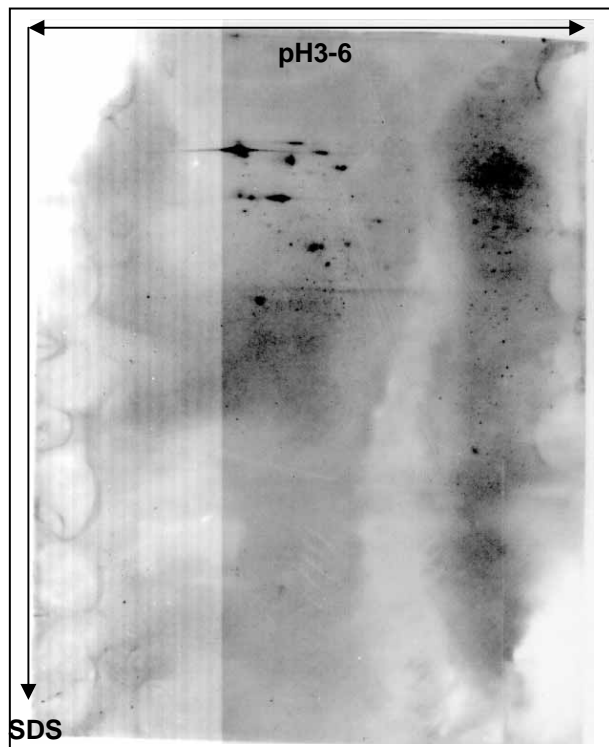
Abbildung 3.30 zeigt die zweidimensionale Auftrennung dieser Fraktion, Abbildung 3.31 ein mittels des Software-Programmes PDQuest generiertes Standardgel aus vier verschiedenen Zellaufarbeitungen mit je vier 2-D Gelen.

Vor der Generierung dieser Gelserie mussten in einer Reihe von Vorversuchen die verschiedenen Parameter der Auftrennung optimiert werden.

Die Wahl des Detergens  $C_{12}E_8$  zeigte sich als ausschlaggebend für die effektive Solubilisierung der Proteine, wohingegen u.a. mit CHAPS, dem üblicherweise bei der isoelektrischen Fokussierung benutztem Detergens, weitaus weniger Proteine auf den Gelen zu sehen waren.

Aus Versuchen zur Solubilisierungsdauer wurde eine zweistündige Solubilisierung mit viermaliger Inkubation im Ultraschallbad (30 Sekunden) ermittelt. Diese Bedingung erlaubte eine nahezu quantitative Solubilisierung der Membranproteine.

Bei den analytischen Gelen mit geringerer Proteinmenge zeigte der Auftrag mittels Sample-Cup bessere Ergebnisse als eine in-Gel Rehydratisierung, der anodale Auftrag bessere als der kathodale. Die Zugabe von 40 mM Essigsäure zur Probe vor dem Auftrag führte durch die Protonierung der Proteine zu einem besseren Einlauf der Probe in den Streifen. Dies wurde zusätzlich durch eine 11-stündige Einlaufphase mit geringeren Stromstärken unterstützt.



**Abb. 3.32:** Immunoblot gegen die konservierte Signaldomäne der Transducerproteine nach zweidimensionaler Auftrennung einer Gesamtmembranfraktion von TOM nach Abb. 3.30.

Die Zugabe von 0,5% Pharmalyten pH 3-10 (v/v) in den Rehydratisierungspuffer des IPG-Streifens führte zu der besten Spotauflösung im Vergleich zu anderen Konzentrationen (0% bis 4%) und anderem pH-Intervall (Pharmalyte pH 3-6).

In einer Reihe zur Bestimmung der Fokussierungsdauer wurden bei 3500 V Spannung die Streifen zwischen 20 kVh und 80 kVh fokussiert, die besten Ergebnisse wurden dabei zwischen 30 und 40 kVh erzielt.

Eine Identifizierung von integralen Membranproteinen gelang mittels eines Immunoblots gegen die konservierte Signaldomäne der Transducerproteine (Abbildung 3.32). Zu erkennen sind Signale,

die den apparenten Molekularmassen von 90 bis 120 kDa der Transducerproteine entsprechen. Alle Proteine sind scharf fokussiert, d.h. dass die isoelektrische Fokussierung dieser integralen Membranproteine funktioniert. Die Signale ließen sich jedoch mit keinem silbergefärbten Proteinfleck korrelieren, was folgende Ursachen haben kann:

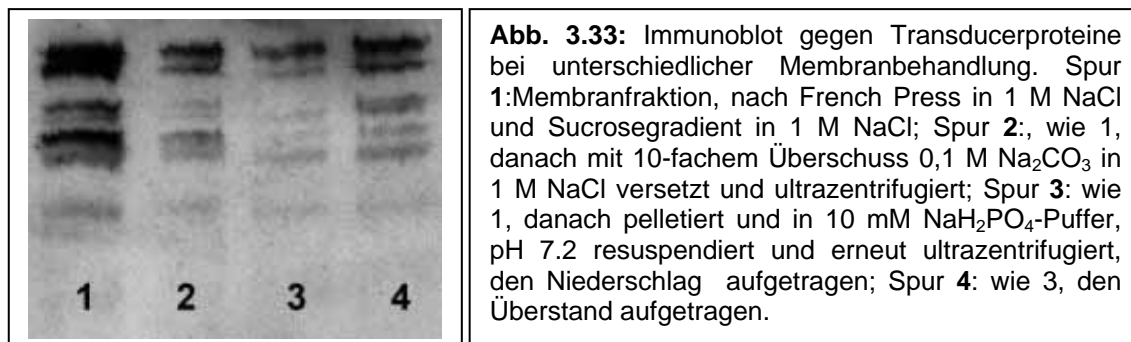
- (1) Die Transducer gehen im Rahmen der Probenpräparation weitgehend verloren
- (2) sie treten nur in geringem Umfang in die zweite Dimension über.
- (3) die Silberfärbung ist mit selektiven Verlusten verbunden.

Ferner können alle Ursachen zu dem Verlust beitragen. Es wurden daher alle vier Möglichkeiten überprüft, die Probenpräparation wird in Abschnitt 3.3.5 behandelt, der Transfer in Abschnitt 3.3.8, die Visualisierung mittels Silberfärbung in Abschnitt 3.3.14 und die MALDI-TOF Fingerprint Analyse in Abschnitt 3.4.5 und 4.3.8.

#### 3.3.5 Verlust der Transducerproteine bei Nidrigsalzbehandlung

Das geringe Vorkommen der Transducerproteine nach Zellaufschluss mittels French-Press-NS führte zu der Annahme, dass diese bei der Membranaufarbeitung verloren gehen könnten. Der Verlust der Transducerproteine wurden deshalb zu verschiedenen Zeitpunkten dieser Membranaufarbeitung, die zu einer Abreicherung der ribosomalen Proteine führte, über 1-D SDS-Gelelektrophorese überprüft.

Abbildung 3.33 zeigt einen Immunoblot gegen die Transducerproteine.



Spur 1 zeigt das Muster der Transducerproteine der unbehandelten Membranpräparation nach French-Press Aufschluss und diskontinuierlichem Sucrosegradienten. Spur 2 zeigt das Muster nach einer Behandlung mit einem Überschuss an 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 1 M NaCl und erneuter Ultrazentrifugation. Im Vergleich zur Spur 1 ist eine deutliche Abnahme der Proteine zu erkennen. Spur 3 und 4 die Proteinmuster der Membran, wenn diese in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7,2 resuspendiert und erneut ultrazentrifugiert wurde, was den Bedingungen der French-Press-NS Membranaufarbeitung entspricht. Der Niederschlag ist in Spur 3, der Überstand in Spur 4 aufgetragen. Im Vergleich der Spuren 3 und 4 ist zu erkennen, dass sich

Großteil der Transducerproteine nach Ultrazentrifugation im Überstand der Niedersalzbildung befindet.

Unter den angewandten Zentrifugationsbedingungen (174.000 g, 1 h, entsprechen bei Beckmann TLA-100.3 einem k-Faktor von 24) bedeutet dies, dass der Sedimentationskoeffizient kleiner als 24 ist, also in einer Größenordnung von Einzelproteinen liegt.

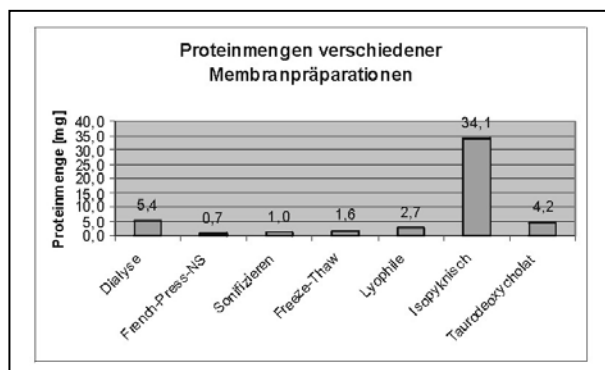
Die Tatsache, dass sich Membranbereiche unter diesen Bedingungen nicht pelletieren lassen, steht im Gegensatz zur allgemeinen Erfahrung mit Membranen, der Sedimentationskoeffizient von Plasmamembranen wird mit 10.000 bis 100.000 angegeben (Lottspeich, 1998).

Die Identifizierung von HtrI nach Zellaufschluss gegen Niedersalz (Abschnitt 3.3.2) unter gleichen Zentrifugationsbedingungen ist Gegenstand der Diskussion in Abschnitt 4.3.2.

### 3.3.6 Vergleich unterschiedlicher Membranaufarbeitungen/Präparationen

Im Vergleich der verschiedenen Zellaufschlüsse wurden bezüglich der Proteinmenge der erhaltenen Membranpräparationen deutliche Unterschiede festgestellt. Abbildung 3.34 zeigt die mittels BCA bestimmten Proteinmengen, die aus jeweils einem Liter Zellkultur mit anschließender Reinigung erhalten wurden.

Mit Ausnahme der isopyknischen Aufarbeitung bestehen alle anderen Membranpräparationen aus differentiellen Zentrifugationsschritten in Niedersalz.



**Abb. 3.34:** Proteinmengen der verschiedenen Membranpräparationen.

Eine theoretische Berechnung der Membranproteinmenge (durchgeführt in Abschnitt 4.3.3) ergibt als Maximalwert 121 mg Membranproteine pro Liter Zellkultur. Dieser Wert setzt sich aus kalkulierten Maximalwerten von 79 mg Glykoprotein, 25 mg integralen Membranproteinen und 17 mg Proteinen aus membrangebundenen Proteinkomplexen zusammen.

Diese Unterscheidung ist wiederum für die Einschätzung der Proteinmengen von Bedeutung, da in den Niedersalzschrinen die Membranproteinkomplexe dissoziieren und in den Zentrifugationsschritten (differentiell oder isopyknisch) abgetrennt werden. Das Glykoprotein kann durch differentielle Zentrifugation in Niedersalz von den Membranen abgetrennt werden (Oesterhelt und Stoeckenius, 1973), mit einem Molekulargewicht von 89.700 und nur einer Transmembranhelix sollte es auch aufgrund des niedrigen Lipid:Proteinverhältnisses bei der isopyknischen Aufarbeitung nicht mehr in der Membranfraktion enthalten sein. Somit

liegt der theoretische Maximalwert der Niedrigsalzaufarbeitungen bei 25 mg integralen Membranproteinen (ausschließlich des Glykoproteins).

Im Gegensatz zu den theoretischen Berechnungen liegen die experimentell gefundenen Werte der Membranproteine nach differentieller Niedrigsalz-Zentrifugation zwischen 0,66 mg (French-Press-NS) und 5,4 mg (Dialyse). Auch wenn die experimentelle Bestimmung (BCA-Methode) mit vielen Fehlern verbunden ist (vor allem Lipide, Glykosilierung), zeigt sie dennoch deutlich die durch Inkubation in Niedrigsalz verbundenen Verluste. Die isopyknische Aufarbeitung und die Taurodeoxycholataufarbeitungen unterscheiden sich lediglich durch einen Verzicht von differentiellen Zentrifugationsschritten in Niedrigsalz. Durch den direkten Vergleich von differentieller und isopyknischer Zentrifugation in Niedrigsalz konnte quantitativ gezeigt werden, dass neben den Transducerproteinen nahezu 90% der Membranproteine bei differentieller Zentrifugation in Niedrigsalz in den Überständen verbleiben. Diese Niedrigsalz-Inkubation wurde daher in den weiteren Aufarbeitungen vermieden, stattdessen wurde eine Aufarbeitung in Hochsalz (1 M NaCl) etabliert (French-Press HS).

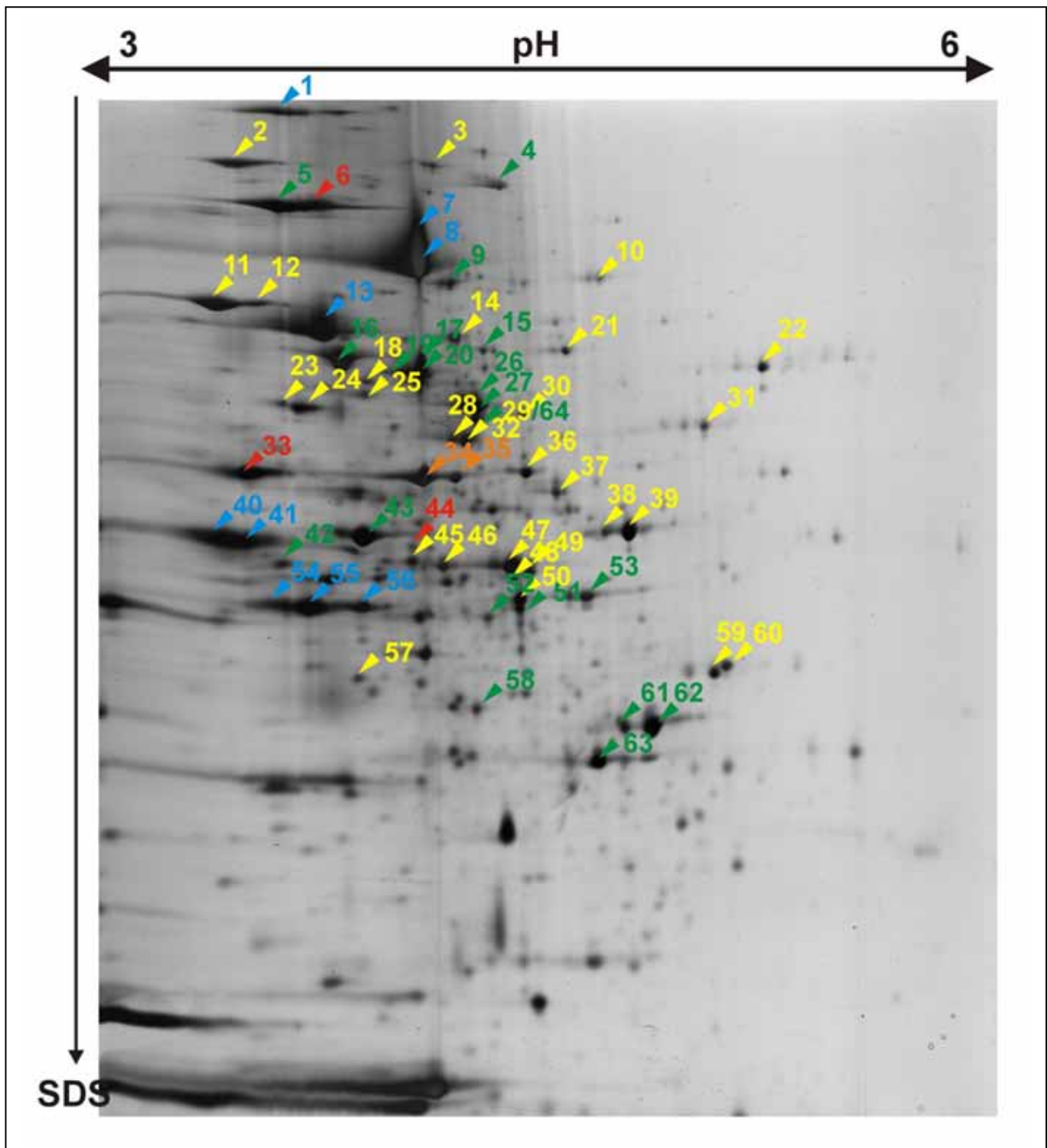
#### 3.3.7 IEF-SDS Auftrennung nach French-Press-HS

Mehrfache Dialyseschritte beim isopyknischen Zellaufschluss führen jedoch aufgrund von Oberflächenadsorptionen zu Verlusten von hydrophoben Membranproteinen.

Es wurde deshalb mit einem Zellaufschluss mittels French-Press gearbeitet, bei dem die Niedrigsalzschritte durch weitere Hochsalzschritte ersetzt wurde (French-Press-HS).

Als eine weitere Variation wurde zur Solubilisierung der mittels  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  delipidierten Proteine eine Detergenzienmischung aus 1% ASB-14 und 1% Triton X-100 benutzt. Die Solubilisierung wurde zudem mittels 30 sekundiger Sonifizierung mit einem Mikrotip unterstützt. Diese Kombination führte nach zweidimensionaler Auftrennung zu den meisten detektierbaren Proteinflecken.

Abbildung 3.35 zeigt die erhaltene Auftrennung nach Fokussierung im pH Intervall 3-6 und SDS-Größenauftrennung. Rote Pfeile an den Spots entsprechen identifizierten Proteinen mit mehr als 1 TMD, orange mit 1 TMD, blaue mit einem vorhergesagtem Lipidanker, grüne Proteinen aus Membrankomplexen und gelbe löslichen/unbekannten Proteinen.



**Abb. 3.35:** Zweidimensionales Auftrennung der Membranfraktion von *H. salinarum* nach French-Press-HS und Delipidierung mittels  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ . Die Solubilisierung erfolgte im 2-D Lyse-Puffer (1%ASB-14, 1% Tx-100), die Auftrennung wie in Abb. 3.29 beschrieben. Rote Pfeile an den Spots entsprechen Proteinen mit mehr als 1 TMD, orange mit 1 TMD, blaue mit einem vorhergesagten Lipidanker, grüne Proteinen aus Membrankomplexen und gelbe löslichen/unbekannten Proteinen. Die Liste der identifizierten Spots ist in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Die Liste der identifizierten Spots ist in Tabelle 3.5 aufgeführt.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 3.5:** Identifizierte Membranproteine der zweidimensionalen Auftrennung (IEF/SDS) aus Abbildung 3.35, geordnet nach TM/LAGC-Motiv und GRAVY.

Spot No.	CODE	T M	GRA VY	MW	pI	Protein-Name	Status	Lokali sation
44	OE2042F	7	0,29	87666	4,2	probable copper-transporting ATPase (EC 3.6.1.-)	insecure	TMD
33	OE3991	7	0,17	77159	4,3	H <sup>+</sup> transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain I.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	insecure	TMD
6	OE3347F	2	-0,4	56659	4,1	transducer protein htrl	trusted	TMD
25	OE1133F	1	-0,12	39089	4,2	protein OE1133F	trusted	TMD
34, 35	OE1490R	1	-0,34	42654	4,2	conserved protein	trusted	TMD
40, 41	OE3910R	0*	-0,18	33687	4,1	probable ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	trusted	L
1	OE1391R	0*	-0,19	82112	4,2	halocyanin hcpG	trusted	L
51	OE3629R	0*	-0,22	41700	4,6	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	trusted	L
54, 55	OE2317R	0*	-0,27	36432	4,2	probable ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (membrane lipoprotein tmpC homolog)	trusted	L
56	OE4357F	0*	-0,39	38642	4,3	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	insecure	L
13	OE4551F	0*	-0,45	61874	4,2	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	trusted	L
7, 8	OE4305R	0*	-0,59	68944	4,4	ABC-type dipeptide transport system periplasmic dipeptide-binding protein	trusted	L
31	OE1856R	0	0,13	40530	4,9	probable pantothenate metabolism flavoprotein	insecure	
63	OE3717F	0	0,12	31645	4,7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) 32K chain	insecure	MC
45	OE3971R	0	0,09	30256	4,2	parA domain protein	trusted	Mprep
60	OE2816F	0	0,04	30271	5,4	protein OE2816F	trusted	Mprep
42	OE1994F	0	0,02	30591	4,1	probable ABC-type transport system ATP-binding protein	trusted	MC
52	OE4359F	0	0,01	36099	4,5	ABC-type transport system ATP-binding protein	insecure	MC
47, 48, 59, 60	OE5187R	0	-0,01	34593	4,5	probable hydrolase	trusted	Sol
43	OE4339R	0	-0,04	31835	4,2	ABC-type transport system ATP-binding protein	trusted	MC
59	OE1545F	0	-0,06	28889	4,8	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (cis-retinol dehydrogenase homolog)	trusted	Sol
21	OE2190R	0	-0,07	47351	4,6	aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.-) (succinate-semialdehyde dehydrogenase homolog)	insecure	Mprep
36	OE3764F	0	-0,07	43934	4,5	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.99.5) chain B	trusted	Mprep
46	OE5142F	0	-0,12	37740	4,3	cell division protein ftsZ5	trusted	Sol
22	OE1808F	0	-0,14	45620	5,1	probable phytoene dehydrogenase (EC 1.14.99.-) 3 (alternative EC 1.3.-.-)	trusted	Sol
58	OE2026F	0	-0,14	30830	4,4	ABC-type transport system ATP-binding protein	insecure	MC
15	OE2316R	0	-0,16	54527	4,4	ABC-type transport system ATP-binding protein	trusted	MC
17, 19, 20	OE2307F	0	-0,18	41685	4,2	NADH dehydrogenase homolog	trusted	MC
38, 39	OE4508R	0	-0,19	36925	4,7	dihydroorotate oxidase (EC 1.3.3.1)	trusted	Sol
23, 24	OE1559R	0	-0,2	41176	4,1	cell division protein ftsZ1	trusted	Sol



64	OE3533F	0	-0,21	48291	4,4	probable protoporphyrinogen oxidase (EC 1.3.3.4)	insecure	Mprep
18	OE2728R	0	-0,23	45326	4,2	glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.-)	trusted	Sol
30	OE1270F	0	-0,27	45961	4,5	glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.-)	insecure	Sol
29	OE3718F	0	-0,27	42039	4,3	cell division protein	insecure	Sol
3	OE4613F	0	-0,27	71060	4,3	aconitate hydratase (EC 4.2.1.3)	insecure	Sol
14	OE3468R	0	-0,28	56333	4,4	phytoene dehydrogenase (EC 1.14.99.-) (phytoene desaturase) 2 (alternative EC 1.3.-.-)	trusted	Sol
10	OE3763F	0	-0,33	61344	4,6	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.99.5) chain A	trusted	Mprep
5	OE3985R	0	-0,34	64217	4,1	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain A.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	trusted	MC
37	OE1699R	0	-0,35	45115	4,5	oxidoreductase (EC 1.-.-.-) (geranylgeranyl hydrogenase homolog)	trusted	Mprep
4	OE3112R	0	-0,35	82139	4,4	AAA-type ATPase (transitional ATPase homolog)	insecure	MC
28, 32	OE4721R	0	-0,35	45478	4,4	translation elongation factor aEF-1 alpha chain	trusted	Sol
50	OE3955F	0	-0,36	30999	4,4	probable proline dehydrogenase (EC 1.5.99.8)	trusted	Sol
16	OE3984R	0	-0,38	51946	4,1	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain B.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	trusted	MC
11, 12	OE2149R	0	-0,4	45917	4,1	protein OE2149R	trusted	Sol
57	OE2602R	0	-0,42	23075	4,1	ribosomal protein L1	insecure	Sol
26, 27	OE2865R	0	-0,48	66870	4,5	succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) chain A (flavoprotein)	trusted	MC
2	OE1737R	0	-0,5	67381	4,1	dnaK-type molecular chaperone hsp70	trusted	Sol
9	OE1956F	0	-0,51	63429	4,3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain CD	trusted	MC
61, 62	OE1876R	0	-0,54	29989	4,6	probable menaquinol--cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.-) (cytochrome bc complex) Rieske iron-sulfur protein (ubiquinol--cytochrome-c reductase (cytochrome bc1 complex) Rieske iron-sulfur protein homolog)	trusted	MC
53	OE2866R	0	-0,8	33665	4,6	succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) chain B (iron-sulfur protein)	insecure	MC

(Anmerkung zu Tab. 3.5: Ein \* in der TM-Spalte bedeutet ein vorhandenes LAGC-Motiv. In der Lokalisierungsspalte werden die Proteine folgendermaßen gegliedert: TMD: vorhergesagte TMD, L: vorhergesagter Lipidanker, MC: Untereinheit in einem membranständigen Komplex, Mprep: Protein wurde ausschliesslich in Membranpräparationen identifiziert, Sol: Identifizierung auch in cytosolischen Präparationen.)

Die Identifizierung der Proteine führte zu dem Ergebnis, dass eine Vielzahl von Membranproteinen aufgetrennt werden konnte. Hierbei handelt es sich bei den meisten Proteinen um lösliche Untereinheiten von Membrankomplexen und Proteinen mit einem Lipidanker-Motiv (N-terminales LAGC-Motiv, bei dem ein Lipid an das Cystein gebunden ist (Hayashi und Wu, 1990), bei Archaea vermutlich ein Glyceroldiphytanol diether (Mattar *et al.*, 1994). Es konnten zudem 5 integrale Membranproteine identifiziert werden: Spots 44 (kupfertransportierende ATPase, 7 Helices), 33 (H<sup>+</sup>-ATPase, 7 Helices) und 6 (HtrI, 2

### 3. Ergebnisse

Helices). Bei den Spots 34 und 35 (OE1490R) ist eine Transmembranhelix mittels TMHMM vorhergesagt.

Bemerkenswert ist der Hydrophatie-Wert von +0,29 der kupfertransportierenden ATPase (vgl. Abschnitt 1.7). Diese Identifizierung stellt das bisher hydrophobste Protein dar, welches auf einem IEF/SDS-Gel bei Prokaryoten überhaupt gefunden wurde.

Weiterhin ist von Bedeutung, dass es sich bei den Proteinflecken mit höchster Signalintensität bei der Silberfärbung fast ausschliesslich um ABC-Transporter handelt (Spots 7+8, 13, 16, 34+35, 40+41, 54+55).

Die Gesamtzahl der detektierbaren Proteinflecken ist zwar deutlich geringer als beim Zellaufschluss French-Press-NS (Abbildung 3.30 und 3.31), jedoch ist die Membranfraktion French-Press-HS nur von einer geringen Anzahl löslicher Proteine kontaminiert, was durch die Identifizierung von 50 Proteinen gezeigt wurde. Die Proteine wurden in folgende Klassen (letzte Spalte in Tabelle 3.5) eingeteilt:

**Tab. 3.6:** Einteilung der Identifizierte Proteine aus Tab. 3.5

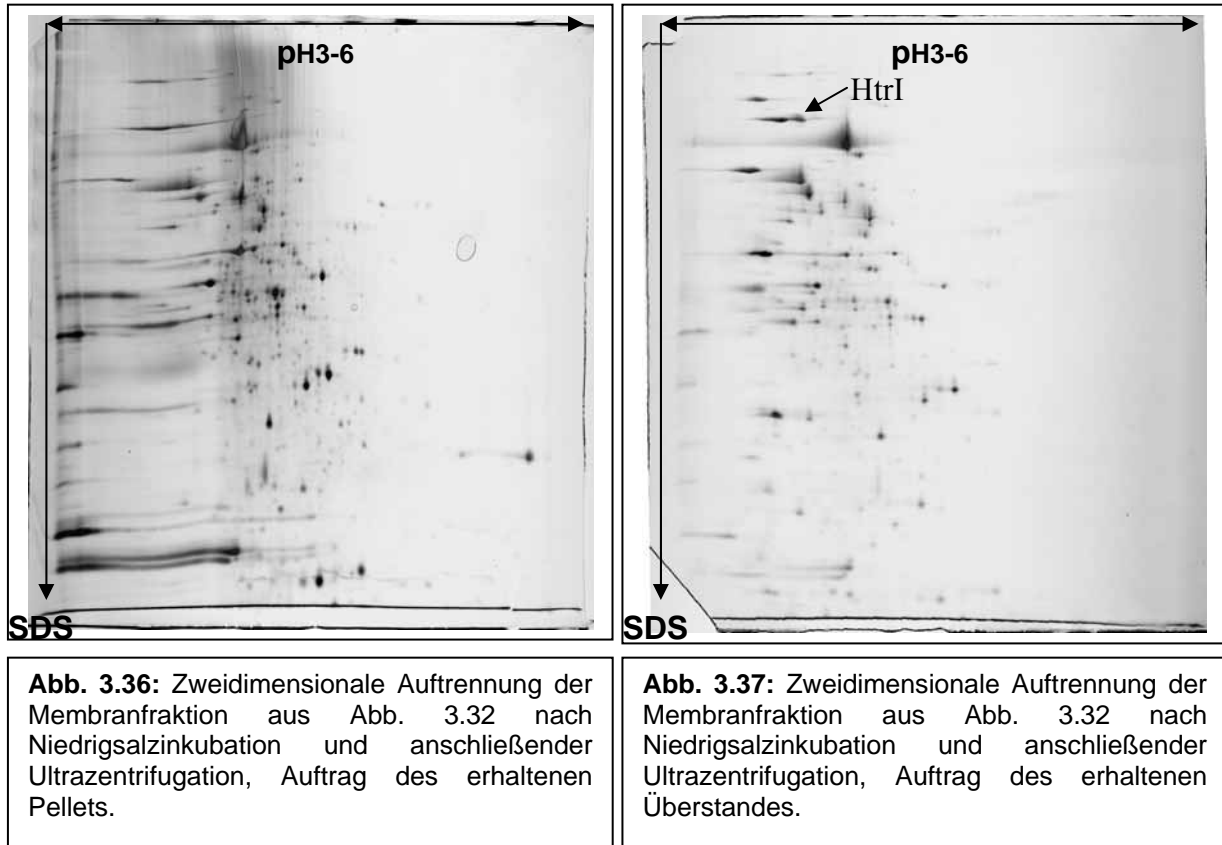
<b>Proteinklasse</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Anzahl</b>
<b>I</b>	vorhergesagte TMD	5
<b>L</b>	vorhergesagter Lipidanker	7
<b>MC</b>	Untereinheit in einem membranständigen Komplex	14
<b>Mprep</b>	Protein wurde ausschliesslich in Membranpräparationen identifiziert	8
<b>Sol</b>	Identifizierung auch in cytosolischen Präparationen	16

Lediglich 16 der insgesamt 50 identifizierten Proteine (32%) sind nach dieser Einteilung als Kontamination der Membranpräparation zu betrachten, wohingegen bei den vorherigen Präparationen kaum Membranproteine gefunden wurden. Andererseits konnten von den insgesamt ausgeschnittenen 192 Spots lediglich 25% identifiziert werden.

Eine genauere Analyse der über MALDI-MS-Fingerprint identifizierten Peptide zeigte, dass bei den integralen Membranproteinen lediglich Peptide der terminalen bzw. Henkelbereiche gefunden wurden.

Die Abreicherung von Membranproteinen durch die Niedrigsalzbehandlung ist in den Abbildungen 3.36 und 3.37 dargestellt. Hierbei wurde ein Aliquot der in Abbildung 3.35 gezeigten Fraktion pelletiert, in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer aufgenommen und erneut ultrazentrifugiert.

Abbildung 3.36 zeigt das Elektropherogramm des Niederschlages, Abbildung 3.37 des Überstandes. Das in Abbildung 3.35 identifizierte HtrI ist deutlich im Überstand zu erkennen. Die zweidimensionale Auftrennung bestätigt somit den über Immunoblot nachgewiesenen Verlust des Transducerproteins HtrI (vgl. Abb. 3.33).



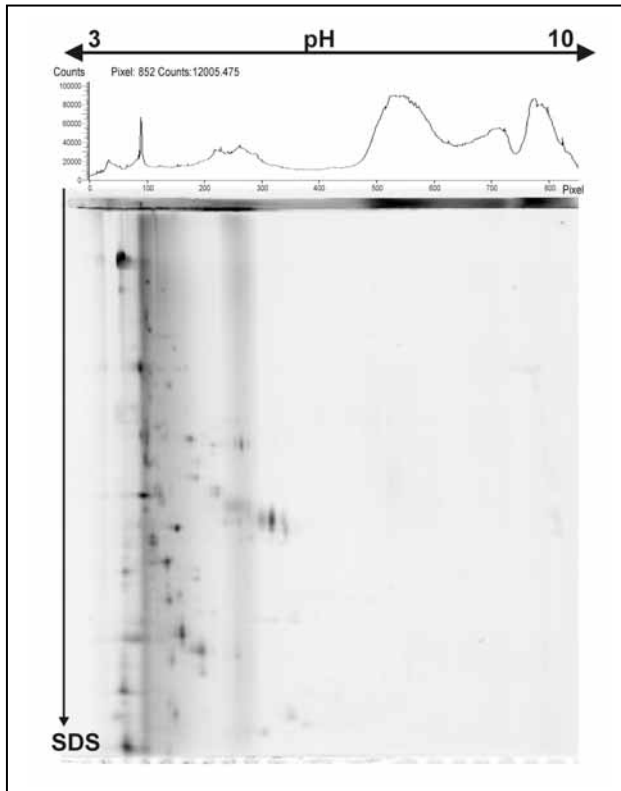
Obwohl eindeutig nachgewiesen wurde, dass Membranproteine während der Probenpräparation verloren gehen, konnten in dem optimierten Ansatz nur sehr wenig integrale Membranproteine identifiziert werden. Es wurde daher der Transferschritt in die zweite Dimension als weitere Verlustquelle untersucht.

### 3.3.8 Verlust von Membranproteinen beim IEF-SDS-Transfer

Eine weitere Möglichkeit des Verlustes an Membranproteinen stellt der Transfer von der IEF- in die SDS-Dimension dar. Es ist allgemein bekannt, dass die Löslichkeit von Proteinen an ihrem pI am geringsten ist, wodurch es dort besonders leicht zu Präzipitationen kommt. Bei löslichen Proteinen wird die Präzipitation entweder durch die chaotrope Umgebung im Harnstoff/Thioharnstoff-Puffer verhindert oder aber eventuell präzipitierte Proteine werden durch die anschließende SDS-Inkubation wieder in Lösung gebracht. Die Präzipitation von Membranproteinen ist hingegen irreversibel, wie in Abbildung 3.38 dargestellt ist.

Die Abbildung zeigt die Fraktion aus Abbildung 3.35, die jedoch vor der Fokussierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy<sup>TM</sup>5 (Amesham Biosciences) markiert wurde. Dieser Farbstoff emittiert bei einer Wellenlänge von 665 nm, so dass die Eigenfluoreszenz der Folie des IPG Streifens nicht stört. Bei der Dokumentation wurden sowohl das SDS-Gel als auch der noch aufliegende Streifen zur Fluoreszenz gebracht.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.38:** Fluoreszenz-markierte Membranfraktion nach IEF und SDS. Der IEF-Streifen wurde bei der Visualisierung auf dem Gel belassen. (Negativdarstellung, fluoreszierende Bereiche dunkel).

Neben den zu erwartenden Spots auf dem SDS-Gel sind in weit höherem Maß Fluoreszenzsignale im IPG-Streifen zu detektieren. Diese treten zudem in distinkten Bereichen auf. Während im sauren Bereich eine gewisse Migration zur SDS-Gelkante auftritt, sind im schwach basischen Bereich zwischen pH 7 und 8 und im Bereich zwischen 9 und 10 offensichtlich irreversibel präzipitierte und damit immobilisierte Proteine vorhanden.

Dieses Ergebnis dokumentiert das Hauptproblem im IEF/SDS-Trennsystem: Unter optimierten Bedingungen der Membrangewinnung und Solubilisierung fokussieren die Membranproteine, können aber nach deren Präzipitation am pI anschließend kaum noch resolubilisiert werden.

Folgende Versuche zur Solubilisierung nach der Fokussierung wurden daher unternommen:

1. Erhöhung der SDS-Konzentration im Äquilibrationsschritt von 2% auf 4%
2. Schrittweise Erniedrigung der Harnstoffkonzentration von 6 M auf 0 M bei gleichbleibender SDS-Konzentration
3. Äquilibration der Streifen bei 0 M Harnstoff und 4% SDS bei 60°C
4. Äquilibrieren der Streifen bei 6 M Harnstoff, 4% SDS im Ultraschallbad
5. Zugabe von 30% Trifluorethanol zum Äquilibrationspuffer
6. Zugabe von 500 mM NaCl zum Äquilibrationspuffer
7. Äquilibrieren der Streifen in 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 1% BAC, pH 2,1 (SDS fällt in Guanidiniumhydrochlorid als Guanidiniumdodecylsulfat aus, nicht aber das kationische Detergens BAC)

Bei keiner dieser Bedingungen konnten jedoch Spots im basischen Bereich mittels Silberfärbung detektiert werden. Dies führt zu der Folgerung, dass die Präzipitation der integralen Membranproteine irreversibel ist und somit das klassische IEF/SDS-System für die Auftrennung von integralen Membranproteinen nicht nutzbar ist.

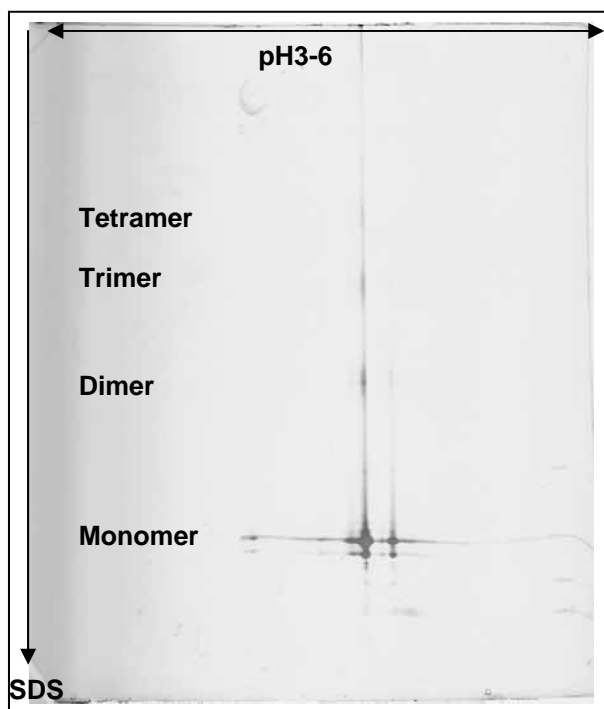
### 3.3.9 IEF in Agarose-Matrix

Die Matrix des IPG-Streifens besteht aus hydrophoben Acrylamid und Acrylamid-Derivaten, deren hydrophobe Interaktionen mit Membranproteinen beschrieben sind (Rimpilainen und Righetti, 1985; Righetti *et al.*, 1987).

Um eine mögliche Bindung der Membranproteine mit der Acrylamidmatrix auszuschließen, wurde eine Fokussierung in flüssiger Agarose erprobt. Ein Gemisch aus 6 M Harnstoff, 1 M Thioharnstoff und gelöster Agarose bleibt bei Raumtemperatur flüssig, verfestigt sich beim Abkühlen auf 4°C und behält bei anschließender Temperaturerhöhung auf Raumtemperatur seine feste Konsistenz.

Der pH-Gradient wird bei dieser Methode mittels Ampholyten generiert, die sich im elektrischen Feld nach ihrem pI ausrichten. In einem Vorversuch wurden pI-Farbmarker eingesetzt, um einen Eindruck von der zum Aufbau des pH-Gradienten benötigten Fokussierdauer zu gewinnen, die in flüssiger Agarose deutlich kürzer sein sollte als in einer Acrylamid-Matrix. Bei einer angelegten Spannung von 1200 V war bereits nach 4 kWh keine Bandenmigration mehr zu verzeichnen.

Abbildung 3.39 zeigt den erfolgreichen Versuch, Bakteriorhodopsin (solubilisiert in 1% Triton X-100, 6 M Harnstoff, 1 M Thioharnstoff) nach kathodalem Auftrag im pH-Intervall 3-6 zu trennen und anschließend in die SDS-Dimension zu transferieren.



**Abb. 3.39:** Zweidimensionale Auftrennung von 5 µg Bakteriorhodopsin in flüssiger Agarose und Transfer in die SDS-Dimension, Visualisierung mittels Silberfärbung.

Zu erkennen sind zwei monomere Spotpaare, die sich in pI und Größe geringfügig unterscheiden, sowie ein Dimer, Trimer und Tetramer des dominanteren Spotpaares.

Die eingesetzte Menge von 5 µg und die mittels Silberfärbung detektierte Menge, die nach eigener Abschätzung ungefähr zwischen 50 und 100 ng liegt, deuten ebenfalls auf einen Verlust im Transferschritt hin. Unter Berücksichtigung der Verteilung der Proteinmenge in die verschiedenen Isoformen ergibt sich ein Verlust von mindestens 2 Größenordnungen.

### 3. Ergebnisse

Bezüglich eines komplexen Proteingemisches folgt daraus, dass ein detektierbares Protein (Detektionslimit der massenkompatiblen Silberfärbung ungefähr 10 ng) mindestens in einer Menge von 1 µg vorhanden sein muss.

Analog der Fluoreszenz-Markierung (Abbildung 3.38) sind auch bei dem Agarose-Transfer Signale an der Gelkante zu detektieren, welche hier jedoch eindeutig Bakteriorhodopsin zugeordnet werden können.

Eine Membranfraktion (250 µg) unter diesen Bedingungen zu trennen führte, entsprechend oben genannter Erwartungen, zu keinen sichtbaren Spots.

In einem weiteren Versuch wurde eine Auftrennung in Acrylamid-Gelen mit freien Ampholyten versucht (Klose-Gele). Jedoch zeigte sich bereits in Vorversuchen mit Farbmakern, dass der ausgebildete Gradient im sauren und basischen Bereich nicht stabil war.

Die bisherige Summe der Verluste von integralen Membranproteinen besteht somit aus den Verlusten bei Nidrigsalzbehandlung und Verlusten im Transferschritt der ersten zur zweiten Dimension.

Eine effektivere Solubilisierung von pI-aufgetrennten Membranproteinen sollte in einer matrixfreien Umgebung möglich sein. Die dafür erforderliche matrixfreie Auftrennung kann mittels der trägerfreien Free-Flow Elektrophorese erreicht werden.

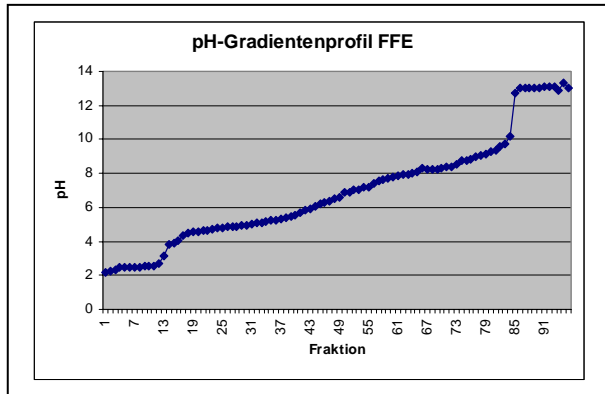
#### 3.3.10 IEF mittels Free-Flow Elektrophorese

Eine weitere Möglichkeit der trägerfreien isoelektrischen Fokussierung stellt die Free-Flow Elektrophorese dar. Bei dieser werden Proteine innerhalb eines Flüssigfilms mit konstantem Fluss nach ihrem pI getrennt und in 96 Fraktionen gesammelt. Das pH-Profil wird bei dieser Methode innerhalb einer 50 cm langen Trennstrecke mittels Ampholyten aufgebaut. Von insgesamt sieben Einlässen des Mediumstroms stellen die beiden äußeren die Elektrodenstabilisierung dar (vgl. Abschnitt 2.3.8.4).

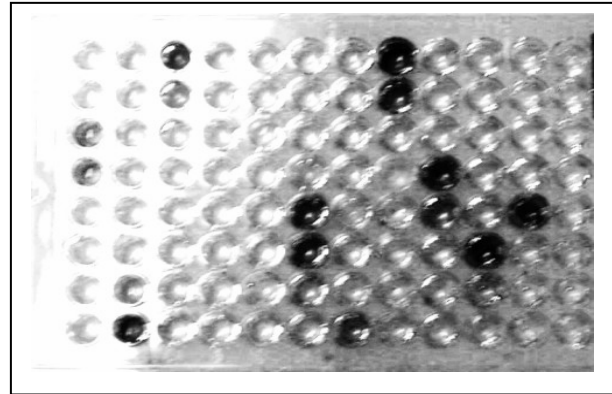
Abbildung 3.40 zeigt das gemessene pH-Profil der 96 Auslassfraktionen.

Zwischen den je 13 Fraktionen umfassenden Randstabilisierungen (Fraktionen 1-13 und 84-96) ist ein lineares pH-Profil zu erkennen, in dem sich die Proteine gemäß ihrem pI trennen.

Als Kontrolle für die Trennschärfe wurden in weiteren Versuchen pI-Farbmakern (SPADNS, 4,0, 5,3, 6,4, 7,5, 8,5, 10,1) zugegeben. Diese trennten sich innerhalb von 1-3 Auslassfraktionen auf (Abbildung 3.41).

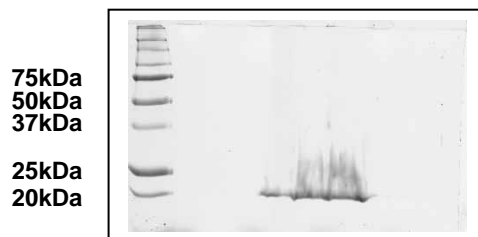


**Abb. 3.40:** pH-Gradientenprofil der FFE in Harnstoff/HPMC-Medium mit Randstabilisierung, siehe Abschnitt 2.3.8.4. Zu erkennen ist ein linearer pH-Gradient zwischen den Randstabilisierungen Fraktionen 1-13 und 84-96).



**Abb. 3.41:** pI-Marker Fraktionierung mittels FFE in Glycerin/HPMC Medium mit Randstabilisierung, siehe Abschnitt 2.3.8.4. Die pI-Marker sind in 1-3 Fraktionen aufgetrennt.

In einem Glycerolmedium bleibt das in Triton X-100 solubilisierte Bakteriorhodopsin in seiner nativen Struktur erhalten und die Auftrennung kann so visuell verfolgt werden.



**Abb. 3.42:** Auftrag von 9 nebeneinanderliegenden Fraktionen mittels FFE fokussiertem BR (12.5% PAA).

Das BR-Solubilisat wurde 1:10 mit dem Trennmedium verdünnt und mittels des Mediumeinlasses 5 in die Trennkammer überführt. Als Kontrolle zur Trennschärfe wurden die umliegenden Fraktionen neben der visuell sichtbaren Fraktion auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach Elektrophorese Coomassie gefärbt. Abbildung 3.42 zeigt das auf nur 3 Fraktionen verteilte Bakteriorhodopsin.

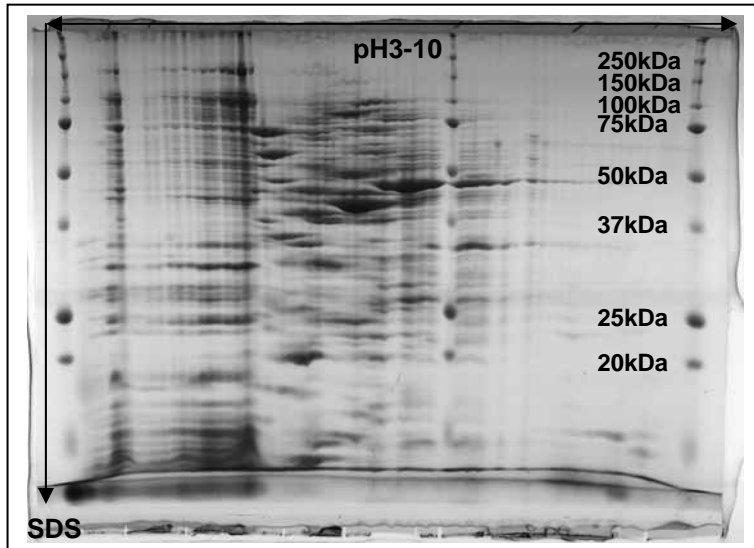
Um die Trennschärfe über den gesamten pH-Bereich zu überprüfen, wurde das Cytosol von *E. coli* unter den denaturierenden Bedingungen, die den späteren Parametern einer Membranauftrennung möglichst nahe kommen sollten, aufgetrennt. Das mittels French-Press gewonnene *E. coli* Cytosol wurde mittels Aceton gefällt und in 7,2 M Harnstoff, 2% CHAPS solubilisiert.

In einem weiteren Versuch wurde eine mittels Sonifizierung und Dichtegradientenzentrifugation gewonnene Membranfraktion von *H. salinarum* in 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff und 1% Dodecylmaltosid solubilisiert.

Beide Fraktionen wurden über einen externen Probenzulauf auf der kathodischen Seite der Apparatur zugegeben und bei 1000 V Spannung innerhalb von 23 Minuten aufgetrennt.

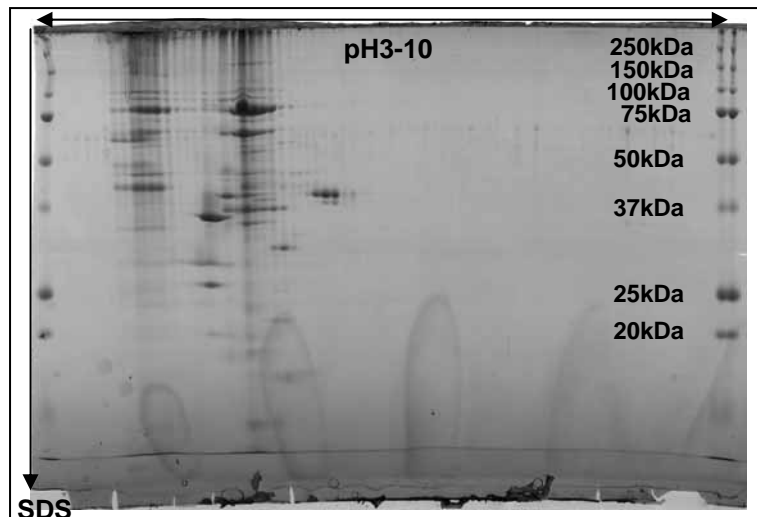
Abbildung 3.43 und 3.44 zeigen die SDS-Auftrennungen der beiden Proben nach Acetonfällung aller im Trennbereich liegenden Fraktionen.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.43:** *E. coli* Cytosol (1 mg) nach FFE-isoelektrischer Fokussierung im pH Intervall 3-10 und SDS-Auftrennung der erhaltenen Fraktionen. Nach Zerstörung des HPMC wurden die Fraktionen zur Entfernung des Harnstoffes mit Aceton gefällt und zweimal mit 50% Aceton gewaschen. Auftrag der Fraktionen 10 bis 80 von links nach rechts auf ein 12.5% SDS-PAA-Gel, Visualisierung mittels Coomassie.

**Abb. 3.44:** *H. salinarum* Membranfraktion (1 mg) nach FFE-isoelektrischer Fokussierung im pH Intervall 3-10 und SDS-Auftrennung der erhaltenen Fraktionen. Nach Zerstörung des HPMC wurden die Fraktionen zur Entfernung des Harnstoffes mit Aceton gefällt und zweimal mit 50% Aceton gewaschen. Auftrag der Fraktionen 10 bis 80 von links nach rechts auf ein 12.5% SDS-PAA-Gel, Visualisierung mittels Coomassie.



Aus Vorversuchen hat sich gezeigt, dass das im Trennmedium enthaltenen HPMC den Probenauftrag stört, es jedoch durch Zugabe von 2% Ameisensäure und fünfminütiger Inkubation im Ultraschallbad zerstört werden kann.

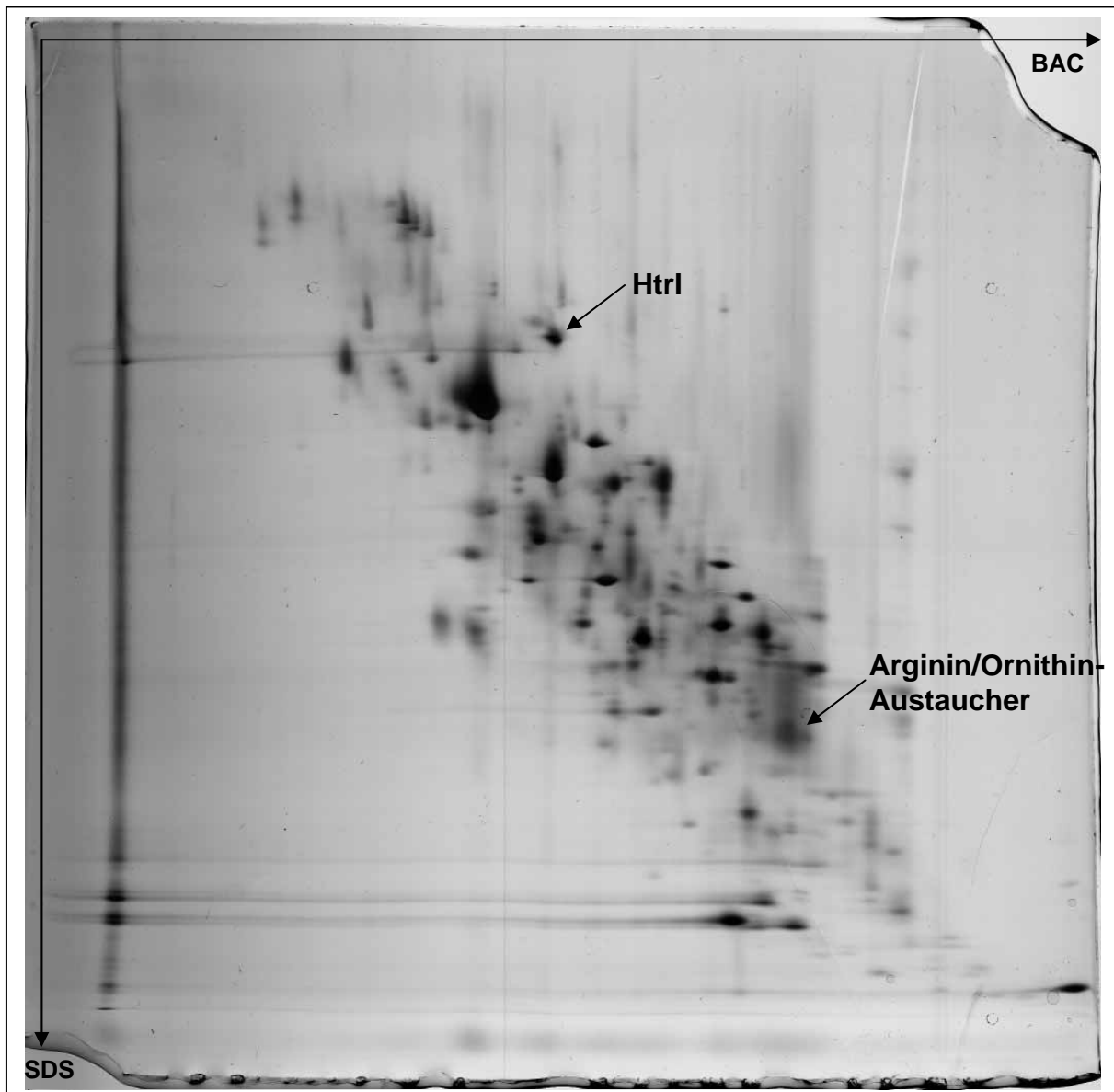
Sowohl in der Auftrennung des *E. coli* Cytosols als auch bei der Membranfraktion von *H. salinarum* sind die Fraktionierungen nicht optimal. Bei beiden Trennungen verteilen sich gerade die höhermolekularen Proteine auf teilweise mehr als acht Fraktionen. Ebenso zeigt der basische Bereich bei den zwei dargestellten Auftrennungen kaum Proteine. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in keinem der pI-abhängigen Verfahren (IPG-IEF, Abschnitt 3.3.7 - 3.3.8, Agarose IEF, Abschnitt 3.3.9 und Free-Flow Elektrophorese) eine quantitative Auftrennung von integralen Membranproteine möglich ist. Es wurden daher zwei pI-unabhängige Auftrennungsverfahren analysiert, die BAC/SDS-Auftrennung (Abschnitt 3.3.11) und LC-MS/MS-Peptidanalyse nach 1-D SDS-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.3.12).



### 3.3.11 Zweidimensionale Auftrennung mittels BAC/SDS

Mittels der Kombination des kationischen Detergens Benzyl-dimethylhexadecylammoniumchlorid (16-BAC) in der ersten Dimension und des anionischen Detergens SDS in der zweiten Dimension kann ebenfalls eine zweidimensionale Auftrennung erreicht werden.

Abbildung 3.45 zeigt eine zweidimensionale Auftrennung der French-Press-HS Membranfraktion aus Abbildung 3.35. Mittels dieses Systems konnten mehr als 400 Proteinflecken aufgetrennt werden.



**Abb. 3.45:** BAC/SDS-Auftrennung einer Membranfraktion (French-Press HS) mit 10% PAA in der BAC-Dimension, 6-16% PAA in der SDS-Dimension. Visualisierung mittels Silberfärbung. Die pI-unabhängige Auftrennung führte zu der Identifizierung des Arginin/Ornithin-Austauschers mit 13 TMD.

Bei dieser Methode, die pI unabhängig funktioniert, werden die Proteine in beiden Dimensionen nach ihrer Größe aufgetrennt. Diese Auftrennung basiert auf dem

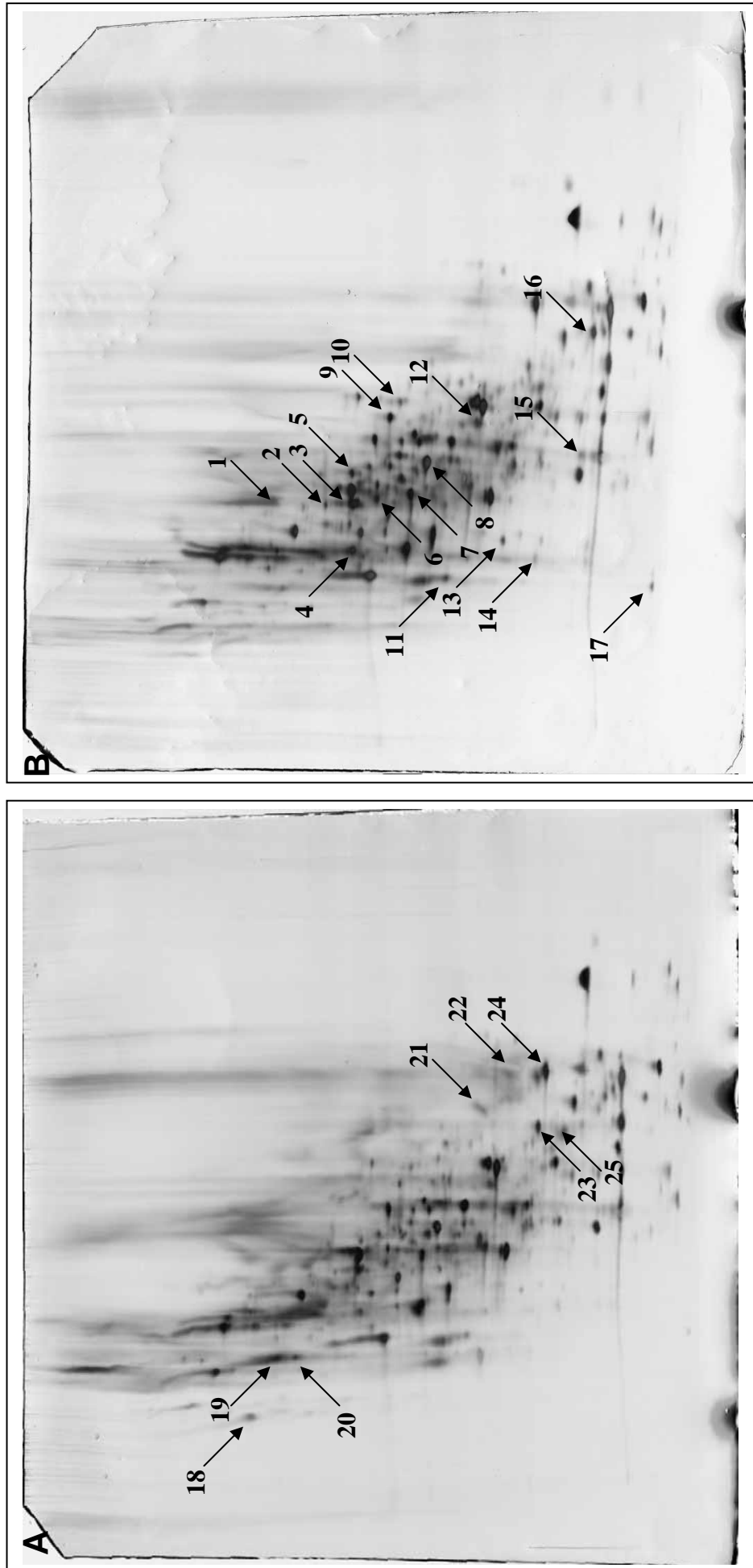
unterschiedlichen apparenten Laufverhalten von Membranproteinen bei negativer bzw. positiver Beladung.

Mittels MALDI-Fingerprint konnte HtrI mit 2 Transmembrandomänen identifiziert werden, ein Arginin/Ornithinaustauscher (OE5204R) mit vorhergesagten 13 Transmembrandomänen wurde als questionable gewertet. Über eine MS/MS-Messung konnte dieses Membranprotein dann eindeutig identifiziert werden. Die Auftrennung eines integralen Membranproteins mit 13 TMD innerhalb einer zweidimensionalen, gelbasierenden Methode zeigt sowohl deren allgemeine Anwendbarkeit für (integrale) Membranproteome, als auch die eingeschränkte Nutzbarkeit des IEF/SDS-Systems. Bei gleicher Probe und Auftragsmenge konnte im IEF/SDS-System kein Proteinfleck dem Arginin/Ornithinaustauscher (pI 4,1) zugeordnet werden (vgl. Abbildung 3.35), obwohl auf BAC/SDS-Ebene ein deutliches Signal vorhanden ist.

#### 3.3.11.1 Vergleichende Analyse mittels BAC/SDS

Der Wildtyp R1 von *H. salinarum* wurde unter zwei unterschiedlichen Bedingungen aufgezogen. Bedingung 1 ist anaerobes Wachstum unter Licht (phototroph), Bedingung 2 aerobes Wachstum unter Lichtausschluss. Bei diesem Versuch wurde eine 35 ml Vorkultur dreimal bei Klett 30 (exponentielle Wachstumsphase) überimpft, um einen einheitlichen zellulären Zustand zu gewährleisten. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Sonifizieren, die Membrananreicherung dann über zweimalige differentielle Ultrazentrifugation in 1/4 BS. 25 Spots zeigten unter den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen eine signifikant verschiedene Expression auf (mehr als Faktor 3, ProteomWeaver). Die Spots 1-17 wurden bei den anaeroben Bedingungen stärker expremiert, die Spots 18-25 bei den aeroben Bedingungen. Tabelle 3.7 zeigt die identifizierten Spots, welche über LC/MS/MS analysiert wurden.

In diesem Vergleich von aerob und phototroph kultivierten Stämmen konnten erstmalig auf BAC-Ebene Expressionsunterschiede von Membranproteinen nachgewiesen werden (Abbildungen 3.46 A und B, Abbildung 3.47 und Tabelle 3.7). Diese besitzen Funktionen im Harnstoffzyklus, im Zitronensäurezyklus und in der Atmungskette.



**Abb 3.46 A und 3.46 B:** BAC/SDS-Gele zweier Membranfraktionen, die von R1-Wildtyp-Stämmen unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen gewonnen wurden. Abb. 3.43 A zeigt die Membranfraktion unter aeroben Bedingungen, Abb 3.43 B unter phototrophen Wachstum. Aus beiden Gelen wurden je 288 Spots ausgeschnitten und sowohl über MALDI-Fingerprint-MS als auch über MALI-TOF-TOF vermessen. Zusätzlich wurden noch 25 Spots ausgeschnitten, die nach ProteomWeaver Analyse um mehr als Faktor 3 unterschiedliche Spotintensitäten besitzen. Diese wurden dann über MALDI-MS-Fingerprint und MS/MS vermessen.

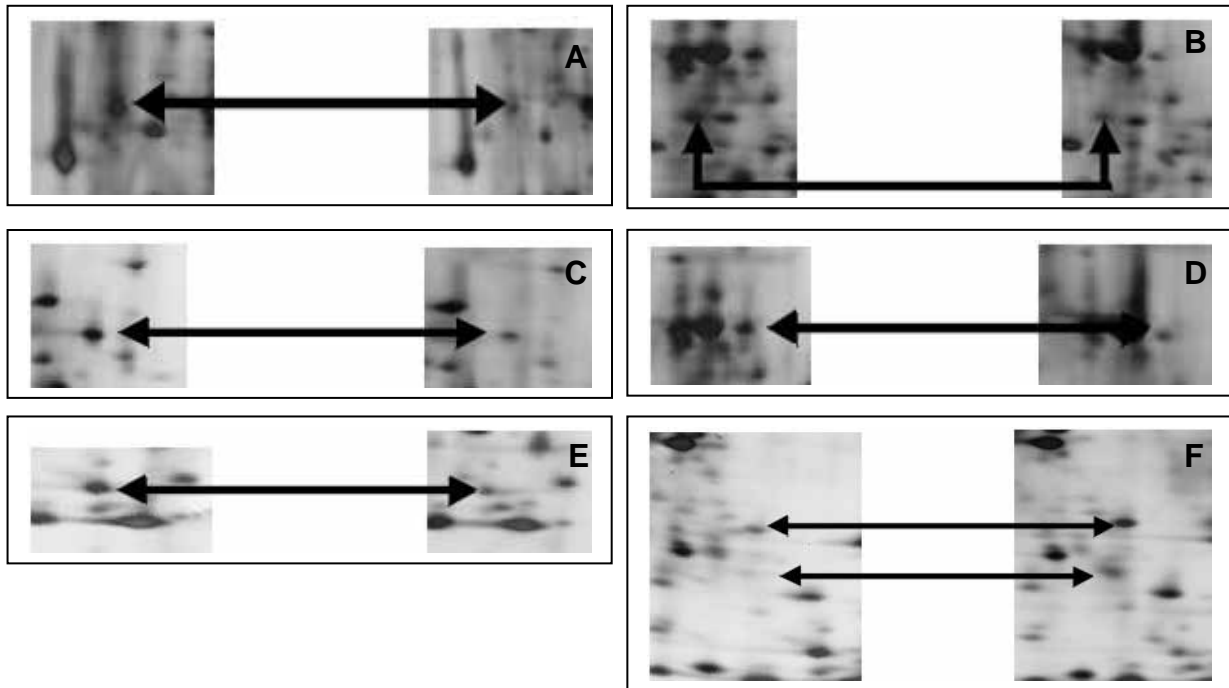
**Tab. 3.7:** Identifizierungen der unterschiedlich expremierten Proteine bei aeroben und anaeroben/phototrophen Wachstum nach BAC/SDS-Auftrennung mittels MS/MS.

	Spot	Score	Oe-Name	Name
Hochregulierte Proteine bei phototropher Bedingung	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	185	OE1270F	glutamate dehydrogenase
	5	36	OE3195F	succinate--CoA ligase (ADP-forming) (EC 6.2.1.5) beta chain
	6	144	OE4420R	argininosuccinate synthase
	7	118	OE2626R	probable ATP-binding protein mrp
		73	OE3834R	probable oxidoreductase
	8	113	OE4007F	electron transfer flavoprotein alpha chain
	9	259	OE3196F	succinate--CoA ligase (ADP-forming) (EC 6.2.1.5) alpha chain
	10	215	OE1781F	probable ABC-type transport system ATP-binding protein
	11	78	OE4721R	translation elongation factor aEF-1 alpha chain
	12	115	OE2641F	ribosomal protein S2
		44	OE3405F	ribosomal protein S4.eR
		30	OE7162R	sporulation initiation inhibitor homolog
	13	51	OE3718F	cell division protein
	14	120	OE3388F	ribosomal protein L3
15	72	OE3991R	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain I.a (A-type ATP synthase)	
16	55	OE4146F	TATA-binding transcription initiation factor	
17	-	-	-	
Hochreguliert bei aerober Bedingung	18	-	-	-
	19	23	OE3517F	protein OE3517F
	20	30	OE1956F	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain CD
	21	-	-	-
	22	-	-	-
	23	203	OE3988R	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain E.a (A-type ATP synthase)
		-	-	-
	25	56	OE4071R	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain II

Neben einigen Verunreinigungen dominanter löslicher Proteine konnten einige regulierte Proteine sowohl der Energie-Konservation (Spot 5, 6, 8, 9, 15, 20, 23 und 25) als auch ein beteiligter Transkriptionsinitiations-Faktor (Spot 16) identifiziert werden.

Eine detaillierte Ansicht der regulierten Proteine ist in Abbildung 3.47 dargestellt, in der bei allen Abbildungsausschnitten die anaeroben Wachstumsbedingungen links abgebildet sind.

Während unter aeroben Bedingungen die ATP-Synthese hauptsächlich über den Zitronensäurezyklus (Ng *et al.*, 2000) erfolgt, wird unter anaeroben Bedingungen ATP über mindestens zwei Wege synthetisiert: Arginifermentation (Hartmann *et al.*, 1980; Ruepp und Soppa, 1996) und Photosynthese (Oesterhelt und Stoeckenius, 1973).



**Abb. 3.47:** Darstellung ausgewählter Proteine, die bei den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen differentiell exprimiert wurden. Abbildung A bis E zeigen Proteine, die bei anaeroben/phototrophen Bedingungen stärker exprimiert werden, Abbildung F bei aeroben Bedingungen. **A:** Spot 4 (Glutamate dehydrogenase gdhB), **B:** Spot 6 (Argininosuccinat Synthase), **C:** Spot 9 (Succinate-CoA Ligase (ADP-forming) alpha chain), **D:** Spot 5 (Succinate-CoA Ligase (ADP-forming) beta chain), **E:** Spot 16 (TATA-binding Transkription Initiations-Faktor), **F:** Spot 23/25 ( $H^+$ -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain E.a (A-type ATP synthase), oberer Pfeil, und Cytochrome-c Oxidase (EC 1.9.3.1) chain II), unterer Pfeil).

### 1. Anaerobe Wachstumsbedingungen

Bei den anaerob gewachsenen Kulturen lassen sich direkte Rückschlüsse auf den benutzten Metabolismusweg ziehen, welcher primär auf dem Harnstoffzyklus, nicht jedoch der Argininfermentation beruht.

Die auf dem BAC-Gel gefundene Argininosuccinat-Synthase (Spot 6, OE4420R) ist ein Enzym, welches im Harnstoffzyklus die ATP-anhängige Reaktion von Citrullin und Aspartat zu Argininosuccinat kondensiert. Der Harnstoffzyklus bezieht seine Energie aus der Hydrolyse von 4 Phosphatbindungen ( $3 \text{ ATP} \rightarrow 2 \text{ ADP} + \text{AMP}$ ). Diese werden sowohl durch Photosynthese mittels Bakteriorhodopsin unter Generierung eines Protonengradienten, als auch bei der oxidativen Phosphorylierung unter Verwendung der NADH's regeneriert, die bei der Glutamat-Dehydrogenase- (die Ammoniak bei der Reaktion zu 2-Oxoglutarat freisetzt) und der Malat-Dehydrogenase-Reaktion angefallen sind. Die Glutamat-Dehydrogenase (Spot 4, OE1270F) konnte auf den BAC-Gelen ebenfalls als hochreguliertes Protein identifiziert werden.

### 3. Ergebnisse

Die Succinat-CoA-Ligase ist ein Enzym des Citratzyklus, welches die bei der Succinyl-CoA-Hydrolyse freigewordene Energie zur Bildung einer energiereichen Phosphatbindung nutzt (ATP bei Bakterien, GTP bei Eukarya). Das Enzym besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die beide als hochregulierte Proteine identifiziert werden konnten (Spot 9, OE3196F, und Spot 5, OE3195F). Der TCA-Zyklus arbeitet allgemein nur unter aeroben Bedingungen, da eine schnelle Regeneration von  $\text{NAD}^+$  aus NADH durch die Atmungskette erforderlich ist. Eine verminderte Aktivität des Zyklus unter anaeroben Bedingungen ist auch experimentell beschrieben (Bhaumik und Sonawat, 1994). Eine mögliche Erklärung der Hochregulierung der Succinat-CoA-Ligase liegt in dem bei einigen Archaea beschriebenen reduktiven Citratzyklus. *Thermoproteus neutrophilus*, ein strikt anaerob wachsender, Schwefel-reduzierender Organismus nutzt  $\text{CO}_2$  als Quelle dieses Stoffwechselweges, bei dem Acetyl-CoA unter Reaktion mit  $\text{CO}_2$  zu Pyruvat umgewandelt wird. Nach der Reaktion zu Phosphoenolpyruvat wird es unter erneuter Reaktion mit  $\text{CO}_2$  zu Oxalacetat umgewandelt, und dann unter Reaktionen zu Fumarat und Succinat schließlich unter erneuter Zufuhr von  $\text{CO}_2$  zu 2-Oxoglutarat umgewandelt. Dieses reagiert dann mit  $\text{CO}_2$  zu Citrat, welches dann in Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten wird. Bei den Methanogenen (*M. thermoautotrophicum*, *M. hungatei* und *M. voltae*) ist zudem ein teilweise-reduktiver Citratzyklus beschrieben, bei dem 2-Oxoglutarat aus Phosphoenolpyruvat über die Zwischenprodukte Oxaloacetat, Malat, Fumarat, Succinat und Succinyl-CoA gebildet wird (Danson, 1993). Zwar kann das [2Fe-2S] Ferredoxin (OE1658F) aufgrund seines Potentials nur im oxidativen Citratzyklus als Coenzym die Oxidation des Pyruvats zum Acetyl-CoA vermitteln, jedoch existiert ein [3Fe-4S][4Fe-4S] Ferredoxin (OE4496R), welches dem aus *Thermoplasma acidophilum* homolog ist und als mögliches Coenzym die Reaktion zum Phosphoenolpyruvat übernehmen könnte.

Das einzige membrangebundene Enzym des Citratzyklus ist jedoch die Succinat-Dehydrogenase, die über 3 vorhergesagte Transmembrandomänen verfügt. Der GRAVY-Index der  $\alpha$ -Untereinheit der Succinat-CoA Ligase von +0,16 lässt jedoch eine Membraninteraktion vermuten. Mit Ausnahme der c- und d-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase sind bei anderen Experimenten alle weiteren der insgesamt 18 beteiligten Proteine des reduktiven Citratzyklus identifiziert worden, so dass die Existenz dieses Metabolismusweges möglich ist. In *H. salinarum* ist bisher lediglich die Existenz des oxidativen Citratzyklus beschrieben (Aitken und Brown, 1969; Danson, 1993).

Von Bedeutung könnte der TATA-bindende Transkription-Initiationsfaktor *tbpE* (Spot 16, OE4146F) sein, da dieser eine Komponente der Genregulation darstellen könnte, der bei

anaerobem Wachstum nötig ist. In *H. salinarum* sind 6 TATA-binding Proteine (TBP) und 7 allgemeine Transkriptionsfaktoren (TFB) bekannt. Die basale Transkription in Archaea erfolgt über eine Assemblierung von TBP, TFB und RNA Polymerase (RNAP) an die downstream-Region der TATA-Box. In einer Hypothese wird angenommen, dass die Kombination der TBP's mit verschiedenen TFB's ( $6 \times 7 = 42$  Kombinationen) eine globale Regulation der Transkription darstellt, analog den bakteriellen Sigma-Faktoren (Thompson *et al.*, 1999; Baliga *et al.*, 2000).

## 2. Aerobe Wachstumsbedingungen

Bei dem BAC-Gel der aerob gewachsenen Kultur sind 3 Proteine der Atmungskette identifiziert worden:

(1) Die NADH-Dehydrogenase (Ubichinon) chain CD (Spot 20, OE1956F) stellt eine von 11 Untereinheiten (A-D, H-N) aus dem Atmungsketten-Komplex I der terminalen Elektronentransportkette dar. Die Annotation erfolgte analog dem nuo-Operon aus *E. coli*, jedoch sind die Untereinheiten C und D bei *H. salinarum* fusioniert und die Untereinheit J in J1 und J2 gesplittet. Die das Akzeptor-Modul darstellenden Untereinheiten E, F und G fehlen bei *H. salinarum*.

(2) Die Cytochrom-c-Oxidase, chain II (Spot 25, OE4071R) aus Komplex IV ist eine von drei terminalen Oxidasen. Während die Oxidase A aus 3 Untereinheiten besteht (cox1A, OE1979R; cox2A, OE1984F; cox3A, OE1988R) bestehen die Oxidasen B (cox1B, OE4070R; cox2B, OE4071R) und C (cydA, OE7075F/OE6185F; cydB, OE7966F/OE6186F) aus 2 Untereinheiten, gleichzeitig liegt letztere innerhalb eines 60kb-Abschnittes als Duplikat vor. Bemerkenswert bei den Oxidasen ist, dass bei *H. salinarum* und bisher untersuchten anderen Archaea kein Cytochrom-c vorhanden ist, sondern wahrscheinlich Halocyanin als Elektronen-Carrier dient.

(3) die H<sup>+</sup>-transporting two-sector ATPase, chain E.a (A-type ATP synthase) aus Komplex V (Spot 23, OE3988R). Die ATPasen der Archaea (A-Typ) sind denen des V-Typ (Vakuolen) und F-Typ (Bakteria, Mitochondrien) ähnlich. Die insgesamt aus 8 Untereinheiten bestehende A-Typ ATPase setzt sich aus einem A<sub>1</sub>-Komplex mit den Untereinheiten A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>CDEF (entspricht den F<sub>1</sub>-Untereinheiten  $\beta_3\alpha_3\gamma\delta\varepsilon$  bei *E. coli*), und dem A<sub>0</sub>-Komplex mit der Stoichiometrie IK<sub>X</sub> zusammen (entspricht bei *E. coli* abc<sub>9-12</sub>). Die Untereinheit I stellt eine Fusion der Untereinheiten a und b von *E. coli* dar. Die bei aeroben Bedingungen als hochreguliert gefundene Untereinheit E entspricht der Untereinheit  $\delta$  bei *E. coli* (bzw. OSCP

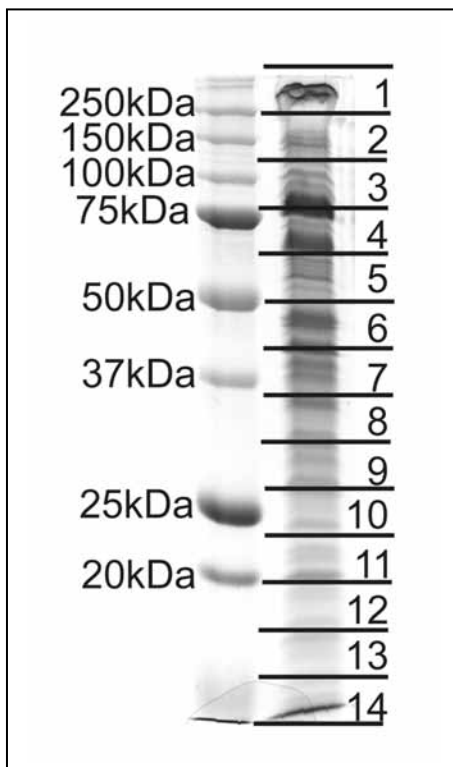
der mitochondrialen ATPase), welche die löslichen Stator-Komponenten  $\alpha_3\beta_3$  mit der membranständigen b-Untereinheit (*E. coli*) verbindet.

Allerdings wurden bei den phototrophen Bedingungen die Untereinheit I als hochreguliert gefunden, und beide Untereinheiten liegen auf einer Transkriptionseinheit *atpHIKECFAB*. Lediglich *atpD* ist von dem Operon durch zwei ORFs getrennt. Möglicherweise kann eine Funktionsregulierung der archaealen ATPase analog der vakuolären ATPase erfolgen, bei der eine Assoziation und Dissoziation der V1 und V0 Einheiten beschrieben ist (Wieczorek *et al.*, 2000). Unter Umständen kann die Hochregulierung der Verbindungseinheit *atpE* zur Reassemblierung einer funktionell aktiven ATPase führen.

### 3.3.12 LC-MS/MS Analysen eindimensionaler Auftrennungen

Die Problematik des Proteintransfers nach der IEF kann umgangen werden, wenn die weitere Auftrennung eines komplexen Proteingemisches auf Peptidebene erfolgt. Hierbei kann als erste Dimension entweder eine Größenauftrennung mittels SDS-PAGE benutzt werden oder eine Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt in immobilisierten pH-Gradienten.

#### 3.3.12.1 Analyse einer mittels SDS-PAGE aufgetrennten Membranfraktion



**Abb. 3.48:** SDS-PAGE-Auftrennung (12,5%) einer Gesamtmembranfraktion, die anschließend in 14 Fraktionen zerschnitten wurde.

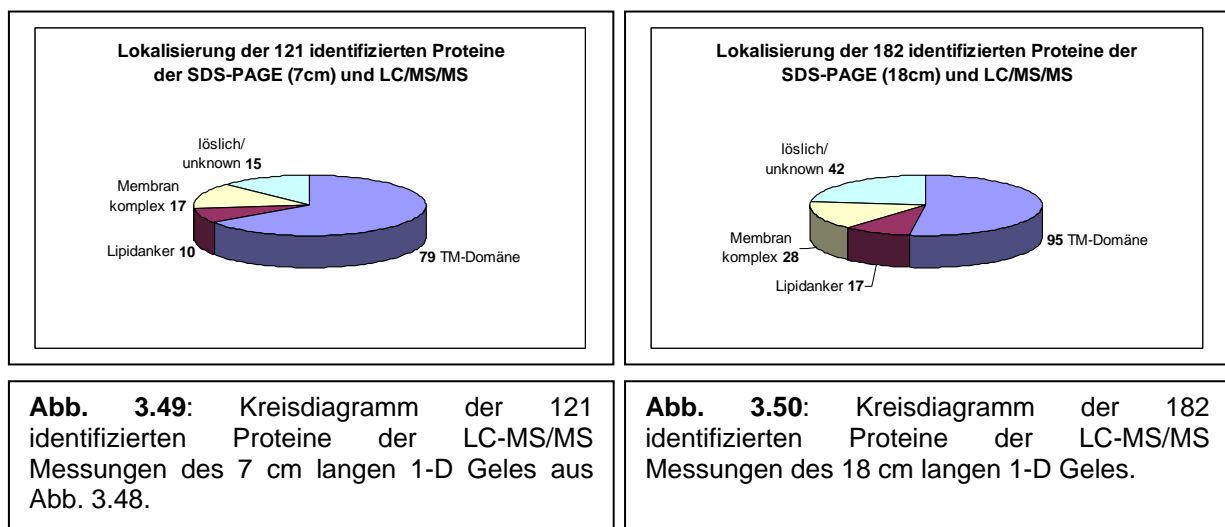
Die Membranproteine einer Gesamtmembranfraktion von *H. salinarum* wurden in einem 12,5%-igen SDS-Gel nach ihren apparenten Molekulargewichten aufgetrennt und anschließend mittels Coomassie-Färbung visualisiert (Abb. 3.48). Eine 7 cm lange Spur wurde in 14 Gelstücke mit 5mm Länge zerschnitten. Nach Reduktion mit DTT und Carbamidomethylierung mit Iodacetamid wurden die 14 Proteingemische tryptisch gespalten. Nach Elution der Peptide aus den Gelstücken wurden diese in Poros-Säulchen entsalzt und anschließend in einer C18-Säule chromatographisch getrennt. An diese Trennung war die MS/MS-Analyse an einem Q-TOF Massenspektrometer gekoppelt.

Insgesamt konnten aus den 14 Fraktionen mit Hilfe der Sequenzinformation 121 Proteine identifiziert werden, von denen 82 als trusted und 39 als insecure gewertet



wurden. Ferner gelten 31 Proteine als questionable. Von denen als trusted und insecure gewerteten Proteinen besitzen 79 Proteine eine oder mehrere Transmembranhelices, 10 Proteine einen Lipidanker und 17 Proteine wurden mittels Homologien zu löslichen Untereinheiten von Membrankomplexen zugeordnet. Abbildung 3.49 zeigt ein Übersichtsdiagramm der identifizierten Proteine.

In einem weiteren Experiment wurde die Trennleistung der SDS-PAGE gesteigert, indem die Trennstrecke von 7 cm auf 18 cm verlängert wurde. Aus den insgesamt 36 erhaltenen Fraktionen (5 mm Stücke) konnten nach tryptischer Spaltung und Auftrennung über eine C4-Säule 182 Proteine identifiziert werden, von denen 95 Proteine über eine vorhergesagte Transmembrandomäne verfügen (Abbildung 3.50).



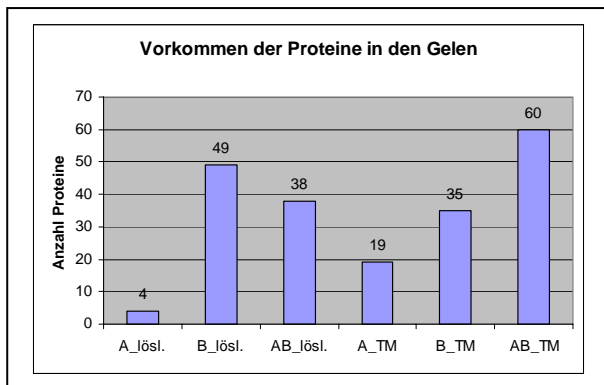
Die detaillierte Auflistung der über diese Versuche insgesamt identifizierten 205 Proteine befindet sich im Anhang unter dem Abschnitt 7.6, wichtige Membranproteinklassen werden in Abschnitt 3.3.13 beschrieben.

Der Vergleich der identifizierten Proteine aus beiden Gelen zeigte eine starke Zunahme von löslichen Proteinen im 18 cm langem Gel. Abbildung 3.51 zeigt die Identifizierung der Proteine in Abhängigkeit des analysierten Gels.

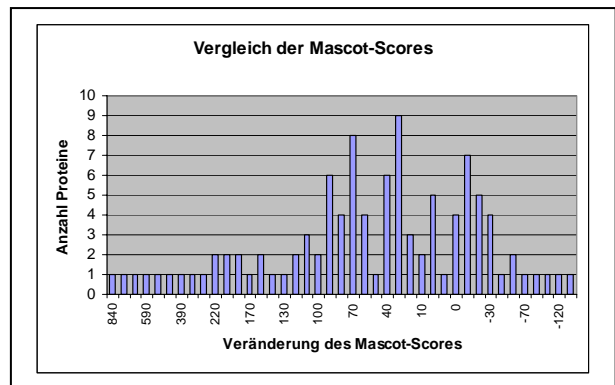
Proteine, die ausschliesslich in dem 7 cm langen Gel identifiziert wurden, sind mit A, Proteine aus dem 18 cm langen Gel mit B und in beiden Gelen identifizierte Proteine mit AB gekennzeichnet. Gleichzeitig wurde zwischen Proteinen mit vorhergesagter TMD und „löslichen“ Proteinen (einschliesslich Lipidanker und Komplexzugehörigkeit) unterschieden. Auch der Unterschied zwischen den TM-Proteinen, die ausschließlich in einem der beiden Gele vorkommen, ist auffällig. Bei den aus beiden Experimenten zusammen identifizierten 114 integralen Proteinen sind 19 ausschließlich im 7 cm-Gel identifiziert worden, 35 ausnahmslos im 18 cm Gel.

### 3. Ergebnisse

Bezüglich der Protein-Klassifizierung nach den Mascot-Scores wurden bei den (in beiden Gelen vorhandenen) Proteinen folgende Veränderungen festgestellt: 68 Proteine waren in beiden Gelen trusted und 3 Proteine insecure. Jeweils 6 Proteine, die in Gel A als trusted bzw. insecure gewertet wurden, erhielten den Status insecure bzw. questionable in Gel B. 21 Proteine, die in Gel A den Status insecure hatten, wurden bei Gel B als trusted identifiziert. Eine genaue Darstellung der Mascot-Score Differenzen ist in Abbildung 3.52 dargestellt, bei der die Mascot-Scores aus Gel A als Referenz genommen wurden, ein positiver Wert also eine Verbesserung bei Gel B bedeutet.



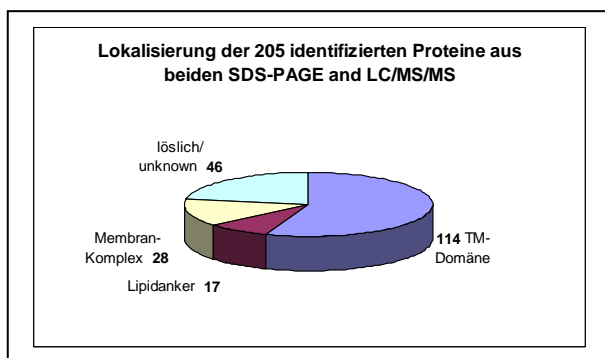
**Abb. 3.51:** Vorkommen der identifizierten Proteine in den SDS-Gelen, wobei A Proteinen entspricht, die ausschließlich in dem 7cm Trenngel vorkommen, B ausschließlich in dem 18 cm langem Gel. AB entspricht Proteinen, die in beiden Gelen vorkommen.



**Abb. 3.52:** Veränderung der Mascot-Scores von Proteinen, die in beiden SDS-Gelen gefunden wurden (AB in Abb. 3.51). Positive Werte (links) bedeuten eine Score-Erhöpfung der Proteine aus dem 18 cm Gel. 10er Score-Differenzen wurden zusammengefasst.

Dies bedeutet, dass die Verlängerung der Trennstrecke (Faktor 2,6) sowohl zu einer Erhöhung der Identifizierungen (Faktor 1,8), als auch zu Verbesserung des Mascot-Scores der vorherigen Identifizierungen führte.

Insgesamt konnten so aus beiden Experimenten 205 Proteine identifiziert werden (Abbildung



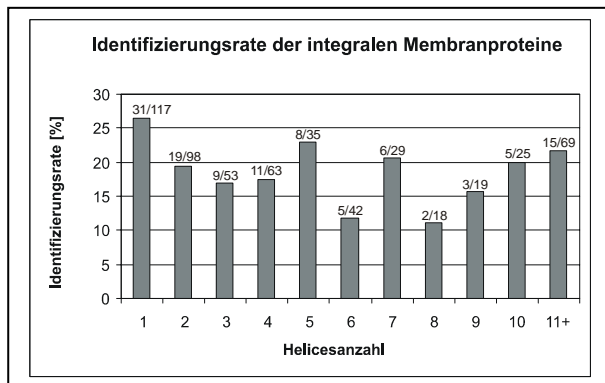
**Abb. 3.53:** Kreisdiagramm der 205 identifizierten Proteine der LC-MS/MS Messungen der beiden 1-D Gel LC/MS/MS Messungen aus Abb. 3.49 und Abb. 3.50.

3.53), von denen 155 (77%) Membranproteine sind.

114 dieser Proteine besitzen eine vorhergesagte Transmembrandomäne, 17 Proteine verfügen über einen Lipidanker und 28 Proteine sind über Homologien einen Membrankomplex zuzuordnen.

Lediglich 46 Proteine sind entweder löslich oder besitzen keine Homologien zu anderen Proteinen (unknown).

Die Analyse der identifizierten integralen Membranproteine ist in Abbildung 3.54 dargestellt, in der das Verhältnis der identifizierten Proteine zur vorhergesagten Anzahl von Proteinen in Abhängigkeit der Helicesanzahl dargestellt ist.



**Abb. 3.54:** Identifizierungsrate der integralen Membranproteine aus beiden SDS-Gelen in Abhängigkeit der Helicesanzahl. Im Diagramm angegeben Werte entsprechen der Anzahl gefundener Proteine (1. Wert) im Vergleich zur Anzahl vorhergesagter Proteine (2. Wert). Das Verhältniss (in Prozent) ist als Balkendiagramm aufgetragen.

Auffallend ist besonders die annähernd gleiche Identifizierungsrate von ungefähr 15-20 Prozent. Dies bedeutet, im Gegensatz zur MALDI-MS Methodik, dass die Identifizierung von Membranproteinen mittels ESI-MS/MS unabhängig von der Anzahl der Helices zu deren Identifizierung führt.

Weiterhin war auffällig, dass bei der Analyse der 114 integralen Membranproteine kein Peptid gefunden wurde, welches einen helikalen Abschnitt besitzt. Es wurden lediglich Bereiche des C- oder N-Terminus oder der Helices verbindenen Henkel gefunden.

Weiterhin ist die Anzahl der identifizierten alkalischen Membranproteine ( $pI > 7$ ) mit lediglich 13 Identifizierungen stark unterrepräsentiert. Beide Beobachtungen werden im Diskussionsteil (Abschnitt 4.3.9 und 4.3.10) behandelt.

### 3.3.12.2 Analyse einer IEF-IPG aufgetrennten Membranfraktion

In einem Versuch zur Identifizierung nicht-transferierter Membranproteine nach der IEF wurde eine delipidierte Membranfraktion in einem pH 3-10 IPG-Streifen fokussiert. Dieser wurde dann analog nach Abschnitt 3.3.8 äquilibriert und auf ein SDS-Gel gelegt. Nach beendeter SDS-Dimension wurde der Streifen in 17 Stücke geschnitten (je 1 cm Länge) und zurückgebliebene Proteine tryptisch gespalten, jedoch war eine Identifikation von Proteinen nicht möglich, da das Spektrum von vielen einfach-geladenen Signale überdeckt war. Die Existenz von alkalischen Membranproteinen wurde jedoch durch die Fluoreszenz-Markierung (Abbildung 3.38) nachgewiesen. Eine mögliche Ursache für die nicht-Identifizierung sind eventuelle Verluste von hydrophoben Proteinen während der in-Gel Spaltung (vgl. Abschnitt 3.3.14 bzgl. des Einflusses von organischen Lösungsmitteln).

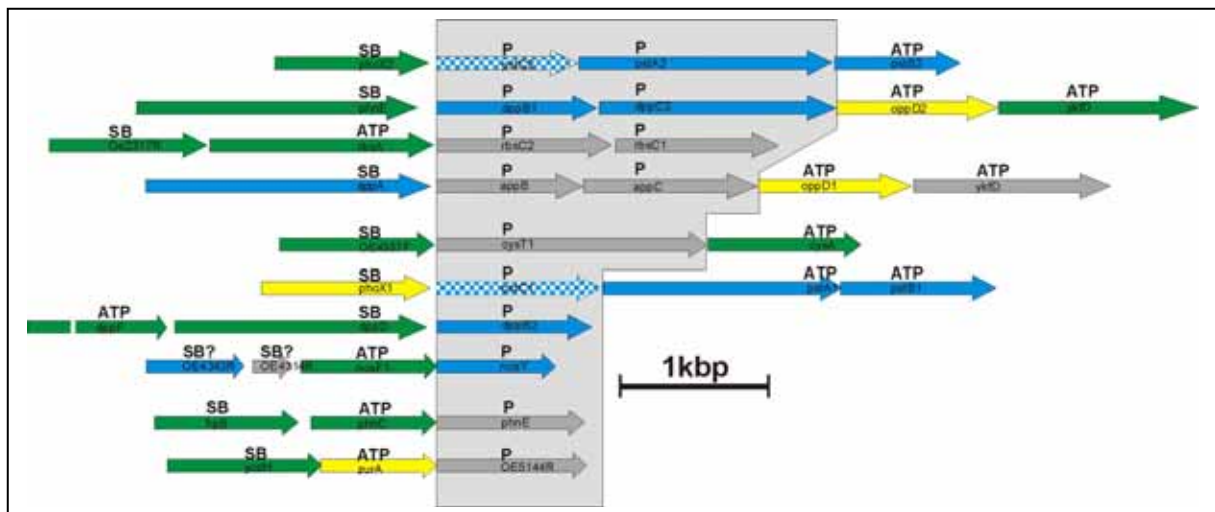
### 3.3.13 Identifizierte Membranproteine in Schlüsselfunktionen

Viele wichtige physiologische Prozesse wie Transportprozesse (ABC-Transporter), die Detektion von externen Stimuli (Signaltransduktion) und der Energiemetabolismus (Atmungskette und Halocyanine) werden von Proteinen der Zellmembran ausgeführt. In diese Prozesse involvierte Proteine konnten in den MALDI-TOF und LC/MS/MS Experimenten identifiziert werden.

#### 3.3.13.1 ABC-Typ Transport Systeme

*H. salinarum* enthält eine große Anzahl von Transportproteinen, von denen eine Klasse die ABC-Transporter sind. Diese bestehen aus drei Untereinheiten: (1) die Permeasen, bei denen es sich um integrale Membranproteine mit 6-12 TMD handelt, (2) die ATP-bindenden Untereinheiten, welche cytoplasmatische periphere Membranproteine sind, und (3) die periplasmatischen Substrat-bindenden Untereinheiten, bei denen es sich ebenfalls um periphere Membranproteine handelt, die zusätzlich oft über einen vorhergesagten Lipidanker direkt mit der Membran verbunden sind. Untereinheiten von 10 ABC-Transportern konnten identifiziert werden (Abbildung 3.55).

Einige Permeasen konnten nicht identifiziert werden, jedoch legt das Vorhandensein der peripheren Untereinheiten deren Existenz sehr nahe.



**Abb 3.55:** Graphische Darstellung der 10 Transkriptionseinheiten der ABC-Transporter, ausgerichtet nach den Permeasen (grauer Kasten). Die Operons enthalten Homologe der drei Untereinheiten Permeasen (P), ATP-bindende Untereinheit (ATP) und periplasmatisches Substrat-bindende Untereinheit (SB).

In jedem Operon sind mindestens zwei Genprodukte identifiziert worden, klassifiziert nach der Methode MALDI-TOF (gelb), LC/MS/MS (blau) oder beides (grün). Während die meisten peripheren Membranproteine identifiziert werden konnten, sind einige Permeasen nicht gefunden (grau) oder nur als questionable (blau-kariert) gewertet worden.

### 3.3.13.2 Transducerproteine

Halobacterium reagiert auf externe Stimuli (Phototaxis, Chemotaxis, Aerotaxis, Osmotaxis) und aus der Genomanalyse sind 18 Transducerproteine bekannt, die an der Signaltransduktion zum Flagellarmotor beteiligt sind. Der Großteil der Transducer (12) ist mittels einer Transmembrandomäne in der Membran lokalisiert. Eine Funktion konnte bisher 7 dieser Transducer zugewiesen werden: htrI (photophil auf Orangelicht, photophobisch auf UV-Licht (Marwan und Oesterhelt, 1990; Spudich und Bogomolni, 1984; Takahashi *et al.*, 1985)), htrII (photophobisch auf Blaulicht), hemAT (aerophob (Hou *et al.*, 2000)), htrVIII (aerophil (Brooun *et al.*, 1998)), basT (Chemotaxis zu einigen Aminosäuren (Kokoeva und Oesterhelt, 2000)), cosT (Chemotaxis zu Osmolyten (Kokoeva *et al.*, 2002)) und htr14 (PMF-Sensor (Koch und Oesterhelt, in Vorbereitung)). Von den 6 löslichen Transducern konnte bisher lediglich für car eine Funktion nachgewiesen werden (Chemotaxis zu Arginin) .

Mittels LC/MS/MS konnten 9 der 12 membranständigen Transducer identifiziert werden:

htrI, htrII, htr4, htr6, htrVIII, htr14, htr16, costT and basT.

Proteine der periplasmatischen Substrat-bindenden Superfamilie sind üblicherweise in Transportprozesse involviert, können aber auch an der Signaltransduktion (oder beidem, Stock und Surette, 1996) beteiligt sein. In Mesophilen sind deren Gene generell an Transkriptionseinheiten der ABC-Transporter gekoppelt, auch wenn sie zusätzlich an der Signaltransduktion beteiligt sind. Im Gegensatz dazu bilden in *H. salinarum* 4 Gene eine Transkriptionseinheit mit korrespondierenden Transducern. Drei von diesen Genprodukten konnten mittels LC/MS/MS identifiziert werden: basB und basT, cosB und cosT, tmpC und htrVI.

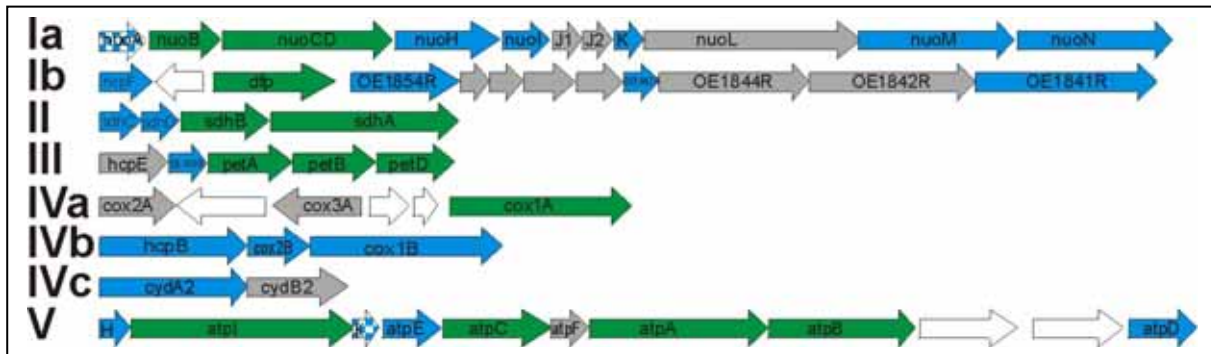
### 3.3.13.3 Atmungskette

Im Gegensatz zu vielen anderen Archaea besitzen Halophile die Eigenschaft, unter aeroben Bedingungen zu wachsen. Die Genomanalyse zeigte, dass eine vollständige Atmungskette existiert. Für jede der 5 Atmungsketten-Komplexe konnten sowohl lösliche als auch integrale Untereinheiten mittels MALDI-TOF und/oder LC/MS/MS identifiziert werden (Abbildung 3. 56).

Der Elektronentransfer zwischen den Komplexen erfolgt über einen lipophilen Elektronen-Carrier (Ubiquinon in Mitochondrien, Plastoquinon in Chloroplasten, wahrscheinlich Menaquinon in Halobacterium) und kleinen Elektronen-transportierenden Proteinen, bei denen es sich entweder um hem-Proteine (Cytochrome-c in Mitochondrien und Photosynthesebetreibende Bakterien) oder Kupfer-Proteine (Plastocyanine in Chloroplasten und

### 3. Ergebnisse

Cyanobacteria, Halocyanine in Halobacterium) handelt. Einige der Halocyanine konnten identifiziert werden.



**Abb 3.56:** Graphische Darstellung der Gene der 5 Komplexe der Atmungskette, mit römischen Zahlen markiert. Mögliche Alternativen sind mit den Buchstaben a, b und c markiert. Die weißen Kästen repräsentieren Gene, die nicht mit der Atmungskette zusammenhängen, graue Kästen mit OE-Nomenklatur zeigen keine Homologien zu anderen Genen. Das Farbschema entspricht ansonsten der Identifizierungsmethode, siehe Abb. 3.55.

#### Komplex I-a

Komplex I, das Äquivalent der NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) aus Mitochondrien, wird durch eine Transkriptionseinheit von 11 Genen (nuoABCDHIJ2KLMN) kodiert, von denen viele identifiziert werden konnten (Abb. 3.56 Ia). Gene und deren Anordnung sind exakt denen von *E. coli* äquivalent, mit den Ausnahmen, dass die Untereinheiten C und D fusioniert sind, die Untereinheit J als J1 und J2 geteilt vorliegt und dass die Untereinheiten E, F und G fehlen. Bemerkenswert ist das Fehlen des Sub-Komplexes (E, F, und G), der in *E. coli* mit NADH interagiert. Dieser Sub-Komplex ist in *Archaeoglobus* durch einen anderen Sub-Komplex ersetzt, in dem das korrespondierende Enzym mit reduziertem F420 interagiert (Bruggemann *et al.*, 2000). Von den in *Archaeoglobus* vorhandenen Untereinheiten existiert in *Halobacterium* nur ein Homolog (OE3349F).

Zusätzlich besitzt *Halobacterium* ein Homolog (OE3717F) zu der 32K-Kette der NADH-Dehydrogenase von Säugern, die ebenfalls identifiziert werden konnte. Das Substrat der "NADH dehydrogenase" konnte bisher in *Halobacterium* nicht identifiziert werden.

#### Komplex I-b

Ein zweiter Komplex I (Komplex Ib) existiert in *Halobacterium*. Die Transkriptionseinheit besteht aus 9 Genen, von denen die meisten unbekannter Funktion sind. Es gibt eine Transkriptionseinheit, die zwei Homologe der Untereinheit L (OE1841R, OE1842R) und ein Homolog der Untereinheit N (OE1844R) kodiert. Ein Homolog der Untereinheit L (OE1841R) konnte identifiziert werden (Abb. 3.56 Ib). In der Nähe dieser Transkriptionseinheit befindet sich zusätzlich ein Halocyanin (hcpF, OE1859R).

### Komplex II

Komplex II ist die Succinate-Dehydrogenase, ein Enzym des Citratzyklus, welches über 1-2 Untereinheiten in der Membran (mittels TMD) verankert ist. Die Gene bilden dabei eine Transkriptionseinheit. Alle vier Untereinheiten des Komplexes konnten aus der Membranfraktion identifiziert werden (Abb. 3.56 II).

### Komplex III

Komplex III besteht aus Cytochrom b<sub>6</sub>, Cytochrom f, dem Rieske Eisen-Schwefel Protein und einer 17 K Untereinheit in Chloroplasten. In den Mitochondrien ist das Cytochrom f durch Cytochrom c<sub>1</sub> ersetzt und die Gene für Cytochrom b<sub>6</sub> und die 17 K Untereinheit, die jeweils 4 TMDs besitzen, sind zu Cytochrom b mit 8 TMDs fusioniert.

Die korrespondierenden Gene in *H. salinarum* entsprechen denen der Chloroplasten. PetB (OE1874R) ist das Äquivalent zu Cytochrom b<sub>6</sub>, petD (OE1872R) ist das Äquivalent der 17 K Untereinheit, und petA (OE1876R) entspricht dem Rieske Eisen-Schwefel Protein. Es existiert kein Homolog zu Cytochrom c<sub>1</sub> in *H. salinarum*, jedoch kann diese Funktion von einem Halocyanin übernommen werden. Aus der Membranfraktion konnten alle drei halobakteriellen Untereinheiten identifiziert werden. Diese liegen auf einer Transkriptionseinheit, die ebenfalls eines der Halocyanin Gene enthält (hcpE, OE1879R, Abbildung 3.56 III).

### Komplex IV

Komplex IV ist die "Cytochrome-c Oxidase" in Mitochondrien und stellt den terminalen Elektronenakzeptor dar, welcher Sauerstoff zu Wasser reduziert. Der bakterielle Komplex besteht aus den Untereinheiten I, II und III, während der mitochondriale Komplex noch zusätzliche Untereinheiten enthält. In Halobacterium existieren 3 distinkte terminale Elektronenakzeptoren, die zumindest die Untereinheiten I und II enthalten. Die Untereinheit I konnten in allen der 3 Komplexe gefunden werden (Abb 3.56, Einheiten IVa, IVb, und IVc).

### Komplex IV-a

In dem Komplex IV-a besteht der terminale Elektronenakzeptor-Komplex aus den Proteinen cox1A (OE1979R, Untereinheit I), cox2A (OE1988R, Untereinheit II), and cox3A (OE1984F, Untereinheit III). Die drei Gene sind benachbart, formen jedoch keine Transkriptionseinheit und sind auf beiden DNA-Strängen kodiert. Lediglich die Untereinheit I konnte identifiziert werden (Abbildung 3.56 IVa).

#### Komplex IV-b

Ein weiterer terminaler Elektronenakzeptor-Komplex (Komplex IV-b) besteht aus den Proteinen *cox1B* (OE4070R, Untereinheit I) und *cox2B* (OE4071R, Untereinheit II). Der orthologe Komplex von *N. pharaonis* konnte gereinigt, geklont, und vollständig auf der DNA- und teilweise auf Proteinebene sequenziert werden (Mattar und Engelhard, 1997). Dieser besteht aus 4 Untereinheiten, die auf einer Transkriptionseinheit *cbaDBAC* liegen. *Cox1B* ist das Ortholog von *cbaA* und *cox2B* ist das Ortholog von *cbaB*. *Halobacterium* besitzt kein Homolog zu *cbaC*. Das halobakterielle Homolog zu *cbaD* von *N. pharaonis* hat eine modifizierte Domänenstruktur, es enthält ein zusätzliches Paar von kupfer-bindenden Domänen in der N-terminalen Region (*hcpB*, OE4073R, siehe weiter unten). Ähnlich wie in *N. pharaonis* bilden die Gene des Komplexes eine Transkriptionseinheit (Abbildung 3.56 IVb). Die beiden Cytochromoxidase Untereinheiten konnten ebenso wie das Halocyanin *hcpB* identifiziert werden. Es gibt jedoch kein Gen der Untereinheit III in der Nähe der Transkriptionseinheit.

#### Komplex IV-c

Ein weiterer terminaler Elektronenakzeptor Komplex (Komplex IV-c) besteht aus den Proteinen *cydA2* (OE6185F, Untereinheit I) und *cydB2* (OE6186F, Untereinheit II), von denen die Untereinheit I identifiziert wurde (Abbildung 3.56 IVc). Die beiden Untereinheiten bilden eine Transkriptionseinheit. es existieren für jedes der Proteine zwei Gene, da sie auf einem 60kb Duplikat liegen, welches von den Megaplasmiden *pHS2* (*cydA2*, OE6185F und *cydB2*, OE6186F) und *pHS1* (*cydA1*, OE7065F und *cydB1*, OE7066F) geteilt wird. Es konnte kein Gen der Untereinheit III in der Nähe der Transkriptionseinheit gefunden werden.

#### Komplex V

*Halobacterium* besitzt die für Archaea typische A-Typ ATP Synthase. 8 Untereinheiten bilden eine Transkriptionseinheit, in der ein zusätzliches Protein unbekannter Funktion lokalisiert ist. Untereinheiten aus dem Membran- und peripheren Sektor konnten identifiziert werden (Abb. 3.56 V).

#### 3.3.13.4 Halocyanine

*Halobacterium* nutzt das Kupfer-bindende Protein Halocyanin für den Elektronentransfer zwischen den Atmungskomplexen. Dies ist äquivalent zu der Situation in Chloroplasten und Cyanobakteria. Es gibt in *Halobacterium* 8 Halocyanin-Gene und 4 der entsprechenden Proteine wurden identifiziert (*hcpB*, OE4073R; *hcpC*, OE2171F; *hcpF*, OE1859R; und *hcpG*,



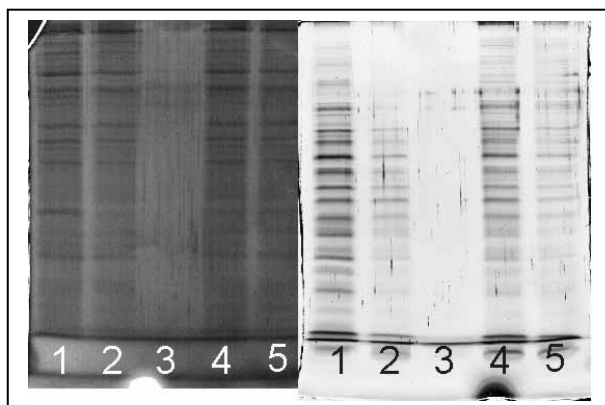
OE1391R). Einige der Halocyanin-Gene sind in oder nahe der Transkriptionseinheiten der Atmungskette lokalisiert. Vier Halocyanine sind mittels 1-3 TMD mit der Membran assoziiert, drei Halocyanine über einen Lipidanker. Lediglich ein Halocyanin besitzt keine vorhergesagte Membranverankerung, ist jedoch auf dem Gel einer Membranfraktion identifiziert worden.

Zwei der Halocyanine enthalten zwei Kupfer-bindende Domänen. Ein besonderer Fall ist der von hcpB (OE4073R), welches zwei Kupfer-bindende Domänen im Stamm R1, aber nur eine Domäne im eng verwandten Stamm NRC-1 enthält. Diese Differenz stammt aus der Entfernung eines Sektors von 420bp in NRC-1, welches die zweite Hälfte der ersten Domäne und die erste Hälfte der zweiten Domäne eliminiert.

### 3.3.14 Verlust hydrophober Membranproteine durch Lösungsmittel

Im Gel der LC/MS/MS-Analyse sind kaum alkalische Membranproteine identifiziert worden. Der Färbeschritt wurde daher im Batch-Verfahren und auf Gelebene überprüft (Abbildung 3.57).

Es wurden folgende Fraktionen aufgetragen: Membranfraktion (Spur 1), Pellet nach 50% MeOH, 12% HOAc Inkubation (Spur 2, entspricht Fixierschritt 1 der Silberfärbung), Überstand des Fixierschrittes (Spur 3), Pellet nach 50% MeOH, 12% HOAc-Inkubation und Pellet nach dreimaliger 50% EtOH-Inkubation (Spur 4, entspricht Schritt 1 und 2 der Silberfärbung) und eingetrockneter Überstand des dreimaligen EtOH-Schrittes (Spur 5).



**Abb. 3.57:** Überprüfung der Fixierschritte der Silberfärbung. Die linke Gelhälfte wurde mittels Zn/Im gefärbt, die rechte mittels Silber. Spur 1: Membranfraktion, Spur 2: Pellet nach erstem Fixierschritt, Spur 3: Überstand nach erstem Fixierschritt, Spur 4: Pellet nach erstem und zweitem Fixierschritt, Spur 5: Überstand nach zweitem Fixierschritt.

Der linke Teil des Gels wurde mittels Zn/Im-Färbung visualisiert (keine Fixierschritte, keine organischen Lösungsmittel), der rechte Teil des Gels mittels Silberfärbung.

Bei der Zn/Im-Färbung sind im ersten Schritt der „Batch-Silberfixierung“ kaum Verluste von Proteinen zu erkennen, Spur 1 und 2 sind nahezu identisch, in Spur 3 als Negativkontrolle des ersten Fixierschrittes sind keine Banden zu erkennen. In Spur 5, der möglichen Verlustquelle des zweiten Fixierschrittes der Silberfärbung sind hingegen deutliche Banden zu erkennen.

Dies bedeutet, dass im „Batch-Verfahren“ einmal präzipitierte Proteine durch organische Lösungsmittel wieder in Lösung gebracht werden können. Dieses Verfahren wird sowohl bei

der TCA-Fällung angewandt, um Säurespuren vom Niederschlag zu entfernen, als auch bei Äquilibriumsschritten zur in-Gel Spaltung, wo mehrmals mit 50% Acetonitril gewaschen wird. Ein direkter Vergleich zum silbergefärbten Gel ist hingegen nicht möglich, da hier die beiden Fixierschritte zur Färbung benutzt wurden, insofern der zu überprüfende Verlust der Schritte in allen Spuren auftreten sollte. Auffällig ist jedoch, dass die Sensitivität beider Färbung ungefähr gleich ist, wohingegen die Zn/Im-Färbung in der Literatur als deutlich geringer beschrieben wird (Ferrerias *et al.*, 1993). Der Versuch in Abbildung 3.57 unterstützt die Vermutung, dass speziell hydrophobe Proteine bei dieser Behandlung verloren gehen.

## 3.4 Proteinanalytik

### 3.4.1 Hochdurchsatz-Spaltung von Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Hochdurchsatz-Spaltung von Proteinen entwickelt. Aufgrund der thematischen Notwendigkeit, einen möglichst vollständigen Eindruck der verschiedenen Fraktionen und Subfraktionen zu erhalten, konnte die experimentelle Durchführung nicht in einzelnen Reaktionsgefäßen vollzogen werden. Die Benutzung von Mehrkanalpipetten beim Entfernen der Reaktionslösung ist aufgrund des Anhaftens der Gelstücke an die Pipettenspitzen nicht praktikabel.

Diese, sich als limitierender Schritt erweisende, Passage konnte mittels einer Filter-Mikrotiterplatte gelöst werden. Bei der Filtermembran handelt es sich um eine Durapor-PVDF-Membran, die eine geringe Protein/Peptid-Bindungsaffinität aufweist. Die ausgeschnittenen Gelstücke werden in die 96 Reaktionsgefäße der Filter-Mikrotiterplatte überführt, in der die Schritte zur Entfärbung und Äquilibriumierung vollzogen werden. In diesem System werden die Lösungen mittels einer Mehrkanalpipette in die Gefäße pipettiert und durch Zentrifugation durch die Filtermembran eluiert. Die zurückgehaltenen Gelstücke werden mit der Trypsinlösung überschichtet und nach der Spaltung werden die Peptide durch die Filtermembran in eine sich darunter befindliche Mikrotiterplatte zentrifugiert. Ebenso wird eine Nachelution bisher nicht aus dem Gelstück diffundierter Peptide mittels zweier Acetonitrilschritte durchgeführt. Da diese Elution durch die Filtermembran einer Sterilfiltration entspricht, werden so die Kokristallisation mit der MALDI-Matrix störende Verunreinigungen, wie etwa Gelreste, vom Eluat entfernt.

Der Einsatz dieser Filterplatten ermöglicht es, mit geringem Arbeitsaufwand (3 Stunden Hand-On) bis zu 768 Proben (8 mal 96-er MTP) zu entfärben und zu spalten.

Zweieinhalb Jahre nach der Etablierung der Methode wurde dieses Prinzip von der Firma Millipore patentiert und wird seitdem vermarktet.

### 3.4.2 Sensitivitätsbestimmung MALDI

Bei einer Sensitivitätsbestimmung des MALDI-Massenspektrometers wurden verschiedene Matrices, Probenhalter (Target) und Präparationstechniken miteinander verglichen. Folgende Techniken wurden dabei variiert:

Matrix: HCCA und DHB/MHB

Target: Anchor- und Stahltarget

Präparation: DriedDroplet (DD) und Dünnschicht (TL)

Um die Probe konstant zu halten, wurde mit einem in-Lösung-Verdau von Rinderserumalbumin (BSA) gearbeitet. Als Parameter der erhaltenen Spektrenqualität wurde der Mascot-Score gegen die MSDB-Datenbank gewertet. Bei dieser Versuchsreihe wurden verschiedenen Mengen an BSA aufgetragen, die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

**Tab. 3.8:** Abhängigkeit der Mascot-Scores bei unterschiedlichen MALDI-Präparationen und BSA-Mengen. Die genaue Zusammensetzung der Matrices ist dem Methodenteil zu entnehmen, bei den Nitrocellulosepräparationen besteht die Matrix aus 9,6 mg/ml HCCA und 4 mg/ml Nitrocellulose.

n(BSA)	DD HCCA Stahl	DD HCCA Anchor	TL HCCA/Nitrocell. Anchor	TL HCCA/Nitrocell. Anchor_2 min	DD DHB/MHB Anchor
1 pmol	139	155	0	163	163
500 fmol	190	175	0	152	0
250 fmol	209	226	0	79	187
125 fmol	209	307	0	83	51
50 fmol	226	247	0	0	138
25 fmol	132	220	0	174	0
10 fmol	50	329	0	0	0
5 fmol	0	94	0	0	0
2,5 fmol	0	0	0	0	0

BSA konnte bis zu einer Menge von 5 fmol bei der DriedDroplet Methode mit HCCA auf einem Anchor-target eindeutig identifiziert werden, jedoch können aufgrund der Protokollvorschrift nur Probenvolumina von 0,2 µl eingesetzt werden, was in einer automatischen Targetpräparation aufgrund eines benötigten Minimalvolumens von 10 µl nicht möglich ist.

Im Vergleich der anderen Präparationen zeigt sich, dass die DriedDroplet Methode auf Stahl bis zu 10 fmol identifizierbare Ergebnisse liefert und im Bereich von 500 fmol bis 50 fmol nahezu konstante Scores liefert.

Bei den Dünnschichtpräparationen wurde die Probe auf dem Target eingetrocknet (Datenspalte 3), bei einer anderen Präparation nach zwei Minuten wieder abpipettiert (Datenspalte 4). Das Abziehen der Probe ist somit zwingend nötig.

### 3. Ergebnisse

In einer zweiten Versuchsreihe (Tab. 3.9) wurden die Matrixkonzentrationen der Dünnschichtpräparation variiert, ferner wurde auf die Nitrocellulose verzichtet. Bei allen Präparationen wurde die Probe nach zweiminütiger Inkubation abpipettiert.

**Tab. 3.9:** Abhängigkeit der Mascot-Scores bei unterschiedlichen Matrixkonzentrationen der MALDI-Präparationen und BSA-Mengen. Die genaue Zusammensetzung der Matrices ist im Methodenteil beschrieben, Datenspalte 1 ist aus Tab 3.8 entnommen.

n(BSA)	TL HCCA-Nitrocell. Anchor	TL 8 mg/ml HCCA Anchor	TL 10 mg/ml HCCA Anchor	TL 12 mg/ml HCCA Anchor	TL 14 mg/ml HCCA Anchor	TL 16 mg/ml HCCA Anchor
1 pmol	163	94	189	190	195	100
500 fmol	152	156	157	151	194	181
250 fmol	79	203	62	147	134	238
125 fmol	83	189	186	287	196	150
50 fmol	0	129	0	110	85	63
25 fmol	174	139	0	0	92	86
10 fmol	0	0	0	0	0	0
5 fmol	0	0	0	0	0	0
2,5 fmol	0	0	0	0	0	0

Mit Ausnahme der 10 mg/ml-Konzentration von HCCA zeigten alle anderen Konzentrationen zwar eine gewisse Stabilität der Scores, jedoch konnte keine Sensitivitätssteigerung erreicht werden. Ferner ist zu berücksichtigen, dass durch die Notwendigkeit der Waschschrte die Dünnschicht-Präparation nicht automatisierbar ist. Für eine Hochdurchsatz-Analytik ist diese Automatisierung jedoch Voraussetzung. Diese Ergebnisse führten dazu, dass als Standardmethode die Proben mittels DriedDroplet in einer HCCA-Matrix automatisch auf ein Stahltarget pipettiert und vermessen wurden.

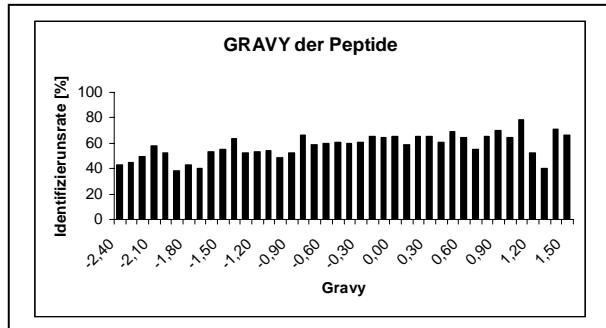
#### 3.4.3 Analyse der MALDI-identifizierten Peptide

Während löslichen Proteine in sehr hohem Maße über MALDI-MS-Fingerprint analysiert werden konnten, war die Identifizierungsrate bei den Membranproteinen eher niedrig. Proteine aus Membranpräparationen wiesen eine relativ hohe Anzahl von Proteinflecken auf, die selbst bei großer Spotintensität nicht identifiziert werden konnten.

Um die allgemeine Anwendbarkeit der MALDI-Messmethodik zu überprüfen, wurden die identifizierten Peptide von über 6000 Spektren einer Nachanalyse unterzogen. Kriterium dieser Analyse war der GRAVY-Index, der als Maß der Hydrophobizität ein Merkmal der integralen Membranproteine darstellt. Ergebnis dieser Untersuchung ist, dass unter der benutzten Methodik die Identifizierungsrate der gefundenen Peptide unabhängig von deren Hydrophobizität (GRAVY) ist (Abbildung 3.58).

Bei dieser Untersuchung wurde der GRAVY-Bereich von  $-2,40$  bis  $+1,60$  betrachtet, der Wert von  $+1,6$  ist dabei sehr hoch, wie aus einer statistischen Betrachtung der

Aminosäurezusammensetzung der Transmembranhelices (Anhang 7.7) hervorgeht. Der durchschnittliche GRAVY-Wert der Transmembranbereiche (22 Aminosäuren) liegt bei +1,73, jedoch wird dieser Wert durch ein folgendes Lysin/Arginin (bei tryptischer Spaltung) schon auf +1,47 (23 Aminosäuren) reduziert.



**Abb. 3.58:** Identifizierungsrate der gefundenen Peptide bezüglich des GRAVY-Wertes.

Ferner wurden für die Analyse ausschließlich Peptide von den Proteinen ausgewählt, die den Identifizierungsstatus trusted oder insecure besitzen.

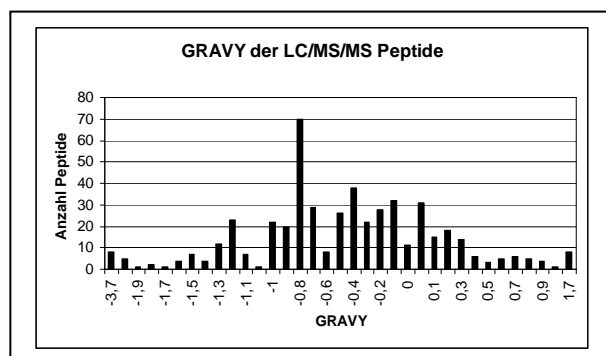
Diese Analyse zeigt, dass die Hydrophobizität von Membranproteinen kein Kriterium für ihre eventuelle Nicht-identifizierung ist. Da die Identifizierung

unter den Standardbedingungen erfolgte, können weitere Rückschlüsse auf die Probenpräparation gezogen werden:

- (1) Hydrophobe Peptide lassen sich aus den Gelstücken eluieren
- (2) sie gehen nicht an den Oberflächen der benutzten Mikrotiterplatten, Filtermembranen und Pipettenspitzen verloren
- (3) die Matrixpräparation auf Stahltargets führt zu keiner Abreicherung (was bei den hydrophoben Ankertargets der Fall sein sollte)
- (4) die Protonierungseffizienz ist im Vergleich zu hydrophilen Proteinen nicht benachteiligt.

### 3.4.4 Analyse der LC/MS/MS-identifizierten Peptide

Analog der Überprüfung der mittels MALDI-MS identifizierten Peptide wurden die GRAVY-Werte der über LC/MS/MS identifizierten Peptide analysiert. Insgesamt konnten aus beiden Experimenten 497 Peptide identifiziert werden (wobei auch Mehrfach-Identifizierungen miteinbezogen wurden), die zu 205 Proteinen gehören.



**Abb. 3.59:** Anzahl und GRAVY der gefundenen Peptide der LC/MS/MS-Messung.

Die Verteilung nach deren Hydrophobizität ist in Abbildung 3.59 dargestellt, jedoch wurde hier (im Gegensatz zur MALDI-Analyse) die Anzahl der identifizierten Peptide aufgetragen.

Aus dieser Darstellung ist ersichtlich, dass die meisten identifizierten Peptide einen GRAVY zwischen  $-1,0$  und  $+0,1$  haben.

### 3. Ergebnisse

Jedoch muss berücksichtigt werden, dass bei der Analyse keine Helices gefunden wurden, deren Hydrophobizität innerhalb der Helices einen GRAVY-Wert von +1,7 besitzen. Es wurden zwar insgesamt 8 Peptide gefunden, die einen GRAVY zwischen 1,1 und 1,7 besitzen, jedoch ist diese Anzahl bezüglich der möglichen Helicesanzahl extrem gering. Aus einer Statistik wurde errechnet, dass bei 565 integralen Membranproteinen 2784 Helices vorhanden sind.

Um eine Aussage über einen möglichen Längen-„Cut-Off“ der LC/MS/MS Analyse zu treffen, wurde daher analog der MALDI-Auftragung (Abbildung 3.56) das Verhältniss zu den vorhandenen Peptiden berechnet. In dieser Statistik wurden gefundene Peptide nur einfach gewertet, d.h. mögliche Methioninoxidierung, Mehrfachladung und mehrfache Identifizierung nicht miteinberechnet.

**Tab. 3.10:** Anzahl und Länge der gefundenen Peptide der LC/MS/MS-Messung

Anzahl Aminosäuren	identifizierte Peptide	theor. vorhandene Peptide	%
5-9	194	1268	15,3
10-15	329	732	44,9
15-20	145	452	32,1
20-25	55	336	16,4
25-30	19	258	7,4
31ff	9	655	1,4

In dieser Betrachtung wurden die Längen der identifizierten Peptide mit den (nach theoretischer tryptischer Spaltung) in den 205 identifizierten Proteinen vorhandenen Peptiden verglichen (Tabelle 3.10).

Die prozentual meisten Peptide wurden mit einer Länge von 10-15 Aminosäuren gefunden, eine deutliche Abnahme der Identifizierungsrate tritt ab einer Länge von 25 Aminosäuren auf.

#### 3.4.5 Entfernung von SDS aus silbergefärbten Gelen

Allgemein stören Detergenzien die nachfolgende Massenspektrometrie. Während eine MALDI-Messung im Gegensatz zu einer ESI-Quelle relativ unempfindlich gegen nichionische Detergenzien ist, muss das anionische Detergens SDS bei beiden Messungen entfernt werden.

In einem Parallelversuch zur Abtrennung des SDS wurde ein 2-D Gel einer Membranfraktion nach Silberfärbung mit Triethylamin/Aceton versetzt (vgl. 2.3.13), ein anderes, identisches, Gel blieb unbehandelt. Die Inkubation mit Triethylamin führt zu einer Ionenpaarbindung des tertiären Amins mit dem anionischen SDS, welches in Aceton löslich ist (Henderson *et al.*, 1979).

Aus beiden Gelen wurden je 48 identische Spots ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF gemessen. Im Vergleich zu dem nichtbehandelten Gel konnten mehr Spots identifiziert werden: 27 trusted (21) und 8 insecure (4). Die Anzahl von questionable gewerteten Proteine, war im behandelten Gel geringer 5 (13).

Die Verschiebungen fanden dabei fast von questionable zu insecure, und von insecure zu trusted statt.

Eine Zusammenfassung der im Anhang unter Abschnitt 7.4 dargestellten Auflistung führt zu folgendem Ergebnis, dargestellt in Tabelle 3.11.

**Tab. 3.11:** Statusveränderung der massenspektrometrisch analysierten Proteine nach Triethylamin-Behandlung im Gel.

Statusveränderung	Anzahl	Statusveränderung	Anzahl
trusted gleich	18	questionable $\Rightarrow$ trusted	4 (2 identisch)
insecure gleich	2	insecure $\Rightarrow$ trusted	2 (2 identisch)
questionable gleich	1	unknown $\Rightarrow$ trusted	1 (identisch)
unknown gleich	2	questionable $\Rightarrow$ insecure	4 (4 identisch)
nicht gemessen $\Rightarrow$ trusted	1	unknown $\Rightarrow$ insecure	1 (identisch)
		trusted $\Rightarrow$ questionable	2 (1 identisch)

Eine genauere Analyse der Peptide, die durch die Triethylamin-Behandlung zusätzlich identifiziert werden konnten, führte zu folgenden Ergebnissen:

(1) Der GRAVY-Index ist unabhängig von der Behandlung, es wurden keine extrem hydrophoben Peptide gefunden.

(2) Der aliphatische Index (Ikai, 1980) scheint eine Bedeutung zu spielen, Peptide mit einem aliphatischen Index von größer 84 wurden relativ häufig gefunden.

Dieser ist definiert als das relative Volumen eines Proteins, welches aus aliphatischen Seitenketten (Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin) besteht. Eine Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Aliphatischer Index} = X(\text{Ala}) + a * X(\text{Val}) + b * ( X(\text{Ile}) + X(\text{Leu}) )$$

wobei  $X(\text{Ala})$ ,  $X(\text{Val})$ ,  $X(\text{Ile})$ , und  $X(\text{Leu})$  Molprozent von Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin sind (100 X Mol Fraktion). Die Koeffizienten  $a$  und  $b$  spiegeln das relative Volumen der Seitenkette von Valin ( $a = 2,9$ ) und von Leu/Ile ( $b = 3,9$ ) bezüglich der Seitenkette von Alanin wieder.

Durch Einsetzen der prozentualen Verteilung der Aminosäuren von Mesophilen und Halophilen ergeben sich nahezu identische Werte: der durchschnittlicher aliphatischer Index von mesophilen Proteinen liegt bei 83,1%, der von *H. salinarum* bei 83,8%.

Die zusätzlich neu gefundenen Peptide bei den 10 Proteinen, die durch die Triethylbehandlung einen besseren Status bekamen, wurden auf ihren aliphatischen Index untersucht.

In der Gruppe questionable  $\Rightarrow$  trusted wurden insgesamt 7 neue Peptide gefunden, 5 davon mit einem aliphatischen Index größer 84 (71%). Bei insecure  $\Rightarrow$  trusted waren es 5 Peptide, 3 davon (60%) mit einem  $aI$  größer 84, bei vorher als unknown gewerteten Proteinen handelt es

### 3. Ergebnisse

sich um 5 Peptide, davon war 1 (20%) größer als 84. Bei den von questionable zu insecure aufgewerteten Proteinen wurden 7 Peptide gefunden, davon 4 (57%) mit einem aI von größer 84.

Unabhängig vom vorherigen Identifizierungsstatus wurden so bei 10 Proteinen insgesamt 23 neue Peptide gefunden, 13 davon (57%) mit einem aI größer 84, der Durchschnittswert der neu gefundenen Peptide lag bei 91.

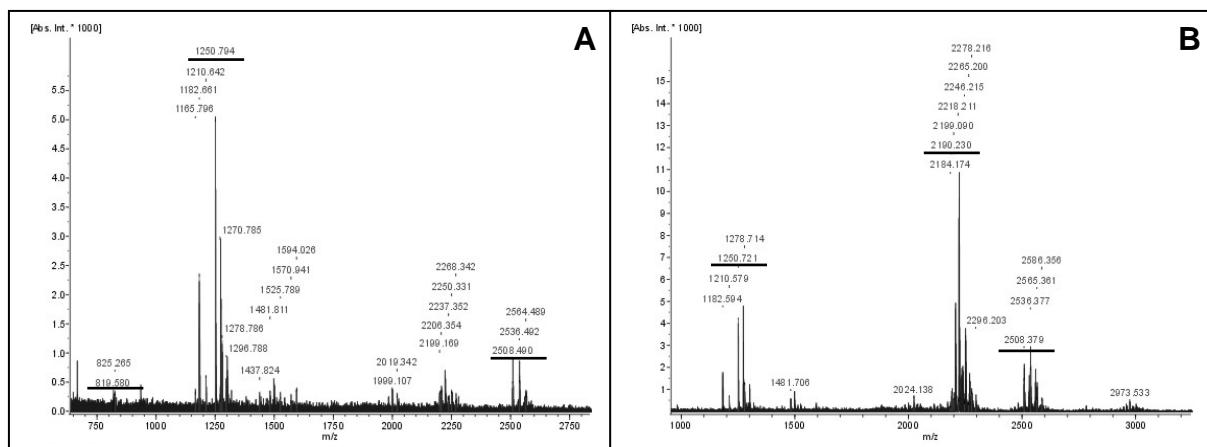
#### 3.4.6 Spaltung und Identifizierung von Bakteriorhodopsin

Die im Laufe dieser Arbeit identifizierten Proteine zeigten nach bioinformatischen Berechnungen, dass die nach tryptischem Verdau generierten Peptide unabhängig von ihrer Hydrophobizität identifiziert werden konnten. Im Falle von HtrI, der kupfertransportierenden ATPase und dem Arginin/Ornithinaustauscher-Austauscher sind jedoch keine Peptide gefunden worden, die innerhalb von helikalen Einheiten lokalisiert sind.

Es wurde daher überprüft, ob diese unter der benutzten MALDI-Standardmethode überhaupt ionisiert werden können.

Als Modell wurde das Membranprotein Bakteriorhodopsin gewählt, welches mit Ausnahme des C-Terminus nahezu vollständig aus Helices besteht (vgl. Abschnitt 7.2).

Um die bereits in der Literatur erwähnte Problematik der tryptischen Spaltung von BR (Shevchenko *et al.*, 2000) zu umgehen, wurde 1 µg einer Purpurmembranfraktion mittels Bromcyan gespalten und anschließend mittels der DriedDroplet (HCCA)-Methode auf ein Stahltarget pipettiert und automatisch gemessen. Die aufgetragenen Mengen betragen dabei 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng, 31,2 ng, 15,6 ng, 7,8 ng und 3,9 ng. Abbildung 3.60 A zeigt das MALDI-Fingerprint-Spektrum der 125 ng Probe, Abbildung 3.60 B das der 3,9 ng Probe. Bei beiden Spektren konnten jeweils 3 Peptide gefunden werden, die der Voraussage



**Abb. 3.60:** MALDI-Fingerprint-Spektrum von Bakteriorhodopsin, welches mit BrCN gespalten wurde. (A) zeigt dabei das Spektrum bei einer Auftragsmenge von 125 ng, (B) von 3.9 ng. Balken unter den Massenzahlen zeigen Peptide, die der theoretischen Spaltung entsprechen.



entsprachen. Tabelle 3.12 zeigt die im Massenbereich zwischen 800-4000 m/z liegenden Peptide nach theoretischer Spaltung mit Bromcyan.

**Tab. 3.12:** Peptide von chemisch (BrCN) gespaltenem Bakteriorhodopsin im Massenbereich 800-4000 m/z nach theoretischer Spaltung. Fettgedruckte Massen wurden in den Spektren aus Abb. 3.60 gefunden.

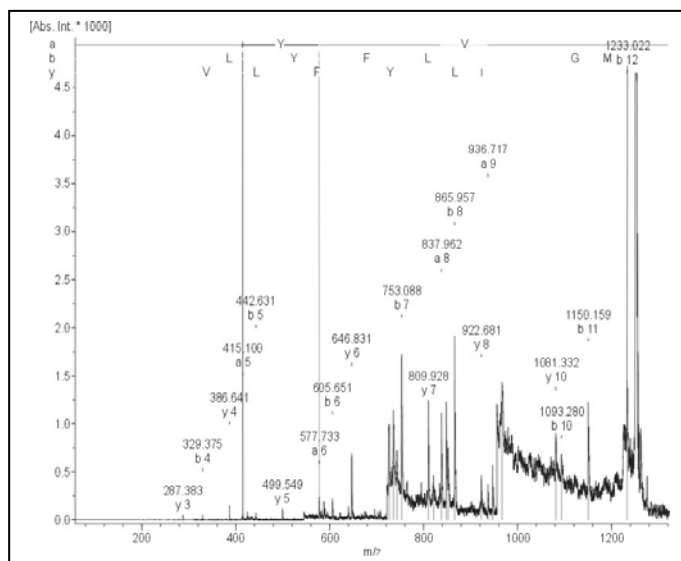
m/z	Position	GRAVY	A.I	Modifikat.	Sequenz	GRAVY
3958,0555	210-249	0,345	100,25		VLDVSAKVGFLILLRSRAI FGAEAEPEPSAGDGAAATSD	0,345
2913,5661	119-145	0,867	104,81		IGTGLVGALTKVYSYRFVWWAIST AAM	0,867
<b>2508,3384</b>	33-56	0,554	89,58		GVSDPDAKKFYAITTLVPAIAFTM	0,554
2207,1971	1-20	0,355	112,50	PYRR: <b>2190,1705</b>	QAQITGRPEWIWLALGTALM	0,355
2081,0993	146-163	1,083	108,33		LYILYVLFFGFTSKAESM	1,083
<b>1250,7143</b>	21-32	1,100	121,67		GLGTYFLVKGM	1,100
<b>819,4611</b>	61-68	1,312	146,25		LLGYGLTM	1,312

Während die Peptide mit den Massen 1250 und 2508 in beiden Spektren gefunden wurden, wurde das Pyroglutamat-Peptid mit der Masse 2190 nur in dem Spektrum mit der höheren Auftragsmenge gefunden. Bei der niedrigeren Auftragsmenge hingegen konnte stattdessen das Peptid mit der Masse 819 gefunden werden.

Mit Ausnahme des Peaks mit 819 m/z haben alle anderen Peptide lange helikale Bereiche.

Zur Identifizierung von Bakteriorhodopsin reichte die Anzahl von 3 Peptiden nicht aus, es wurde daher mittels PSD verifiziert, indem der Peak mit 1250 m/z aus dem Spektrum von Abbildung 3.60A analysiert wurde (125 ng Auftragsmenge).

Das erhaltene Spektrum ist in Abbildung 3.61 dargestellt.



**Abb. 3.61:** MALDI-PSD-Spektrum von Bakteriorhodopsin, Peak 1250 m/z bei 125 ng Auftragsmenge.

Die y- und b-Reihen sind nahezu vollständig: Bei der y-Reihe konnten y3-y8 und y10 zugeordnet werden, bei der komplementären b-Reihe b4-b8 und b10-b12.

Bei den Peaks mit 2190 und 2508 (vgl. Tabelle 3.12) konnte jedoch keine Sequenzinformation gewonnen werden. Eine nähere Diskussion zu den Fingerprint- und PSD-Messungen findet sich im Diskussionsteil unter Abschnitt 4.3.7.

## 4. Diskussion

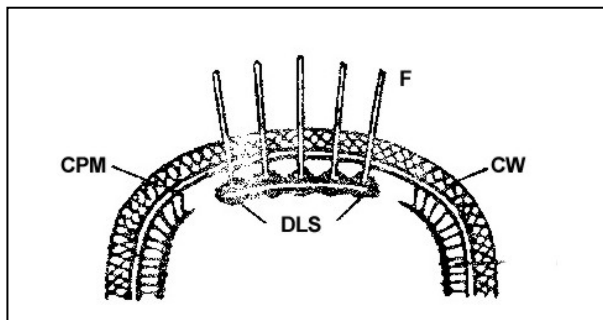
In dieser Arbeit wurden verschiedene Sub-Proteome von *Halobacterium salinarum* untersucht. Hierbei fand eine Unterscheidung nach zellulären Kompartimenten statt, die folgendermaßen gegliedert wurden:

1. Das Flagellarmotorproteom, welches hauptsächlich strukturell untersucht wurde
2. Das Cytosolproteom, das mittels des IEF/SDS-Systems aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert wurde
3. Das Membranproteom, an dem die Grenzen des IEF/SDS-Systems aufgezeigt wurden und alternative Auftrennungsmethoden erarbeitet wurden.

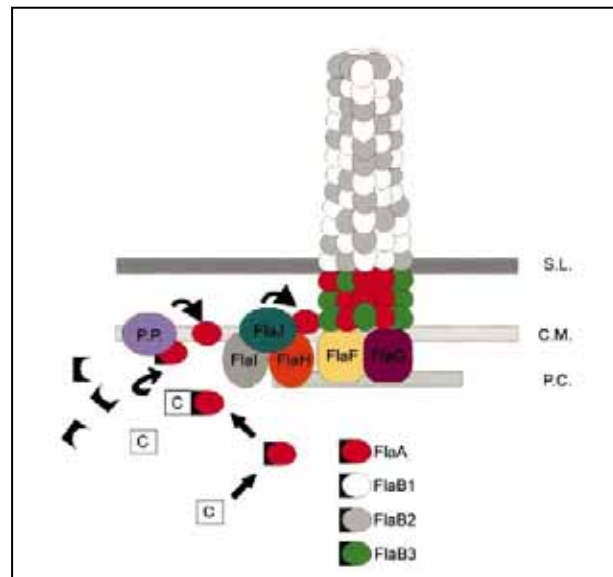
### 4.1 Das Motorproteom

#### 4.1.1 Modelle zum archaealen Flagellarkomplex

Bisher ist wenig über den Aufbau archaealer Motorkomplexe bekannt (vgl. Abschnitt 1.5). Informationen liegen zwar detailliert über die Flagelle selber vor, jedoch über die Art der Verankerung ist außer der Existenz einer Polkappe nichts bekannt (Kupper *et al.*, 1994; Speranskii *et al.*, 1996). In einem ersten Modell von Speranskii wurde aus Beobachtungen von Dünnschnitt-elektronenmikroskopischen Aufnahmen angenommen, dass die Flagellen in einer scheibenförmigen Lamellenstruktur (Disk-like lamellar structure, DLS, entspricht der Polar Cap) verankert sind, und von dort durch die Membran und den S-Layer verlaufen (Abbildung 4.1).



**Abb. 4.1:** Modell von Speranskii *et al.* (1996) zur Lokalisierung von Flagellen und Polar Cap. (F: Flagelle, CPM: Cytoplasma-Membran, CW: Cell-Wall, DLS:Disk-like lamellar structure).



**Abb. 4.2:** Spekulatives Modell zur Struktur und Assemblierung einer Flagelle von *M. voltae* nach Thomas *et al.* (2001). (SL:S-Layer, CM: Cytoplasma-Membran, PC: Polar Cap).

Eine der Polar Cap ähnliche Struktur wurde auch bei *Methanococcus voltae* gefunden (Koval und Jarrel, 1987). Gleichzeitig wurde eine knaufähnliche Form am Ende der Flagelle beobachtet (Kalmakoff *et al.*, 1988).

Eine Hook-Struktur, die der in Bakterien ähnlich ist, findet sich bei *Methanococcus voltae* (Thomas *et al.*, 2001) und *Methanococcus thermolithotrophicus* (Cruden *et al.*, 1989), welche jedoch weitaus länger als die bakteriellen Strukturen sind (100 nm bis 265 nm im Vergleich zu 55 nm bei Salmonella).

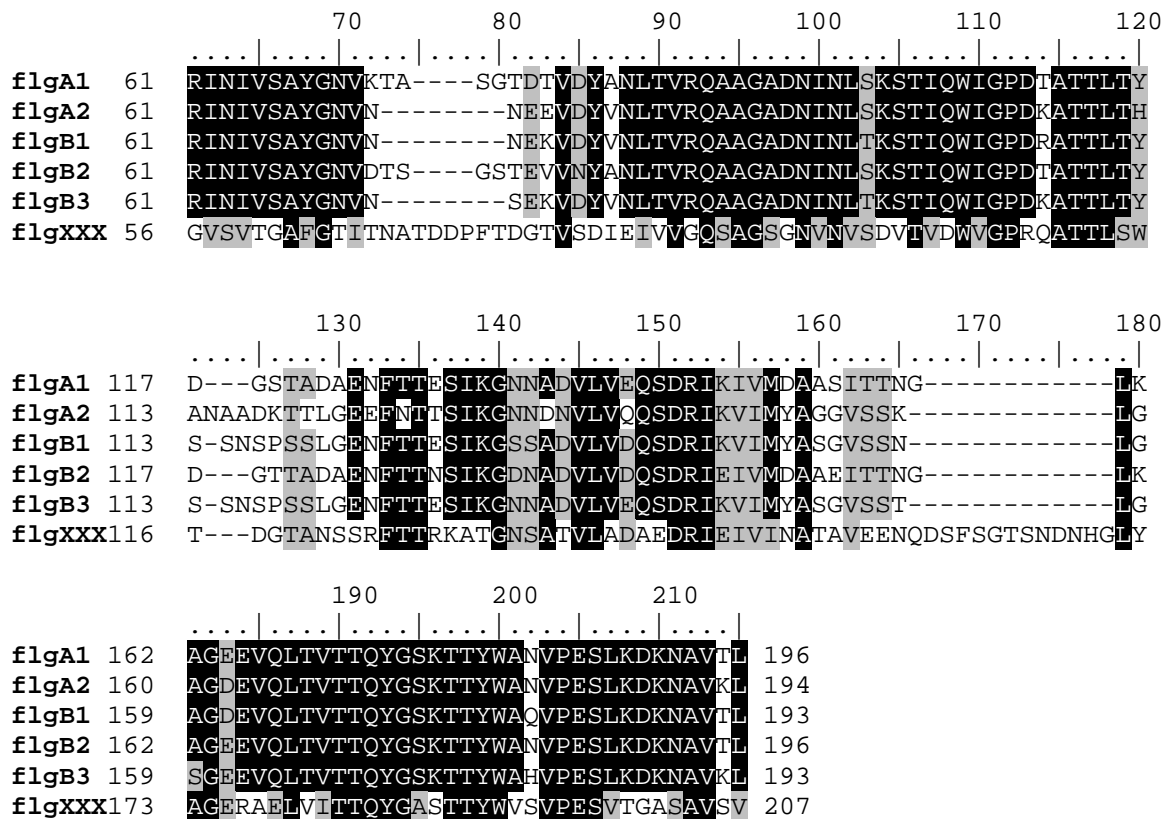
In einem Modell von Jarrell (Thomas *et al.*, 2001) wurden die bisher bekannten Informationen von *M. voltae* unter Berücksichtigung der Assemblierungs-Komponenten zusammengefasst, gleichzeitig wurde eine Hook-Komponente, bestehend aus FlaA und FlaB3 eingeführt (Abbildung 4.2). Auffallend war ferner die Beobachtung, dass FlaB3 ausschließlich in der Hook-Region vorhanden ist, nicht jedoch in der Flagelle (Bardy *et al.*, 2002). Die Zuordnung von den bekannten Flagellinen an einen Hook ist bei *H. salinarum* nicht zutreffend, da sämtliche flaA und flaB-Proteine in der gesamten Flagelle vorhanden sind. Den Modellen von Speranskii und Jarrell wird in Abschnitt 4.1.5 ein eigenes Modell gegenübergestellt, welches die genannten Merkmale beider Modelle vereinigt, jedoch zusätzliche Aspekte aus eigenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Überlegungen zur Rotation berücksichtigt.

#### 4.1.2 Homologien der Flagelline von *H. salinarum* zu anderen Archaea

Eine Homologiesuche des Hook-bildenden FlaB3 aus *M. voltae* gegen *H. salinarum* ergab, dass ein weiteres Flagellin-Protein existiert, welches bisher nicht auf Proteinebene identifiziert werden konnte. Dieses flagellinXXX (flgXXX, 115kB entfernt von flgA2) wurde mit einer Wahrscheinlichkeit von  $6e^{-12}$  (Blosum62) gefunden und besitzt in den Aminosäurepositionen 3-59 eine Identität von 29% und 50% Positive, verglichen mit FlaB3 aus *M. voltae* (Positionen 12-68, vgl. Abschnitt 7.3). Diese Werte variieren nur geringfügig von den anderen Fla-Proteinen von *M. voltae*. Im Vergleich von flgXXX zu den bisher bekannten Flagellinen von *H. salinarum* ist eine noch signifikantere Übereinstimmung vorhanden. Eine Sequenzanalyse aller Flagelline von *H. salinarum* sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

		10	20	30	40	50	60
		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
<b>flgA1</b>	1	MFEFITDEDERGQVIGIGTLIVFIAMVLVAAlAAGVLIINTAGFLQSKGSATGEEESAQVSN					
<b>flgA2</b>	1	MFEFITDEDERGQVIGIGTLIVFIAMVLVAAlAAGVLIINTAGFLQSKGSATGEEESAQVSN					
<b>flgB1</b>	1	MFEFITDEDERGQVIGIGTLIVFIAMVLVAAlAAGVLIINTAGYLQSKGSATGEEESAQVSN					
<b>flgB2</b>	1	MFEFITDEDERGQVIGIGTLIVFIAMVLVAAlAAGVLIINTAGYLQSKGSATGEEESAQVSN					
<b>flgB3</b>	1	MFEFITDEDERGQVIGIGTLIVFIAMVLVAAlAAGVLIINTAGYLQSKGSATGEEESAQVSN					
<b>flgXXX</b>	1	-----MESMRRGQVIGIGTLIVFVAMILVAAMAAS TLVDIGGMLQSRGDATGEEAVGQVSN					

#### 4. Diskussion



**Abb. 4.3:** Homologievergleich der Flagelline von *H. salinarum*.

Die ersten 60 Aminosäuren stellen eine hochkonservierte Region dar, die in vielen Archaea vorhanden ist. Ein umfassendes Alignment dieser Region ist im Anhang unter Abschnitt 7.3 abgebildet. Bei allen befindet sich eine Signalpeptid-Schnittstelle nach einem Glycin (Position 12 bei *H. salinarum*), jedoch besitzt flgXXX in diesem Bereich eine andere Aminosäuresequenz als die anderen Flagelline aus *H. salinarum*. Zusätzlich sind bei flgXXX zwei saure Bereiche (pI 3,42 und 3,91) in den Positionen 72-83 und 163-178 vorhanden, die sehr hydrophil sind (GRAVY -0,743 und -2,019) und bei den anderen halobakteriellen Flagellinen fehlen. Sowohl aus dem unterschiedlichen Aufbau des nicht-konservierten Bereiches als auch des differierenden N-Terminus lässt sich auf eine andere Lokalisation und Funktion des flgXXX schließen.

Bei *M. voltae* konnte flaK als die Preflagelline-Peptidase identifiziert werden. Diese ist mit 5 vorhergesagten (TMHMM) Transmembranhelices in der Membran verankert. Eine Homologiesuche gegen *H. salinarum* ergab mit einer Wahrscheinlichkeit von  $4e-10$  (BLOSUM62) ein preflagelline peptidase Homolog (OE4201R) mit ebenfalls 5 vorhergesagten Helices. (Anmerkung: Das existierende flaK in *H. salinarum* (Oe2378R), welches im fla-Operon lokalisiert ist, stellt ein Homolog des cell division inhibitor minD dar, hat jedoch keine Homologie zu dem flaK aus *M. voltaea*).

Zusammen mit den Flagellin-Proteinen wurde das preflagelline peptidase Homolog (Oe4201R) in der Membranfraktion mittels LC/MS/MS identifiziert. Das flgXXX konnte jedoch in den bisherigen Aufarbeitungen nicht identifiziert werden (vgl. Abschnitt 3.3.12.1 und 7.6).

#### 4.1.3 Glykosilierung der Flagelline

Die Flagelline sind ähnlich wie das Glykoprotein der Zellhülle glykosiliert (Wieland *et al.*, 1985), wobei der Zuckerteil über eine N-glykosidische Bindung an einem Asparagin erfolgt (vgl. Abschnitt 1.4.1). Diese Glykosilierung findet als post-translationale Modifikation außen an der Zelloberfläche statt (Sumper, 1987).

Das allgemeine Motiv für die Glykosilierung des Oberflächenproteins und der Flagelline ist N-X-T/S. Die Flagelline (mit Ausnahme von flgXXX) haben 3 hochkonservierte Glykosilierungsseiten, dem Sequenzvergleich oben entsprechend an den Asparagin-Positionen 88, 101 und 132. Lediglich die Position 101 ist bei flgXXX konserviert, jedoch ist das N-X-T/S Motiv zusätzlich noch an den Positionen 73, 129 und 158 vorhanden.

Bei höheren Konzentrationen des nicht-zellgängigen Antibiotikums Bacitracin (Mescher und Strominger, 1978) sind in *M. deltae* keine intakten Flagellen mehr zu erkennen (Bayley *et al.*, 1993), was zu dem Schluss führt, dass eine minimale Glykosilierung zur Filamentausbildung nötig ist. Bei Zellen von *H. salinarum*, die mit Bacitracin inkubiert wurden, konnten ebenfalls keine Flagellen beobachtet werden (Abb. 3.9 und 3.10).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich der Rückschluss ziehen, dass eine die cytoplasmatische Membran durchdringende Flagelle auf der Cytosolseite entweder unglykosiliert vorliegt, oder aber eine andere Flagellin-Zusammensetzung besitzt. Bei einer anderen Zusammensetzung der Flagelle im Cytosolraum wäre somit die Anwesenheit von Glykosilierungsstellen nicht notwendig.

#### 4.1.4 Energiequelle der Motorrotation

Bei den Bakterien findet die Flagellar-Rotation über einen Protonengradienten statt. Das die cytoplasmatische Membran durchspannende Protein motA bildet einen Protonenkanal-Komplex, welcher aus zwei Halbkanälen besteht. Diese Halbkanäle haben untereinander keinen Kontakt. Ein Proton von einem Halbkanal wird an ein protonenbindendes Protein am M-Ring übertragen und kann nur dann den anderen Halbkanal erreichen, wenn sich der M-Ring dreht. Der entstehende Protonenfluss in das Cytoplasma wird durch den Protonengradienten über die Membran hinweg ermöglicht.

Erster Nachweis dieser Antriebsquelle wurde durch eine Aufhebung des Protonengradienten erbracht (Larsen *et al.*, 1974): Durch Zugabe des Ionophors Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) zu einer Suspension von *E. coli* Zellen wurde die Motilität innerhalb von 10 Sekunden vollständig aufgehoben.

Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei Zellen von *H. salinarum* gemacht, was darauf hindeutet, dass auch bei den Archaea ein ähnliches Prinzip der Rotationsbewegung vorliegt.

Diese Annahme ist Grundlage für eine Betrachtung zur Lokalisierung der StatorKomponenten des archaealen Flagellarmotors:

(1) Lokalisierung der StatorKomponenten innerhalb der Polar Cap

Aus den EM-Aufnahmen von *M. voltae* und *H. salinarum* wurde auf einen membranartigen Charakter der Polar Cap geschlossen. Eine die cytoplasmatische Membran durchdringende Flagelle kann von motA/motB-Homologen, welche in der Polar Cap-Membran verankert sind, angetrieben werden. Damit dieser Antrieb protonengetrieben funktioniert, muss (1) das Kompartiment, welches zwischen der Polar Cap und der cytoplasmatischen Membran liegt, vom Cytoplasma abgetrennt sein (2) dieser Bereich der cytoplasmatischen Membran protonendurchlässig sein und (3) der Protonengradient über die Membran der Polar Cap aufrecht erhalten werden, um so einen Protonendurchfluss durch die Halbkanäle zu gewährleisten. Aufgrund dieser Anforderungen wird dieses Modell als nicht wahrscheinlich angesehen.

(2) Lokalisierung der StatorKomponenten innerhalb cytoplasmatischen Membran

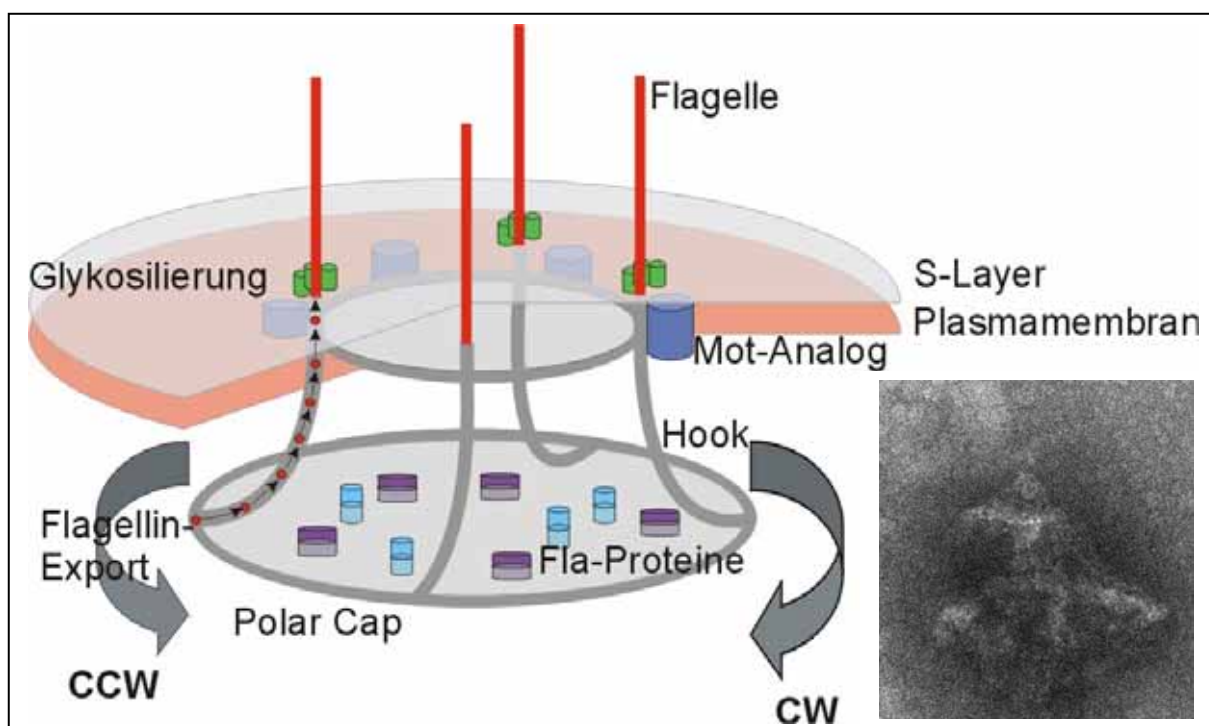
Die Flagelle durchdringt die cytoplasmatische Membran und wird durch mot-Homologe, welche diese durchspannen, angetrieben. Diese Annahme ist mit dem aus den Bakteria bekannten Protonengradienten-basierenden Modell einfach zu vereinbaren. Die Polar Cap hat nach diesem Modell die Aufgabe, das Flagellenbündel zusätzlich zu stabilisieren. Diese zusätzliche Verankerung ist nötig, da bei *H. salinarum* zur Stabilisierung nur der direkt außerhalb der Membran befindliche S-Layer, jedoch kein zusätzlicher Mureinwall wie bei den Bakteria vorhanden ist. Eine weitere Erklärung stellt die Art der Assemblierung der Flagellen dar:

Im Gegensatz zu den Bakteria erfolgt diese nicht vom Ende der Flagellen her, sondern die Verlängerung erfolgt von deren Anfang. Bei den Bakteria sorgt eine „Deckel“-Struktur dafür, dass die durch die Flagelle exportierten Proteine assembliert werden (Hughes und Aldridge, 2001). Aufgrund des geringen Innendurchmessers der archaealen Flagellen (Trachtenberg, 2000), kann die Assemblierung der Flagellen in Archaea nicht wie bei den Bakterien erfolgen, sondern ist eher dem Export der Pili wahrscheinlich.

In dem Modell von Jarrell wird zwar die Pili-ähnliche Assemblierung der Flagelle beschrieben, jedoch bleibt das von Speranskii beobachtete Durchdringen der Flagelle durch die cytoplasmatische Membran bis zur Polar Cap unberücksichtigt. Weiterhin bleibt bei dem Modell von Jarrell unklar, wie (1) die Verlängerung der Flagelle bei einer vorhandenen Hook-Struktur von der Polar Cap aus erfolgen kann und (2) wie eine Rotation (bei Assemblierung zwischen cytoplasmatischer Membran und S-Layer) möglich ist.

#### 4.1.5 Modell des Flagellarmotors

Ein mögliches Modell, welches alle oben genannten Beobachtungen zusammenfasst, ist in Abbildung 4.4 dargestellt, zusammen mit der die EM-Aufnahme von Abb. 3.14 B.



**Abb. 4.4:** Modell zum Flagellarmotor, welches auf einer rotierenden Polar Cap und einer Hook-Struktur basiert. Als Einsatz ist die EM-Aufnahme von Abb. 3.14 B abgebildet.

Dieses Modell beruht auf zwei kreisförmigen Strukturen, die über Hook-Strukturen miteinander verbunden sind und zusammen den Rotor darstellen (vgl. Abb. 3.14 B).

Die kleinere Ringstruktur (vgl. Abb. 3.13 und Abb. 3.14 B) besitzt einen Durchmesser von 140 nm und ist in der Membran verankert. Die größere Struktur (Abb. 3.14 A) mit einem Durchmesser von 280 nm ist die Polar Cap, die mit dem kleineren Ring verbunden ist (Abb. 3.14 B). Zugleich sind beide Ringe zusätzlich über Hook-Strukturen miteinander verbunden, die den publizierten Längen von *M. thermolithotrophicus* (Cruden *et al.*, 1989) entsprechen (vgl. Abschnitt 3.1.5).

Folgende Punkte dieses Modells werden diskutiert:

(1) die Funktion der Polar Cap

Archaea haben im Gegensatz zu den Bakterien keine Murein-Zellwand, die Stabilisierung der Zelle erfolgt über einen direkt über der Membran liegenden S-Layer. Als zusätzliche (intrazelluläre) Stabilisierung des Flagellenbündels kann bei den Archaea die Polarkappe dienen. Gleichzeitig kann an dieser die Flagellarbiosynthese erfolgen, der Flagellin-Export erfolgt durch den Hook.

(2) Der Hook

Der in Abbildung 3.14 A gemessene Flagellen/Hook-Durchmesser von 29 nm ist doppelt so groß wie der normale Flagellendurchmesser. Dieser Durchmesser reicht aus, um ähnlich den Bakterien einen Flagellinexport durch den Hook zu ermöglichen, der gekrümmt innerhalb der Zelle vorliegt und die beiden Ringe verbindet. Der Hook kann durch das flgXXX ausgebildet werden, welches den Flagellen homolog ist, jedoch nicht glykosyliert ist. Desweiteren besitzt das flgXXX zwei Bereiche (Positionen 72-83 und 163-178, vgl. Abbildung 4.3), die bei den anderen Flagellinen fehlen. Unter Umständen können diese stark hydrophilen Bereiche die Innenseite des Hook-Kanals darstellen, durch den die schwach hydrophilen Pre-Flagelline (GRAVY  $-0,09$  bis  $-0,04$ ) exportiert werden. Die Assemblierung der Pre-Flagelline zur Flagelle kann im Anschluß an diesen erfolgen, die Glykosylierung der Flagelle findet anschließend an der Zelloberfläche statt.

(3) die strukturell synchronisierte Rotation der Flagellen

Die Anordnung von mehreren fest verankerten Flagellen an eine Rotor-Struktur erklärt in einfacher Weise den „push/pull“-Mechanismus von *H. salinarum*. Eine Änderung der Protonentranslokation wirkt sich sofort auf das gesamte Flagellenbündel aus, so dass eine Bewegung der Zelle in beide Richtungen erfolgen kann. Bei den Bakterien findet zwar auch eine Rotation gegen den Uhrzeigersinn (counterclockwise, ccw) statt, jedoch fällt dabei das Flagellenbündel auseinander.

(4) Anzahl der Flagellen

Der Umfang des kleineren Ringes (bei 140 nm Durchmesser) beträgt 440 nm, der Durchmesser des postulierten Hooks 29 nm. Damit könnten maximal 15 Hook-Strukturen an diesem lokalisiert sein. Dies entspricht exakt der maximal beobachteten Anzahl von Flagellen bei *H. salinarum*. Bei *Haloarcula quadrata* ist hingegen nur eine Flagelle beobachtet worden (Alem *et al.*, 1984; Oren, 2002). Um die Rotation mit diesem Modell zu erklären, muss der Hook vom Mittelpunkt des größeren Ringes durch den Mittelpunkt des kleineren Ringes verlaufen.



## (5) Größenverhältnisse der rotierenden Strukturen

Ein möglicher Kritikpunkt an diesem Modell ist die Größe der rotierenden Struktur, die bei 140 nm (kleinerer Ring) bzw. 280 nm (Polar Cap) liegt. Das Volumen der Polar Cap liegt bei einer angenommenen Dicke von 10 nm bei  $615.440 \text{ nm}^3$ . Dieser Wert muss aber relativ zu Flagelle betrachtet werden, die bei einer Dicke von 10 nm und einer Länge von  $10 \mu\text{m}$  ein Volumen von  $785.000 \text{ nm}^3$  besitzt (unter der Vereinfachung einer linearen Flagelle); zudem befinden sich am Zellpol ca. 10-15 Flagellen. Entscheidend ist jedoch der bei der Rotation zu erwartende Widerstand, welcher bei der kreisförmigen Struktur im Vergleich zur spiralförmigen Flagelle minimal ist. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass bei kleinen Reynolds-Zahlen ( $R = av\rho/\eta$ ;  $a$ =Objektgröße [m],  $v$ =Geschwindigkeit [m/s],  $\rho$ =Dichte [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ],  $\eta$ =dynamische Viskosität [ $\text{kg}/\text{m s}$ ]) die Trägheit irrelevant ist (Purcell, 1977). Bei 3000 rpm beträgt die Reynoldszahl der Polar Cap  $1,39 \times 10^{-5}$ , im Vergleich dazu hat eine schwimmende Zelle eine Reynoldszahl von  $3,39 \times 10^{-6}$ .

## (6) der Stator

Die Statorkomponenten des Motors sind nach diesem Modell in der cytoplasmatischen Membran verankert, bei denen es sich analog den Bakterien um MotA Analoge handeln könnte, welche über eine Protonentranslokation den Rotor (kleiner Ring) antreiben.

## (7) die Rotationsgeschwindigkeit

Bei *E. coli* wurden die Umdrehungen des Rotors auf 15.000 rpm bestimmt (Lowe *et al.*, 1987).

Stellt der kleinere Ring von *H. salinarum* den mittels Protonentranslokation angetriebenen Ring dar, muss bei gleicher Protonenanzahl aufgrund des größeren Durchmessers die Rotation langsamer sein. Bei einem Radius von 15 nm des M-Ringes bei *E. coli* und 70 nm des kleineren Ringes bei *H. salinarum* ist der Umfang bei letzterem dementsprechend um Faktor 4,67 größer. Ohne Berücksichtigung der bei kleinen Reynolds-Zahlen wichtiger werdenden Viskosität des Mediums muss die resultierende Geschwindigkeit von *H. salinarum* mindestens um diesen Faktor langsamer sein als bei *E. coli*. Die tatsächlich gemessenen Geschwindigkeiten der Zellen von *E. coli* und *S. typhimurium* liegt bei  $20\text{-}40 \mu\text{m}/\text{s}$  (Manson, 1992), wohingegen bei *H. salinarum* eine Geschwindigkeit von  $2\text{-}3 \mu\text{m}/\text{s}$  bestimmt wurde (Alam und Oesterhelt, 1984; Thomas *et al.*, 2001), also um Faktor 10 niedriger.

Das Modell der rotierenden Polar Cap kann aufgrund der Größe des rotierenden Elementes diese Beobachtung erklären, welche vorher wie folgt interpretiert wurde: „Mit geringer Konkurrenz unter extremen Lebensbedingungen besteht nur eine geringe Notwendigkeit, ein ineffektives System zu verbessern.“ (Wilson und Beveridge, 1993).

## 4.2 Cytosolproteom

### 4.2.1 Übersicht des Proteininventars von *H. salinarum*

Im Rahmen des Cytosolproteoms konnten 711 Proteine (54% der vorhergesagten cytosolischen ORF's) im pH-Bereich 3-6 und größer 20 kDa identifiziert werden. Dieser hohe Wert der Identifizierung über 2-D Gelelektrophorese ist bisher bei keinem anderen Organismus beschrieben worden.

Die sehr starke Übereinstimmung der isoelektrischen Punkte mit den theoretischen Berechnungen und den praktischen Bestimmungen ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Die mittlere Standardabweichung bei allen cytosolischen Gelen lag bei 0,03-0,05 pH-Einheiten.

Diese Standardabweichung liegt nur eine Größenordnung über der überhaupt erreichbaren Auftrennung zweier Protein-Polyionen ( $\Delta\text{pH } 0,0025$ , vgl. Abschnitt 1.6.3) und stellt somit ein weiteres Validierungskriterium für die Identifizierung von Proteinen dar, die nach MALDI-Fingerprint Messungen nur einen unzureichend hohen Score aufweisen, jedoch innerhalb der Standardabweichung liegen.

Ebenso können auch Rückschlüsse auf Proteine gezogen werden, die eindeutig identifiziert worden sind, jedoch nicht auf der Ausgleichsgeraden liegen:

(1) es handelt sich um eine falsche Annotation eines ORF's, der als zu lang bzw. zu kurz vorhergesagt wurde, (2) es handelt sich um eine artefaktuelle Modifizierung, z.B. von Proteasen oder Chemikalien während der zweidimensionalen Auftrennung, oder (3) es liegt eine in-vivo post-translationale Modifikation vor.

Das Ausmaß der Identifizierung in den anderen Sektoren (MG kleiner 20.000 und pI größer 6) ist jedoch geringer.

#### 1. Geringes Molekulargewicht:

Bezüglich der Proteine kleineren Molekulargewichtes ist das Niveau der Identifizierung erheblich tiefer (96 Proteine, 13%). Hierbei müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden, die diese geringe Anzahl erklären können:

(1) Komplexzugehörigkeit. Bei der Untersuchung der nativen cytosolischen Komplexe mittels Gelchromatographie zeigte sich, dass ein Großteil der Proteine im Ausschlussvolumen der Säule eluierte (Abbildung 3.19 und 3.20). Die letzte Fraktion, die kleinen Monomeren entspricht, ist jedoch relativ klein. Daraus folgt, dass die kleinen Proteine entweder deutlich weniger exprimiert vorliegen, oder fast ausschließlich in Komplexen auftreten.

Die erste Fraktion (Abbildung 3.21 A) der Gelchromatographie zeigte eine ungewöhnlich starke Präzipitation, die in dieser Form nur bei Versuchen mit Ribosomen beobachtet wurde.

Diese sollten tatsächlich in dieser Fraktion vorhanden sein, bei *E. coli* machen sie etwa 10% des Zellproteins aus (Voet und Voet, 1992). Bei einem Sedimentationskoeffizienten von 70 S sind diese nach einem Taurodeoxycholat-Aufschluss und Zentrifugation im Überstand. Die Ribosomen bestehen zu ca. 2/3 (w/w) aus RNA, welche aufgrund ihrer Größe und hohen Ladung für die schlechte Fokussierung dieser Fraktion verantwortlich gemacht werden kann. In den weiteren Fraktionen (Abbildung 3.21 H und 3.21 I) konnten keine Proteine angereichert werden, die nicht auch in der Gesamtcytosolauftrennung (Abbildung 3.16) sichtbar sind.

Neben der Anreicherung von Proteinen über deren native Komplexstruktur wurde ebenfalls versucht, eine Komplexitätsverringering des Proteingemisches über eine Ammoniumsulfatfällung zu erreichen. Da es sich um eine Aussalzung handelt, wurde zusätzlich der pH-Wert bei diesen Experimenten aufgrund des durchschnittlichen pI von 4,2 der Proteine auf diesen Wert eingestellt. Es zeigte sich jedoch, dass die meisten Proteine im ersten Schritt der Ammoniumsulfat-Konzentrationsreihe ausfielen (Abbildung 3.22). Eine Optimierung der Ammoniumsulfat-Fällung bezüglich gleicher Proteinmengen in den Fraktionen ist bei pH-Werten zwischen 4,2 und 7,2 möglich. Während bei pH 4,2 die meisten Proteine im ersten Schritt ausfallen, werden bei pH 7,2 die meisten Proteine zwischen 60% und 80% Ammoniumsulfat ausgesalzt.

(2) Expression und Modifikation. Nicht alle Proteine einer Zelle werden unter einer Wachstumsbedingung exprimiert, so dass möglicherweise unter den angewandten Bedingungen diese von der Zelle nicht benötigt/exprimiert werden. Gegen diese Annahme spricht jedoch die hohe Anzahl an Proteinflecken (1800), die bei einer Gesamtcytosolauftrennung erreicht wurden. Weiterhin wurden von 611 in dieser Auftrennung identifizierten Proteinen 94 aus verschiedenen Proteinflecken identifiziert, was einer Modifikationsrate von 14% entspricht. Dies zugrundelegend, sollten 1550 verschiedene Proteine auf der Gelserie aufgetrennt und visualisiert worden sein (Tebbe und Klein *et al.*, 2004, accepted). Ferner ist es unwahrscheinlich, dass lediglich kleinere Proteine von den Wachstumsbedingungen beeinflusst sind.

(3) Visualisierung. Aus Vorversuchen zur Ermittlung des besten PAA-Gradienten konnten beim Gesamtcytosol ebenfalls keine kleineren Proteine detektiert werden. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Silberfärbung auf einer Reaktion an den Carbonylgruppen basiert und damit die Intensität der Masse des Proteins proportional ist, d.h. ein 10 kDa Protein bei gleichem Expressionsniveau eine fünffach geringere Silberintensität besitzt wie ein 50 kDa Protein.

(4) Membranassoziation. Zur Cytosolreinigung wurde fast ausnahmslos ein Aufschluss mittels Taurodeoxycholat verwendet, bei dem nur die rein cytoplasmatischen Proteine aus der Zelle diffundieren. Möglicherweise sind die kleineren Proteine aber mit der Membran assoziiert, so dass sie unter den angewandten Bedingungen mit den Zellhüllen abgetrennt werden. Diese Vermutung wird bestätigt, wenn anstelle des Taurodeoxycholat-Aufschlusses die Zellen mittels Dialyse geöffnet werden (A. Tebbe, persönliche Mitteilung).

(5) Identifizierung. Proteine mit einer Molekularmasse kleiner 20 kDa generieren bei tryptischer Spaltung nicht ausreichend Peptide, um mittels MALDI-Fingerprint identifiziert werden zu können. Die durchschnittlich 10 benötigten Peptide im Massenbereich 800-4000 m/z (vgl. Abschnitt 4.2.3) werden bei diesen kleinen Proteinen nicht erreicht.

Abhilfe könnte in Zukunft durch folgende Experimente erreicht werden:

Die abgetrennten Zellhüllen können mittels Dialyse geöffnet werden und die kleineren Proteine so von den Membranen dissoziieren und einer Analyse zugänglich sein. Eine weitere Anreicherung der niedermolekularen Proteine könnte erreicht werden, indem unter denaturierenden Bedingungen eine Ausschluss-Filtermembran (z.B. 20 kDa) eingesetzt wird, die größere Proteine zurückhält. Die anschließende Identifizierung kann dann über die Sequenzinformation erfolgen, d.h. die Proteine werden anstelle MALDI-TOF Fingerprint mittels LC-MS/MS oder MALDI-TOF-TOF analysiert.

#### 2. Isoelektrischer Punkt größer 7

Es sind 105 lösliche Proteine mit einem pI größer 7 vorhergesagt, von denen 54 hypothetisch und 13 ribosomalen Ursprungs sind. Insgesamt konnten jedoch lediglich 5 identifiziert werden. Die geringe Anzahl von gefundenen basischen Proteinen könnte erhöht werden, wenn mittels einer denaturierenden Auftrennung die sauren Proteine abgereichert werden. Dies kann über die Methode der trägerfreien Elektrophorese im IEF-Modus erfolgen. Nach der Auftrennung können anschließend die basischen Fraktionen vereinigt, konzentriert und mittels der 2-D IEF/SDS-Methode aufgetrennt werden.

#### 4.2.2 Vergleich des Proteininventars zu anderen Organismen

Das Proteininventar von *H. salinarum* zeigt deutliche Unterschiede zu anderen Organismen. Die theoretischen 2-D Gele der Proteome anderer Organismen aus den Reichen von Bakteria, Archaea und Eukarya (*Escherichia coli*, *Methanococcus jannaschii*, *Drosophila melanogaster*) zeigen eine „Schmetterlings-Form“, in der die meisten Proteine entweder einen pI um 5 oder um 9 besitzen (Schwartz *et al.*, 2001). Einen isoelektrischen Punkt von 7 besitzen ausgesprochen wenige Proteine. Im Vergleich dazu fehlt der basische Bereich bei *H.*

*salinarum* nahezu vollständig. Während im sauren hauptsächlich cytosolische Proteine vorliegen, sind im basischen Bereich nahezu ausschließlich Membranproteine vorhanden. Dieser Sachverhalt wird in Abschnitt 4.3 weitergehend diskutiert.

Der mittels 2-D Gelelektrophorese best charakterisierte Organismus ist *Bacillus subtilis* mit 4200 vorhergesagten Proteinen. In einem zusammenfassenden Artikel der Gruppe Hecker (Universität Greifswald) über bisher identifizierte Proteine dieses Organismus konnten auf einem Referenzgel 346 Proteine zugeordnet werden (Büttner *et al.*, 2001), was 8% des Proteoms abdeckt.

Insgesamt wurden bei *B. subtilis* 47 Proteine (16% von den 346) identifiziert, die als Mehrfach-Spots auftraten, was auf post-translationale Modifikationen zurückzuführen sein könnte. Dieser Wert entspricht der bei *H. salinarum* gefundenen Modifikationsrate von 13% (Tebbe und Klein *et al.*, 2004, accepted), sowie der ungefähren Größenordnung von Modifikationen, die bei den Bakterien auf einen Faktor von 1,3 geschätzt werden. Demgegenüber wird die Anzahl von Modifikationen bei den Eukarya auf Faktor 10 geschätzt.

#### 4.2.3 Peptidanalyse der Proteine von *H. salinarum*

In dieser Arbeit wurde ein System entwickelt, welches es ermöglicht, in kurzer Zeit einen Großteil der auf einem 2-D Gel visualisierten Spots zu identifizieren. Die Visualisierung erfolgte dabei fast ausschließlich mittels Silberfärbung, da diese sich durch eine höhere Sensitivität als die bei Proteomansätzen häufig benutzte Coomassie-Färbung auszeichnet. Die Entfärbung, tryptische Spaltung und Elution in Filter-Mikrotiterplatten ermöglichte eine Hochdurchsatz-Methodik, die den lange Zeit existierenden „Flaschenhals“ zwischen Spot und MALDI-Fingerprint Messung aufhob. Die momentan auf dem Markt vorhandenen Roboter bieten bisher keine Verbesserung bezüglich dieser Methode der Identifizierung von ausgeschnittenen Spots.

Mit Ausnahme der durch Edmann-Sequenzierung identifizierten Proteine (Tabelle 3.3) und der 1-D SDS LC/MS/MS-Proben (Anhang 7.6) sind alle identifizierten Proteine auf diesem Weg prozessiert worden. Mit Ausnahme dieser Proben wurden alle anderen durch HCCA-DriedDroplet Auftrag auf einem Stahltarget mit anschließender vollautomatischer MALDI-Messung und Annotation analysiert. Die Etablierung dieser zuverlässig arbeitenden Methode ermöglichte ein sehr hohes Identifizierungsniveau der über 2-D Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, die in diesem Umfang bisher nicht veröffentlicht wurde.

Die theoretische tryptische Spaltung (vgl. Abb. 4.12) aller cytosolischen Proteine ergab folgende Verteilung: Es entstehen durchschnittlich 12 Peptidfragmente im Massenbereich 800-4000 m/z, wobei 2,1 Peptide zwischen 800-1000, 8,8 Peptide zwischen 1000-3000 und

#### 4. Diskussion

1,1 Peptide zwischen 3000-4000 liegen. Die Unterteilung in die drei Massensektoren ist insofern von Bedeutung, als die Identifizierung von Peptiden innerhalb dieser Bereiche stark variiert. Während der Bereich zwischen 800-1000 m/z meistens von Matrix- und Salzpeaks überdeckt ist, weisen die Peaks im Bereich zwischen 3000-4000 m/z eine geringere Intensität und Auflösung auf. Grund dafür ist die natürliche Kohlenstoff-Isotopenverteilung, die bei größeren Peptiden zu einer verstärkten Aufspaltung der Signale führt. Die theoretische Verteilung bestätigte die Hochdurchsatz-Strategie mittels tryptischer Spaltung und MALDI-Fingerprint, da ausreichend Fragmente im optimalen Massenbereich zwischen 1000-3000 m/z generiert werden.

Desweiteren zeigte sich, dass durchschnittlich für eine „trusted“-Identifizierung 6 Peptide eines Proteins gefunden werden müssen. Die Nachanalyse der als „trusted“ identifizierten Proteine zeigte jedoch, dass durchschnittlich nur 60% der möglichen Peptide durch die MALDI-TOF Fingerprint Analyse erfasst werden und somit ein Protein mindestens 10 vorhergesagte Peptidfragmente im Massenbereich 800-4000 m/z enthalten muss, um identifiziert werden zu können. Dieser theoretisch ermittelte Wert von 10 Peptiden liegt unter der experimentellen Durchschnittsverteilung von 12 Peptiden für ein Protein und bestätigt somit den strategischen Ansatz. Zur Überprüfung der Ausbeute von nur 60% wurde die Wiederfindungsrate von Peptiden analysiert:

(1) die Identifizierungsrate von Cystein-haltigen Peptiden.

Im Rahmen des Transferschrittes von der IEF- in die SDS-Dimension findet eine Carbamidomethylierung statt, bei der die Cysteinreste vor Oxidation geschützt werden sollen. Es wurden alle theoretischen im Massenfenster 800-4000 m/z liegenden cysteinhaltigen Peptiden mit den experimentell gefundenen (carbamidomethylierten) Peptiden korreliert und mit der Wiederfindungsrate nicht-cysteinhaltiger Peptide verglichen. Die Analyse dieses Parameters, der in der Recherche als feste Modifikation angegeben wurde (nicht-carbamidomethylierte Cystein-Peptide werden somit nicht erkannt), zeigte, dass kein überproportionaler Verlust cysteinhaltiger Peptide vorliegt, die Carbamidomethylierung somit quantitativ erfolgt.

(2) die Spaltungseffizienz von Trypsin.

Bei der Mascot-Recherche der gefundenen Peptide wurde als ein zusätzlicher Suchparameter angegeben, dass C-terminal nach allen Lysinen/Argininen gespalten wird, mit der Ausnahme von Prolin als nachfolgender Aminosäure und die tryptische Reaktion mit 100% Ausbeute verläuft (Parametereinstellung: 0 missed-cleavage sites (MCS)).

Dieser Parameter wurde bei allen Messungen angewandt, jedoch zeigte eine Nachanalyse aller Spektren von trusted/insecure/believed Proteinen, dass bei 4611 Spektren (72,5%) insgesamt 10266 MCS auftraten, was einem Durchschnitt von 2,2 MCS/Spektrum entspricht. Durch das Zulassen einer MCS verdoppelt sich die Anzahl theoretisch möglicher Peptide. Diese Zahl geht in die Beurteilung durch das Wahrscheinlichkeits-basierende Mascot Programm ein, dass bei einer Vergrößerung der möglichen Peptidanzahl die Sicherheit einer Identifizierung herabstuft und damit einen geringeren „Score“ generiert. Ähnlich den post-translationalen Modifikationen wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit das Kriterium der MCS erst bei einer nachfolgenden manuellen Validierung der Daten betrachtet.

### **4.3 Membranproteom**

#### **4.3.1 Übersicht zur Gewinnung und Auftrennung von Membranproteinen**

Der Weg von der Zelle zum identifizierten Protein ist in verschiedene Stationen zu unterteilen, die speziell bei Membranproteinen mit Verlusten verbunden sind:

- (1) Zellaufschluss
- (2) Membranisolierung
- (3) Membranproteinsolubilisierung
- (4) Auftrennung in einer ersten Dimension (IEF in fester oder flüssiger Matrix, BAC, SDS-PAGE)
- (5) Transfer in eine zweite Dimension (SDS-PAGE oder RP-HPLC) und Auftrennung
- (6) Visualisierung (Färbung oder Chromatogramm)
- (7) Proteinspaltung
- (8) Peptid-Elution
- (9) Massenanalytik

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, in welcher Form die Verluste auftreten und wie alternative Lösungsansätze aussehen können.

Marker waren hierbei sowohl die halobakteriellen Transducerproteine als auch das 7-transmembranhelikale Bakteriorhodopsin, welches in vieler Hinsicht als Modell-Membranprotein dienen kann.

##### 4.3.2 Von der Zelle zur Membranfraktion

Die etablierte Methode zum Zellaufschluss zu Beginn dieser Arbeit war die Dialyse gegen Niedrigsalz. Die durch Osmolyse entstandenen Membranen lassen sich in chemisch distinkte Membranbereiche unterteilen, welche durch Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt werden können (Abbildung 3.28). Bei der Betrachtung der Gesamtmembranfraktion wurde mit der Mutante TOM (BR<sup>-</sup>, HR<sup>-</sup>) gearbeitet, da ein Großteil der Membranfraktion in der stationären Phase der Zellen des Standardstammes S9 aus Bakteriorhodopsin besteht. Es muss nicht nur für eine weitere Proteinanalytik die BR tragende Purpurmembran anschließend abgetrennt werden, sondern ihr „Platzbedarf“ von bis zu 80% verringert die Ausbeute aller anderen Membranproteine entsprechend.

Die durch Dialyse und dreimalige Ultrazentrifugation erhaltene Membranfraktion (Abb. 3.26 und 3.27) zeigte jedoch Kontaminationen von ribosomalen Proteinen in der IEF/SDS Analyse, die auch mittels einer diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation nicht abgetrennt werden konnten. Da halobakterielle Ribosomen durch die Niedrigsalzbedingungen in ihre Untereinheiten zerfallen (Makowski *et al.*, 1987, von Böhlen *et al.*, 1991), sprach dieses Ergebnis für eine artefizielle Bindung dieser Proteine an die Membran während der Präparation. Bei einer Versuchsreihe mit verschiedenen Aufschlussmethoden wurden danach folgende Beobachtungen gemacht: Bei Aufschluss mittels Beschallung oder Frieren/Tauen (Freeze/Thaw) in Basalsalz entstehen große Vesikel, welche in Basalsalz abzentrifugiert werden können, jedoch aufgrund des in ihnen eingeschlossenen Volumens proportional zur Verdünnung des Mediums Kontaminationen enthalten. Bei einem Aufschluss mit der „French-Press“ entstehen kleine Vesikel oder Membranbereiche, welche jedoch chemisch nicht distinkt sind. Nach Ultrazentrifugation in Basalsalz ( $\zeta=1,13 \text{ g/cm}^3$ ) ist (1) kein Niederschlag pelletierbar ist ( $\zeta_{\text{(Membranproteine)}}=1,05-1,18 \text{ g/cm}^3$ ), und (2) nach einem kontinuierlichen Dichtegradienten unter Niedrigsalzbedingen von BR-haltigen Stämmen (R1 und S9, BR-Überproduzent) das purpurfarbene BR über den gesamten Gradienten verteilt war.

Für die Gesamtmembrangewinnung ist Punkt 2 unerheblich; das Pelletieren der Membranbereiche konnte durch anschließende 1:4 Verdünnung mit Wasser oder durch Zellaufschluss in 1/4 BS (French-Press-HS) erreicht werden.

Die unter diesen Aufschlussbedingungen mitisolierten Proteinkomplexe, wie Ribosomen, konnten dann über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten abgetrennt werden (Abbildung 3.35 und Tabelle 3.5).



Weitere Reinigungsschritte können hingegen mit deutlichen Verlusten verbunden sein, die besonders bei hydrophoben Proteinen während der Inkubation mit organischen Lösungsmitteln auftreten.

Bei der Chloroform/Methanol-Fällung (Wessel und Flügge, 1984) werden allgemein Proteine an der entstehenden Phasengrenze angereichert. In einer der ersten Publikationen zur präparativen IEF/SDS-Gelelektrophorese von Membranproteinen (Pasquali *et al.*, 1997) wurde dieser Schritt zur Proteinkonzentrierung benutzt. Bei einer eigenen 1-D SDS-PAGE Analyse der halobakteriellen Membranen zeigte sich jedoch, dass zahlreiche Proteine in der oberen Methanolphase vorhanden waren. In einer späteren Publikation (Santoni *et al.*, 2000) wurde eine abgewandelte Methode der  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Fällung benutzt, um eine spezifische Anreicherung hydrophober Proteine in der Methanolphase zu erreichen. Eine ähnliche Beobachtung wurde von mir bei Bakteriorhodopsin gemacht, welches sogar bei einer Acetonfällung in der organischen Phase verbleibt. Es wurde daher die  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Fällung von Santoni *et al.* angewandt, da bei dieser sowohl die Interphase als auch die Methanolphase zur weiteren Analyse verwendet wurde.

Ein etablierter Schritt zur Entfernung „peripherer“-Proteine ist die alkalische Extraktion (Fujiki *et al.*, 1982). Diese Reinigung basiert auf zwei Beobachtungen: Geschlossene Membranvesikel, die bei der Isolierung aus Mesophilen entstehen, werden zu flachen Membranbereichen geöffnet und kontaminierende basische Proteine (Ribosomen), welche durch ionische Adsorption an diese binden (Scheele *et al.*, 1978) werden durch diese Behandlung entfernt.

Membranbereiche von *H. salinarum* verhalten sich hingegen bei der Änderung des pH-Wertes und der Ionenstärke anders:

Abbildung 3.33 zeigt eine Abreicherung von Transmembran-Proteinen unter Niedrigsalz und bei einer alkalischen Extraktion in 1 M NaCl.

Offensichtlich dissoziieren die nach French-Press Aufschluss gewonnenen Vesikel bei Niedrigsalz-Inkubation in kleine Membranfragmente mit Svedberg-Einheiten, die nicht mehr ausreichen, die Membranen unter den üblichen Parametern einer Membranreinigung von 1 Stunde und 100.000 g vollständig zu pelletieren. Der errechnete Sedimentationskoeffizient von maximal 24S liegt somit in der Größenordnung von Einzelproteinen. Dies entspricht formal einer Solubilisierung, die im Falle von *H. salinarum* bei einigen Membranproteinen in wässriger Lösung erfolgt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Stoeckenius und Rowen, 1967) bestätigen diese Auflösung der Membran: Nach Dialyse von Vesikeln gegen Niedrigsalz wurden neben einer von Gasvakuolen stammenden „intracytoplasmatischen

#### 4. Diskussion

Membran“ lediglich Fragmente der Purpurmembran im Niederschlag nach differentieller Zentrifugation beobachtet. Ein klarer, orangefarbener Überstand konnte nach 6-stündiger Zentrifugation bei 105.000 g pelletiert werden, der aus Membranen mit einem Durchmesser zwischen 50 nm und 100 nm bestand.

Diese Auflösung der Membran ist bereits 1963 beschrieben worden (Brown, 1963), in der die möglichen Parameteränderungen Salzkonzentration, Temperatur und pH betrachtet wurden. Ausgangspunkt der Untersuchungen waren dabei Vesikel, die Änderungen wurden über eine Abschwächung der Trübung verfolgt. Hauptaussagen dieser Publikation waren, dass eine Salzniedrigung bereits unterhalb von 2,5 M NaCl (pH 8,8) zu einer Auflösung der Vesikel führt, und dieser Effekt gleichzeitig bei 35°C weitaus stärker ist als bei 0°C, zudem bei 35°C bereits nach 5 Minuten ein Gleichgewichtszustand erreicht wird (20% der ursprünglichen Trübung bei 0,31 M NaCl). Die pH-Wert abhängig Änderung der Trübung wurden bei 0,33 M NaCl und 35°C gemessen und zeigte einen Einbruch der Trübungskurve bei pH 4 auf etwa 30% (die Trübung bei pH 2 wurde 100% gesetzt), während eine weitere pH-Erhöhung (bis pH 7,5) keinen weiteren Einfluss mehr zeigte.

Als möglicher Grund für die Auflösung der Membran wurde in dieser Publikation (Brown, 1963) die negative Ladung der Aminosäuren Glutamat und Aspartat genannt. Nach der Theorie von Debye-Hückel sollte eine negative Ladung hier durch eine Ionenatmosphäre von Na<sup>+</sup>-Ionen umgeben sein und diese somit abschirmen. Eine gegenseitige Abstoßung der Membranproteine wird so unter Hochsalz-Bedingungen verhindert.

Tatsächlich zeigen auch die Membranproteine von *H. salinarum* im Vergleich zu Mesophilen einen höheren Anteil von sauren Aminosäuren. Die Dissoziation der Membran ist somit eventuell ein spezifisches Problem halophiler Organismen.

Interessanterweise konnte das 2-TM Protein HtrI auf IEF/SDS-Gelen nach Dialyse-Aufschluss in der pelletierbaren Fraktion identifiziert werden (Abbildung 3.26), bei einem 1/4 BS-Aufschluss mittels French-Press und anschließender Niedrigsalzbehandlung hingegen ging es in die nicht-pelletierbare Fraktion über (Abbildung 3.37).

Eine möglicher Erklärung für diese Beobachtung stellen die ribosomalen Proteine dar: Ein relativ hoher Anteil an positiv geladenen Aminosäuren (13 der 58 ribosomalen Proteine haben einen pI zwischen 8,8 und 11,9) kann hier durch elektrostatische Anziehung entweder Membranbereiche stabilisieren oder dissoziierte Komplexe aggregieren lassen, und so unter den angewandten Ultrazentrifugationsbedingungen diese sedimentieren lassen.

Da die ribosomalen Proteine als intakte Ribosomen unter dem 1/4 BS Schritt entfernt wurden, besteht bei einer anschließenden Inkubation mit Niedrigsalz keine Möglichkeit einer Stabilisierung bzw. Aggregatbildung.

Diese Bindung von ribosomalen Proteinen durch elektrostatische Anziehung wird bei der isopyknischen Reinigung der Purpurmembraan (nach Dialyse) jedoch nicht beobachtet, einziges Protein dieser Fraktion ist Bakteriorhodopsin (Abbildung 3.29 G). Trotz des sauren pI von 4,8 ist eine für diesen Bereich unübliche Aminosäurezusammensetzung zu beobachten, die geladenen Aminosäuren Aspartat, Glutamat und Arginin sind deutlich weniger vorhanden als bei halophilen Proteinen üblich (D: 3,6% zu 9,8%, E: 4% zu 7,8%, R: 2,8% zu 7,0%). Den lediglich 19 negativen Resten (Aspartat und Glutamat) stehen 14 positive Resten gegenüber. Dieser geringe Überschuss an 5 negativen Resten reicht möglicherweise nicht aus, um ribosomale Proteine zu binden. Eine Bindung von Pferde-Ferritin (pI 4,1-4,6) an die Purpurmembraan unter Niedrigsalzbedingungen konnte lediglich bei pH-Werten deutlich unterhalb von pH 6 beobachtet werden, gleichzeitig nahm die Bindung mit zunehmender Salzkonzentration ab (Neugebauer und Oesterhelt, 1978).

Eine ähnlich niedrige Anzahl von geladenen Resten mit einer kleinen Differenz findet sich ebenfalls bei den weiteren Retinalproteinen (HR, SRI und SRII). Die mit den Sensorrhodopsinen assoziierten Transducer HtrI/II haben demgegenüber ein Verhältnis von negativen zu positiven Resten von 109/41 (HtrI) und 146/47 (HtrII).

#### 4.3.3 Theoretische Abschätzung der Membranproteinmenge

In einer theoretischen Abschätzung zur Proteinmenge in einer Zelle wurde das von Hartmut Michel (Michel und Oesterhelt, 1976; Michel, 1977) experimentell bestimmte Zellvolumen und die intrazelluläre Wassermenge von Zellen ( $OD_{600} = 1$ , ein Liter Zellkultur) als Grundlage genommen. Diese Werte wurden anschließend mit den daraus resultierenden Zellgrößen und Zellzahlen korreliert.

##### Cytosolische Proteine

Das Gesamtzellvolumen von einem Liter Kultur ( $OD_{600} = 1$ ) wurde über die Microhämatocritmethode bestimmt und ein Wert von 1,36 ml ermittelt. In einem weiteren Experiment konnte die intrazelluläre Wassermenge mittels Isotopenmessung bei 1 Liter Kultur auf 890  $\mu$ l bestimmt werden (Michel, 1977). Da 1 ml Basalsalz nur 895 mg Wasser enthält, kann die in einem Liter Kultur vorhandene Salzmenge (bei intrazellulären 3 M KCl und 1 M NaCl) auf 282 mg genähert werden. Damit verbleibt ein Restvolumen von 360  $\mu$ l,

welches hauptsächlich aus Proteinen, RNA, DNA und Metaboliten besteht. Das Massenverhältnis von Proteinen zu anderen Zellbestandteilen beträgt in *E. coli* ungefähr 3 zu 2 (Alberts *et al.*, 1990). Bei einer durchschnittlichen Dichte der Proteine von  $1,34 \text{ g/cm}^3$  und einer ungefähren Dichte der Nucleotiden von  $1,8 \text{ g/cm}^3$  folgt in 1 Liter Kultur eine cytosolische Proteinmenge von 322 mg (24% w/v, bezüglich des Zellvolumens) und eine Restmenge von 215 mg.

Die Cytosolproteinmenge wird nach der Membranproteinberechnung mit den publizierten, experimentell bestimmten Werten (Biuret Methode) verglichen; umgerechnet auf 1 Liter Kultur wurden 500 mg Gesamtproteinmenge bestimmt (Hartmann *et al.*, 1977, Michel und Oesterhelt, 1976).

#### Membranproteine

Für die Berechnung der Membranproteinmenge muss die Oberfläche einer Zelle und die Zellzahl berücksichtigt werden. Aus dem experimentell bestimmten Wert des Gesamtzellvolumens ergeben sich zwei mögliche Rechnungen: (1) Die Zelldimensionen betragen  $0,5 \mu\text{m} \times 3,5 \mu\text{m}$  bei einer Zellzahl von  $2 \times 10^9$  Zellen/ml und (2) die Zelldimensionen betragen  $0,6 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  (Hartmann *et al.*, 1977) mit einer daraus resultierenden Zellzahl von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml (Werte werden im folgenden in Klammern angeben).

Für das Innere einer Zelle ( $V=l\pi r^2$ , mit  $l$ =Länge und  $r$ =Radius) folgt somit ein Volumen von  $0,69 \mu\text{m}^3$  bzw.  $0,69 \cdot 10^{-12} \text{ ml}$  ( $1,4 \mu\text{m}^3$  bzw.  $1,4 \cdot 10^{-12} \text{ ml}$ ), für die Zellmembran eine Oberfläche von  $5,89 \mu\text{m}^2$  ( $10 \mu\text{m}^2$ ).

Die Membranproteine wurden ferner in drei Klassen unterschieden, das Glykoprotein der Zelloberfläche, die integrale Membranproteine und die periphere Membranproteine.

**(1) Glykoprotein.** Für die Berechnung der Proteinmenge des Glykoproteins wurde von der Symmetrie des Glykoproteins von *H. volcanii* ausgegangen, welches in einem P6-symmetrischen Gitter vorliegt und die Zentren jeweils 16,8 nm (Kessel *et al.*, 1988) entfernt sind. Bei der Vereinfachung, dass diese kreisförmig auf der Oberfläche verteilt sind ergibt sich für eine P6-Zelle ( $r=8,4 \text{ nm}$ ) eine Fläche von  $222 \text{ nm}^2$ . Auf der Oberfläche kommen somit insgesamt 159.000 (270.000) Moleküle Glykoprotein pro Zelle vor.

Bei einem Molekulargewicht von 89.700 ergeben sich somit 46 (39) mg/1 Liter Kultur. Dieses Gewicht berücksichtigt jedoch nur den Aminosäureanteil des Proteins, rechnet man die Zuckerreste hinzu ergibt sich bei einer Molekularmasse von 200 kDa eine Proteinmenge von 106 (90) mg/1 Liter Kultur.

**(2) Integrale Membranproteine.** Für die Plasmamembran wurde Bakteriorhodopsin als Referenz genommen, zudem wurden zwei Abschätzungen der Proteinmengen vorgenommen:

(A) Aus der elektronenkristallographischen Analyse ist bekannt, dass BR als Trimer in einem trigonalen Gitter mit einer Kantenlänge von 6,2 nm vorliegt (Hendersson *et al.*, 1900). Damit befinden sich 3 BR Moleküle in einer Quadratfläche von 38,44 nm<sup>2</sup>. Bei vollständiger Oberflächenabdeckung ergibt sich eine Anzahl von 460.000 (780.000) BR Molekülen pro Zelle. Bekannt ist, dass im Stamm S9 die Purpurmembran etwa 80% der Oberfläche abdeckt, und damit 367.000 (624.000) Moleküle/S9-Zelle vorliegen. Dies entspricht einer BR Menge von 32 (27) mg/1 Liter S9-Zellkultur.

(B) Bei der Isolierung der Purpurmembran werden beim Stamm S9 ungefähr 42 mg BR/ 1 Liter Kultur isoliert. Dieser Wert entspricht 486.000 (778.000) BR Molekülen pro Zelle bei 80%-iger Bedeckung der Oberfläche mit Purpurmembranen bzw. 608.000 (973.000) BR Moleküle pro Zelle bei 100%-iger Oberflächenabdeckung.

Für die anderen integralen Membranproteine verbleiben somit im Stamm S9 20% der Oberfläche, die nach der zweiten Abschätzung von theoretisch 122.000 (195.000) BR Molekülen besetzt sein könnte. Für eine genauere Abschätzung dieser Proteinmenge muss daher noch das (von BR unterschiedliche) Verhältnis von Transmembrandomänen und löslichem Teil der Proteine (Henkel und Termini) berücksichtigt werden:

Die 122.000 (195.000) BR Moleküle enthalten 854.000 (1.365.000) Helices. Bei einer Gleichverteilung aller 568 TM-Proteine ergeben sich insgesamt 2784 Helices mit 61.248 Aminosäuren und insgesamt 98.985 Aminosäuren in nicht-helikalen Bereichen (vgl. Tabelle 4.3 in Abschnitt 4.3.10)

Umgerechnet auf eine Helix sind somit 22 Aminosäuren im helikalen Bereich und 35,6 Aminosäuren im löslichen Teil, zusammengefasst pro Helix 57,55 Aminosäuren, was bei einer durchschnittlichen Molekularmasse von 121 Da/Aminosäure insgesamt 7 kDa/Helix ergibt. Daraus folgt bei 854.000 (1.365.000) Helices/Zelle ein Wert von 20 (16) mg/1 Liter Zellkultur. Unter der Annahme, dass die Proteinexpression im Wildtyp und bei BR defizienten Stämmen nicht signifikant variiert, beträgt die Menge der übrigen integralen Membranproteine 20 (16) mg/1 Liter Zellkultur.

**(3) Periphere Proteine.** Neben den integralen Proteinen besteht eine Membranfraktion zusätzlich aus den löslichen Untereinheiten der Membranproteinkomplexe sowie den Proteinen, die über einen Lipidanker an die Membran gebunden sind. (Hierbei verfügen die Proteine über ein N-terminales RR-LAGC Motiv, wobei diese Sequenz zwischen dem Glycin und dem Cystein abgespalten wird und ein Lipid mittels einer Thioetherbindung an das

#### 4. Diskussion

Cystein gebunden ist. Bezüglich der Membrankomplexe lässt sich eine Berechnung unter folgenden zwei Annahmen machen: (1) Es findet eine Massenverteilung analog des Restcytosols statt, d.h. der Anteil des Proteins liegt innerhalb eines Raumes bei 24% (w/v) und (2) Dieser Raum besitzt eine Dicke von 13,3 nm, was der Ausdehnung der löslichen Untereinheit der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP Synthase (von Hefe) entspricht (Stock *et al.*, 1999)

Das Volumen dieses Raumes ergibt sich aus der Differenz des oben berechneten Raumes (Zylinder) und eines Raum, der im Durchmesser und Länge um jeweils 26,6 nm verkleinert wurde. Es beträgt somit pro Zelle  $0,758 \cdot 10^{-13}$  ml ( $1,294 \cdot 10^{-13}$  ml), was bei einem Proteinanteil von 24% (w/v) einer Menge von 36 (34) mg/1 Liter Zellen entspricht.

Zusammenfassend ergeben sich somit bezüglich 1 Liter Zellkultur folgende Maximalmengen an Membranproteinen:

Glykoprotein:	46 mg (mit Glykosilierung 106 mg)
BR:	42 mg (im Stamm S9)
Integrale Membranproteine:	20 mg
Membranuntereinheiten:	36 mg

Damit folgt, einschließlich der Zuckerreste, in BR defizienten (BR<sup>-</sup>) Stämmen eine Membranproteinmenge von 162 mg/ 1 Liter Kultur.

Vom Wildtyp R1M1 ist bekannt, dass 50% der Oberfläche von BR bedeckt sind, damit beträgt die Membranproteinmenge 188 mg, zusammen mit den 326 mg cytosolischen Proteinen ergibt sich eine Gesamtproteinmenge/1 Liter Kultur von 514 mg. Dieser Wert stimmt mit den 500 mg Protein/1 Liter Kultur überein, die experimentell in R1M1 bestimmt wurde (Hartmann *et al.*, 1977, Michel und Oesterhelt, 1976).

Die theoretische Maximalmenge der integralen Membranproteine konnte experimentell in ungefährer Größenordnung bestätigt werden, bei der einzigen untersuchten Hochsalz-Methode (isopyknische Aufarbeitung) konnte eine um Faktor 1,7 größere Menge isoliert werden (34 mg, Abbildung 3.34). Hierbei sollte es sich um eine Fraktion rein integraler Membranproteine handeln, da nach Dialyse der Zellhüllen die lipidhaltigen Membranproteine in einem diskontinuierlichen Dichtegradienten von peripheren Membranproteinen und vom Glykoprotein abgetrennt wurden. Für das Glykoprotein wurde sowohl ein Sedimentationskoeffizient in Niedrigsalz von  $S_{20,w} = 8,9 \pm 0,5$  S als auch ein Sedimentationskoeffizient in 4 M NaCl bestimmt (Hecht *et al.*, 1986). Da in diesem Medium integrale Membranproteine aufgrund ihrer Dichte nicht pelletiert werden können, folgt, dass

sich das Glykoprotein wie ein lösliches Protein verhält und unter den angewandten Zentrifugationsbedingungen im oberen Gradientenbereich verbleibt.

Bei den experimentell bestimmten Werten muss allerdings beachtet werden, dass Membranproteine, im Gegensatz zu löslichen Proteinen, schwer zu quantifizieren sind. Bei der BCA-Bestimmung (vgl. Abschnitt 2.3.5.2) wird im alkalischen Milieu gearbeitet. Diese Bedingungen reichen aus, um lösliche Proteine (wie das in der Eichgeraden benutzte BSA) zu denaturieren, so dass quantitativ die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen von Cystein, Tyrosin, Tryptophan und Peptidbindungen komplexiert werden (Fischer, 1998). Helikale Einheiten von integralen Membranproteinen sollten jedoch bei alkalischen Bedingungen erhalten bleiben, was zu einer geringeren Komplexierung der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und damit verringerten Sensitivität des Testes führt. Eine vollständige Denaturierung der Helixstruktur kann zwar durch Chaotrope oder Detergenzien erreicht werden, jedoch stören diese Substanzen fast alle Proteinbestimmungen. Gleichzeitig sollten Zuckerreste (von anderen glykosilierten Proteinen oder nicht vollständig abgetrenntem Glykoprotein) und Lipide die BCA-Bestimmung beeinflussen. Der BCA-Test kann somit (bei annähernd gleicher Probe) zur relativen Bestimmung eingesetzt werden, eine Absolutbestimmung jedoch ist mit deutlichen Fehlern verbunden.

Im Vergleich von Taurodeoxycholat-Aufschluss (4,2 mg Protein nach BCA-Bestimmung) und isopyknischer Aufarbeitung (34 mg Protein nach BCA-Bestimmung) bedeutet dies ein Verlust von fast 90% integraler Membranproteine durch differentielle Zentrifugation in Niedersalz. Bezüglich der Transducerproteine wurde ein Verlust in dieser Größenordnung über einen Immunoblot nachgewiesen (vgl. Abbildung 3.33).

#### 4.3.4 Membranproteine von *H. salinarum*

Die Membranproteine von *H. salinarum* zeichnen sich durch eine bemerkenswerte Gleichverteilung von vorhergesagten sauren und basischen Proteinen aus, 58% aller Membranproteine besitzen einen sauren pI (vgl. Abschnitt 3.3.1).

Experimentell konnte diese Gleichverteilung jedoch nicht eindeutig bestätigt werden, da einerseits deutliche Fluoreszenzsignale einer aufgetrennten Membranpräparation im basischen Bereich des IPG-Streifen (Abbildung 3.38) detektiert wurden, andererseits bei LC-MS/MS Analyse (Abschnitt 3.3.12) lediglich 13 alkalische Membranproteine identifiziert wurden. Die Problematik der Identifizierung von alkalischen Membranproteinen wird in Abschnitt 4.3.10 diskutiert.

Im allgemeinen existiert ein Zusammenhang von pI und Lokalisierung der Proteinen, wie in bimodularen theoretischen Berechnungen bei Bakterien und Archaea gezeigt werden konnte: bei den Mesophilen sind im Sauren (pI 5-6) überwiegend cytosolische Proteine lokalisiert, die

integralen Membranproteine sind überwiegend im Basischen (pI 8-9) (van Bogelen *et al.*, 1999, Schwartz *et al.*, 2001).

Tabelle 4.1 zeigt diese Verteilung der Proteine im Vergleich von *H. salinarum* und *E. coli*. Dieser Zusammenhang besteht auch bei den Eukarya, wie in einem trimodularen Vergleich der 3 Reiche, gezeigt wurde, allerdings sind die Proteine des Zellkerns über den gesamten pI Bereich verteilt (Schwartz *et al.*, 2001).

**Tab. 4.1:** Verteilung von löslichen und TMD-Proteinen von *H. salinarum* und *E. coli* in Abhängigkeit ihres pI.

pH	<i>H. salinarum</i>		<i>E. coli</i>	
	3-6	6-12	3-6	6-12
<b>0 TMD</b>	2067 93%	149 7%	1712 53%	1499 47%
<b>1-24 TMD</b>	329 58%	239 42%	188 18%	848 82%
<b>1-2 TMD</b>	160 74%	55 26%	125 33%	255 67%
<b>&gt; 3 TMD</b>	169 48%	184 52%	63 10%	593 90%

Die Verschiebung von Membranproteinen bei *H. salinarum* in den sauren pI Bereich kann durch ihre cytosolischen Extra-Membranteile erklärt werden, welche aufgrund ihrer Natur über eine hohe Anzahl von sauren Resten verfügen sollten. Allerdings besitzt noch die Hälfte der löslichen Proteine von Mesophilen einen sauren pI (pI 3-6) (bei *E.coli* etwa 53%). Eine genauere Betrachtung

der Zusammensetzung der halobakteriellen Membranproteine findet sich im nächsten Kapitel, bei dem auf das Phänomen der Membranhalophilie eingegangen wird.

Die Gesamtanzahl von 566 Membranproteinen bei 2783 ORF's scheint im Vergleich zu *E. coli* zunächst gering zu sein (1283 vorhergesagte Membranproteine bei 4290 ORF's), jedoch ist die Anzahl der Membranproteine von der Komplexität des Organismus bzw. der Genomgröße abhängig (Wallin und von Heijne, 1998). In einem verbesserten Ansatz zur Vorhersage integraler Membranproteine (Minimierung falsch-positiver und falsch-negativer Prognosen) konnte jedoch gezeigt werden, dass nahezu sämtlich betrachtete Organismen aus den Reichen Archaea, Eubacteria und Eukarya einen prozentualen Membranproteinanteil bezüglich des Proteoms von 20%-35% haben, bei oben genanntem *E. coli* sind es bei 4290 ORFs 29,9% integrale Membranproteine.

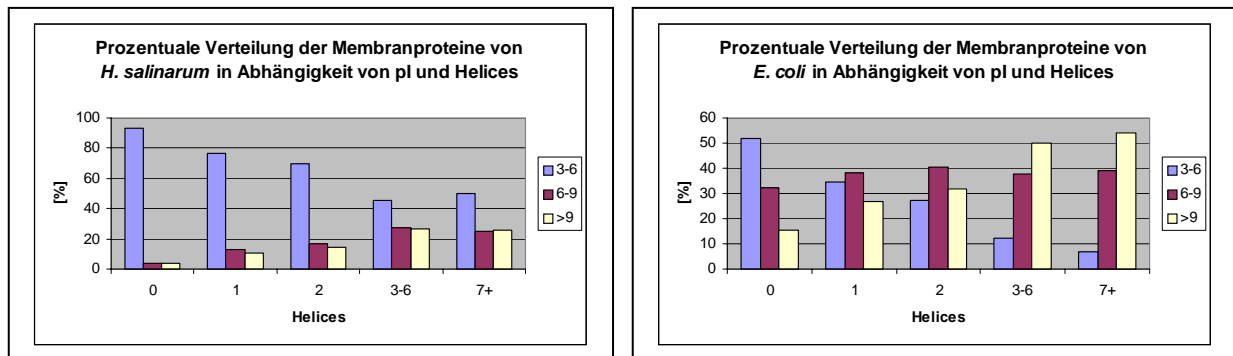
Bezüglich der Archaea liegt der Anteil von Membranproteinen bei *Archaeoglobus fulgidus* bei 24,2%, *Methanococcus jannaschii* 20,4%, *Methanobacterium thermoauto.* 24,9% und bei *Pyrococcus horikoshii* bei 29,9% (Stevens und Arkin, 2000). Die 566 Membranproteine von *H. salinarum* stellen einen Anteil von 20,4% dar, was genau dem Anteil von *M. jannaschii* entspricht.

#### 4.3.5 Membranhalophilie

Für eine Betrachtung der Verteilung von geladenen Aminosäuren wurden zusammen mit Dr. C. Garcia-Rizo Cytosol- und Membranproteine von *H. salinarum* und *E. coli* miteinander verglichen.



Die in Abschnitt 4.3.3 beschriebene Acidität der halophilen Membranproteine ist in Abbildung 4.5 (*H. salinarum*) und Abbildung 4.6 (*E. coli*) dargestellt.



**Abb. 4.5:** Verteilung der Proteine von *H. salinarum* in Abhängigkeit von Helicesanzahl und pI.

**Abb. 4.6:** Verteilung der Proteine von *E. coli* in Abhängigkeit von Helicesanzahl und pI.

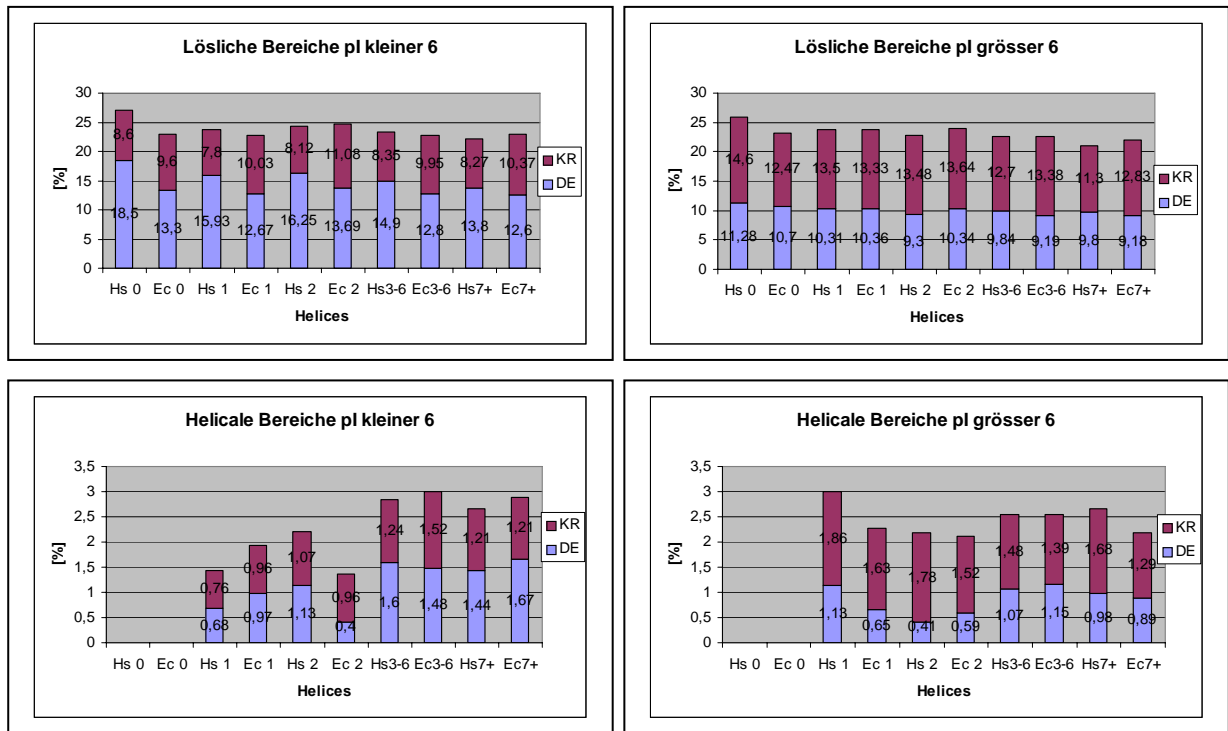
Deutlich ist eine generelle Abnahme des Anteils von sauren Proteinen bei zunehmender Helicesanzahl zu erkennen, bei *H. salinarum* von 75% (1 TMD) auf 50% (>7 TMD), bei *E. coli* von 35% (1 TMD) auf 5% (>7 TMD). Der Anteil der basischen Proteine in *H. salinarum* nimmt zwischen pI 6-9 und größer 9 gleichermaßen zu. Demgegenüber bleibt die prozentuale Verteilung der schwach-alkalischen Membranproteine bei *E. coli* nahezu konstant (30-40%), der Anteil der stark alkalischen Membranproteine nimmt hingegen von 15% (1 TMD) auf über 50% (>7 TMD) zu. Während insgesamt bei *H. salinarum* fast 50% aller multi-helikalen (3 oder mehr Helices) Membranproteine im pI Bereich kleiner 6 lokalisiert sind, haben die multi-helikalen Membranproteine bei *E. coli* fast ausschließlich basischen Charakter.

Bei einer ersten Untersuchung wurden die Membranproteine unterteilt in einen Membranbereich (bestehend aus dem mittels TMHMM vorhergesagten helikalen Bereichen) und in einen löslichen Bereich, bei dem nicht zwischen intra- und extrazellulärem Bereich unterschieden wurde. Diese Statistik wurde in Abhängigkeit von der Helices-Anzahl und dem pI der Proteine gemacht, um so den Effekt der geladenen Aminosäuren auf den pI einschätzen zu können. Als Referenz für den cytosolischen Bereich wurde ebenfalls die Verteilung der geladenen Aminosäuren in den cytosolischen Proteinen gerechnet. Die graphische Darstellung dieser Verteilung ist in Abbildung 4.7 gezeigt.

Im Vergleich von helikalen und löslichen Bereichen treten die geladenen Aminosäuren entsprechend allgemeiner Erkenntnisse fast ausschließlich außerhalb der Helices auf. In den weiteren Betrachtungen wird der Membranbereich daher nicht weiter diskutiert. Im pI Bereich größer 6 fällt bei den löslichen Bereichen auf, dass sowohl der DE-Anteil als auch der KR-Anteil nahezu konstant sind. Diese Aussage trifft sowohl im Vergleich von *H. salinarum* und *E. coli*, als auch im Vergleich zunehmender Helicesanzahl zu. Demgegenüber variieren im pI-

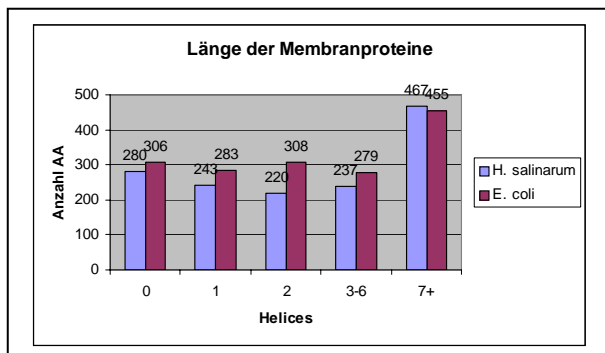
#### 4. Diskussion

Bereich kleiner 6 die Anzahl von sauren und basischen Aminosäuren im Vergleich der Organismen (Anteil DE *H. salinarum* > *E. coli*, Anteil KR *H. salinarum* < *E. coli*), was eine Evidenz für die Halophilie darstellt. Demgegenüber fällt bei zunehmender Helicesanzahl auf, dass bei *H. salinarum* der DE Anteil stark abnimmt (von 18,5% auf 13,8%), der KR Anteil hingegen nahezu konstant bleibt. Bei *E. coli* hingegen bleiben die Anteile der geladenen Aminosäuren nahezu konstant (10% KR, 12,6% DE).



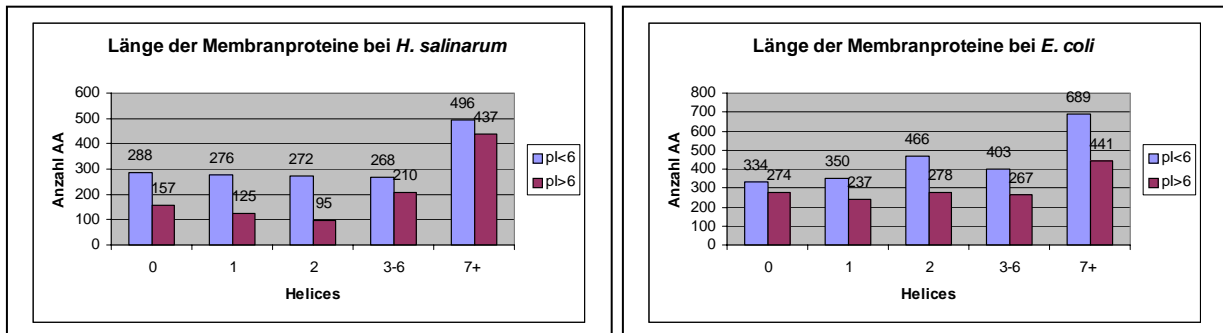
**Abb. 4.7:** Prozentuale Verteilung der geladenen Aminosäuren in Abhängigkeit von Helices-Anzahl und pI des Proteins und der Lokalisierung innerhalb des Proteins bei *H. salinarum* und *E. coli*.

Bezüglich der durchschnittlichen Länge der Membranproteine unterscheiden sich *H. salinarum* und *E. coli* nur geringfügig, jedoch sind allgemein (mit Ausnahme der 7+ Membranproteine) die Proteine von *H. salinarum* kürzer als die von *E. coli* (Abbildung 4.8). Die Längendifferenz liegt dabei bei 26 AA (0 TMD), 40 AA (1 TMD), 88 AA (2 TMD), 42 AA (3-6 TMD) und -12 AA (7+ TMD).



**Abb. 4.8:** Vergleich der Proteinlängen von *H. salinarum* und *E. coli* in Abhängigkeit der Helicesanzahl.

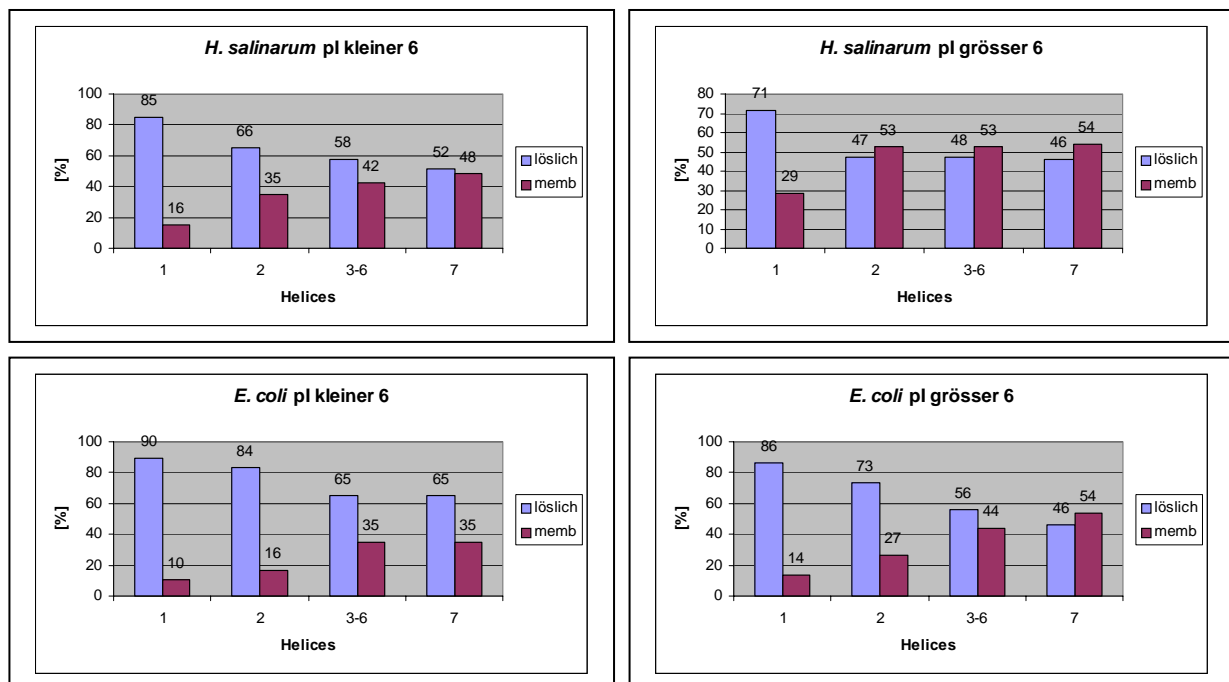
Ein wesentlicher Unterschied bezüglich der Länge der Proteine ist hingegen bei verschiedenen  $pI$ 's zu beobachten (Abbildung 4.9): Saure Proteine sind grundsätzlich länger als basische Proteine.



**Abb. 4.9:** Vergleich der Längen von Proteinen in Abhängigkeit von  $pI$  und Helicesanzahl bei *H. salinarum* und *E. coli*.

Die Unterschiede zwischen sauren und basischen Proteinen liegen bei *H. salinarum* bei 131 Aminosäuren (0 TMD), 151 AA (1 TMD), 177 AA (2 TMD), 58 AA (3-6 TMD) und 59 AA (7+ TMD). Bei *E. coli* liegen die Differenzen bei 60 AA (0 TMD), 113 AA (1 TMD), 188 AA (2 TMD), 136 AA (3-6 TMD) und 248 AA (7+TMD). Innerhalb des letzten Vergleiches muss aber berücksichtigt werden, dass es bei den Mesophilen im allgemeinen nur sehr wenige saure multi-helikale Membranproteine gibt.

In einer weiteren Rechnung wurde daher das Verhältnis von Aminosäurenanzahl innerhalb und außerhalb einer Helix berechnet (Abbildung 4.10).



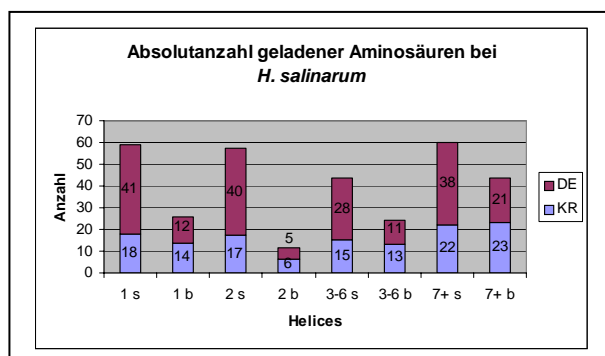
**Abb. 4.10:** Vergleich von Helicesanteilen (memb) und löslichen Bereichen (löslich) bei *H. salinarum* und *E. coli* in Abhängigkeit von Helicesanzahl und  $pI$ .

#### 4. Diskussion

Bei den sauren Membranproteinen von *H. salinarum* und den basischen Membranproteinen von *E. coli* ist folgende Veränderung bei zunehmender Helicesanzahl festzustellen: Der prozentuale Anteil der löslichen Bereiche nimmt bei zunehmender Helicesanzahl ab, gleichzeitig ist dieser Anteil bei den sauren Membranproteinen beider Organismen größer (ca. 10%) als bei den alkalischen Membranproteinen.

Die basischen Membranproteine (>1 TMD) von *H. salinarum* haben ferner ein auffälliges prozentuales Verhältnis von helikalen und löslichen Bereichen: Über 50% aller Aminosäuren liegen innerhalb der Helices. Bei einer Helixlänge von 22 Aminosäuren bei *H. salinarum* liegen durchschnittlich (bei gleicher Anzahl von Helices und löslichen Bereichen) 23 Aminosäuren (2 TMD), 25 Aminosäuren (3-6 TMD) und 21 Aminosäuren (7+ TMD) in den löslichen Bereichen. Diese Zahl scheint somit ein Minimum der nötigen Aminosäuren darzustellen, die zwei Helices miteinander verbindet. Diese kleinen Werte werden annähernd bei den aciden 7+ TMD-Proteinen bei *H. salinarum* mit 29 Aminosäuren und den basischen 7+ TMD-Proteinen von *E. coli* (21 Aminosäuren) erreicht.

In einer Betrachtung der Absolutzahlen der Membranproteine wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Länge der sauren Proteine und einer spezifischen Zunahme der sauren Aminosäuren besteht. Grundlage dieser Berechnung ist die Beobachtung, dass bei den basischen Membranproteinen von *H. salinarum* eine den Mesophilen ähnliche Zusammensetzung vorliegt (vergleiche Abb. 4.7). Abbildung 4.11 zeigt die Absolutzahlen der geladenen Aminosäuren in Abhängigkeit von Helices und pI.



**Abb. 4.11:** Absolutzahlen der geladenen Aminosäuren von *H. salinarum* in Abhängigkeit von Helicesanzahl und pI.

Es scheint ein Grundgerüst von basischen Aminosäuren vorzuliegen, so dass die Verschiebung in den sauren Bereich ausschließlich durch eine Anhäufung der sauren Aminosäuren hervorgerufen wird.

Mit Ausnahme der 2-helikalen Transmembranproteine liegt die Anzahl der basischen Aminosäuren, unabhängig vom pI des Proteins, zwischen 13,1 (3-6 TMD,

basisch) und 23,1 (7+TMD, basisch). Demgegenüber variieren die Mengen der sauren Aminosäuren zwischen 10,9 (3-6 TMD, basisch) und 41 (1 TMD, sauer).

Aus der Längendifferenz von sauren und basischen Proteinen lässt sich die prozentuale Zunahme von Aspartat und Glutamat in den verlängerten Bereichen ermitteln ( $\sum DE_{\text{sauer-}}$

$\Sigma DE_{\text{bas}})/(\Sigma A A \text{Prot}_{\text{sauer}} - \Sigma A A \text{Prot}_{\text{bas}}) * 100$ ). Bei 1 TMD sind 20% der zusätzlichen Aminosäuren D/E, bei 3 und mehr Helices sogar 30%.

Die Halophilie von Membranproteinen kann demnach erklärt werden als eine Verlängerung der Proteinlänge in den nicht-membranständigen Bereichen mit dem Ziel, saure Aminosäuren spezifisch in diese einzubinden.

#### 4.3.6 Isoelektrische Fokussierung von Membranproteinen

Der aktuelle Stand der isoelektrischen Fokussierung mit Membranproteinen ist bereits in Abschnitt 1.7 beschrieben worden. Trotz zahlreicher Parameteränderungen, die vor allem zu einer verbesserten Solubilisierung der Proteine führten (Molloy, 2000), sind hydrophobe Transmembranproteine auf IEF/SDS-Gelen nahezu nicht vorhanden.

Bei der Probenvorbereitung sind speziell bei den Membranproteinen einige zusätzliche Schritte für die IEF nötig:

(1) Delipidierung: gebundene Phospho- und Glykolipide (vgl. Abschnitt 1.4.2) bringen zusätzliche Ladungen in Form von freien Phosphatgruppen (PGP) und vor allem von Sulfatgruppen (PGS, S-TGA-1, S-TeGa) ein, welche den apparenten isoelektrischen Punkt eines Proteins verändern. Zwar findet bei Solubilisierung ein Austausch der Lipide gegen das Detergens statt, jedoch erfolgt dieser Austausch nicht quantitativ, so dass eine Vielzahl möglicher Protein/Lipid-Formen entsteht. Der niedrige pKa-Wert der sulfatisierten Lipide führt dann zu einer starken Acidisierung der Proteine, die somit in der IEF-Dimension entweder im sauren Bereich lokalisiert sind, oder aber bei den sauren Membranproteinen eventuell einen pI von kleiner 3 erreichen (außerhalb des Trennbereiches). Durch eine vorherige Inkubation in Chloroform/Methanol kann eine Delipidierung erfolgen, die einen Großteil der Lipide entfernt.

(2) das Glykoprotein der Zellhülle stellt vermutlich das dominanteste Membranprotein dar, welches neben seiner Größe (89,7 kDa) zusätzlich eine außergewöhnliche Acidität besitzt (Uronsäurederivate und Sulfatreste, vgl. Abschnitt 1.4.1). Bei dem Probenauftrag führt die große Anzahl an Ladungsträgern zu einer hohen Mobilität des Proteins in Lösung, die jedoch an der Grenzfläche zur Gelmatrix aufgrund der Proteingröße aufgehoben wird. Dies führt durch die Konzentrierung an der Auftragsstelle zu einer Präzipitation, die weitere Proteine am Eintritt in den Streifen hindert. Experimentell konnte dieser Effekt durch eine extrem langsame Einlaufphase der Probe bei geringen Stromstärken minimiert werden.

Eine Abtrennung des Glykoproteins kann unter einer Erniedrigung der Ionenstärke von kleiner 1 M NaCl erfolgen, jedoch erfolgt dabei die oben beschriebene Dissoziation der Membran.

#### 4. Diskussion

(3) DNA und RNA werden bei ausschließlich differentieller Zentrifugation mit den Membranbereichen pelletiert. Bei einem anschließenden Probenauftrag migrieren diese (hochgeladenen) Makromoleküle wie das Glykoprotein schnell zur Gelmatrix und blockieren die Auftragsstelle. Im Rahmen der Aufarbeitung können RNA und DNA durch einen Dichtegradienten abgetrennt werden, oder aber kurz vor dem Probenauftrag. Eine vorherige Behandlung mit DNase und RNase vor dem Probenauftrag brachte eine verbesserten Proteineintritt in die IEF-Dimension, was in einer späteren Publikation bei der unspezifischen Endonuclease Benzonase beschrieben wurde (Chan *et al.*, 2002). Eine im Rahmen der Solubilisierung durchgeführte Sonifizierung mit einem Mikrotip führt ebenfalls zu einer Zerstörung der DNA/RNA-Struktur, so dass eine zusätzliche Inkubation mit Enzymen nicht nötig war.

Der Einsatz einer Detergenzienmischung aus ASB-14/Tx-100 in Harnstoff/Thioharnstoff nach einer Delipidierung durch  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Extraktion führte im Rahmen dieser Arbeit zu dem bisher hydrophobsten bakteriellen Membranprotein, welches auf einem klassischen 2-D Gel (Abbildung 3.35) identifiziert werden konnte (probable copper-transporting ATPase, 7 TMD, GRAVY +0,29).

Auffallend bei diesem Protein ist, dass es bei einer Größe von 87,7 kDa und lediglich 7 Transmembranhelices (0,08 TMD/kDa) einen solch hohen GRAVY-Wert besitzt. Ein nahezu 40 kDa langer N-terminaler Abschnitt besteht aus einem cytosolischen Bereich ohne eine TM-Vorhersage.

Ein weiteres Protein (OE3991R,  $\text{H}^+$ -transporting two-sector ATPase chain I.a, 7 TMD, GRAVY +0,17) wurde auf diesem Gel lediglich als „unknown“ identifiziert (3 gefundene Peptide), korreliert jedoch bezüglich Größe und pI mit einem auf einem anderen Gel unter ähnlichen Bedingungen identifizierten Spot. Hier wurden 6 Peptide gefunden, was zu einer „insecure“-Identifizierung führte. Die vorhergesagten 7 Transmembran-Domänen liegen im N-Terminus, ein ebenfalls 40 kDa langer C-Terminus stellt einen cytosolischen Abschnitt dar. Aus diesen Identifizierungen lässt sich schließen, dass nicht nur die Anzahl von Transmembranhelices und Hydrophobizität für das nicht-Vorhandensein der Membranproteine verantwortlich sind, sondern vor allem das Verhältnis aus Transmembrandomäne zur Größe des Proteins (TMD/kDa).

Die Präzipitation der fokussierten Proteine an ihrem pI konnte durch eine Fluoreszenz-Markierung nachgewiesen werden (Abbildung 3.38). Sämtliche Versuche, diese wieder zu resolubilisieren, führten jedoch zu keinem verbesserten Transfer:

(1) Ein wichtiger Parameter, den es zu evaluieren galt, war der Einfluss von Harnstoff bei der Äquilibrierung von IEF zur SDS-Dimension. Der Äquilibrierungspuffer (6 M Harnstoff, 2 % SDS, 30% Glycerol, 50 mM Tris/HCl, pH 8,8, vgl. Abschnitt 2.3.9) enthält 6 M Harnstoff, obwohl von Weber und Kuter (1971) die SDS-Entfernung von Proteinen mittels Harnstoff beschrieben wurde (SDS-solubilisierter Proteine wurden zunächst gegen Harnstoff dialysiert, die darauffolgender Dialyse gegen Wasser brachte die Proteine wieder in ihre native Konformation). Eine Erhöhung der Chaotropie der Umgebung könnte durchaus zu einer Verringerung der hydrophoben Wechselwirkung von Detergens und Protein führen, die dann nicht mehr ausreicht, eine Präzipitation von Membranproteinen aufzuheben. Eine schrittweise Verringerung der Harnstoffkonzentration führte jedoch zu keiner Aufhebung der Präzipitation.

(2) Versuche, eine verbesserte Kinetik der Solubilisierung durch Temperaturerhöhung oder Ultraschall zu erreichen, führten ebenfalls zu keinem verbesserten Transfer.

(3) Die Effektivität der Solubilisierung von anionischen Detergenzien kann zudem durch eine Erhöhung der Ionenstärke verbessert werden. Speziell der basische Bereich des IPG-Streifens gleicht in seiner chemischen Zusammensetzung einem Anionenaustauscher, so dass eine Überprüfung der Transferproblematik mit relativ hoher NaCl-Konzentration (500 mM) versucht wurde.

(4) Ein weiterer Störfaktor des Transferschrittes kann im Detergens der IEF-Dimension liegen. Dieses kann zusammen mit SDS Mischmicellen bilden und damit die Konzentration an „freiem“ SDS im IPG-Streifen reduzieren, so dass kein Detergensaustausch am Protein mehr erfolgen kann (Gianazza *et al.*, 1986). Um diesen Effekt auszuschließen, wurden die IPG-Streifen vor dem Transfer in Methanol/Essigsäure/H<sub>2</sub>O inkubiert, jedoch konnte auch hier kein verbesserter Transfer beobachtet werden.

(5) Allgemein üblich erfolgt die Solubilisierung von Proteinen mit SDS nach dem Lämmli-System bei pH 8,8. Die Löslichkeit von Proteinen ist jedoch an ihrem pI am geringsten, speziell Membranproteine haben im allgemeinen einen eher basischen pI. Die Überprüfung der pH-Abhängigkeit während der Äquilibrierung wurde daher in einem sauren Milieu (pH 2,1) vorgenommen. Ferner wurde mit dem stärkeren Chaotrop Guanidiniumhydrochlorid und dem kationischen Detergens 16-BAC gearbeitet. Jedoch führte auch diese Parameterveränderung zu keiner Verbesserung.

(6) In einem weiteren Experiment wurde der Einfluß der Matrix überprüft. Um den hydrophoben Charakter des Acrylamids und deren Derivate in IPG-Streifen zu evaluieren wurde in einem Versuchsaufbau mit flüssiger Agarose und Carrier-Ampholyten BR

fokussiert. Nach beendeter Fokussierung wurde die Matrix erhärtet und die Matrix auf ein SDS-PAA-Gel transferiert. Zwar sind Spots in einem pI-Bereich zu erkennen, die früheren Studien auf IEF-Ebene entsprechen (Ross *et al.*, 1989), jedoch um zwei Größenordnungen verringerter Intensität (vgl. Abbildung 3.39).

So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine zweidimensionale Auftrennung von Membranproteinen innerhalb einer Matrix in der IEF-Dimension aufgrund einer irreversiblen Präzipitation nicht quantitativ möglich ist.

Eine vollständig matrixfreie isoelektrische Fokussierung ist mittels der Free-Flow Elektrophorese möglich. Diese Methode bietet den Vorteil, dass durch den kontinuierlichen Fluss eine präparative Auftrennung möglich ist und zum anderem die aufgetrennten Proteine nach der Fraktionierung in Lösung vorliegen. Weiterhin werden die oben erwähnten Probleme des Probenauftrags (Konzentrierung an der Auftragsstelle) umgangen.

In einem Versuch unter nativen Bedingungen konnte Bakteriorhodopsin (vgl. Abbildung 3.42) in 3 Fraktionen aufgetrennt werden. Nach erfolgter Fraktionierung bildete sich nach kurzer Zeit ein Präzipitat, was die obige Annahme der irreversiblen Präzipitation unterstützt. In einem Reaktionsgefäß konnte dieses dann jedoch wieder solubilisiert werden. Bei der nativen Auftrennung von Membranprotein-Komplexen entstand hingegen schon im Trennraum ein Präzipitat.

Unter denaturierenden Bedingungen konnte zwar die Präzipitation verhindert werden, jedoch konnten nach SDS-Gelaufreinigung keine Proteine in den basischen Fraktionen detektiert werden. Allerdings muss die experimentelle Durchführung näher betrachtet werden: Bei einer hochmolaren Harnstoffkonzentration ist die Viskosität des Mediums erheblich größer als bei den nativen Bedingungen, so dass die Mobilität der Proteine deutlich herabgesetzt ist (vgl. Abschnitt 1.6.3). Zwar lässt sich dieser Effekt durch eine Erhöhung des elektrischen Feldes ausgleichen, jedoch werden hierbei die elektroosmotischen Effekte speziell im kathodischen (basischem) Bereich zunehmen.

Ferner wurde in diesen Versuchen kein Detergens zum Medium zugegeben, so dass eine eventuelle Detergensverarmung an den Proteinen für eine Präzipitation oder ungleiche pI-Werte der Proteine verantwortlich sein kann. Andererseits findet die Auftrennung innerhalb eines kurzen Zeitraums statt, in dem die Trennung von Detergens und Protein unter Umständen noch nicht stattfindet. Weiterhin beeinflussen sich das zur Osmostabilisierung eingesetzte HPMC und Detergens gegenseitig, was wiederum zu einer Verstärkung der Elektroosmose im basischen Bereich führt. Die Zugabe einer geringen Menge des Detergens Triton X-114, welches mit dem HPMC kompatibel ist, zum Trennmedium führte



jedoch auch zu keiner Visualisierung von basischen Proteinen. Diese erfolgte über eine SDS-PAGE, für die die Proteine unter gleichzeitiger Entfernung des Harnstoffes angereichert werden mussten. Bei der angewandten Acetonfällung sind eventuelle Verluste hydrophober Proteine möglich.

Zusammenfassend konnten integrale Membranproteine über keine zweidimensionalen Trennverfahren, die auf Unterschieden im isoelektrischen Punkt basieren, im ausreichenden Maße aufgetrennt werden. Es wurden daher pI-unabhängige Methoden angewandt.

#### 4.3.7 Alternative Auftrennungen und Visualisierung

Weitere Auftrennungsmöglichkeiten in der ersten Dimension stellen das BAC-System (mit nachfolgender SDS-Auftrennung) und eine SDS-Dimension mit nachfolgender RP-HPLC dar.

##### 4.3.7.1 Zweidimensionale Größenauftrennung im BAC/SDS-System

Eine direkte Alternative zur isoelektrischen Fokussierung stellt die Auftrennung mittels des kationischen Detergens 16-BAC dar (Macfarlane, 1983, Macfarlane, 1996; Hartinger *et al.*, 1996). Prinzip dieser Methodik ist das unterschiedliche apparente Molekulargewicht bei Membranproteinen mit kationischen bzw. anionischen Detergenzien nach Solubilisierung. Das Ergebnis der Auftrennung sind Proteinflecken, welche von der Diagonalen abweichen. Allerdings steht im Vergleich zur isoelektrischen Fokussierung nur ein geringerer Teil des Geles zur Auflösung zur Verfügung. Dieser Effekt ist als nicht dramatisch zu bewerten, da bei einem 20 cm x 20 cm großen Gel und einer maximalen Abweichung von  $\pm 1,5$  cm von der Diagonalen sich eine Fläche von ungefähr 80 cm<sup>2</sup> ergibt, in der die Auftrennung stattfindet. In einem gleichgroßen IEF/SDS-Gel hingegen ist die Fläche 400 cm<sup>2</sup>, also lediglich um Faktor 5 größer als bei dem BAC/SDS-System.

Die Identifizierung des Arginin/Ornithinaustauscher (OE5204F) mit 13 Transmembran-Domänen und einem GRAVY von +0,74 als eines der dominantesten Proteine zeigt den Vorteil dieses Systems: auf 2-D Ebene von IEF/SDS war dieses Protein bisher nicht identifizierbar (Abbildung 3.45).

Bemerkenswert bei allen im Rahmen dieser Arbeit gemachten BAC/SDS-Gelen ist die hohe Anzahl von Proteinen, die von der Diagonalen abweichen. In den bisherigen Berichten konzentrierten sich alle Proteine weitgehend auf der Diagonalen. Da in keinem Fall ein Nachweis über die Natur dieser Proteine als Membranproteine geführt wurde, könnten unter Umständen wesentliche Verunreinigungen von löslichen oder aber peripheren Proteinen visualisiert worden sein, die im Gegensatz zu den integralen Membranproteinen kein abweichendes Verhalten zeigen. Deshalb ist es als Vorteil für die hier beschriebene Methode

zu werten, dass aufgrund der Halophilie diese Proteine ebenso wie integrale Membranproteine ein anderes apparentes SDS-Molekulargewicht besitzen (Madern *et al.*, 2000) und so ebenfalls aufgetrennt werden können.

Die Auftrennung durch kationische Detergenzien in der ersten Dimension ist auch mittels CTAB (Cetyltriethylammonium-bromid) möglich (Navarre *et al.*, 2002), jedoch war die beschriebene Auftrennung einer Hefe-Plasmamembranfraktion bei weitem schlechter als die von *H. salinarum* mittels BAC/SDS.

In einem Vergleich von aerob und phototroph kultivierten Stämmen konnten erstmalig Unterschiede des Expressionsniveaus von Membranproteinen nachgewiesen werden (Abbildungen 3.46, Abbildung 3.47 und Tabelle 3.7). Die hochregulierten und identifizierten Proteine aus dem aeroben Wachstum stammen alle aus den Atmungskettenkomplexen und bestätigen das Potential dieser Auftrennungsmethode. Es konnten jedoch insgesamt nur 20 Proteine identifiziert werden, auch eine MALDI-TOF-TOF Analyse brachte keine Verbesserung. Mögliche Ursachen können durch Verluste bei der Silberfärbung, bei der Spaltung und der Elution liegen, diese Punkte werden in den nächsten Abschnitten näher diskutiert.

##### 4.3.7.2 Eindimensionale SDS-Auftrennung zur Vorfraktionierung

Eine weitere Möglichkeit der zweidimensionalen Auftrennung ist die Kombination aus Protein- und Peptidauftrennung. Hier besteht die erste Dimension aus einer Größenauftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, gefolgt von einer zweiten Dimension durch reversed Phase-HPLC als chromatographische Trennung von Peptidfragmenten aus diesen Proteinen. Die erste Dimension ist auch für Membranproteine ohne Limitation, da diese alle in SDS löslich sind. Nach Zerschneiden des Geles zur Generierung von Subfraktionen ist allerdings die folgende enzymatische Spaltung und Elution der Peptide problematisch (vgl. nächsten Abschnitt). Da das gesamte Gel für die Analyse benutzt wurde, treten keine Verluste von Proteinen mit signifikant unterschiedlichem apparenten Laufverhalten auf; das 89,7 kDa große Glykoprotein der Zellhülle konnte an der Kante vom Trenngel zum Sammelgel (größer 200 kDa) identifiziert werden.

Die komplette Analyse eines Gelstreifens umgeht ferner mögliche Verluste von Proteinen, die auf unterschiedliche Färbungen verschieden reagieren. Das ubiquitär vorkommende Calciumbindende Protein Calmodulin lässt sich zwar mit Coomassie visualisieren, bei einer Färbung mit Silber (sowohl unter sauren als auch basischen Bindungen) bleibt es farblos (Rochette-Egly und Stussi-Garaud, 1984). Sowohl die Coomassie-Färbung als auch die Visualisierung mit SyproRuby beruhen auf eine Anbindung der Farbstoffe an die basischen Aminosäuren

(Lopez *et al.*, 2000). Bemerkenswerterweise besitzt Calmodulin bezüglich der sauren Reste eine ähnliche Zusammensetzung wie halophile Proteine (zwischen 20,4% D/E (Hefe) und 26,2% D/E (Weizen)).

Ein Einfluss von negativen Ladungen ist auch bei sauren Proteinen und polyphosphorylierten Proteinen beschrieben (Stetler-Stevenson und Veis, 1983; Tsay und Veis, 1985; Myers *et al.*, 1996). Möglicherweise haben auch am Protein zurückgebliebene Phospholipide eine ähnliche Wirkung, so dass eine Färbung eventuell unterbunden bzw. die Intensität abgeschwächt wird. Bei sowohl den löslichen als auch den Membranfraktionen von *H. salinarum* ließen sich die Proteine mit SyproRuby (allgemein 10fach sensitiver als Silberfärbungen) erheblich schlechter färben als mit einer massen-kompatiblen Silberfärbung, eine Coomassie-Visualisierung nach IEF/SDS-Auftrennung führte selbst bei einer Auftragsmenge von 2 mg Protein zu nur wenigen Proteinspots.

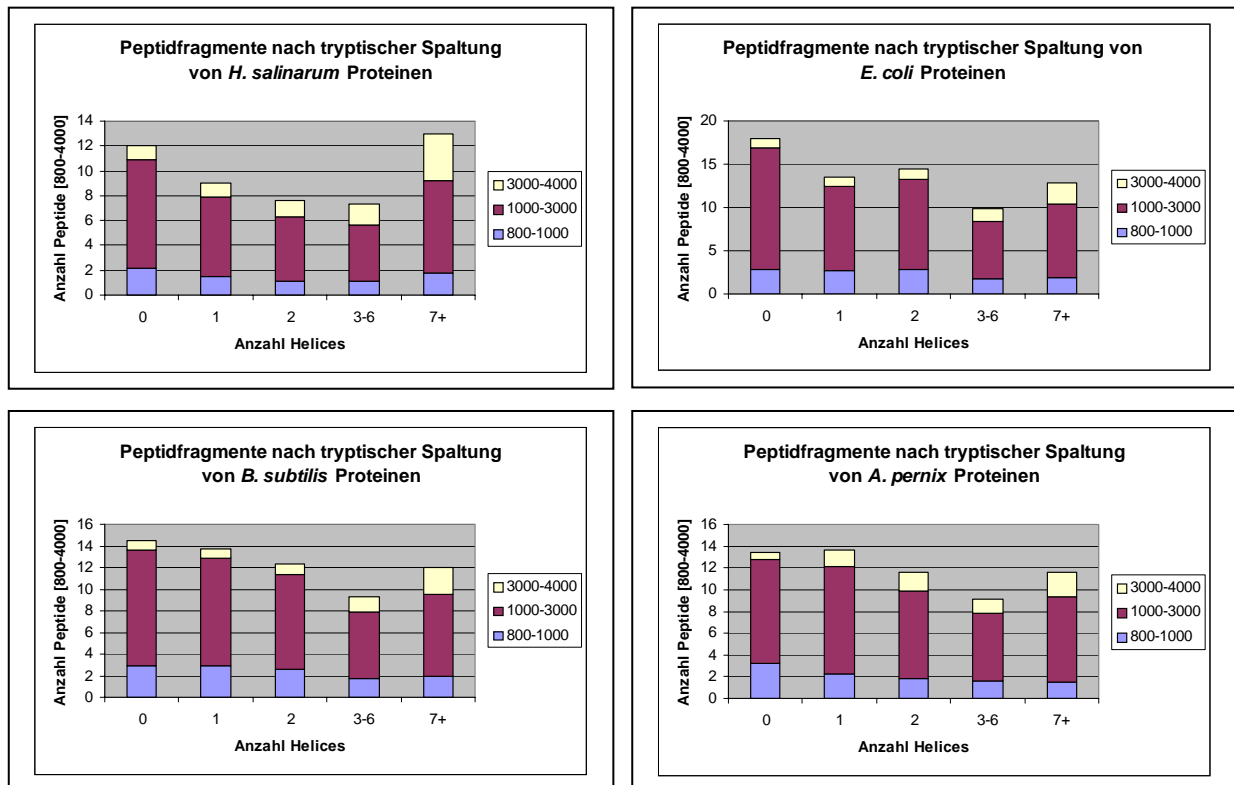
Unabhängig von der Aminosäurezusammensetzung der Proteine ist die Zink/Imidazolfärbung, die im Falle von *H. salinarum* sich ähnlich sensitiv zeigte wie die Silberfärbung und auch im pH-Bereich 3-6 nach IEF/SDS Auftrennung zusätzliche Spots zeigte. Im pH-Intervall 6-10 waren jedoch keine weiteren Proteine visualisierbar. Dies wird durch die Fluoreszenzmarkierung, welche an den Lysinresten erfolgt, bestätigt; die Proteine bleiben irreversibel an ihrem pI präzipitiert.

#### 4.3.8 Spaltung von Membranproteinen und massenspektrometrische Identifizierung

Eine routinemäßige Analyse und Identifizierung von einer Vielzahl Proteinen ist mit Hilfe der Massenspektrometrie möglich. Hierbei wird aufgrund einer erhöhten Massenungenauigkeit bei höherem Molekulargewicht meist nicht mit Proteinen gearbeitet, sondern mit kleineren Peptiden. Diese können dann entweder über die gewonnene Sequenzinformation (PSD, MS/MS) oder über das Fingerprint-Spektrum (MALDI) einem Protein zugeordnet werden.

Im Rahmen des Proteomansatzes wird die Endoprotease Trypsin, welches C-terminal nach Lysin/Arginin (kein C-terminales Prolin direkt folgend) schneidet, häufig eingesetzt. Berechnungen von C. Garcia-Rizo aus der Bioinformatikgruppe zeigten, dass die tryptische Spaltung von Membranproteinen bei allen Organismen ausreichend Peptide generiert (mindestens 10 Peptide sind für eine trusted-Identifizierung nötig, vgl. Abschnitt 4.2.3), um anschließend mittels MALDI-TOF identifiziert zu werden. Abbildung 4.12 zeigt die Verteilung der Peptidfragmente nach theoretischer tryptischer Spaltung von *H. salinarum*, *E. coli*, *B. subtilis* und *Aeropyrum pernix*. Einzige Ausnahme sind die Membranproteine (1-6 TMD) von *H. salinarum*, lediglich 7 bis 9 Peptide entstehen nach theoretischer tryptischer Spaltung im Massenbereich 800-4000 m/z.

#### 4. Diskussion



**Abb. 4.12:** Theoretische Spaltung von Cytosol- und Membranproteinen mittels Trypsin. Dargestellt ist die (theoretische) Abhängigkeit der Anzahl und Verteilung der (innerhalb des MALDI-Fingerprint Fensters liegenden) entstehenden Peptidfragmente von der vorhergesagten Helixanzahl (0 TM bei cytosolischen Proteinen).

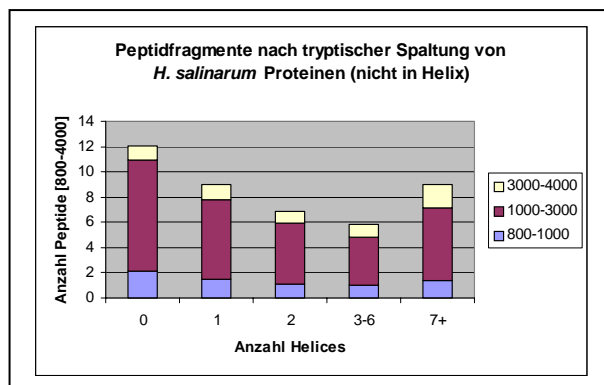
Aus eigenen Versuchen und einer späteren Publikation (Shevchenko *et al.*, 2000) war bekannt, dass Bakteriorhodopsin resistent gegenüber einer klassischen tryptischen Spaltung ist, lediglich ein Peptid konnte identifiziert werden, bei dem es sich wahrscheinlich („Data not shown“, Shevchenko *et al.*, 2000) um den N-Terminus handelte. Das Arginin227 ist lediglich die zweite Aminosäuren innerhalb einer Transmembranhelix (vgl. Abschnitt 7.2), und somit Trypsin zugänglich. Das entstehende Peptid hat eine monoisotopische Masse von 1918,87 m/z. Bei einer vollständigen tryptischen Spaltung ergeben sich 5 weitere Peptide (zwischen 800-4000 m/z) der Massen 3329,82 (Position 1-30), 2974,5615 (135-159), 1452,7151 (160-172), 987,6349 (217-225) und 976,4404 (31-40). Während die Schnittpositionen K172, K217 und R225 vollständig innerhalb der Helices liegen, sind K30 und K40 lediglich 3 Aminosäuren innerhalb einer Helix. Interessanterweise liegen die Schnittstellen R135 und K159 in den Henkeln, schließen jedoch eine Helix ein. Die Größe des entstandenen Peptides von 2974,56 m/z liegt jedoch sehr nahe an der von Shevchenko gewählten Fenstergröße von 800-3000 m/z.

In der Fraktion 7 eines Dichtegradienten (Abbildungen 3.28) ist auf SDS-Gelen eine Leiterstruktur erkennbar, bei der es sich vermutlich um Bakteriorhodopsin und seine

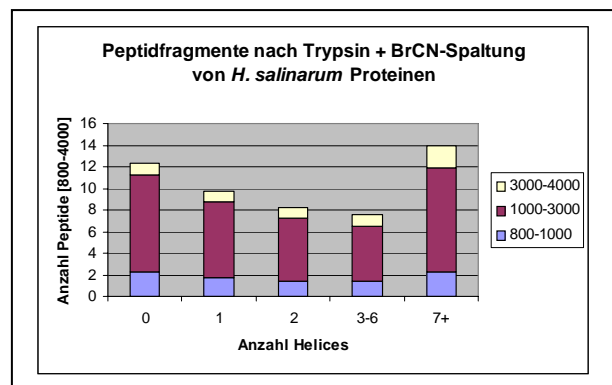
Oligomeren handelt (Abbildung 3.29 G). Da diese Fraktion 7 die Purpurmembran darstellt, sollte diese ausschließlich BR enthalten. Bei keinem der innerhalb der Leiter liegenden Flecken sind jedoch nach tryptischer Spaltung und MALDI-TOF Analyse Peptide mit den theoretischen Peptidgrößen von BR gefunden worden.

Unter der Annahme, dass Membranproteine unter Standardbedingungen nicht innerhalb der Helices von Trypsin geschnitten werden, wurden die Rechnungen von Abbildung 4.12 für *H. salinarum* unter dieser Berücksichtigung wiederholt.

Dies führte zu dem Ergebnis, dass bei allen Membranproteinen, unabhängig von der Helicesanzahl, nicht mehr ausreichend Peptide generiert werden (Abbildung 4.13).



**Abb. 4.13:** Anzahl der Peptidfragmente der Membranproteine von *H. salinarum* nach tryptischer Spaltung, jedoch nicht innerhalb der Helices.



**Abb. 4.14:** Anzahl der Peptidfragmente der Membranproteine von *H. salinarum* nach BrCN und tryptischer Spaltung.

Eine von den Transmembranstrukturen unabhängige Spaltung ist mittels chemischer Methoden möglich. Hierbei ist besonders die Bromcyanspaltung (Gross und Witkop, 1961) verbreitet. Bei dieser Reaktion wird C-terminal aus Methionin ein Homoserinlacton gebildet, jedoch nur aus Methionin in der nicht-oxidierten Form.

Bei der Spaltung von Bakteriorhodospin mit Bromcyan und anschließender MALDI-TOF Analyse (Fingerprint und PSD) konnte die Effizienz dieser Spaltung und der anschließenden Nachanalyse bestätigt werden (vgl. Abschnitt 3.4.6). Nachteil dieser Methodik ist die geringe Anzahl an entstehenden Peptiden, da Methionin lediglich zu 1,66% in den vorhergesagten halobakteriellen Proteinen vorkommt. Bei BR sind es 7 Peptide mit 3958,0555 (210-248), 2913,5661 (119-145), 2508,3384 (33-56), 2190,1705 (1-20), 2081,0993 (146-163), 1250,7143 (21-32) und 819,4611 (61-68).

Von diesen konnten jedoch nur jeweils 3 Peptide (2 identische und jeweils 2 unterschiedliche Peptide in den Spektren) bei unterschiedlichen Auftragsmengen gefunden werden (vgl. Abschnitt 3.4.6). Lediglich das N-terminale Peptid ist nicht in der Membran lokalisiert, alle anderen 3 gefundenen Peptide sind helikale Peptide. Dies bedeutet, dass mittels MALDI-TOF

Transmembrandomänen detektiert werden können, der Ionisierungsprozess also unabhängig von der Peptidlokalisierung und Hydrophobizität verläuft. Ebenso ist die PSD-Analyse von Helicesbereichen möglich, wie das Peptid mit der Masse 1250 m/z beweist.

Interessant ist dabei, dass das Pyroglutamat selbst unter den sauren Bedingungen des Probenauftrages stabil bleibt. Im Spektrum mit dem 125 ng Auftrag konnte nur dieser Peak gefunden werden, das Peptid mit geöffneter Glutamatkette (theoretische Masse 2207 m/z) wurde nicht detektiert. Somit wurden jeweils in einem Spektrum 3 Peptide von 7 theoretisch vorhergesagten gefunden (43%), ein Wert, der geringfügig unter der cytosolischen Peptid-Rate (60% gefundene tryptisch-generierte Peptide im Massenbereich) liegt. Das Protein konnte jedoch nur durch anschließende PSD-Analyse identifiziert werden, ein Verfahren, das sich (momentan) nicht für eine Hochdurchsatz-Methode eignet. Es wurde daher *in-silicio* versucht, Membranproteine durch Kombination mehrerer Spaltungsmethoden in ausreichend viele Peptide im Massenbereich 800-4000 m/z zu spalten, um sie so der Hochdurchsatz-Methode MALDI-Fingerprint zugänglich zu machen:

Die durchschnittliche Verteilung der Bromcyanspaltung alleine und in Kombination mit einer tryptischen Spaltung sind in Abbildung 4.14 gezeigt, bei der die nötige Zahl von 10 Peptiden für eine MALDI-TOF-Fingerprint Analyse ebenfalls nicht generiert wird (Ausnahme >7 TMD).

Ebenso wurden von der Bioinformatikgruppe folgende Variationen weiterer Schnittmöglichkeiten gerechnet:

- |                               |                             |
|-------------------------------|-----------------------------|
| (1) BrCN und Trypsin          | (6) GluC und BrCN           |
| (2) Iodosobenzoat             | (7) GluC und Iodosobenzoat  |
| (3) Iodosobenzoat und Trypsin | (8) AspN                    |
| (4) Iodosobenzoat und BrCN    | (9) AspN und BrCN           |
| (5) GluC                      | (10) AspN und Iodosobenzoat |

Die chemische Spaltung mit ortho-Iodosobenzoat erfolgt C-terminal nach Tryptophan (Mahoney und Hermodson, 1979), zeigt jedoch durch ortho-Iodoxybenzoat-Verunreinigung eine C-terminale Spaltungsaktivität nach Tyrosinresten (Mahoney *et al.*, 1981).

Keine dieser Kombinationen führte bei den Membranproteinen in allen Helicesklassen zu den für eine Identifizierung nötigen 10 oder mehr Spaltstellen im Massenbereich 800-400 m/z.

Da selbst bei diesen verschiedenen Kombinationen unter theoretischen Bedingungen nicht ausreichend Peptide generiert werden, ist eine abschließende Aussage über die massenspektrometrische Identifizierung halobakterieller Membranproteine möglich:

Mittels MALDI-TOF Fingerprint können integrale Membranproteine von *H. salinarum* nicht umfassend identifiziert werden, eine Zuordnung ist lediglich über Sequenzinformationen möglich.

Diese Sequenzinformationen sind über PSD, TOF/TOF oder aber MS/MS erhältlich. Mittels PSD konnten die Peptide der Bromcyanspaltung von BR identifiziert werden, jedoch ist die Methode für einen Hochdurchsatz nur bedingt nutzbar. Zum einen muss der zu analysierende Peak in einem Massenbereich von  $\pm 50$  Da alleine und in einer ausreichenden Intensität vorhanden sein, zum anderen kann derzeit kein Softwareprogramm eine automatische Annotation der aufgenommenen Spektren durchführen.

#### 4.3.9 LC/MS/MS-Analysen der Membranfraktion

Im Rahmen der zwei LC/MS/MS Experimente konnten 114 integrale Membranproteine (20% des vorhergesagten integralen Membranproteoms) identifiziert werden. Eine weitergehende Analyse führte zu zwei Beobachtungen:

- (1) Keins der identifizierten Peptide war ein helikales Fragment.
- (2) Nur wenig basische Membranproteine wurden identifiziert. Dieser Punkt wird im nächsten Abschnitt weitergehend diskutiert.

Um unvollständige Spaltung in den helikalen Bereichen auszuschließen wurde bei der anschließenden Recherche auch fehlende Schnittstellen berücksichtigt. So entstandene Peptide haben zwar eine größere Aminosäureanzahl, sind jedoch durch Mehrfachprotonierungen detektierbar. Das „Massenfenster“ ist also nicht limitierend, es müssen die helikalen Peptide anderweitig verloren gehen.

Möglichkeiten dieses Verlustes sind somit (1) Unlöslichkeit der Helices-Peptide im wässrig-sauren Medium, (2) Verluste bei der Probenvorbereitung, (3) Verlust am Säulenmaterial (Entsalzungssäulchen, Vorsäule, Trennsäule) oder (4) Verluste durch nicht ausreichende Ionisierung.

Punkt (1) wird maßgeblich von Beobachtungen bei dem strukturell homologen Rinder-Rhodopsin unterstützt: BrCN generierte Peptidfragmente sind nur in reinem TFA oder Ameisensäure löslich (Kraft *et al.*, 2001). Bei den LC/MS/MS-Analysen wurde dieser Einfluss berücksichtigt, die Resuspension der Peptide fand zuerst in 100% Ameisensäure (bzw. 100% TFA) statt, anschließend wurde die Probe verdünnt. Bei der MALDI-Probenauftragung ist dies nicht so kritisch zu werten, da hier keine Säulentrennung erfolgte und die Peptide direkt in angesäuerter Acetonitril-Lösung aufgenommen wurden.

Die Probenvorbereitung (Punkt 2) ist besonders bei der ESI-Methode von Bedeutung, da Lipide und Detergenzien mehr stören als bei einer MALDI-Quelle. So wurde bei Versuchen

mit Rhodopsin (Kraft *et al.*, 2001) dieses zunächst in nicht-ionischem Detergens solubilisiert und anschließend mit TCA gefällt und in 95% Ethanol gewaschen. In SDS solubilisierte Proteine hingegen lassen sich nicht mittels TCA-Fällung präzipitieren. Eine andere Methode der Fällung von Bakteriorhodopsin besteht in einer modifizierten Acetonfällung mit Ammoniak und TCA (Hufnagel *et al.*, 1996). Eine weitere Möglichkeit zu einer ESI-Analyse ohne Präzipitation wurde von Barnidge vorgestellt (Barnidge *et al.*, 1999) bei der solubiliertes BR in einem Chloroform/Methanol/Wasser/Ameisensäure (2/5/4,25/0,1) in die Chloroformphase überging. Der Übergang in die Chloroformphase steht dabei in einem scheinbaren Widerspruch zu der Chloroform/Methanol-Extraktion nach Rabilloud, bei der hydrophobe Membranproteine in die Methanol-Phase übergehen (Santoni *et al.*, 2000). Entscheidend ist jedoch der Säurezusatz, bei gleichem Protokoll ohne die Ameisensäure wird das BR teils in der Methanolphase und teils als Präzipitat in der Interphase gefunden. Auch die Acetonfällung erfordert die Zugabe von TCA.

Die Verluste am Säulenmaterial (Punkt 3) bezüglich hydrophober Membranfragmente wurden bei Peptidfragmenten von Rhodopsin beschrieben (Kraft *et al.*, 2001).

Eine mangelnde Ionisierung (4) ist eventuell auf restliches Detergens in der Probe zurückzuführen. Speziell hydrophobe Proteine können Spuren des anionischen Detergens SDS gebunden haben, die bei einer MALDI Analyse sowohl die Kokristallisation mit der Matrix behindern könnten, als auch Bereiche mit geringerer Protonierungseffizienz bilden.

Die Entfernung von SDS mittels einer Ionenpaarbindung mit Triethylamin ist in Abschnitt 3.4.5 beschrieben. Bei der Analyse der zusätzlichen gefundenen Peptide ist ein Zusammenhang mit dem aliphatischen Index zu beobachten, nicht jedoch mit dem GRAVY-Wert. Diese Versuche wurden jedoch nicht mit Membranproteinen gemacht, sondern mit löslichen Proteinen aus einem IEF/SDS Gel. Der positive Einfluss der Ionenpaarbindung wurde jetzt aber auch für Bakteriorhodopsin und Membranproteine aus Peroxisomen von Zischka *et al.* (2004, accepted) nachgewiesen.

#### 4.3.10 Die Problematik der TM-Helices und basische Membranproteine

Die Nicht-Identifizierbarkeit helikaler Membranbereiche stellt für alle Organismen ein Problem dar. Dennoch können Membranproteine über deren Henkel identifiziert werden. Das Verhältnis von Helices und löslichen Bereichen der integralen Membranproteine ist in Abschnitt 4.3.5 im Vergleich von *H. salinarum* und *E. coli* beschrieben. *H. salinarum* ist mit einem Anteil von 58% saurer Membranproteine eine Ausnahme, bei allen nicht-halophilen Organismen sind 90% der Membranproteine (mehr als 2 Helices) im basischen lokalisiert. Daraus kann geschlossen werden, dass die bei *H. salinarum* geringe Identifizierbarkeit der



basischen Membranproteine übertragbar ist auf eine allgemeine Problematik für (nahezu) alle mesophilen Membranproteine. Die folgenden statistischen Analysen vergleichen verschiedene Eigenschaften der integralen Membranproteine, um die geringe Identifizierbarkeit der basischen Membranproteine zu erklären.

Die durchschnittlichen Längen der Helices, Henkel und Termini zeigt bei *H. salinarum* folgende Verteilung (Tabelle 4.2):

**Tab. 4.2:** Anzahl und Längen von Helices, cytoplasmatischen (\_in) und periplasmatischen (\_out) Henkeln und Termini bei *H. salinarum*, berechnet nach TMHMM.

Gruppe	Σ	Helix		Inside		Outside		N-term_in		N-term_out		C-term_in		C-term_out	
		Länge	Σ	Länge	Σ	Länge	Σ	Länge	Σ	Länge	Σ	Länge	Σ	Länge	Σ
ALL	568	22	2784	22	1038	23	1178	29	357	39	211	31	351	136	217
ACID	392	22	1778	23	656	27	730	35	237	45	155	39	229	168	163
ALKA	176	22	1006	19	382	18	448	18	120	21	56	16	122	41	54
ACID_1	98	22	98	0	0	0	0	22	55	88	43	78	43	273	55
ACID_2	77	22	154	82	22	96	55	46	55	31	22	22	55	220	22
ACID_3	113	22	479	19	172	22	194	44	63	30	50	33	72	121	41
ACID_7	104	22	1047	22	462	20	481	29	64	26	40	32	59	56	45
ALKA_1	19	23	19	0	0	0	0	12	9	62	10	31	10	108	9
ALKA_2	21	22	42	7	5	9	16	18	16	15	5	15	16	8	5
ALKA_3	80	22	359	23	121	21	158	18	58	13	22	11	59	19	21
ALKA_7	56	22	586	17	256	17	274	18	37	9	19	20	37	42	19

(Anmerkung: Die Unterscheidung zwischen sauren (Acid) und alkalischen (Alka) Proteinen liegt bei pl 7,0. In der Gruppenspalte steht \_1 für 1 TMD, \_2 für 2 TMD, \_3 für 3-6 TMD und \_7 für 7 und mehr TMD, # steht für die Anzahl der Proteine (Spalte 2) bzw. Anzahl der analysierten Bereiche (weitere Spalten).

Diese Daten belegen:

- (1) Bei Proteinen mit 3 und mehr Helices sind die Längen der Henkel nahezu konstant. Sie sind unabhängig vom pI der Proteine und liegen zwischen 17 und 23 AS.
- (2) Wesentliche Unterschiede bestehen in den terminalen Bereichen, die bei alkalischen Proteinen kürzer sind als bei sauren Proteinen
- (3) Bei den alkalischen Membranproteinen sind die terminalen Bereiche kürzer als 21 AS (Ausnahme: 19 Alka\_7 Proteine mit einem außenliegenden C-Terminus von 42 AS. Dieser Wert stammt jedoch von 3 Proteinen mit einem C-Terminus von über 100 AS, 11 Proteine haben weniger als 10 AS im C-Terminus).

Bei den alkalischen Membranproteinen ( $\geq 1$  TMD) stellt sich die Frage nach ihrer Existenz, da als einziger direkter Nachweis nur das Fluorogramm des IPG-Streifens (Abb. 3.38) vorliegt. Aus dem 1-D Gel und LC/MS/MS Analyse konnten allerdings basische integrale Membranproteine identifiziert werden, wenn auch nur 13 an der Zahl.

Ein indirekter Nachweis auf die Existenz weiterer basischer Membranproteine kann jedoch über identifizierte periphere Membranproteine erbracht werden, welche mit den nicht gefundenen Proteinen einen funktionellen Komplex bilden sollten. Kriterien der

Komplexzuordnung sind hierbei Homologien zu Komplexen aus anderen Organismen und die Nachbarschaft der betreffenden Gene in einem gemeinsamen Operon. Die Klasse der ABC-Transporter ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, da diese in großer Zahl in *H. salinarum* vorkommen und allgemein aus drei Einheiten bestehen: (1) einem periplasmatischen Substrat-bindenden Protein, (2) einer Permease (5-6 TMD pro Permease Domäne) und (3) einem ATP-bindenden Protein.

Die Übersicht in Abbildung 3.55 zeigt 10 verschiedene ABC-Transportsysteme in *H. salinarum*, von denen jedoch 7 Permeasen nicht gefunden werden konnten.

Es wurde daher überprüft, ob nach tryptischer Spaltung der basischen integralen Membranproteine eine ausreichende Zahl Peptide im Massenfenster generiert werden.

Die folgende theoretische Analyse wurde auf der Basis folgender Annahmen gemacht:

(1) Es wurden die Längen der generierten Peptide im Bereich zwischen 5-14 Aminosäuren betrachtet, da dies den Ergebnissen der bisherigen LC/MS/MS Analysen entsprach (vgl. Tabelle 3.10). Längere Peptide können zwar theoretisch durch Mehrfachprotonierung identifiziert werden, jedoch werden diese bei komplexeren Gemischen durch Signale von geringerer Ladung unterdrückt. Ferner wird bei der Mascot-Recherche ein Algorithmus verwendet, der Ionen der y-, b-, z- und a-Serien gleichermaßen bewertet. Dies führt bei längeren Peptiden zu einer stärkeren Unterbewertung einer längeren y-Serie (wenn die entsprechenden Gegenionen nicht gefunden werden) im Vergleich zu kürzeren Peptiden und Serien.

(2) Es wurde ausschließlich der Henkelbereich analysiert, da (a) dieser Trypsin zugänglich ist (b) Wechselwirkungen der hydrophoben Helices mit dem Säulenmaterial ausgeschlossen sind und (c) die Peptide löslichen Charakter haben, d.h. nicht präzipitieren sollten.

Das Ergebnis ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

**Tab. 4.3:** Anzahl und Länge von tryptischen Peptiden der integralen Membranproteine im praktischem Messbereich (5-14 Aminosäuren, AS) von LC/MS/MS-Analysen.

Membranproteine	Anzahl der Proteine	Anzahl der Peptide		
		5-9 AS	10-14 AS	5-14 AS
<b>Alle Membranproteine</b>	<b>568</b>	2071	1061	3132
<b>Saure Membranproteine</b>	<b>392</b>	1485	827	2312 (73,8%)
<b>Alkalische Membranproteine</b>	<b>176</b>	586	234	820 (26,2%)

Aus dieser Statistik folgt, dass die alkalischen Membranproteine zwar aufgrund ihrer geringeren Häufigkeit eine geringere Anzahl an tryptischen Fragmenten bilden, jedoch dies nicht die geringe Identifizierungsrate in den LC/MS/MS-Experimenten erklären kann. Diese lag (bei 13 identifizierten basischen integrale Membranproteine von 114 insgesamt identifizierten TM-Proteinen) bei 11,4%.

Hieraus lässt sich schließen, dass alkalische Membranproteine in der Membranfraktion enthalten sind und ausreichend lösliche Peptide generiert werden, die identifizierbar sind.

Als einzige Verlustquelle bleibt somit lediglich ein Verlust der Membranproteine auf Proteinebene übrig, d.h. Verluste bei der Solubilisierung/Probenauftrag oder aber bei der Färbung.

Der Färbeschritt wurde daher durch Inkubation der Membranfraktion in den Lösungsmitteln der Silberfärbung überprüft. Präzipitierte Membranproteine wurden durch Zentrifugation von den Proteinen getrennt, die in den organischen Lösungsmitteln löslich sind, d.h. während der Färbung verloren gehen können. Die erhaltenen Fraktionen wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine über die Zn/Im-Färbung visualisiert (bei dieser Färbung werden keine organischen Lösungsmittel verwendet). Nach Inkubation in 50% Ethanol (zweiter Schritt der Silberfärbung) sind deutlich Proteine im Überstand zu erkennen.

In diesem Schritt sollten jedoch vor allem hydrophobe Proteine aus dem Gel herausgewaschen werden. Die in Tabelle 4.4 dargestellte Verteilung der Membranproteine bezüglich ihres pI und GRAVY-Index erlauben die Vermutung, dass die alkalischen Membranproteine hydrophober sind als die sauren Proteine.

**Tab. 4.4:** GRAVY der Membranproteine in Abhängigkeit von pI und Anzahl der TMD, hydrophobe Proteine haben einen GRAVY > 0.

Gruppe	Gesamtanzahl	hydrophob		hydrophil	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<b>ALL</b>	568	458	80,6%	110	19,4%
<b>ACID</b>	392	288	73,5%	104	26,5%
<b>ALKA</b>	176	170	96,6%	6	3,4%
<b>ACID_1</b>	98	31	31,6%	67	68,4%
<b>ACID_2</b>	77	53	68,8%	24	31,2%
<b>ACID_3</b>	113	100	88,5%	13	11,5%
<b>ACID_7</b>	104	104	100,0%	0	0,0%
<b>ALKA_1</b>	19	14	73,7%	5	26,3%
<b>ALKA_2</b>	21	20	95,2%	1	4,8%
<b>ALKA_3</b>	80	80	100%	0	0,0%
<b>ALKA_7</b>	56	56	100%	0	0,0%

Die genaue Aufschlüsselung nach pI und TMD bestätigt diese Vermutung, bereits ab 3 TMD haben 100% der basischen Membranproteine einen positiven GRAVY-Index. Dieser Wert wird bei den sauren Membranproteinen nur bei 7 und mehr Helices erreicht. In einem TMD-unabhängigen Vergleich sind 96,6% der alkalischen Proteine hydrophob, wohingegen lediglich 73,5% der sauren Proteine einen GRAVY-Wert von größer 0 besitzen.

Der Verlust an hydrophoben Proteinen bei etablierten Färbungen betrifft vor allem Membranproteine, da diese, von wenigen Ausnahmen abgesehen, als einzige Proteinklasse einen positiven GRAVY besitzen. Die als Anpassung an die hohen Salzkonzentrationen zu verstehende Verlängerung der terminalen Bereiche bedingt somit eine Verringerung des GRAVY's, was zu einem geringeren Verlust der sauren Membranproteine führt. Aus Abbildung 3.57 geht jedoch auch hervor, dass die Verluste nicht quantitativ erfolgen, die

Zn/Im-gefärbten Spuren von „fixierten“ Proteinen (Spur 4) und Proteinen im 50% EtOH-Schritt (Spur 5) sind ähnlich. Bezüglich des GRAVY's unterscheiden sich die gefundenen von nicht-gefundenen Permeasen kaum. Eine weitergehende Untersuchung dieses möglichen Verlustschrittes wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen, jedoch können unter Umständen diese Verluste auch bei anderen Inkubationsschritten mit organischen Lösungsmitteln auftreten, wie beispielsweise bei der Äquilibration von Gelstücken vor tryptischer Spaltung (in 50% Acetonitril) oder Waschschritten nach einer TCA-Fällung (in 70% Ethanol).

Zusammenfassend unterscheiden sich basische von sauren Membranproteinen durch wesentlich kürzere Termini und daraus resultierende geringere Anzahl von Peptidfragmenten (5-14 Aminosäuren) nach tryptischer Spaltung und einer stärkeren Hydrophobizität der Proteine.

Weiterhin zeigt sich aus anderen Arbeiten, dass speziell bei Membranproteinen Strategien, die ohne Gelelektrophorese auskommen, verfolgt werden.

##### 4.3.11 Perspektiven der Membranproteomanalyse

Gel-basierte Methoden der Membranproteinauftrennung sind mit Verlusten bei der Probenaufarbeitung (Solubilisierung), der Probenaufreinigung (Präzipitationen am pI), dem Transferschritt von einer Dimension in die nächste, und auch der Visualisierung verbunden. Weiterhin müssen die Peptide unter Verlusten aus dem Gel eluiert werden, um einer Hochdurchsatz-Methode zugänglich sein.

Die Grenzen des IEF/SDS-Systems sind in dieser Arbeit aufgezeigt, eine Gel-basierte Strategie aus BAC/SDS-Auftrennung mit anschließender MALDI-TOF/TOF Analyse vorgestellt worden. Eine SDS-PAGE mit anschließender LC/MS/MS-Auftrennung führte in dieser Arbeit zu den meisten identifizierten integralen Membranproteinen, wobei diese Methodik Gel- und Chromatographie- Methoden vereinigt.

Viele der diskutierten Probleme können durch Gel-freie Systeme umgangen werden, bei denen als zusätzlicher Vorteil keine Limitationen durch den Probenauftrag berichtet sind:

(1) LC/MS/MS Analyse einer Membranfraktion nach tryptischer und BrCN-Spaltung (Washburn *et al.*, 2001). Bei dieser Methode wurde eine Hefe-Membranfraktion mit Bromcyan gespalten und nach Neutralisation die Peptide tryptisch in kleinere Fragmente zerlegt. Diese wurden mit Ionenaustauscher-Chromatographie und RP-HPLC getrennt und in der nachfolgenden LC/MS/MS-Analyse 1484 Proteine identifiziert, 131 davon mit einer vorhergesagten TM-Domäne.

(2) ICAT-Markierung mit tryptischer Spaltung, Chromatographie und LC/MS/MS-Analyse (Han *et al.*, 2002). Bei dieser Methode werden zwei Proben nach SDS-Solubilisierung mit unterschiedlichen Isotopenmarkierung (d0 und d8 an den Cysteinen) tryptisch gespalten und an einem Kationenaustauscher und einer Avidin-Affinitätsäule getrennt. Die zurückgebliebenen (biotinylierten und markierten) Peptide werden anschließend über eine RP-Kapillar-HPLC getrennt und online mittels ESI-MS/MS analysiert.

Bei einer Mikrosomen-Präparation konnten so 491 Proteine identifiziert werden, 11,2% davon waren Oberflächen-Antigene, Rezeptoren und Membranproteine.

(3) Solubilisierung in organischen Lösungsmitteln, tryptische Spaltung und LC/MS/MS (Blonder *et al.*, 2002). Eine Membranfraktion von *Deinococcus radiodurans* wurde mit French-Press, Zentrifugation und Carbonat-Extraktion bereitet, bei 90°C denaturiert und zu 60% mit Methanol versetzt. In dieser Lösung wurde dann die Proteine tryptisch gespalten, die Peptide über eine RP-Kapillar-HPLC getrennt und online mittels ESI-MS/MS analysiert. 215 integrale Membranproteine konnten so identifiziert werden.

(4) Proteinase K Spaltung mit LC/MS/MS (Wu und Yates, 2003).

Die unspezifische Proteinase K spaltet exponierte cytosolische Bereiche von Membranproteinen. Zurückbleibende helikale Bereiche können anschließend mittels LC/MS/MS analysiert werden. Bei einer Rattenhirn-Probe konnten so 1610 Proteine identifiziert werden, 28,2% davon mit TM-Domänen (Wu *et al.*, 2003).

Gemeinsame Eigenschaft aller hier dargestellten Methoden ist eine weitere Auftrennung auf Peptidebene. Kombinationen dieser Methoden mit klassischen Trennungen (Phasenextraktion mit Tx-114, Dichtegradient, unterschiedliche Solubilisierungsbedingungen) können so verbesserte Strategien für die Proteomanalyse der Membranproteine darstellen.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Proteome von *H. salinarum* untersucht, die nach zellulären Kompartimenten unterschieden wurden in (1) das Flagellarmotor-Proteom (2) das Cytosolproteom und (3) das Membranproteom.

Die Untersuchung des Flagellarmotors erfolgte hauptsächlich auf struktureller Basis mittels Elektronenmikroskopie. Es konnte eine Struktur mit zwei übereinanderliegenden Ringen isoliert werden, die beide an eine Flagelle gebunden sind. Aus weiteren Aufnahmen und Größenkorrelationen wurde ein Modell zum Flagellarmotor entworfen, welches eine Rotation beider Ringe beinhaltet. An diese Doppelringstruktur sind mehrere Flagellen über einen Hook gebunden, was dieses Modell damit vom bakteriellen Flagellarmotor unterscheidet.

Bei der Untersuchung des Cytosolproteoms konnten insgesamt 840 Proteine mittels MALDI-MS-Fingerprint identifiziert werden, was einer Identifizierungsrate von 38% des löslichen Proteoms entspricht (Identifizierungsrate aller löslichen Proteine größer 20 kD: 61%).

Es wurde eine massenkompatible Silberfärbung optimiert und ein semi-manuelles Verfahren zur in-Gel Spaltung entwickelt, mit dem 800 Proteine/Tag enzymatisch gespalten werden können. Für die anschließende Identifizierung wurde ein Standardprotokoll für die Proben- und Matrixpräparation entwickelt, welches sich im Vergleich zu anderen automatischen Präparationen als zuverlässiger und sensitiver gezeigt hat.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde von der Bioinformatikgruppe (Dr. F. Pfeiffer) das webbasierte HALOLEX-System entwickelt, welches als Ziel die vollständige Erfassung aller Fakten zu *H. salinarum* hat. Die generierten Daten (Gele, Proteinidentifizierungen, MALDI-Peaks, MS/MS-Peaks) werden innerhalb dieser Oberfläche zugänglich gemacht und erlauben detaillierte Nachanalysen.

Für das Membranproteom wurde gezeigt, dass der etablierte Zellaufschluss mittels Niedrigsalz-Dialyse zu einer erheblichen Kontamination mit löslichen Proteinen führt. Ein Aufschluss unter Hochsalzbedingungen mit anschließender Dichtegradienten-Zentrifugation reinigt die Membran, jedoch dissoziiert die Zellmembran bei anschließender Niedrigsalz-Behandlung in hohem Maße in nicht pelletierbare Fragmente. Eine optimierte Membranaufarbeitung unter ständigen Hochsalzbedingungen, Dichtegradienten-Zentrifugation, Delipidierung und Solubilisierung in einer Detergenzienmischung (Triton X-100/ASB-14) führte bei anschließender zweidimensionaler Trennung (IEF/SDS) zur Identifizierung von fast ausschließlich peripheren Membranproteinen. Mit einer fluoreszenzmarkierten Membranfraktion konnte gezeigt werden, dass der Verlust von

integralen Membranproteinen auf einer nahezu quantitativen Präzipitation der Membranproteine an deren pI beruht.

Eine pI-unabhängige Strategie wurde mittels BAC/SDS etabliert, die speziell bei *H. salinarum* zu einer guten Proteinauftrennung führt. Die Identifizierung eines 13 TM-Antiporters (0,22 TM/kD, GRAVY +0,74) als dominantestes Protein dieser Membranfraktion zeigt die Anwendbarkeit dieses Systems. In einem Vergleich von Membranfraktionen aus aerob und phototroph gewachsenen Kulturen konnten so Unterschiede des Expressionsniveaus von Membranproteinen nachgewiesen werden.

Aus theoretischen Berechnungen der vorhergesagten Membranproteine zeigte sich weiterhin, dass bei tryptischer Spaltung nicht ausreichend Peptid-Fragmente generiert werden, um mittels MALDI-Fingerprint-Analyse identifiziert zu werden. Diese (*H. salinarum* spezifische) Problematik kann mittels MS/MS umgangen werden. Bei der Kombination aus 1-D Gel und LC/MS/MS konnten schließlich 114 integrale Membranproteine identifiziert werden, was 20% des integralen Membranproteoms entspricht.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aitken, D. M., Brwon, A. D. (1969) Citrate and glyoxylate cycles in the halophil, *Halobacterium salinarium*. *Biochem. Biophys. Acta*, **177**, 351-354
- Alam, M., Oesterhelt, D. (1984) Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J. Mol. Biol.*, **176**, 459-475
- Alam, M., Claviez, M., Oesterhelt, D., Kessel, M. (1984) Flagella and Motility Behavior of Square Bacteria. *EMBO*, **3**, 2899-2903
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994) Molekularbiologie der Zelle, VCH Verlagsgesellschaft(ed. L. Jaenicke), S. 100
- Allen, R.C., Harley R.A., Talamo, R.C. (1974) A new method for determination of alpha-1-antitrypsin phenotypes using isoelectric focusing on polyacrylamide gel slabs. *Am. J. Clin. Path.*, **62**, 732-739
- Baley, D. P., Kalmokoff, M. L., Jarrell, K. F. (1993) Effect of bacitracin on flagellar assembly and presumed glycosilation of the flagellins in *Methanococcus deltae*. *Arch. Microbiol.*, **160**, 179-185
- Baliga, N. S., Goo, Y. A., Ng, W. V., Hood., L., Daniels, C. J., DasSarma, S. (2000) Is gene expression in Halobacterium NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? *Mol. Microbiol.*, **36**, 1184-1185
- Bamberg, E., Hegemann, P., Oesterhelt, D. (1984) Reconstitution of the light-driven electrogenic ion pump halorhodopsin in black lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 53-60
- Bardy, S.L., Mori, T., Komoriya, K., Aizawa, S.I., Jarrell, K.F. (2002) Identification and Localization of Flagellins FlaA And FlaB3 within Flagella of Methanococcus Voltae. *J. Bacteriol.*, **184** (19), 5223-5233
- Barnidge, D.R., Dratz, E.A., Jesaitis, A.J., Sunner, J. (1999) Extraction Method for Analysis of detergent-solubilized Bacteriorhodopsin and hydrophobic Peptides by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.*, **269**, 1-9
- Basinger, G.W., Oliver, J.D. (1979) Inhibition of Halobacterium-Cutirubrum Lipid Biosynthesis by Bacitracin. *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 423-427
- Bhaumik S.R., Sonawat, H.M. (1994).Pyruvate metabolism in Halobacterium salinarium studied by intracellular <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Bacteriol.*, **176**, 2172-2176
- Bini, L., SanchezCampillo, M., Santucci, A., Magi, B., Marzocchi, B., Comanducci, M., Christiansen, G., Birkelund, S., Cevenini, R., Vretou, E., Ratti, G., Pallini, V. (1996) Mapping of Chlamydia trachomatis proteins by immobiline-polyacrylamide two-dimensional electrophoresis: Spot identification by N-terminal sequencing and immunoblotting. *Electrophoresis*, **17** (1), 185-190
- Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D. (1993) A nonlinear wide range Immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis*, **14**, 1357-1365
- Blanck, A., Oesterhelt, D. (1987) The halo opsin gene. 2. Sequence, primary structure of halorhodopsin and comparison with bacteriorhodopsin. *EMBO J.*, **6**, 265-273
- Blanck, A., Oesterhelt, D., Ferrando, E., Schegk, E.S., Lottspeich, F. (1989) Primary structure of sensory rhodopsin I, a procaryotic photoreceptor. *EMBO J.*, **8** 3963-3971
- Blattner, F.R., Plunkett III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Viles, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Wayne Davis, N., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Nature*, **277**, 1453-1462
- Blaurock, A.E., Stoeckenius, W. (1971) Structure of the purple membrane. *Nature*, **233**, 152-155



- Blonder, J., Goshe, M. B., Moore, R. J., Pasa-Tolic, L., Masselon, C. D., Lipton, M. S., Smith, R. D. (2002) Enrichment of Integral Membrane Proteins for Proteomic Analysis Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.*, **1**, 351-360
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99
- Bogomolni, R.A., Stoeckenius, W., Szundi, I., Perozo, E., Olson, K.D., Spudich, J.L. (1994) Removal of transducer HtrI allows electrogenic proton translocation by sensory rhodopsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10188-10192
- Bonnete, F., Ebel, C., Zaccai, G., Eisenberg, H. (1993) Biophysical Study of halophilic Malate-Dehydrogenase in Solution - Revised Subunit Structure and Solvent Interactions of native and recombinant Enzyme. *J. Chem. Soc. Faraday. T.*, **89** (15), 2659-2666
- Bonnete, F., Madern, D., Zaccai, G. (1994) Stability against Denaturation Mechanisms in halophilic Malate-Dehydrogenase adapt to Solvent Conditions. *J. Mol. Biol.*, **244** (4), 436-447
- Bordier, C. (1981) Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution. *J. Biol. Chem.*, **256** (4), 1604-1607
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- Bren, A., Eisenbach, M. (1998) The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. *J. Mol. Biol.*, **284**, 1191-1199
- Brooun, A., Bell, J., Freitas, T., Larsen, R. W., Alam, M. (1998) An archaeal aerotaxis transducer combines subunit I core structures of eukaryotic cytochrome c oxidase and eubacterial methyl-accepting chemotaxis proteins. *J. Bacteriol.*, **180**, 1642-1646.
- Bruggemann, H., Falinski, F., Deppenmeier, U. (2000) Structure of the F420H2 : quinone oxidoreductase of *Archaeoglobus fulgidus* - Identification and overproduction of the F420H2-oxidizing subunit. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5810-5814.
- Brown, A.D. (1963) The peripheral structures of gram-negative bacteria IV. The cation-sensitive dissolution of the cell membrane of the halophilic bacterium, *Halobacterium Halobium*. *Biochim. Biophys. Acta*, **75**, 425-435
- Büttner, K., Berhardt, J., Scharf, C., Schmidt, R., Mäder, U., Eymann, C., Antelmann, H., Völker, A., Völker, U., Hecker, M. (2001) A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis*, **22**, 2908-2935
- Celis J. E., Rasmussen, H. H, Olsen, E., Madsen, P., Leffers, H., Honore, B., Dejgaard, K., Gromov, P., Vorum, H., Vassilev, A., Baskin, Y., Liu, X. D., Celis, A., Basse, B., Lauridsen, J. B., Ratz, G. P., Andersen, A. H., Walbum, E., Kjaergaard, I., Andersen, I., Puype, M., Vandamme, J., Vandekerckhove, J. (1994) The Human Keratinocyte 2-Dimensional Protein Database (Update –1994) – Towards an integrated Approach to the Study of Cell-Proliferation, Differentiation and Skin-Diseases. *Electrophoresis*, **15** (11), 1349-1458
- Chan, L.L., Lo, S.C.L, Hodgkiss, I.J. (2002) Proteomic study of a model causative agent of harmful red tide, *Prorocentrum triestinum* I: Optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, **2**, 1169-1186
- Chapman, D.L. (1913) *Phil. Mag.*, **25**, 475
- Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquie, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J., Rabilloud, T. (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, **19**, 1901-1909

## 6. Literaturverzeichnis

- Cohen-Krausz, S., Trachtenberg, S. (2002) The Structure of the Archaeobacterial Flagellar Filament of the extrem halophile *Halobacterium salinarum* R1M1 and its relation to eubacterial flagellar Filaments and Type IV Pili. *J. Mol. Biol.*, **321**, 383-395
- Cruden, D., Sparling, R., Markovetz, A., J. (1989) Isolation and ultrastructure of *Methanococcus thermolithotrophicus* and *Methanospirillum hungatei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1414-1419
- Danson, M.J. (1993) *Central metabolism of the archaea*. in: *The Biochemistry of Archaea*. Elsevier (eds. Kates, M., Kusher, D.J., Matheson, A.T.) S.12-13
- Dennis, P.P., Shimmin, L.C. (1997) Evolutionary Divergence and salinity-mediated Selection in Halophilic Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 90-104
- Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., Jones, K.M. (1969) Data for Biochemical Research (2<sup>nd</sup> ed.), Oxford University Press, S. 1-63
- DeRosier, D.J. (1998) The Turn of the Screw: The bacterial flagellar motor. *Cell*, **93**, 17-20
- Diezel, W., Kopperschlager, G., Hofmann, E. (1972) An improved procedure for protein staining in polyacrylamid gels with a new type of Coomassie brilliant Blue. *Anal. Biochem.*, **48**, 617-620
- Dossi, G., Celentano, F., Gianazza, E., Righetti, P.G. (1983) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Generation of extended pH intervals. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **7**, 123-142
- Dundas, I.E.D (1977) Physiology of Halobacteriaceae. *Adv. Microb. Physiol.*, **15**, 85-120
- Dunker, A.K., Rueckert, R.R. (1969) Observations on molecular weight determination on polyacrylamide gel. *J. Biol. Chem.*, **244**, 5074-5080
- Duschl, A., Lanyi, J.K., Zimanyi, L. (1990) Properties and photochemistry of a halorhodopsin from the haloalkalophile, *Natronobacterium pharaonis*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 1261-1267
- Dym, O., Mevarech, M., Sussmann, J.L. (1995) Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from archaeobacterium. *Science*, **267**, 1344-1346
- Eckerskorn, C. (1998) Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag (eds. F. Lottspeich/H. Zorbas), S. 342-368
- Eley, M.H., Burns, P.C., Kannapell, C.C., Campbell, P.S. (1978) Cetyltrimethylammonium Bromide Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Estimation of Protein Subunit molecular Weights Using Cationic Detergents. *Anal. Biochem.*, **92**, 411-419
- Englard, S., Seifter S. (1990) Precipitation Techniques. *Method. Enzymol.*, **182**, 285-300
- Essen, L.-O., Siegert, R., Lehmann, W., D., Oesterhelt, D. (1998) Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *PNAS*, **95**, 11673-11678
- Faguy, D.M., Jarrell, K.F., Kuzio, J., Kalmokoff, M.L. (1994) Molecular analysis of archaeal flagellins - similarity to the type-IV pilin - transport superfamily widespread in bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **40**, 67-71
- Fawcett, J.S., Vicchio, D., Chrambach, A. (1988) The adsorption of large proteins in electrofocussing on immobilized pH gradients II. Dependence on the oligomeric state of Immobiline. *Electrophoresis*, **9**, 469-474
- Fazekas, deSt., Groth, S., Webster, R.G., Datyner, A. (1963) Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 377-391
- Ferrando-May, E., Krahl, M., Marwan, W., Oesterhelt, D. (1993) The methyl-accepting transducer protein HtrI is functionally associated with the photoreceptor sensory rhodopsin I in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *EMBO J.*, **12**, 2999-3005

- Ferreras, M., Gavilanes, J., G., Garcia-Segura, J., M. (1993) A permanent Zn<sup>2+</sup> Reverse Staining Method for the Detection and Quantification of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.*, **213**, 206-212
- Fischer, L. (1998) Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag (ed. F. Lottspeich/H. Zorbas), S. 37-45
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., Lazarow, P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of Sodium Carbonate Treatment: Application to Endoplasmatic Reticulum. *J. Cell Biol.*, **93**, 97-102
- Gasparic, V., Bjellquist, B., Rosengren, A. (1975) Swedish Patent No. 14049-1
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C., R., Meagher, D., A., Imai, B., S., Mische, S., M. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, **20**, 601-605
- Gianazza, E., Caccia, P., Quaglia, L., Righetti, P.G., Rimpiläinen, M.A., Forsen, R.J. (1986) Two-dimensional analysis of membrane proteins with isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis*, **7**, 537-543
- Gianazza, E., Chillemi, F., Duranti, M., Righetti, P.G. (1983) Analytical and preparative isoelectric focusing of peptides in immobilized pH gradients. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **8**, 339-351
- Giddings, J.C., Dahlgren, H. (1971) *Separation Sci*, **6**, 345
- Gobom, J., Eickhoff, H., Horn, M., Przewieslik, T., Luebbert, C., Lehrach, H., Nordhoff, E. (2000) Technology for sensitive, high through-put protein identification from 2-D-Gels; Poster WPH 297, 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Long Beach, CA, 2000
- Gobom, J., Schuerenberg, M., Mueller, M., Theiss, D., Lehrach, H., Nordhoff, E. (2001) a-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Affinity Sample Preparation. A Protocol for MALDI-MS Peptide Analysis in Proteomics. *Anal. Chem.*, **73**, 434-438
- Görg, A. (1997) Hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Dalt). Kursmanual. H. Lassnig Druck, München, 1997, S. 5
- Görg, A., Postel, W., Günther, S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **9**, 531-546
- Görg, A., Postel, W., Günther, S., Weser, J., Strahler, J.R., Hanash, S.M., Somerlot, L., Kuick, R. (1988) Approach to stationary two-dimensional pattern: Influence of focusing time and Immobiline-carrier ampholytes concentration. *Electrophoresis*, **9**, 37-46
- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Günther, S., Strahler, J.R., Hanash, S.M., Somerlot, L. (1987) Elimination of point steaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamid to the equilibration buffer. *Electrophoresis*, **8**, 122-124
- Gouy, M.G. (1910) *J. Phys.*, **9**, 457
- Grant, W.D., Larsen, H. (1989) Extremely halophilic archaeobacteria. Order Halobacteriales red. nov. In Bergey's manual of systematic bacteriology (ed. N. Pfennig), Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 2216-2233
- Grigorieff, N., Ceska, T.A., Downing, K.H., Baldwin, J.M., Henderson, R. (1996) Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.*, **259**, 393-421
- Gross, E., Witkop, B. (1961) Selective Cleavage of Methionyl Peptide Bonds in Ribonuclease with Cyanogen Bromide. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1510-1511
- Gültekin, H., Heermann, K.H. (1988) The use of polyvinylidendifluorid membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.*, **172**, 320-329

## 6. Literaturverzeichnis

- Hames, B.D. (1990) Gel Electrophoresis of Proteins-A practical Approach. Oxford University Press, 2<sup>nd</sup> Edition, S 10-11
- Han, D.K., Eng, J., Zhou, H., Aebersold, R. (2002) Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 946-951
- Hartinger, J., Stenius, K., Högemann, D., Jahn, R. (1996) 16-BAC/SDS-PAGE: A Two-Dimensional Gel Electrophoresis System suitable for the Separation of Integral Membrane Proteins. *Anal. Biochem.*, **240**, 126-133
- Hartmann, R., Oesterhelt, D. (1977) Bacteriorhodopsin-mediated photophosphorylation in Halobacterium Halobium. *Eur. J. Biochem.*, **77**, 325-335
- Hartmann, R., Sickinger, H.D., Oesterhelt, D. (1977) Quantitative Aspects of Energy Conversion in Halobacteria. *FEBS Letters*, **82**, 1-6
- Hartmann, R., Sickinger, H.D., Oesterhelt, D. (1980) Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl. Sci. USA*, **77**, **6**, 3821-3825
- Haupts, U., Bamberg, E., Oesterhelt, D. (1996) Different modes of proton translocation by sensory rhodopsin I. *EMBO J.*, **15**, 1834-1841
- Hayashi, S., Wu, H. C. (1990) Lipoproteins in Bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 451-471
- Hecht, K., Wieland, F., Jaenicke, J. (1986) The Cell surface Glycoprotein of *Halobacterium halobium*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **367**, 33-38
- Helmholtz, H.L. (1879) Studien über elektrische Grenzschichten. *Wiedemann's Ann Phys Chem*, **7**, 337-382
- Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., Downing, K.H. (1990) Model for the Structure of Bacteriorhodopsin Based on High-Resolution Electron-Cryo-Microscopy. *J. Mol. Biol.*, **213**, 899-929
- Henderson, L.E., Oroszlan, S., Konigsberg, W. (1979) A Micromethode for complete removal of Deodecyl Sulfate from Proteins by Ion-Pair Extraction. *Anal. Biochem.*, **93**, 153-157
- Henry, D.C. (1931) The Cataphoresis of Suspended Particles. Part I. The Equation of Cataphoresis. *Proc. Roy. Soc., A* **133**, 106-129
- Henry, D.C. (1948) *Trans. Faraday Soc.*, **44**, 1021
- Herbert, B., R., Molloy, M., P., Gooley, A., A., Walsh, B., J., Bryson, W., G., Williams, K., L. (1998) Improved Proteins Solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis*, **19**, 845-851
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, **6**, 103-112
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1989) Electrophoresis Forum '89, Radola B.J. (Hrsg.) TU München, München, S.283
- Hou, S., B., Larsen, R., W., Boudko, D., Riley, C., W., Karatan, E., Zimmer, M., Ordal, G., W., Alam, M. (2000) Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria. *Nature*, **403** (6769), 540-544
- Hückel, E. (1924) Die Kataphorese der Kugle. *Phys. Z.*, **25**, 204-210
- Hufnagel, P., Schweiger, U., Eckerskorn, C., Oesterhelt, D. (1996) Electrospray Ionization Mass Spectrometry of genetically and chemically modified Bacteriorhodopsin. *Anal. Biochem.*, **243**, 46-54
- Hughes, K.T., Aldridge, P.D. (2001) Putting a lid on it. *Nature Struct. Biol.*, **8** (2), 96-97

- Ikeda, K., Suzuki, S. (1912) US Patent 1, 015891
- Jako, J., Hitzig, W.H. (1974) Chemical Biochemistry, Principle and Methods, Curtius H.C., Roth M. (Hrsg.), Walter de Gruyter, Berlin-New York, Bd. 1, S. 105
- Jarrell, K.F., Bayley, D.P., Kostyukova, A.S. (1996) The archaeal flagellum: a unique motility structure. *J. Bacteriol.*, **178**, 5057-5064
- Jarrell, K.F., Koval, S.F. (1989) Ultrastructure and biochemistry of *Methanococcus voltae*. *Crit. Rev. Microbiol.*, **17**, 53-87
- Jensen, O., N., Mortensen, P., Vorm, O., Mann, M. (1997) Automation of Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using fuzzy logic feedback control. *Anal. Chem.*, **69**, 1706 – 1714
- Jonas, R., Koutalos, Y., Ebrey, T.G. (1990) Purple membrane: Surface Charge density and the multiple effect of pH and Cations. *Photochem. Photobiol.*, **52**, 1163-1177
- Kalmokoff, M.L., Karnauhov, T.M., Jarrell, K.F. (1990) Conserved N-terminal sequences in the flagellins of archaeobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**, 154-160
- Kamekura, M. (1998) Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles*, **2**, 289-295
- Kalmakoff, M.L., Jarrell, K.F., Koval, S.F. (1988) Isolation of Flagella from the Archaeobacterium *Methanococcus voltae* by Phase Separation with Triton X-114. *J. Bacteriol.*, **170**, 1752-1758
- Kalmokoff, M.L., Koval, S.F., Jarrell, K.F. (1992) Relatedness of the flagellins from methanogens. *Arch. Microbiol.*, **157**, 481-487
- Kandler, O., König, H. (1993) The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria), Elsevier Science Publishers B.V., S. 24
- Kates, M. (1978) The phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic archaea. *Prog. Chem. Fats Other Lipids*, **15**, 301-342
- Kates, M. (1992) Archaeobacterial lipids: Structure, biosynthesis and function. *Biochem. Soc. Symp.*, **58**, 51-72
- Kempf, B., Bremer, E (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.*, **170**, 319-330
- Kessel, M., Wildhaber, I., Cohen, S., Baumeister, W. (1988) Three-dimensional structure of the regular surface glycoprotein layer of *Halobacterium volcanii* from the Dead Sea. *EMBO*, **7** (5), 1549-1554
- Klose, J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focussing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, **26**, 231-243
- Klose, J., Kobalz, U. (1995) Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, **16**, 1034-1059
- König, H. (1988) Archaeobacterial cell envelopes. *Can. J. Microbiol.*, **34**, 395-406
- Kokoeva, M., V., Oesterhelt, D. (2000) BasT, a membrane-bound transducer protein for amino acid detection in *Halobacterium salinarum*. *Mol. Microbiol.*, **35** (3), 647-656
- Kokoeva, M., V., Storch, K., F., Klein, C., Oesterhelt, D. (2002) A novel mode of sensory transduction in archaea: binding protein-mediated chemotaxis towards osmoprotectants and amino acids. *EMBO J.*, **21** (10), 2312-2322
- Kolbe M., Besir H., Essen, L., O., Oesterhelt D. (2000) Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 angstrom resolution. *Science*, **288** (5470), 1390-1396

## 6. Literaturverzeichnis

- Kolin, A. (1954) Separation and Concentration of Proteins in a pH Field combines with an electric field. *J. Chem. Phys.*, **22**, 1628-1629
- Kolin, A. (1958) Rapid Electrophoresis in density gradients combined with pH and/or conductivity gradients. *Meth. Biochem. Anal.*, **6**, 259-288
- Koval, S., F., Jarrell, K., F., (1987) Ultrastructure and Biochemistry of the cell wall of *Methanococcus voltae*. *J. Bacteriol.*, **169**, 1298-1306
- Kraft, P., Mills, J., Dratz, E. (2001) Mass spectrometric analysis of cyanogen bromid fragments of integral membrane proteins at the picomol level: Application to Rhodopsin. *Anal. Biochem.*, **292**, 76-86
- Krebs, M.P., Khorana, H.G. (1993) Mechanism of light-dependent proton translocation by bacteriorhodopsin. *J. Bacteriol.*, **175**, 1555-1560
- Krebs, M.P., Li, W., Halambeck, T.P. (1997) Intramembrane Substitutions in helix D of bacteriorhodopsin disrupt the purple membrane. *J. Mol. Biol.*, **267**, 172-183
- Kuntz, I. D.(1971) Hydration of macromolecules. III. Hydration of Polypeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 514-5516
- Kupper, J., Marwan, W., Typke, D., Grünberg, H., Uwer, U., Gluch, M., Oesterhelt, D. (1994) The Flagellar Bundle of Halobacterium salinarium is inserted into a Distinct Polar Cup Structure. *J. Bacteriol.*, **176**, 5184-5187
- Kushner, D.J. (1988) What is the „true“ internal environment of halophilic and other bacteria? *Canad. J. Microbiol.*, **34**, 482-486
- Kushner, D.J., Kamekura, M. (1988) Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodriguez-Valdera F (ed) Halophilic Bacteria, vol 1. CRC Press, Boca Raton, pp109-140
- Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**,105-132
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the Bacteriophage T4. *Nature* , **227**, 680-685
- Langworthy, T.A. (1977) Long-Chain Diglycerol Tetraethers from Thermoplasma Acidophilum. *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 37-50
- Langworthy, T.A., Pond, J.L. (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *System. Appl. Microbiol.*, **7**, 253-257
- Lanyi, J.K. (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **38**, 272-290
- Lanyi, J.K. (1993) Pathways of proton transfer in the light-driven pump bacteriorhodopsin. *Experientia*, **49**, 514-517
- Lanyi, J.K., MacDonald, R.E. (1976) Existence of electrogenic hydrogen ion/sodium ion antiport in Halobacterium halobium cell envelope vesicles. *Biochemistry*, **15**, 4608-4614
- Lanzotti, V., Nicolaus, B., Trincone, A., DeRosa, M., Grant, W.D., Gambacorta, A (1989) An isoprenoid ether analogue of phosphatidic acid from a halophilic archaeobacterium. *Biochim. Biophys. Acta*, **1002**, 398-400
- Larsen, S.H., Adler, J., Gargus, J.J., Hogg, R.W (1974) Chemomechanical Coupling without ATP: The Source of Energy for Motility and Chemotaxis in Bacteria. *PNAS*, **71** (4), 1239-1243.
- Lechner, J., Sumper, M.(1987) The primary structure of a prokaryotic glycoprotein. Cloning and sequencing of the cell surface glycoprotein gene of halobacteria. *J. Biol. Chem.*, **262**, 9724-9729

- Lemke, H.D., Oesterhelt, D. (1981) Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in bacteriorhodopsin. *FEBS Letters*, **128**, 255-260
- Li, K.W., Geraerts, W.P.M., van Elk, R., Joosse, J. (1989) Quantification of proteins in the subnanogram and nanogram range: comparison of the aurodye, ferridye and india ink staining methode. *Anal. Biochem.*, **182**, 44-47
- Link, A.J., Robinson, K., Church, G.M. (1997) Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genom of Escherichia coli K-12. *Electrophoresis*, **18**, 1259-1313
- Lopez, M.F., Berggren, K., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Robinson, M., 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** (17), 3673-3683
- Lottspeich, F. (1998) Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag (eds. F. Lottspeich/H. Zorbas), S. 21
- Lowe, G., Meister, M., Berg, H.C. (1987) Rapid rotation of flagellar bundles in swimming Bacteria. *Nature*, **325**, 637-640
- MacDonald, R.E., Greene, R.V., Lanyi, J.K. (1977) Light-activated amino acid transport systems in H. halobium envelope vesicles: role of chemical and electrical gradients. *Biochemistry*, **16**, 3227-3235
- Macfarlane, D.E. (1983) Use of Benzyltrimethyl-n-Hexadecylammonium Chloride („Bac“), a cationic detergent, in an Acidic Polyacrylamide Gel Electrophoresis System to detect Base labile Protein Methylation in Intact Cells. *Anal. Biochem.*, **132**, 231-235
- 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**, 457-463
- Madern, D., Pfister, C., Zaccari, G. (1995) Mutation at a single acidic Amino-Acid enhances the halophilic Behavior of Malate-Dehydrogenase from Haloarcula-Marismortui in physiological Salts. *Eur J. Biochem.*, **230** (3), 1088-1095
- Mahoney, W.C., Hermodson, M.A. (1979) High-yield cleavage of Tryptophanyl Peptide Bonds by o-Iodosobenzoic acid. *Biochemistry*, **18**, 3810-3814
- Mahoney, W.C., Smith, P.K., Hermodson, M.A. (1981) Fragmentation of Proteins with ortho-Iodosobenzoic acid - Chemical Mechanism and Identification of ortho-Iodoxybenzoic acid as a reactive Contaminant that modifies Tyrosyl Residues. *Biochemistry*, **20**, 443-448
- Manabe, T., Tachi, K., Kojima, K., Okuyama, T. (1979) Two-dimensional electrophoresis of plasma proteins without denaturing agents. *J. Biochem.*, **85**, 649-659
- Martin, D.D., Ciulla, R. A., Roberts, M.F. (1999) Osmoadaptation in archaea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1815-1825
- Marwan, W., Oesterhelt, D. (1987) Signal formation in the halobacterial photophobic response mediated by a 4th retinal protein (P480) *J. Mol. Biol.*, **195**, 333-342
- Marwan, W., Oesterhelt, D. (1990) Quantitation of Photochromism of Sensory Rhodopsin-I by Computerized Tracking of Halobacterium-Halobium Cells. *J. Mol. Biol.*, **215**, 277-285
- Marwan, M., Oesterhelt, D. (2000) Archaeal Vision and Bacterial Smelling: Sensory Control of the Swimming Behaviour by Two Component Signalling and Fumarate. *ASM-News*, **66**, 83-90
- Marwan, W., Schäfer, W., Oesterhelt, D. (1990) Signal Transduction in Halobacterium Depends on Fumarate. *EMBO*, **9**, 355-362
- Marwan, W., Bibikov, S.I., Montrone, M., Oesterhelt, D. (1995) Mechanism of photosensory adaptation in *Halobacterium-salinarium*. *J. Mol. Biol.*, **246**, 493-499

## 6. Literaturverzeichnis

- Mastro, R., Hall, M. (1999) Protein Delipidation and Precipitation by Tri-n-butylphosphate, Acetone and Methanol Treatment for Isoelectric Focussing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **273**, 313-315
- Mattar, S., Engelhard, M. (1997) Cytochrome ba(3) from *Natronobacterium pharaonis* - An archaeal four-subunit cytochrome-c-type oxidase. *Eur. J. Biochem.*, **250**, 332-341
- Mattar, S., Scharf, B., Kent, S. B. H., Rodewald, K., Oesterhelt, D., Engelhard, M. (1994) The Primary Structure of Halocyanin, an Archaeal Blue Copper Protein, predicts a Lipid Anchor for Membrane Fixation. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14939-14945
- Makowski, I., Frolow, F., Saper, M.A., Shoham, M., Wittmann, H.G., Yonath, A. (1987) Single-Crystals of large ribosomal particles from *Halobacterium-Marismortui* diffract to 6-Å. *J. Mol. Biol.*, **193**, 819-822
- Mescher, M.F., Strominger, J.L. (1975) Bacitracin induces Sphere Formation in *Halobacterium* Species which Lack a Wall Peptidoglycan. *J. Gen. Microbiol.*, **89**, 375-378
- Mescher, M.F., Strominger, J.L. (1976) Purification and characterization of a procaryotic glucoprotein from cell envelope of *Halobacterium salinarium*, *J. Biol. Chem.*, **251**, 2005-2014
- Meyer T.S., Lamberts B.L. (1965) Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta*, **107**, 144-145
- Michel, H., Oesterhelt, D. (1976) Light-induced changes of the pH gradient and the membrane potential in *H. halobium*. *FEBS Lett.*, **65**, 175-178
- Michel, H. (1977) Der elektrochemische Protonengradient bei *Halobacterium halobium* und seine Beziehung zu den intrazellulären Spiegeln von ATP, ADP und Phosphat. Dissertation, Universität Würzburg
- Michov, B.M. (1995) *Elektrophorese*, Walter de Gruyter, Berlin-New York, S. 1
- Miercke, L.J.W., Ross, P.E., Stroud, R.M., Dratz, E.A. (1989) Purification of bacteriorhodopsin and characterization of mature and partially processed forms. *J. Biol. Chem.*, **264**, 7531-7535
- Moldoveanu, N., Kates, M. (1989) Effect of Bacitracin on Growth and Phospholipid, Glycolipid and Bacterioruberin Biosynthesis in *Halobacterium-Cutirubrum*. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 2503-2508
- Moldoveanu, N., Kates, M., Montero, C.G., Ventosa, A. (1990) Polar lipids of non-alkaliphilic Halococci. *Biochim. Biophys. Acta*, **1046**, 127-135
- Molloy, M.P. (2000) Two-Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins using immobilized pH Gradients. *Anal. Biochem.*, **280**, 1-10
- Montrone, M., Oesterhelt, D., Marwan, W. (1996) Phosphorylation-independent bacterial chemoresponses correlate with changes in the cytoplasmic level of fumarate. *J. Bacteriology*, **178**, 6882-6887
- Mortz, E., Krogh, T.N., Vorum, H., Gorg, A. (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*, **1**, 1359-1363
- Müller, D.J., Heymann, J.B., Oesterhelt, F., Möller, C., Gaub, H., Büldt, G., Engel, A. (2000) Atomic force microscopy of native purple membrane. *Biochem. Biophys. Acta*, **1460**, 27-38
- Myers, J.M., Veis, A., Sabsay, B., Wheeler, A.P. (1996) A Method for Enhancing the Sensitivity and Stability of Stains-All for Phosphoproteins separated in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.*, **240**, 300-302



- Navarre, C., Degand, H., Bennett, K.L., Crawford, J.S., Mortz, E., Boutry, M. (2002) Subproteomics: Identification of plasma membrane proteins from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteomics*, **2**, 1706-1714
- Neugebauer, D.-C., Oesterhelt, D. (1978) Two Faces of the Purple Membrane. II. Differences in Surface charge properties revealed by Ferritin Binding. *J. Mol. Biol.*, **125**, 123-135
- Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H. (1985) Clear Background and highly sensitive Protein Staining with Coomassie Blue G250 in Polyacrylamide Gels – A Systematic Analysis, *Electrophoresis*, **6** (9), 427-448
- Ng, W.V., Kennedy, S.P., Mahairas, G.G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H.D., Lasky, S.R., Baliga, N.S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T.A., Welti, R., Goo, Y.A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M.J., Hough, D.W., Maddocks, D.G., Jablonski, P.E., Krebs, M.P., Angevine, C.M., Dale, H., Isenbarger, T.A., Peck, R.F., Pohlschroder, M., Spudich, J.L., Jung, K.H., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C.J., Dennis, P.P., Omer, A.D., Ebhardt, H., Lowe, T.M., Liang, P., Riley, M., Hood, L., DasSarma, S. (2000) Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1, *PNAS*, **97**, 12176-12181
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021
- Oesterhelt, D., Krippahl, G. (1983) Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically deficient mutants. *Ann. Microbiol.*, **134B**, 137-150
- Oesterhelt, D., Marwan, W. (1995) Wie Archaea sehen und schmecken. *Biospektrum*, **1**, 11-16
- Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature*, **233**, 149-152
- Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. (1973) Functions of a New Photoreceptor Membrane. *Proc. Natl. Sci. USA*, **70**, 2853-2857
- Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. (1974) Isolation of the Cell Membrane of *Halobacterium halobium* and its Fractionation into Red and Purple Membrane. *Methods Enzymol.*, **31**, Biomembranes, 667-678
- Oesterhelt, D., Tittor, J. (1989) Two pumps, one principle: light-driven ion transport in Halobacteria. *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 57-61
- Oesterhelt, D., Tittor, J., Bamberg, E. (1992) A unifying concept for ion translocation by retinal proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**, 181-191
- Oh-Ishi, M., Satoh, M., Maeda, T. (2000) Preparative two-dimensional gel electrophoresis with agarose gels in the first dimension for high molecular mass proteins. *Electrophoresis*, **21**, 1653-1669
- Onsager, L. (1926) Zur Theorie der Elektrolyte I. *Phys. Z.*, **27**, 388-392
- Onsager, L. (1933) Theories of concentrated electrolytes. *Chem. Rev.*, **13**, 73-101
- Oren, A. (2002) Halophilic Organisms and their environments in: *Cellular Origin and Life in extreme habitats*. Kluwer Academic Publishers (ed. J. Seckbach), S. 85
- Pasquali, C., Fialka, I., Huber, L.A. (1997) Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis*, **18**, 2573-2581
- Patenge, N., Berendes, A., Engelhardt, H., Schuster, S.C., Oesterhelt, D. (2001) The fla gene cluster is involved in the biogenesis of flagella in *Halobacterium salinarum*. *Mol. Microbiol.*, **41**, 1-12
- Paul, G., Lottspeich, F., Wieland, F. (1986) Asparaginyln-acetylgalactosamine: linkage unit of halobacterial glycosaminoglycan. *J. Biol. Chem.*, **261**, 1020-1024

## 6. Literaturverzeichnis

- Perkins, D., N., Pappin, D., J., Creasy, D., M., Cottrell, J., S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551-3567
- Perrin, J. (1904) Mechanisme de lélectrisation de contact et solutions colloïdales. *J. Chim. Phys.*, **2**, 601-644
- Privalov, P.L., Griko, Y., Venyaminov, S.Y. (1986) Cold Denaturation of Myoglobin. *J. Mol. Biol.*, **190**, 487-498
- Pundak, S., Aloni, H., Eisenberg, H. (1981) Structure and Activity of Malate-Dehydrogenase from the extreme halophilic Bacteria of the Dead-Sea .2. Inactivation, Dissociation and Unfolding at NaCl Concentrations below 2M - Salt, Salt Concentration and Temperature-Dependence of Enzyme Stability. *Eur. J. Biochem.*, **118** (3), 471-477
- Pundak, S., Eisenberg, H. (1981) Structure and Activity of Malate-Dehydrogenase from the extreme halophilic Bacteria of the Dead-Sea .1. Conformation and Interaction with Water and Salt between 5M And 1M Nacl Concentration. *Eur. J. Biochem.*, **118** (3): 463-470
- Purcell, E.M. (1977) Life at low Reynolds numbers. *Am. J. Physics*, **45**, 3-11
- Pyatibratov, M.G., Kostyukova, A.S., Tarasov, V.Y., Fedorov, O.V. (1993) Morphology and subunit composition of flagella and haloalkalophilic archaebacteria. *Dokl. Acad. Nauk. SSSR.*, **330**, 116-119
- Qian, M., Haser, R., Payan, F. (1995) Carbohydrate binding sites in a pancreatic  $\alpha$ -amylase-substrate comole, derived from X-Ray structure analysis at 2.1 Å resolution. *Prot. Sci.*, **4**, 747-755
- Quincke, G. (1859) Über eine neue Art elektrischer Stroeme. *Pogg. Ann.*, **107**, 1-47
- Quincke, G. (1861) Ueber die Festsetzung materieller Theilchen durch stromende Electricitaet. *Pogg. Ann.*, **113**, 513-598
- Rabilloud T., Gianazza, E., Catto, N., Righetti, P., G., (1990) Amidosulfobetaines, a Family of Detergents with improved Solubilization Prpoorties: Application for Isoelectric Focusing under denaturing Conditions. *Anal. Biochem.*, **185**, 94-102
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., Lunardi, J. (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **18**, 307-316
- Rabilloud, T., Blisnick, T., Heller, M., Luche, S., Aebersold, R., Lunardi, J., Braun-Breton, C. (1999) Analysis of Membrane Proteins by two-dimensional electrophoresis: Comparison of the Proteins extracted from normal or Plasmodium falciparum - infected Erythrocyte Ghosts. *Electrophoresis*, **20** (18), 3603-3610
- Rabilloud, T., Gelfi, C., Bossi, M.L., Righetti, P.G. (1987) Protein precipitation induced by alkaline Immobilines for isoelectric focussing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **8**, 305-312
- Rabilloud, T., Valette, C., Lawrence, J.J. (1994) Sample application by in gel-rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis*, **15**, 1552-1558
- Rehm, H. (1996) Der Experimentator: Proteinbiochemie, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, S. 14
- Righetti, P.G., Gelfi, C., Bossi, M.I., Boschetti, E. (1987) Isoelectric-Focusing and non-isoelectric precipitation of Ferritin in immobilized pH Gradients - An Improved Protocol Overcoming Protein-Matrix Interactions. *Electrophoresis*, **8** (1), 62-70
- Rimpilainen, M.A., Righetti, P.G. (1985) Membrane protein analysis by isoelectric focussing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **6**, 419-422
- Robinson, R.A., Stokes, R.H. (1965) Electrolyte Solutions, 2. Aufl., Butterworths, London

- Rochette-Egly, C., Stussi-Garaud, C. (1984) Selective detection of Calmodulin in polyacrylamide gels by double staining with Coomassie blue and silver. *Electrophoresis*, **5**, 285-288
- Ross, P.E., Helgerson, S.L., Miercke, L.J.W., Dratz, E.W. (1989) Isoelectric focusing studies of bacteriorhodopsin. *Biochim.Biophys. Acta*, **991**, 134-140
- Rudolph, J., Oesterhelt, D. (1995) Chemotaxis and Phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J.*, **14**, 667-673
- Rudolph, J., Tolliday, N., Schmitt, C., Schuster, S.C., Oesterhelt, D. (1995) Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *EMBO J.*, **14**, 4249-4257
- Rudolph, J., Oesterhelt, D. (1996) Deletion analysis of the che operon in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *J. Mol. Biol.*, **258**, 548-554
- Ruepp, A., Soppa, J. (1996) Fermentative Arginine Degradation in *Halobacterium salinarium* (Formerly *Halobacterium halobium*): Genes, Gene Products, and Transcripts of the arcRACB Gene Cluster. *J. Bact.*, **178**, 4942-4947
- Sanchez, J.C., Rouge, V., Pisteur, M., Ravier, F., Tonella, L., Moosmayer, M., Wilkins, M.R., Hochstrasser, D.F. (1997) Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **18**, 324-327
- Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F., Rabilloud, T. (2000) Membrane Proteomics: Use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis*, **21**, 3329-3344
- Santoni, V., Molloy, M., Rabilloud, T. (2000) Membrane Proteomics: Un Amour impossible? *Electrophoresis*, **21**, 1054-1070
- Schäfer, H., Nau, K., Sickmann, A., Erdmann, R., Meyer, H.E. (2001) Identification of peroxisomal membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Electrophoresis*, **22**, 2955-2968
- Scheele, G.A. (1975) Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 5375-5385
- Scheele, G.A., Palade, G.E., Tartakoff, A.M. (1978) Cell fractionation studies on the guinea pig pancreas. Redistribution of exocrine proteins during the tissue homogenization. *J. Cell Biol.*, **78**, 110-130
- Schwartz, R., Ting, C.S., King, J. (2001) Whole Proteome pI values correlate with subcellular Localizations of Proteins for Organisms within the three Domains of Life. *Genome Research*, **11**, 703-709
- Seidel, R., Scharf, B., Gautel, M., Kleine, K., Oesterhelt, D., Engelhard, M. (1995) The Primary Structure of Sensory Rhodopsin-II - A Member of an additional retinal protein subgroup is coexpressed with its transducer, the halobacterial transducer of Rhodopsin-II. *PNAS*, **92**, 3036-3040
- Shevchenko, A., Loboda, A., Shevchenko, A., Ens, W., Standing, K.G. (2000) MALDI Quadrupole time-of-flight Mass spectrometry: A powerful tool for proteomic research. *Anal. Chem.*, **72** (9): 2132-2141
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996) Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.*, **68**, 850 – 858
- Sinha, P.K., Köttgen, E., Stöffler-Meilicke, M., Gianazza, E., Righetti, P.G. (1990) Two-dimensional maps in very acidic immobilized pH gradients. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **20**, 345-352
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of Protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85

## 6. Literaturverzeichnis

- Smulochowski, M. (1903) *Bull. Acad. Sci. Cracovie*, **182**
- Smulochowski, M. (1921) Handbuch der Elektrizität und des Magnetismus, Graetz L (Hrsg.), Barth, Leipzig, Bd 2, S. 366
- Speranskii, V.V., Metlina, A.L., Novikova, T.M., Bakeyeva, L.Y. (1996) Disk-like lamellar structure as part of the archaeal Flagellar Apparatus. *Biophysics*, **41** (1), 167-173
- Spudich (1998) Variation on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol. Microbiol.*, **26**, 1015-1058
- Spudich, J.L. (1993) Color Sensing in the Archaea: a Eukaryotic-Like Receptor Coupled to a Prokaryotic Transducer. *J. Bacteriol.*, **175**, 7755-7761
- Spudich, J. L., Bogomolni, R. A. (1984) Mechanism of Color Discrimination by a Bacterial Sensory Rhodopsin. *Nature*, **312**, 509-513
- Spudich, J.L., Bogomolni, R.A. (1988) Sensory Rhodopsins of Halobacteria. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **17**, 193-215
- St Jean, A, Trieselmann, B.A., Charlebois, R.L. (1994) Physical map and set of overlapping cosmid clones representing the genome of the archaeon Halobacterium sp. GRB. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 1476-1483
- Stern, O. (1924) Zur Theorie der elektrischen Doppelschicht. *Z. Elektrochem.*, **30**, 508-516
- Stetker-Stevenson, W.G., Veis, A. (1983) Bovine dentin phosphophoryn: composition and molecular weight. *Biochemistry*, **22**, 4326-4335
- Stevens, T.J., Arkin, I.T. (2000) Do more complex organisms have a greater Proportion of membrane Proteins in their genome? *Proteins:Struct. Funct. Gen.*, **39**, 417-420
- Stock, D., Leslie, A.G.W., Walker, J.E (1999) Molecular architecture of the rotary motor in the ATP Synthase. *Science*, 286, 1700-1705
- Stock, J. B., Surette, M. G. (1996) Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology. in: Neidhard, R. C. I., Ingraham, J. L., Lin, E. E. C., Low, K. B., Magasanik, B., et al. (Eds.), *Chemotaxis*, American Society for Microbiology, Washington DC, S. 551-573.
- Stoeckenius, W., Lozier, R.H., Bogomolni, R.A (1979) Bacteriorhodopsin and the purple membrane of Halobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 215-278
- Stoeckenius, W., Rowen, R. (1967) A morphological study of halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentration. *J. Biol.*, **34**, 365-393
- Storch, K., F., Rudolph, J., Oesterhelt, D. (1999) Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon Halobacterium salinarum. *EMBO J.*, **18** (5), 1146-1158
- Sumper, M. (1987) Halobacterial glycoprotein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **906**, 69-79
- Sumper, M., Reitmeier, H., Oesterhelt, D. (1976) Zur Biosynthese der Purpurchromophorenmembran von Halobakterien. *Angew. Chem.*, **7**, 203-210
- Svensson, H. (1961) Isoelectric Fractionations, Analysis, and Characterisation of Ampholytes in natural pH gradients. I. The Differential Equation of Solute Concentrations at a Steady State and its Solution for Simple Cases. *Acta Chem. Scand.*, **15**, 325-341
- Svensson, H. (1962) Isoelectric Fractionations, Analysis, and Characterisation of Ampholytes in natural pH gradients. II. Buffering Capacity and Conductance of Isoionic Ampholytes. *Acta Chem. Scand.*, **16**, 456-466

- Switzer, R.C., Merrill, C.R., Shifrin, S. (1979) A highly sensitive Silver Stain for Detection Proteins and Peptides in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.*, **98**, 231-237
- Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N., Kobatake, Y. (1985) A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*. *FEMS-Microbiol. Lett.*, **28**, 161-164
- Tang, H., Braun, T.F., Blair, D.F. (1996) Motility Protein Complex in the bacterial flagellar Motor. *J. Mol. Biol.*, **261**, 209-221
- Tarasov, V.Y., Pyatibratov, M.G., Tang, S.-L., Dyll-Smith, M., Fedorov, O.V. (2000) Role of flagellins from A and B loci in flagella formation of *Halobacterium salinarum*. *Mol. Microbiol.*, **35** (1), 69-78
- Teissie, J., Prats, M., Lemassu, A., Stewart, L., C., Kates, M. (1990) Lateral Proton Conduction in Monolayers of Phospholipids from Extreme Halophiles. *Biochemistry*, **29**, 59-65
- Thomas, N., A., Bardy, S., L., Jarrell, K., F. (2001) The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 147-174
- Thompson, D. K., Palmer, J. R., Daniels, C. J. (1999) Expression and heat-responsive regulation of a TFIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol. Microbiol.*, **33**, 1184-1185
- Tsay, T.G., Veis, A. (1985) Preparation, detection, and characterization of an antibody to rat .alpha.-phosphophoryn. *Biochemistry*, **24**, 6363-6369
- van Bogelen, R.A., Schiller, E.E., Thomas, J.D., Neidhardt, F.C. (1999) Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis*, **20**, 2149-2159
- Vesterberg, O. (1968) British Patent 110818
- Vesterberg, O. (1969) Synthesis and Isoelectric Fractionation of Carrier Ampholytes. *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2653-2666
- Voet D., Voet, J.G., Pratt, C., W. (1999) Fundamentals in Biochemistry, John Wiley and Sons, Inc., S. 80-81
- Voet, D., Voet, J.G (1992) in: Biochemie, VCH Verlagsgesellschaft, S. 918
- Von Böhlen, K., Makowski, I., Hansen, H., A., S., Bartels, H., Berkovitchyellin, Z., Zaytzevbashan, A., Meyer, S., Paulke, C., Franceschi, F., Yonath, A. (1991) Characterization and preliminary attempts for derivatization of crystals of large ribosomal-subunits from Haloarcula-Marismortui diffracting to 3-A Resolution. *J. Mol. Biol.*, **222**, 11-15
- Wald, G. (1968) Die molekulare Basis des Sehvorganges (Nobelvortrag). *Angew. Chem.*, **80**, 857-862
- Wallin, E., Von Heijne G., (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.*, **7**, 1029-1038
- Washburn, M.P., Walters, D., Yates III, J.R. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 242-247
- Weber, K., Kuter, D.J. (1971) Reversible Denaturation of Enzymes by Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Biol. Chem.*, **246**, 4504-4509
- Weber, K., Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4012
- Weik, M, Patzelt, H., Zaccari, G., Oesterhelt, D. (1998) Localization of Glycolipids in membranes by In Vivo Labeling and Neutron Diffraction. *Mol. Cell*, **1**, 411-419
- Wessel, D., Flügge, U.I. (1984) A Method for the quantitative Recovery of Protein in dilute Solution in the presence of Detergents and Lipids. *Anal. Biochem.*, **138**, 141-143

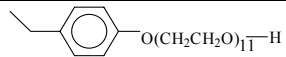
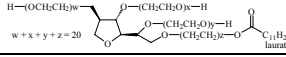
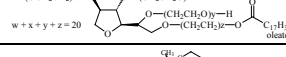
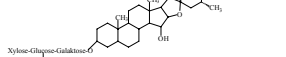
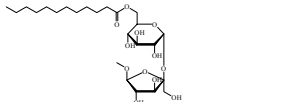
## 6. Literaturverzeichnis

- Wieczorek, H., Grüber, G., Harvey, W. R., Huss, M., Merzendorfer, H., Zeiske, W. (2000) Structure and regulation of insect plasma membrane H<sup>+</sup>V-ATPase. *J. Exp. Biol.*, **203**, 127-135
- Wieland, F., Dompert, W., Bernhardt, G., Sumper, M. (1980) Halobacterial glycoprotein saccharides contain covalently linked sulphate. *FEBS Lett.*, **120**, 110-114
- Wieland, F., Heitzer, R., Schaefer, W. (1983) Asparaginyglucose: Novel type of carbohydrate linkage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 5470-5474
- Wieland, F., Paul, G., Sumper, M. (1985) Halobacterial Flagellins are sulfated Glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15180-15185
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Sanchez, J.C., Bairoch, A., Hochstrasser, D.F. (1998) Two-dimensional Gel Electrophoresis for Proteome Projects: The effects of Protein Hydrophobicity and Copy Number. *Electrophoresis*, **8-9**, 1501-1505
- Wilson, D. R., Beveridge, T. J. (1993) Bacterial flagellar filaments and their component flagellins. *Can. J. Microbiol.*, **40**, 451-472
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**, 221-271
- Woese, C.R., Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms., *Proc. Natl. Sci. USA*, **74**, 5088-5090
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P., Hancock, R. (1981) Silver staining of Proteins in Polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **118**, 197-203
- Wu, C.C., MacCoss, M.J., Howell, K.E., Yates III, J.R. (2003) A method for the comprehensive proteomics analysis of membrane proteins. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 532-538
- Wu, C.C., Yates III, J.R. (2003) The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 262-267
- Yao, V.J., Spudich, J.L. (1992) Primary structure of an archaeobacterial transducer, a methyl-accepting protein associated with sensory rhodopsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11915-11919
- Zaccai, G., Cendrin, F., Haik, Y., Borochoy, N., Eisenberg, H. (1989) Stabilization of halophilic Malate-Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.*, **208** (3) 491-500
- Zaccai, G., Eisenberg, H. (1990) Halophilic Proteins and the Influence of Solvent on Protein Stabilization. *Trends Biochem. Sci.*, **15** (9), 333-337
- Zhang, X-N., Spudich, J., L. (1998) HtrI is a Dimer whose Interface is sensitive to Receptor Photoactivation and His-166 Replacement in Sensory Rhodopsin I. *J. Biol. Chem.*, **273** (31), 19722-19728
- Zillig, W., Palm, P., Reiter, W.D., Gropp, F., Pühler, G., Klenk, H.P. (1988) Comparative evaluation of gene Expression in archaeobacteria. *Eur. J. Biochem.*, **173**, 473-482
- Zischka, H., Gloeckner, C. J., Klein, C., Willmann, S., Swiatek de Lange, M., Ueffing, M. (2003, submitted) SDS removal facilitates mass-spectrometric identification of gel-separated hydrophobic membrane proteins.

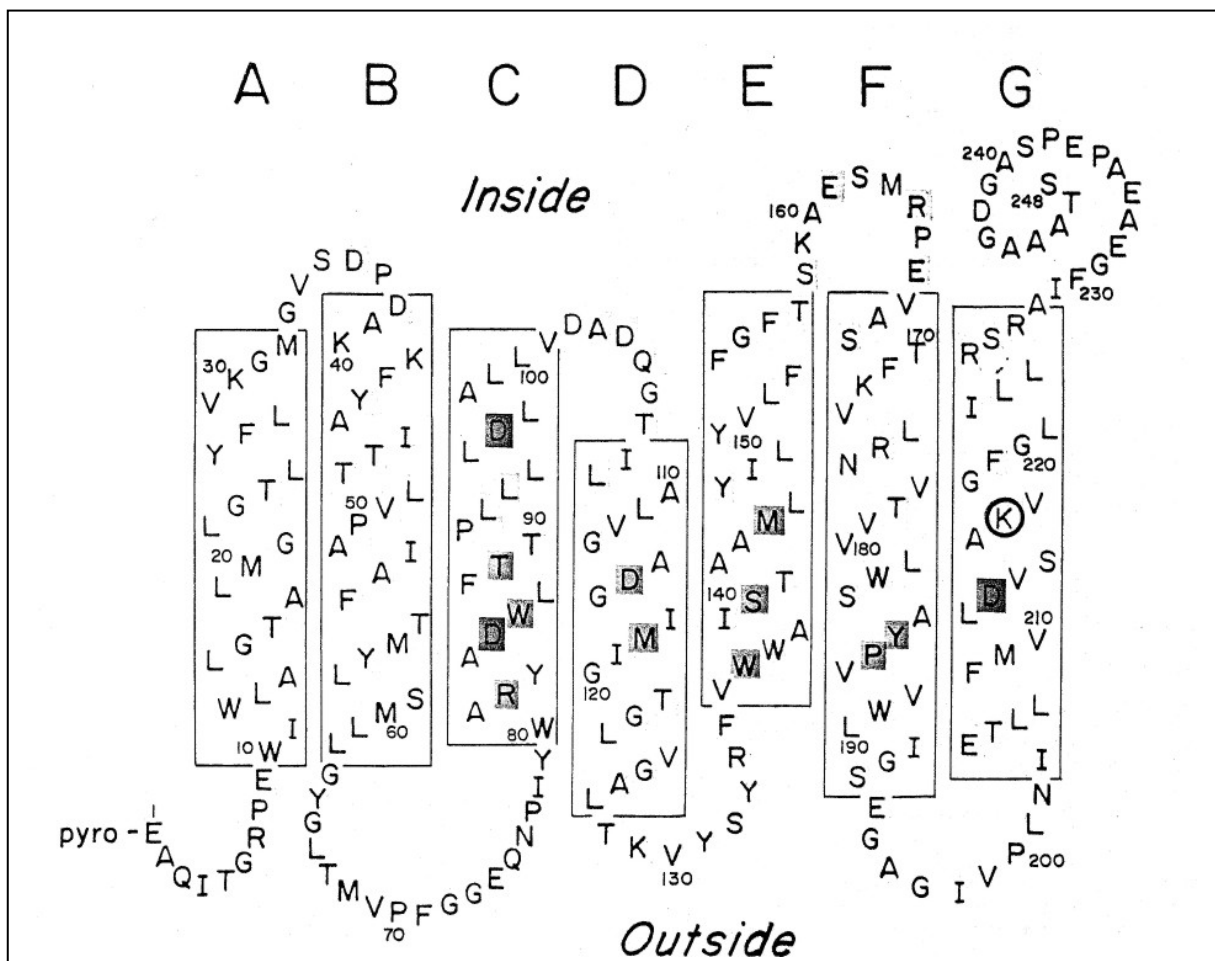
# 7. Anhang

## 7.1 Detergenzien

Name	Struktur	M [ <sup>g</sup> /mol]	CMC (mM) 0-0,05M Na <sup>+</sup>	CMC(mM) 0,1-0,2M Na <sup>+</sup>
Hexyl-β-D-glucosid		264,2	250	195
Heptyl-β- D-glucosid		278,3	79	65
Octyl-β- D-glucosid		292,4	20-25	19-25
Nonyl-β- D-glucosid		306,5	6,5	6,2
Decyl-β- D-glucosid		320,6	2-3	2,0
Dodecyl-β- D-glucosid		348,8	0,13	
Octyl-β- D-Maltopyranosid		468,3		
Decyl-β- D-Maltopyranosid		482,4	1,6	15
Dodecyl-β- D-Maltopyranosid		510,6	0,18	
Heptyl-β-D-thioglucosid			30	23
Octyl-β-D-thioglucosid			9	4
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_8-\text{H}$	540	0,07-0,1	0,05-0,1
C <sub>12</sub> E <sub>9</sub>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_9-\text{H}$	583	0,07-0,1	0,046
BRIJ 35	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{23}-\text{H}$	1200	0,05-0,1	-
HECAMEG		335,4	19,5	
CHAPS			6-10	3-5
CHAPSO		630,9	8	8,0-4,1
MEGA 8		321,4	58	48
MEGA 9			19-25	18
MEGA 10			6-7	5,2
Triton X-100		625	0,2-0,9	0,29
Triton X-114		537	0,35	-

Nonidet P-40		606		
Tween 20		1228	0,059	-
Tween 80		1310	0,012	-
Digitonin			-	-
Sucrose monolaurate		524,6	0,2	

## 7.2 Struktur von Bakteriorhodopsin



Primär-und Sekundärstruktur von Bakteriorhodopsin nach Jonas *et al.* (1990).





## 7.4 Tabelle der Spots nach Triethylaminbehandlung

**Tab. 7.1:** Übersicht zur Triethylaminbehandlung: Gleiche (unterschiedliche) Identifizierung in Fettdruck (Normaldruck), gleichbleibender Identifizierungsstatus in grün, Verbesserung in blau und Verschlechterung in rot. Bei nicht-trusted Status ist die modifizierte Coverage (Coverage der theoretisch möglichen Fragmente zwischen 800-4000 m/z) angegeben. Eine unterschiedliche Nicht-Identifizierung (questionable/unknown) ist schwarz markiert.

Et <sub>3</sub> N-Gel				unbeh. Gel				
Spot-Nr.	Name	Score	Status	coverage [%]	Name	Score	Status	coverage [%]
1	OE 4052	101						
2	OE 4613	159			OE 4613	187		
3	OE 4613	51	q		OE 4344	40	u	42
4	OE 4613	40	u	23	OE 4613	40	u	23
5	OE 2141	44	q		OE 2141	105		
6	OE24861	39	u		OE 4725	37	u	15
7	OE 3356	50	q		OE 2341	34	q	50
8	OE 1592	227			OE 1592	201		
9	OE 5208	213			OE 5208	193		
10	OE 3246	171			OE 3216	68	q	29
11	OE 2190	152			OE 2190	66	q	36
12	OE 4703	154			OE 6033	21	q	16
13	OE 4438	183			OE 4613	132		
14	OE 1270	129			OE 1270	130		
15	OE 4721	120			OE 4721	120		
16	OE 1568	176			OE 1568	90	i	29
17	OE 1656	227			OE 1656	248		
18	OE 4391	136			OE 4391	175		
19	OE 4436	123			OE 4436	41	u	29
20	OE 3623	87	i	94	OE 3623	49	q	54
21	OE 3500	141			OE 3500	162		
22	OE 5141	115			OE 5141	120		
23	OE 4613	136			OE 4613	115		
24	OE 5142	136			OE 5142	192		
25	OE 4613	86	i	33	OE 4613	55	q	24
26	OE 5187	116			OE 5187	138		
27	OE 1418	79	i	64	OE 1418	65	q	49
28	OE 1593	40	q	44	OE 3917	133		
29	OE 1656	48	u	20	OE 1304	43	q	80
30	OE 4466	101			OE 4466	113		
31	OE 5021	102			OE 5021	83	i	38
32	OE 4613	96			OE 4613	112		
33	OE 3940	92	i	47	OE 3940	81	i	45
34	OE 3717	49	u	36	OE 2317	34	u	47
35	OE 2970	105			OE 2970	109		
36	OE 3578	108			OE 3578	122		
37	OE 3115	54	q	54	OE 3115	47	q	34
38	OE 3237	92			OE 3237	64	q	42
39	OE 4330	100			OE 4330	101		
40	OE 1240	38	u	45				
41	OE 2141	30	u	12	OE 2672	38	u	
42	OE 3415	78	i	54				
43	OE 4613	75	i	26	OE 4613	68	q	25
44	OE 2210	81	i	65	OE 2210	59	u	45
45	OE 4562	87	i	100	OE 4562	86	i	100
46	OE 3207	101			OE 3207	105		
47	OE 1626	36	u	35	OE 4293	50	q	
48	OE 1859	44	u	41	OE 5082	38	u	

## 7.5 Identifizierte Proteine des Cytosolproteoms

Im Rahmen des Cytosolprojektes konnten in Zusammenarbeit mit Andreas Tebbe folgende cytosolischen Proteine identifiziert werden, sortiert nach deren vorhergesagten Funktion (Function-Class, FC), die wie folgt abgekürzt wurden:

AA = aminoacid metabolism, CE = cell envelope, CHM = carbohydrate metabolism, CHP = chaperones, CIM = central intermediary metabolism, COM = coenzyme metabolism, CP = cellular processes, EM = energy metabolism, LIP = lipid metabolism, MIS = miscellaneous, NOF = no function, NUM = nucleotide metabolism, REG = gene regulation, RMT = RNA maturation, RRR = replication, repair, recombination, SEC = protein secretion, SIG = signal transduction, TC = transcription, TL = translation, TP = small molecule transport.

FC	OE-Code	Gen	Protein-Name	DaSarma Code	pI	MW	Status
AA	OE1165R	serA3	phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	VNG0104G	4,3	32885	trusted
AA	OE1270F	gdhB	glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.-)	VNG0161G	4,5	45961	trusted
AA	OE1432F	soxB	sarcosine oxidase (EC 1.5.3.1) beta chain	VNG0281G	4,6	39145	trusted
AA	OE1471F	trpA	tryptophan synthase (EC 4.2.1.20) alpha chain	VNG0308G	4,2	28441	trusted
AA	OE1477R	aroD	3-dehydroquinate dehydratase (EC 4.2.1.10)	VNG0314G	4,1	23041	trusted
AA	OE1565F	aroE	shikimate 5-dehydrogenase (EC 1.1.1.25)	VNG0382G	4,7	26634	trusted
AA	OE1568F	trpE2	anthranilate synthase (EC 4.1.3.27) component I	VNG0384G	4,9	51344	trusted
AA	OE1807R	thrC2	threonine synthase (EC 4.2.99.2)	VNG0541G	4,4	41661	trusted
AA	OE1916F	cysK1	cysteine synthase (EC 4.2.99.8) cysK1	VNG0606G	4,2	33297	trusted
AA	OE1943F	gdhA1	glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.-)	VNG0628G	4,2	44992	trusted
AA	OE1944R	aspB2	probable aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	VNG0629G	4,1	40180	trusted
AA	OE2278F	asnA	probable asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing) (EC 6.3.5.4)	VNG0867G	5,2	37659	trusted
AA	OE2425F	aat1	probable aminotransferase (EC 2.6.1.-) (histidinol-phosphate transaminase homolog / aspartate transaminase homolog)	VNG0981C	4,8	38548	trusted
AA	OE2507R	hisC1	histidinol-phosphate transaminase (EC 2.6.1.9)	VNG1033G	4,5	39267	trusted
AA	OE2728R	gdhA2	glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.-)	VNG1204G	4,2	45326	trusted
AA	OE2734F	hutU	urocanate hydratase (EC 4.2.1.49)	VNG1208G	4,4	63236	trusted
AA	OE2739F	hutH	histidine ammonia-lyase (EC 4.3.1.3)	VNG1212G	4,8	54076	trusted
AA	OE2761R	aroC	chorismate synthase (EC 4.6.1.4)	VNG1230G	4,8	42418	trusted
AA	OE2762R	aroA	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EC 2.5.1.19)	VNG1232G	4,4	44322	trusted
AA	OE2945F	ocd2	probable ornithine cyclodeaminase (EC 4.3.1.12)	VNG1364G	4,1	33704	trusted
AA	OE3036F	glyA	glycine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	VNG1414G	4,3	45184	trusted
AA	OE3063F	asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.11)	VNG1435G	4,4	35857	trusted
AA	OE3065R	serA2	probable dehydrogenase (EC 1.-.-) (D-	VNG1437G	4,9	33991	trusted

			3-phosphoglycerate dehydrogenase homolog / 2-ketogluconate reductase homolog)				
AA	OE3274R	gcvP2	glycine cleavage system protein P-2 (glycine dehydrogenase (decarboxylating) (EC 1.4.4.2) chain 2)	VNG1601G	4,5	50475	trusted
AA	OE3278R	gcvT	glycine cleavage system protein T (aminomethyltransferase (EC 2.1.2.10))	VNG1606G	4,2	38197	trusted
AA	OE3332R	trpE1	anthranilate synthase (EC 4.1.3.27) alpha chain	VNG1647G	4,3	56269	trusted
AA	OE3486R	speB	agmatinase (EC 3.5.3.11)	VNG1767G	4,3	28759	trusted
AA	OE3488R	cre	probable creatininase (EC 3.5.2.10)	VNG1769C	4,5	28523	trusted
AA	OE3554F	carB	carbamoyl-phosphate synthase (EC 6.3.-.-) large chain ((ammonia) (EC 6.3.4.16) or (glutamine-hydrolyzing) (EC 6.3.5.5))	VNG1814G	4,2	110746	trusted
AA	OE3556R	carA	carbamoyl-phosphate synthase (EC 6.3.-.-) small chain ((ammonia) (EC 6.3.4.16) or (glutamine-hydrolyzing) (EC 6.3.5.5))	VNG1815G	4,3	37195	insecure
AA	OE3712R	oxdhA2	2-oxoisovalerate dehydrogenase (EC 1.2.4.4) E1 component, alpha subunit 2 (branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase) (NOT E1 component, alpha subunit of pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes)	VNG1926G	4,5	40584	trusted
AA	OE3913F	hisH2	imidazoleglycerol-phosphate synthase (EC 2.4.2.-) (glutamine amidotransferase)	VNG2087G	4,4	22952	insecure
AA	OE3922R	glnA	glutamate--ammonia ligase (EC 6.3.1.2)	VNG2093G	4,4	49755	trusted
AA	OE3931R	iluA	threonine dehydratase (EC 4.2.1.16)	VNG2100G	4,7	43506	trusted
AA	OE3941F	thrC3	threonine synthase (EC 4.2.99.2)	VNG2108G	4,4	36994	insecure
AA	OE3955F	putA	probable proline dehydrogenase (EC 1.5.99.8)	VNG2120G	4,4	30999	trusted
AA	OE3959R	ilvE	branched-chain-amino-acid transaminase (EC 2.6.1.42)	VNG2122G	4,2	34202	trusted
AA	OE4117F	pheA2	probable prephenate dehydratase (EC 4.2.1.51) (monofunctional)	VNG2222G	4,7	28492	trusted
AA	OE4121R	ocd1	probable ornithine cyclodeaminase (EC 4.3.1.12)	VNG2224G	4,1	35365	manual
AA	OE4152R	hisG	ATP phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.17)	VNG2247G	4,3	29987	trusted
AA	OE4159F	achY	adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	VNG2251G	4,4	45905	trusted
AA	OE4206F	mamB	methylaspartate mutase (EC 5.4.99.1) large chain	VNG2288G	4,7	51159	insecure
AA	OE4207F	mamC	methylaspartate ammonia-lyase (EC 4.3.1.2)	VNG2289G	4,8	43612	trusted
AA	OE4331R	tnaA	tryptophanase (EC 4.1.99.1)	VNG2373G	4,6	48135	trusted
AA	OE4391F	agxT	probable serine--pyruvate aminotransferase (EC 2.6.1.51) (probably including alanine-- glyoxylate aminotransferase (EC 2.6.1.44))	VNG2418G	4,6	40907	trusted
AA	OE4405R	serB	phosphoserine phosphatase (EC 3.1.3.3)	VNG2423G	4,5	23799	insecure
AA	OE4408F	serA1	phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	VNG2424G	4,3	54426	trusted
AA	OE4420R	argG	argininosuccinate synthase (EC 6.3.4.5)	VNG2437G	4,4	42003	trusted
AA	OE4436R	lta	L-allo-threonine aldolase (EC 4.2.1.-)	VNG2447G	4,7	36062	trusted
AA	OE5205R	arcB	ornithine carbamoyltransferase (EC 2.1.3.3), catabolic	VNG6315G	4,2	32674	trusted

AA	OE5206R	arcC	carbamate kinase (EC 2.7.2.2)	VNG6316G	4,1	32522	trusted
AA	OE5208R	arcA	arginine deiminase (EC 3.5.3.6)	VNG6317G	4,4	54699	trusted
CE	OE1806R	-	probable periplasmic protein	VNG0540G	4,1	33058	trusted
CHM	OE1013R	glmS	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing) (EC 2.6.1.16)	VNG0006G	5,1	63635	trusted
CHM	OE1014R	graD5	glucose-1-phosphate thymidyltransferase (EC 2.7.7.24)	VNG0008G	4,5	41401	insecure
CHM	OE1016R	graD2	glucose-1-phosphate thymidyltransferase (EC 2.7.7.24)	VNG0009G	4,6	41794	trusted
CHM	OE1077R	ugd	UDP-glucose 6-dehydrogenase (EC 1.1.1.22)	VNG0046G	4,2	46174	trusted
CHM	OE1078F	graD6	glucose-1-phosphate thymidyltransferase (EC 2.7.7.24)	VNG0047G	4,3	27062	insecure
CHM	OE2110R	galE1	UDPglucose 4-epimerase (EC 5.1.3.2)	VNG0752G	4,5	33862	trusted
CHM	OE2530F	graD4	glucose-1-phosphate thymidyltransferase (EC 2.7.7.24)	VNG1055G	4,4	26901	trusted
CHM	OE4703R	uae	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (EC 5.1.3.14)	VNG2639G	4,6	51346	trusted
CHP	OE1664R	rspA	molecular chaperone P45 (validated)	VNG0442G	4,4	45025	manual
CHP	OE1737R	dnaK	dnaK-type molecular chaperone hsp70	VNG0491G	4,1	67381	trusted
CHY	OE3566F	-	conserved hypothetical protein	VNG1823C	4,4	25868	manual
CIM	OE1154F	gapB	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)) (phosphorylating) (EC 1.2.1.59)	VNG0095G	4,4	35681	trusted
CIM	OE1472F	fba2	fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) 2	VNG0309C	4,7	27085	trusted
CIM	OE1495R	pykA	pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	VNG0324G	4,4	60136	trusted
CIM	OE1500R	ppsA	pyruvate, water dikinase (EC 2.7.9.2) (phosphoenolpyruvate synthase)	VNG0330G	4,4	81183	trusted
CIM	OE1602F	gldA2	glycerol-1 phosphate dehydrogenase [NAD(P)] (EC 1.1.1.261)	VNG0406C	4,8	36699	trusted
CIM	OE1710R	korB	oxoglutarate--ferredoxin oxidoreductase (EC 1.2.7.3) beta chain (alpha-ketoglutarate--ferredoxin oxidoreductase beta chain, oxoglutarate dehydrogenase (ferredoxin) beta chain, oxoglutarate synthase beta chain)	VNG0473G	4,4	31207	insecure
CIM	OE1711R	korA	oxoglutarate--ferredoxin oxidoreductase (EC 1.2.7.3) alpha chain (alpha-ketoglutarate--ferredoxin oxidoreductase alpha chain, oxoglutarate dehydrogenase (ferredoxin) alpha chain, oxoglutarate synthase alpha chain)	VNG0474G	4,3	63494	trusted
CIM	OE1726F	acs1	acetate--CoA ligase (EC 6.2.1.1)	VNG0484G	4,5	71525	trusted
CIM	OE1942F	citE	citrate (pro-3S)-lyase (EC 4.1.3.6) beta chain	VNG0627G	4,2	29323	trusted
CIM	OE2019F	fba1	fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) 1	VNG0683C	4,4	28066	trusted
CIM	OE2020F	fbp	fructose-bisphosphatase (EC 3.1.3.11)	VNG0684G	4,1	30142	insecure
CIM	OE2199F	adh5	probable alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	VNG0815G	4,3	35729	trusted
CIM	OE2318R	pmu2	phosphomannomutase (EC 5.4.2.8)	VNG0905G	4,5	47651	trusted
CIM	OE2450F	acs2	acetate--CoA ligase (EC 6.2.1.1)	VNG0997G	4,2	72896	trusted
CIM	OE2486F	adh3	probable alcohol dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> ) (EC 1.1.1.2)	VNG1018G	6,1	63611	insecure
CIM	OE2553R	gpdA1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase chain A homologue (C-terminal truncated)	VNG1070G	4,5	41040	trusted

CIM	OE2622R	porB	pyruvate--ferredoxin oxidoreductase (EC 1.2.7.1) beta chain (pyruvate dehydrogenase (ferredoxin) beta chain, pyruvate synthase beta chain)	VNG1125G	4,9	34630	trusted
CIM	OE2623R	porA	pyruvate--ferredoxin oxidoreductase (EC 1.2.7.1) alpha chain (pyruvate dehydrogenase (ferredoxin) alpha chain, pyruvate synthase alpha chain)	VNG1128G	4,4	68046	trusted
CIM	OE2640F	eno	phosphopyruvate hydratase (EC 4.2.1.11) (enolase)	VNG1142G	4,4	41439	trusted
CIM	OE2745R	pgk	phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	VNG1216G	4,3	41045	trusted
CIM	OE2865R	sdhA	succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) chain A (flavoprotein)	VNG1306G	4,5	66870	trusted
CIM	OE2866R	sdhB	succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) chain B (iron-sulfur protein)	VNG1308G	4,6	33665	insecure
CIM	OE2935R	fumC	fumarate hydratase (EC 4.2.1.2)	VNG1356G	4,6	49585	trusted
CIM	OE3177F	pyc	pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1)	VNG1532G	4,3	65805	trusted
CIM	OE3195F	sucC	succinate--CoA ligase (ADP-forming) (EC 6.2.1.5) beta chain	VNG1541G	4,1	40778	trusted
CIM	OE3196F	sucD	succinate--CoA ligase (ADP-forming) (EC 6.2.1.5) alpha chain	VNG1542G	4,1	29423	insecure
CIM	OE3308F	mdh	malate dehydrogenase (oxaloacetate decarboxylating) (EC 1.1.1.40)	VNG1624G	4,3	80163	trusted
CIM	OE3563R	adh4	alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	VNG1821G	5,1	36727	trusted
CIM	OE3634F	icd	isocitrate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> ) (EC 1.1.1.42)	VNG1873G	4,1	46297	trusted
CIM	OE3762R	glpK	glycerol kinase (EC 2.7.1.30)	VNG1967G	4,3	55763	insecure
CIM	OE3763F	gpdA2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.99.5) chain A	VNG1969G	4,6	61344	trusted
CIM	OE3764F	gpdB	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.99.5) chain B	VNG1971G	4,5	43934	trusted
CIM	OE3792F	pgi	glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9)	VNG1992G	4,3	44201	trusted
CIM	OE3934R	citZ	citrate (si)-synthase (EC 4.1.3.7)	VNG2102G	4,4	40722	trusted
CIM	OE4185F	rpi	ribose-5-phosphate isomerase (EC 5.3.1.6)	VNG2272G	4,4	22577	insecure
CIM	OE4190F	pmm	probable phosphohexomutase (EC 5.4.2.-)	VNG2276G	4,3	47077	insecure
CIM	OE4323F	mdhA	malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	VNG2367G	4,1	32235	manual
CIM	OE4613F	can	aconitate hydratase (EC 4.2.1.3)	VNG2574G	4,3	71060	trusted
CIM	OE4674F	adh2	alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	VNG2617G	4,3	36226	trusted
COM	OE1139F	moaE	probable molybdopterin converting factor chain E	VNG0081G	4,6	28165	trusted
COM	OE1143R	moeA2	probable molybdenum cofactor biosynthesis protein moeA2	VNG0086G	4,5	64206	insecure
COM	OE1146R	moeA1	probable molybdenum cofactor biosynthesis protein moeA 1	VNG0090G	4,9	41951	trusted
COM	OE1615R	folCP	folylpolyglutamate synthase (EC 6.3.2.17) / dihydropteroate synthase (EC 2.5.1.15)	VNG0412G	4,4	85899	trusted
COM	OE1946R	ribE, risB	riboflavin synthase (EC 2.5.1.9) beta chain (6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase)	VNG0630G	4,4	13702	manual
COM	OE1987F	birA2	bifunctional protein birA2 (biotin--[acetyl-CoA-carboxylase] ligase (EC 6.3.4.15) / biotin operon repressor)	VNG0664G	5,2	29091	trusted
COM	OE2057F	thiC	thiamin biosynthesis protein thiC	VNG0715G	4,3	51398	trusted
COM	OE2555R	menE	probable acid--CoA ligase (EC 6.2.1.-)	VNG1073G	4,5	50396	trusted

			menE				
COM	OE2558R	menC	probable O-succinylbenzoate-CoA synthase (OSB synthase) (4-(2'-carboxyphenyl)-4-oxybutyric acid synthase)	VNG1074G	4,5	33259	insecure
COM	OE2561R	menB	naphthoate synthase (EC 4.1.3.36)	VNG1079G	4,5	33172	trusted
COM	OE2563R	menD	2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase (menaquinone-specific)	VNG1081G	4,9	60169	trusted
COM	OE2566R	menF	isochorismate synthase (EC 5.4.99.6)	VNG1083G	4,6	46010	trusted
COM	OE2697R	pqqE2	probable coenzyme PQQ synthesis protein E	VNG1184G	4,4	43859	trusted
COM	OE3186F	birA1	bifunctional protein birA1 (biotin--[acetyl-CoA-carboxylase] ligase (EC 6.3.4.15) / biotin operon repressor)	-	5,5	32936	insecure
COM	OE3207F	cbiT, cobL2	probable precorrin-8W decarboxylase (EC 1.-.-.-)	VNG1550G	4,7	19767	trusted
COM	OE3209F	cbiL, cobI	probable precorrin-2 C20-methyltransferase (EC 2.1.1.130)	VNG1551G	4,6	25041	trusted
COM	OE3212F	cbiF, cobM	precorrin-4 C11-methyltransferase (EC 2.1.1.133)	VNG1553G	4,2	30502	insecure
COM	OE3214F	cbiH1, cobJ1	precorrin-3B C17-methyltransferase (EC 2.1.1.131) 1	VNG1555G	4,5	29664	insecure
COM	OE3216F	cbiH2, cobJ2	precorrin-3B C17-methyltransferase (EC 2.1.1.131) 2	VNG1557G	4,1	35110	insecure
COM	OE3230F	cobN	CobN protein (probable cobalt chelatase) (EC 4.99.1.-) (cobN in PSEDE)	VNG1566G	4,2	140672	trusted
COM	OE3237F	cbiC, cobH	precorrin-8X methylmutase (EC 5.4.1.2)	VNG1567G	4,6	24621	trusted
COM	OE3238F	cbiE, cobL1	probable precorrin-6Y C5,15-methyltransferase (decarboxylating) (EC 2.1.1.132)	VNG1568G	4,5	26283	insecure
COM	OE3243F	cbiA, cobB	cobyric acid a,c-diamide synthase (EC -)	VNG1573G	4,5	45489	trusted
COM	OE3246F	cbiP, cobQ	cobyric acid synthase (EC -)	VNG1576G	4,7	52319	trusted
COM	OE3259F	cobC	cobC protein (adenosylcobinamide synthesis)	VNG1582G	5,2	35486	trusted
COM	OE3498R	cysG1	probable siroheme synthase (probable precorrin-2 oxidase (EC 1.-.-.-) and/or probable ferrochelatase (EC 4.99.1.-)) (N-terminal domain homology to multifunctional siroheme synthase CysG of Escherichia coli)	VNG1775C	5,8	22668	insecure
COM	OE3500R	nirH	probable heme biosynthesis protein nirH/G (nirL/nirD homolog)	VNG1776G	4,5	39307	trusted
COM	OE3524F	pyroA	pyridoxine biosynthesis protein	VNG1793C	4,8	32733	trusted
COM	OE3533F	hemY	probable protoporphyrinogen oxidase (EC 1.3.3.4)	VNG1795C	4,4	48291	insecure
COM	OE3646F	nadB	L-aspartate oxidase (EC 1.4.3.16) (quinolinate synthetase B, part of quinolinate synthetase complex)	VNG1883G	4,5	53239	trusted
COM	OE3689R	nirD	probable heme biosynthesis protein nirD/L (nirH/nirG homolog)	VNG1911G	4,4	38595	insecure
COM	OE3818F	thiL	probable thiamin-phosphate kinase (EC 2.7.4.16)	VNG2011G	4,3	28857	trusted
COM	OE3843F	nadE	NAD <sup>+</sup> synthase (EC 6.3.1.5)	VNG2031G	4,4	28400	insecure
COM	OE3963R	ribB	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase (EC 5.4.99.-)	VNG2125G	4,8	22942	trusted

COM	OE4262F	hemB	porphobilinogen synthase (EC 4.2.1.24)	VNG2322G	4,4	35381	trusted
COM	OE4268F	hemL	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (EC 5.4.3.8)	VNG2326G	4,8	47627	trusted
COM	OE4276F	hemC	hydroxymethylbilane synthase (EC 4.3.1.8)	VNG2330G	4,4	42806	trusted
COM	OE4651F	thi1	thiamine biosynthesis protein (thiazole biosynthetic enzyme)	VNG2604G	4,2	32679	trusted
COM	OE4654F	thiD	phosphomethylpyrimidine kinase (EC 2.7.4.7)	VNG2606G	4,4	45004	trusted
CP	OE1275F	psmA	proteasome alpha chain	VNG0166G	4,3	27325	trusted
CP	OE1319R	ftsZ2	cell division protein ftsZ2	VNG0192G	4,7	39249	trusted
CP	OE1414R	ftsZ4	cell division protein ftsZ4	VNG0265G	4,4	37428	trusted
CP	OE1559R	ftsZ1	cell division protein ftsZ1	VNG0376G	4,1	41176	trusted
CP	OE1765R	pan1	probable proteasome regulatory chain (probable proteasome-activating nucleotidase PAN)	VNG0510G	4,6	48201	trusted
CP	OE2104R	prkA1	probable protein kinase prkA (EC 2.7.1.-) (serine kinase)	VNG0749G	4,4	78724	trusted
CP	OE3143R	-	tetrahedral aminopeptidase	VNG1498G	4,4	36239	trusted
CP	OE3541R	hsp1	probable heat shock protein	VNG1801G	4,2	18530	trusted
CP	OE3693F	ppiA	peptidylprolyl isomerase (EC 5.2.1.8)	VNG1914G	4,1	19342	insecure
CP	OE3718F	ftsZ3	cell division protein	VNG1933G	4,3	42039	trusted
CP	OE3925R	cctB	thermosome beta chain	VNG2096G	4,1	58777	trusted
CP	OE4122R	cctA	thermosome alpha chain	VNG2226G	4,1	60862	trusted
CP	OE5127F	gvpC2	gas-vesicle protein gvpC2	VNG6242G	4,3	31239	trusted
CP	OE5142F	ftsZ5	cell division protein ftsZ5	VNG6260G	4,3	37740	trusted
EM	OE1391R	hepG	halocyanin hepG	VNG0249G	4,2	82112	trusted
EM	OE1876R	petA	probable menaquinol--cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.-) (cytochrome bc complex) Rieske iron-sulfur protein (ubiquinol--cytochrome-c reductase (cytochrome bc1 complex) Rieske iron-sulfur protein homolog)	VNG0584H	4,6	29989	trusted
EM	OE1954F	nuoB	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain B	VNG0636G	4,9	26296	trusted
EM	OE1956F	nuoCD	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain CD	VNG0637G	4,3	63429	trusted
EM	OE1958F	nuoI	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain I	VNG0640G	4,6	17545	insecure
EM	OE3978R	atpD	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain D.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	VNG2135G	4,6	25192	trusted
EM	OE3984R	atpB	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain B.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	VNG2138G	4,1	51946	trusted
EM	OE3985R	atpA	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain A.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	VNG2139G	4,1	64217	trusted
EM	OE3987R	atpC	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain C.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	VNG2141G	4,3	39137	trusted
EM	OE4007F	etfA	electron transfer flavoprotein alpha chain	VNG2151G	4,1	33449	trusted
EM	OE4217R	fdx, fer2	ferredoxin (2Fe-2S)	VNG2293G	3,8	14420	manual
LIP	OE1190F	rdh2	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (cis-retinol dehydrogenase homolog)	VNG0115G	4,1	27754	trusted
LIP	OE1271F	alkK1	probable fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.-)	VNG0162G	4,4	59826	trusted
LIP	OE1426F	pds, zds	probable carotene dehydrogenase (EC	VNG0277G	4,9	58476	trusted



			1.-.-) (phytoene dehydrogenase (EC 1.14.99.-) (phytoene desaturase) (pds(crtP)-type) homolog/ carotene 7,8-desaturase (EC 1.14.99.30) (zeta-carotene desaturase) (zds(crtQ)) homolog)				
LIP	OE1545F	rdh1	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (cis-retinol dehydrogenase homolog)	VNG0364G	4,8	28889	trusted
LIP	OE1555F	acd1	probable acyl/butyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.-)	VNG0371G	4,6	42287	trusted
LIP	OE1721R	mut1A	methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) 1A (N-terminal homology)	VNG0481G	4,2	62057	trusted
LIP	OE1893F	mvd	diphosphomevalonate decarboxylase (4.1.1.33)	VNG0593G	4,8	34728	trusted
LIP	OE1939F	pccB	probable propionyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.3) beta chain or methylmalonyl-CoA decarboxylase (EC 4.1.1.41) beta chain	VNG0623G	4,5	64547	trusted
LIP	OE1972F	mut1B	methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) 1B (N-terminal homology)	VNG0653G	4,3	62125	insecure
LIP	OE2005F	mut2	methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) 2 (C-terminal homology)	VNG0673G	4,5	14593	insecure
LIP	OE2013R	acd4	probable acyl/butyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.-)	VNG0679G	4,5	41146	trusted
LIP	OE2014F	fdfT	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase (EC 2.5.1.21) (squalene synthase)	VNG0680G	4,4	40505	trusted
LIP	OE2138F	acd2	probable acyl/butyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.-)	VNG0775G	4,4	40878	trusted
LIP	OE2645F	mvk	mevalonate kinase (EC 2.7.1.36)	VNG1145G	4,3	33510	trusted
LIP	OE2650F	idsA1	probable trifunctional short-chain (E)-prenyl diphosphate synthase (EC 2.5.1.-) (probable dimethylallyltransferase (EC 2.5.1.1) / probable geranyltranstransferase (EC 2.5.1.10) / probable farnesytranstransferase (EC 2.5.1.29))	VNG1150G	4,3	38003	insecure
LIP	OE2710F	acd3	probable acyl/butyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.-)	VNG1191G	4,5	41109	trusted
LIP	OE2912F	alkK2	probable fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.-)	VNG1339C	4,5	56970	trusted
LIP	OE3123R	acd5	probable acyl/butyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.-)	VNG1482G	4,6	40462	trusted
LIP	OE3175F	mmdA	propionyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.3)	VNG1529G	4,5	56333	trusted
LIP	OE3296F	hmgS	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (EC 4.1.3.5)	VNG1615G	4,6	49144	trusted
LIP	OE3376F	crtB2	geranylgeranyl-diphosphate geranylgeranyltransferase (EC 2.5.1.32) (phytoene synthase)	VNG1680G	5,4	36087	insecure
LIP	OE3381R	crtI1	phytoene dehydrogenase (EC 1.14.99.-) (phytoene desaturase) 1 (alternative EC 1.3.-.-)	VNG1684G	4,4	56273	trusted
LIP	OE3468R	crtI2	phytoene dehydrogenase (EC 1.14.99.-) (phytoene desaturase) 2 (alternative EC 1.3.-.-)	VNG1755G	4,4	56333	trusted
LIP	OE3560F	idi3	probable isopentenyl-diphosphate delta-isomerase (EC 5.3.3.2) 3	VNG1818G	4,6	24564	trusted
LIP	OE3637R	hmgR	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) (EC 1.1.1.34)	VNG1875G	4,2	41086	insecure
LIP	OE3884F	aca	acetyl-CoA C-ac(et)yltransferase (EC	VNG2063G	4,4	40268	trusted

			2.3.1.16) or (EC 2.3.1.9)				
LIP	OE4010F	idsA2	probable multifunctional long-chain (E)-prenyl diphosphate synthase (EC 2.5.1.-)	VNG2153G	4,3	31810	insecure
LIP	OE4500R	acd6	probable acyl/butyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.-)	VNG2499G	4,6	42555	trusted
LIP	OE4695F	phbB	probable acetoacetyl-CoA reductase (EC 1.1.1.36)	VNG2632G	4,6	25854	insecure
LIP	OE6213R	idi1b	isopentenyl-diphosphate delta-isomerase (EC 5.3.3.2) 1	-	4,5	40497	trusted
LIP	OE7093R	idi1a	isopentenyl-diphosphate delta-isomerase (EC 5.3.3.2) 1	H0660	4,5	40520	trusted
MIS	OE1081R	rfbU1	probable glycosyltransferase (EC 2.-.-.)	VNG0051G	5,1	44730	trusted
MIS	OE1158R	rimK	ribosomal protein S6 modification protein rimK	VNG0098G	4,8	30248	insecure
MIS	OE1203F	-	probable creatininase (EC 3.5.2.10)	VNG0124C	4,5	25549	manual
MIS	OE1220F	hstA, hhsA	archaeal histone	VNG0134G	4,9	15919	trusted
MIS	OE1221F	aup	acetylpolyamine aminohydrolase	VNG0136G	4,5	36376	trusted
MIS	OE1309F	pepB1	aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	VNG0186G	4,4	39720	insecure
MIS	OE1358R	moxR	methanol dehydrogenase regulatory protein	VNG0223G	4,7	34014	trusted
MIS	OE1407F	ipp	inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1)	VNG0259G	3,9	20055	manual
MIS	OE1451F	pnm	probable methyltransferase	VNG0294G	5,5	26442	trusted
MIS	OE1462R	-	nicotinamide-nucleotide adenyltransferase (EC 2.7.7.1)	VNG0301C	4,8	19808	trusted
MIS	OE1515R	smc	structural-maintenance-of-chromosomes protein	VNG0342G	4,3	131685	trusted
MIS	OE1613R	-	probable acylaminoacyl-peptidase (EC 3.4.19.1)	VNG0409C	4,5	64919	trusted
MIS	OE1648R	apa	probable bis(5'-nucleosyl)-tetrphosphatase (asymmetrical) (EC 3.6.1.17)	VNG0431G	4,3	16336	trusted
MIS	OE1656F	-	indole-3-acetyl-L-aspartic acid hydrolase (EC 3.5.1.-)	VNG0437C	4,7	44357	trusted
MIS	OE1669F	-	aldehyde dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase homolog)	VNG0446G	4,7	37503	trusted
MIS	OE1684F	nodP	probable sulfate adenyltransferase (EC 2.7.7.4) small chain	VNG0459G	4,1	37269	trusted
MIS	OE1698R	oxr4	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (aldehyde reductase homolog / alcohol dehydrogenase homolog)	VNG0467G	4,1	30698	trusted
MIS	OE1699R	-	oxidoreductase (EC 1.-.-) (geranylgeranyl hydrogenase homolog)	VNG0468C	4,5	45115	trusted
MIS	OE1719R	-	probable oxidoreductase (protochlorophyllide reductase homolog)	VNG0479G	5,5	33719	trusted
MIS	OE1742R	grpE	dnaJ/dnaK ATPase stimulator grpE	VNG0494G	4,1	23846	insecure
MIS	OE1778R	oxr6	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase homolog/ cis-retinol dehydrogenase homolog)	VNG0523G	4,1	26195	trusted
MIS	OE1808F	crtI3	probable phytoene dehydrogenase (EC 1.14.99.-) 3 (alternative EC 1.3.-.)	VNG0542C	5,1	45620	trusted
MIS	OE1906R	-	probable sugar transferase	VNG0600C	4,7	39548	trusted
MIS	OE2011R	scp	probable nonspecific lipid-transfer protein (sterol carrier protein)	VNG0678G	4,5	40541	trusted
MIS	OE2015R	hbd1	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.157)	VNG0681G	4,1	30680	trusted
MIS	OE2065R	pepQ1	probable X-Pro dipeptidase (EC	VNG0723G	4,7	39296	trusted

			3.4.13.9)				
MIS	OE2078R	apbA	2-dehydropantoate 2-reductase (EC 1.1.1.169)	VNG0730C	5,6	31122	trusted
MIS	OE2081R	tpc	RNA 3'-terminal phosphate cyclase (EC 6.5.1.4)	VNG0732G	4,1	34882	trusted
MIS	OE2133R	aldH2	aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.-) (retinal dehydrogenase homolog)	VNG0771G	4,3	55490	trusted
MIS	OE2190R	aldH4	aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.-) (succinate-semialdehyde dehydrogenase homolog)	VNG0808G	4,6	47351	trusted
MIS	OE2243R	cynT	probable carbonate dehydratase (EC 4.2.1.1)	VNG0841G	4,3	25211	trusted
MIS	OE2244R	-	probable methyltransferase	VNG0845C	4,6	28988	trusted
MIS	OE2367F	aldH3	aldehyde dehydrogenase (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homolog, succinate-semialdehyde dehydrogenase homolog)	VNG0937G	4,5	50482	trusted
MIS	OE2372F	acs3	acetate--CoA ligase (ADP-forming) (EC 6.2.1.13) (alpha and beta subunit fusion)	VNG0940G	3,9	73418	trusted
MIS	OE2373F	pta	probable phosphate acetyltransferase (EC 2.3.1.8)	VNG0941C	4,3	37120	trusted
MIS	OE2381R	flaH	fla operon protein flaH	VNG0950G	4,4	28076	trusted
MIS	OE2390R	flaD	flagella accessory protein	VNG0955G	4,8	17699	manual
MIS	OE2451R	-	probable oxidoreductase	VNG0998G	4,5	37364	trusted
MIS	OE2607F	drg	probable GTP-binding protein	VNG1111G	4,8	40312	trusted
MIS	OE2610F	glo1	lactoylglutathione lyase (EC 4.4.1.5)	VNG1114G	4,2	29178	trusted
MIS	OE2613R	-	diphthine synthase (EC 2.1.1.98)	VNG1118G	4,8	27328	trusted
MIS	OE2626R	mrp	probable ATP-binding protein mrp	VNG1131G	4,2	35929	insecure
MIS	OE2674R	ksgA	rRNA (adenine-N6,N6)-dimethyltransferase (EC 2.1.1.-)	VNG1165G	4,5	30263	trusted
MIS	OE2685F	nop56	probable pre-rRNA-processing protein nop56	VNG1174G	5,1	29738	trusted
MIS	OE2689F	fib	fibrillarlin	VNG1176G	4,8	22482	trusted
MIS	OE2703F	pan1	probable copper-containing oxidoreductase	VNG1187G	5,3	41171	trusted
MIS	OE2708R	sod1	superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) 1 (Mn containing, validated)	VNG1190G	4,4	22367	insecure
MIS	OE2763F	pepQ2	X-Pro dipeptidase (EC 3.4.13.9)	VNG1233G	4,3	42445	trusted
MIS	OE2782F	surE	probable stationary-phase survival protein	VNG1241G	4,1	26825	insecure
MIS	OE2827R	hflX2	probable GTP-binding protein	VNG1275G	4,8	49135	trusted
MIS	OE2871F	hbd2	probable 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.157)	VNG1313G	4,2	70021	trusted
MIS	OE2916F	oxr5	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase homolog/ cis-retinol dehydrogenase homolog)	VNG1341G	4,6	25898	trusted
MIS	OE2970R	suhB	probable myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase (EC 3.1.3.25) (IMPase/FBPase (dual activity) homolog)	VNG1379G	4,4	27933	trusted
MIS	OE3085R	rtcB	rtcB protein	VNG1454C	4,6	52878	trusted
MIS	OE3098R	aaa2, cdc48a	AAA-type ATPase (transitional ATPase homolog)	VNG1462G	4,6	70620	insecure
MIS	OE3112R	aaa3, cdc48b	AAA-type ATPase (transitional ATPase homolog)	VNG1472G	4,4	82139	trusted
MIS	OE3119R	panB	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.11)	VNG1478G	4,1	28553	insecure

MIS	OE3168R	-	pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase (acetylornithine transaminase homolog)	VNG1524C	4,6	49462	trusted
MIS	OE3218F	-	cobalamin operon protein	VNG1559H	4,4	24524	insecure
MIS	OE3224F	-	conserved cobalamin operon protein	VNG1562H	4,6	13410	trusted
MIS	OE3297R	msuE	NADH-dependent FMN reductase	VNG1618H	4,3	20014	trusted
MIS	OE3312R	oxr3, aad	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (aryl-alcohol dehydrogenase homolog)	VNG1628G	5,3	35742	trusted
MIS	OE3349F	-	coenzyme F420--quinone oxidoreductase 42K chain homolog	VNG1663C	4,6	42147	trusted
MIS	OE3356F	aaa5, cdc48c, cdcH	AAA-type ATPase (transitional ATPase homolog)	VNG1667G	4,6	81647	trusted
MIS	OE3383R	mch	methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase (EC 3.5.4.27)	VNG1686G	3,9	32133	manual
MIS	OE3458R	-	probable oxidoreductase (versicolorin reductase homolog)	VNG1748C	4,4	22901	trusted
MIS	OE3544F	noxA	probable oxidoreductase (ferredoxin reductase homolog)	VNG1804G	4,3	45709	trusted
MIS	OE3594R	ugpQ	probable glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (EC 3.1.4.46)	VNG1846C	4,5	24837	trusted
MIS	OE3620R	hit2	histidine triad family protein	VNG1864G	4,4	19821	insecure
MIS	OE3623R	map	methionyl aminopeptidase (EC 3.4.11.18)	VNG1866G	4,1	31080	trusted
MIS	OE3691F	trpD2	probable anthranilate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.18)	VNG1912G	4,5	38523	trusted
MIS	OE3717F	nolA	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) 32K chain	VNG1932G	4,7	31645	insecure
MIS	OE3735F	purU	formyltetrahydrofolate deformylase (EC 3.5.1.10)	VNG1946G	4,4	32272	trusted
MIS	OE3805R	pan2	probable proteasome regulatory chain (probable proteasome-activating nucleotidase PAN)	VNG2000G	4,3	45267	trusted
MIS	OE3807R	yjbG	oligoendopeptidase	VNG2001G	4,3	67905	trusted
MIS	OE3808F	-	probable aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	VNG2002H	5,2	45904	trusted
MIS	OE3823F	-	uridine 5'-monophosphate kinase (EC 2.7.4.-)	VNG2015C	4,1	24886	insecure
MIS	OE3834R	gsp	probable oxidoreductase	VNG2023G	4,2	38871	trusted
MIS	OE3836F	yyal	probable acetyltransferase	VNG2025G	5,1	32941	trusted
MIS	OE3863R	ham1	6-N-hydroxylaminopurine sensitivity-controlling protein	VNG2043G	4,4	20146	trusted
MIS	OE3866R	gcp	probable O-sialoglycoprotein endopeptidase (EC 3.4.24.57)	VNG2045G	5,1	56606	trusted
MIS	OE3882R	aaa7	AAA-type ATPase (transitional ATPase homolog)	VNG2062G	4,2	48580	trusted
MIS	OE3891R	lfl2	long-chain-fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.3)	VNG2071G	4,6	70757	trusted
MIS	OE3971R	parA2, minD2	parA domain protein	VNG2130G	4,2	30256	trusted
MIS	OE4021F	oxr1, oxrA	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	VNG2158G	4,2	26397	trusted
MIS	OE4036R	oxr2	probable oxidoreductase (EC 1.-.-) (maleylacetate reductase homolog / alcohol dehydrogenase homolog)	VNG2171G	4,5	40431	trusted
MIS	OE4052F	mcm	DNA helicase (EC 3.6.1.-) mcm (intein-containing)	VNG2181G	4,4	96559	trusted
MIS	OE4094F	pmu1	probable phosphomannomutase	VNG2206G	4,4	47975	trusted
MIS	OE4113F	oxdhA1	2-oxoacid dehydrogenase (EC 1.2.4.4)	VNG2217G	4,2	41467	trusted

			E1 component, alpha subunit 1 (substrate unknown)				
MIS	OE4114F	oxdhB	2-oxoacid dehydrogenase (EC 1.2.4.4) E1 component, beta subunit (substrate unknown)	VNG2218G	4,4	35358	trusted
MIS	OE4115F	dsa	dihydrolipoamide S-acyltransferase (EC 2.3.1.-) (probable E2 component of 2-oxoacid dehydrogenase complex) (substrate of complex unknown)	VNG2219G	4,1	50473	trusted
MIS	OE4157F	trzA	probable chlorohydrolase	VNG2249G	4,3	45091	trusted
MIS	OE4230F	yuxL	probable acylaminoacyl-peptidase (EC 3.4.19.1)	VNG2302G	4,6	72576	trusted
MIS	OE4234R	upp	uracil phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.9) upp	VNG2305C	4,3	24218	trusted
MIS	OE4325F	rad24b	probable DNA helicase	VNG2368G	4,5	83574	trusted
MIS	OE4330F	-	probable phosphoesterase (EC 3.1.-.-)	VNG2372G	4,6	24807	trusted
MIS	OE4356F	tssB	thiosulfate sulfurtransferase (EC 2.8.1.1)	VNG2394G	4,3	27859	trusted
MIS	OE4360R	scm	probable methyltransferase (EC 2.1.1.-) (24-sterol C-methyltransferase homolog)	VNG2398G	4,6	26560	trusted
MIS	OE4398F	hal	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase (EC 4.2.99.10)	VNG2421G	4,5	45757	trusted
MIS	OE4427R	dpsA	DNA-binding protein dpsA	VNG2443G	4,3	20087	trusted
MIS	OE4438F	pepB2	leucyl aminopeptidase (EC 3.4.11.1)	VNG2449G	4,2	40353	trusted
MIS	OE4463F	nifS	probable cysteine desulfurase	VNG2471G	4,2	45106	trusted
MIS	OE4529F	aldH1	aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.-) (retinal dehydrogenase homolog, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homolog)	VNG2513G	4,3	52016	trusted
MIS	OE4571R	pepB3	probable leucyl aminopeptidase (EC 3.4.11.1)	VNG2546G	4,4	39974	trusted
MIS	OE4581F	oxr7	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (phosphogluconate dehydrogenase N-terminal domain homolog)	VNG2553G	4,4	32500	insecure
MIS	OE4630R	-	probable GTP-binding protein	VNG2587C	4,8	23108	insecure
MIS	OE4637R	gbp4	probable GTP-binding protein	VNG2595G	4,3	35566	trusted
MIS	OE4665R	hflX1	GTP-binding protein	VNG2611G	5,2	47190	trusted
MIS	OE4673F	cxp	carboxypeptidase (EC 3.4.-.-)	VNG2616G	4,3	56625	trusted
MIS	OE4677F	uvrD	DNA helicase II	VNG2620G	4,4	69050	trusted
MIS	OE5124R	gvpD2	gas-vesicle operon protein gvpD2 (probable repressor protein)	VNG6240G	5,1	53922	trusted
MIS	OE5128F	gvpN2	gas-vesicle operon protein gvpN2	VNG6244G	5,1	38070	insecure
MIS	OE5139F	lipB	lipoate--protein ligase (EC 6.3.4.-) lipB	VNG6256G	4,6	27039	trusted
MIS	OE5160F	gldA1	glycerol dehydrogenase (EC 1.1.1.6)	VNG6270G	4,2	38468	trusted
MIS	OE5186R	perA	catalase (EC 1.11.1.6) (including: peroxidase (EC 1.11.1.7))	VNG6294G	4,1	80460	insecure
MIS	OE5187R	-	probable hydrolase	VNG6296C	4,5	34593	trusted
MIS	OE5212F	-	protein hp71	VNG6320C	4,5	70891	trusted
NOF	OE1079F	-	conserved protein	VNG0049H	4,6	28835	insecure
NOF	OE1209F	-	dehydratase homolog	VNG0128C	4,6	28497	insecure
NOF	OE1259R	-	protein OE1259R	VNG0153C	3,9	39127	insecure
NOF	OE1263F	-	conserved protein	VNG0156C	4,9	24551	trusted
NOF	OE1291R	-	conserved protein	VNG0176H	4,7	27494	insecure
NOF	OE1298R	-	conserved protein	VNG0179C	4,8	34238	trusted
NOF	OE1302F	lpl	lipoate--protein ligase homolog	VNG0181G	4,4	29535	trusted
NOF	OE1378R	-	conserved protein	VNG0243C	4,8	47539	trusted
NOF	OE1385F	-	conserved protein	VNG0247C	4,3	32202	trusted
NOF	OE1394R	-	conserved protein	VNG0250C	4,6	26328	trusted

NOF	OE1400F	-	conserved protein	VNG0255C	4,4	20968	insecure
NOF	OE1412F	-	conserved protein	VNG0264H	4,2	49548	trusted
NOF	OE1417F	-	conserved protein	VNG0267H	4,6	31633	trusted
NOF	OE1418F	-	conserved protein	VNG0268C	4,7	38550	trusted
NOF	OE1422F	-	conserved protein	VNG0271C	4,7	39672	trusted
NOF	OE1428F	-	protein OE1428F	-	4,5	27608	insecure
NOF	OE1455R	-	conserved protein	VNG0297H	5,2	29664	trusted
NOF	OE1461R	-	conserved protein	VNG0300C	4,5	26577	trusted
NOF	OE1475F	-	conserved protein	VNG0310C	4,3	41462	trusted
NOF	OE1498R	gadD	glutamate decarboxylase homolog	VNG0327G	4,4	37350	trusted
NOF	OE1510F	-	conserved protein	VNG0339H	4,9	25055	trusted
NOF	OE1549F	-	conserved protein	VNG0367H	4,2	12474	manual
NOF	OE1550F	-	conserved protein	VNG0368C	4,6	17767	insecure
NOF	OE1557R	nusG	transcription antitermination protein homolog	VNG0374G	4,3	15799	manual
NOF	OE1560R	-	conserved protein	VNG0378C	4,7	47769	trusted
NOF	OE1579R	-	conserved protein	VNG0391C	4,2	25852	trusted
NOF	OE1584R	-	conserved protein	VNG0394C	4,5	35424	trusted
NOF	OE1592R	epf2	mRNA 3'-end processing factor homolog	VNG0401G	4,8	71866	trusted
NOF	OE1599F	-	dTDPglucose 4,6-dehydratase homolog	VNG0405C	4,5	36144	trusted
NOF	OE1614F	rfbU2	hexosyltransferase homolog	VNG0410G	5,1	39160	trusted
NOF	OE1625F	-	protein OE1625F	VNG0417H	4,6	23369	manual
NOF	OE1626F	-	conserved protein	VNG0419C	4,6	18351	insecure
NOF	OE1629F	-	conserved protein	VNG0421C	5,3	16919	trusted
NOF	OE1636F	pimT2	protein-L-isoaspartate methyltransferase homolog	O-VNG0425G	4,3	25050	trusted
NOF	OE1643F	-	protein OE1643F	VNG0429H	4,6	17709	insecure
NOF	OE1657R	-	geranylgeranyl hydrogenase homolog	VNG0439C	4,4	49283	trusted
NOF	OE1659R	-	conserved protein	VNG0440C	4,2	38630	trusted
NOF	OE1668R	-	protein OE1668R	VNG0447H	4,5	43005	trusted
NOF	OE1672F	pyrE1	orotate phosphoribosyltransferase homolog	VNG0448G	4,2	22155	trusted
NOF	OE1681F	-	phoU protein homolog	VNG0458G	4,5	36532	insecure
NOF	OE1718R	-	conserved protein	VNG0478C	4,3	14635	manual
NOF	OE1722R	-	protein OE1722R	VNG0482H	4,2	21124	trusted
NOF	OE1729R	hat1	protein N-acetyltransferase homolog	VNG0486G	4,8	21396	trusted
NOF	OE1730R	-	conserved protein	VNG0487H	4,3	21060	trusted
NOF	OE1733R	-	protein OE1733R	VNG0488H	4,4	23932	trusted
NOF	OE1738R	-	protein OE1738R	VNG0492H	5,5	24420	trusted
NOF	OE1748R	cna	rRNA methylase homolog	VNG0499G	4,4	32042	trusted
NOF	OE1752F	ppd	3-isopropylmalate dehydratase homolog	VNG0500G	4,4	26297	insecure
NOF	OE1782F	-	conserved protein	VNG0525C	4,3	52919	insecure
NOF	OE1783F	-	conserved protein	VNG0527C	4,2	44925	trusted
NOF	OE1792F	-	conserved protein	VNG0533H	4,1	24631	insecure
NOF	OE1793F	-	conserved protein	VNG0534C	4,9	25513	trusted
NOF	OE1816R	-	3-isopropylmalate dehydratase homolog	VNG0546C	4,1	26158	trusted
NOF	OE1862F	ywaD	aminopeptidase homolog	VNG0575G	4,6	45716	insecure
NOF	OE1918R	-	conserved protein	VNG0608C	4,8	14462	manual
NOF	OE1919R	-	conserved protein	VNG0609C	4,7	23075	trusted
NOF	OE1924F	-	protein OE1924F	VNG0611H	5,3	37541	trusted
NOF	OE1936R	-	conserved protein	VNG0622H	4,6	36470	trusted
NOF	OE1969F	-	CBS domain protein	VNG0651G	4,5	29400	trusted
NOF	OE1974R	-	protein OE1974R	VNG0654C	4,6	27131	trusted
NOF	OE2007F	-	conserved protein	VNG0675C	5,6	32426	trusted
NOF	OE2010R	-	conserved protein	VNG0676C	4,2	13251	manual

NOF	OE2037F	-	endonuclease homolog	VNG0694G	5,1	14646	manual
NOF	OE2041R	-	conserved protein	VNG0698H	4,3	23548	insecure
NOF	OE2049R	-	conserved protein	VNG0705C	5,1	56633	trusted
NOF	OE2055F	-	conserved protein	VNG0711C	4,1	20435	trusted
NOF	OE2060R	-	conserved protein	VNG0718C	4,4	23482	insecure
NOF	OE2067F	-	conserved protein	VNG0725H	4,7	32716	trusted
NOF	OE2071R	-	transcription regulator homolog	VNG0726C	4,7	21879	manual
NOF	OE2088F	kinA2	signal-transducing histidine kinase homolog	VNG0736G	4,4	68231	insecure
NOF	OE2090R	-	protein OE2090R	VNG0738H	4,8	14856	manual
NOF	OE2095R	-	protein OE2095R	VNG0742H	4,8	25860	trusted
NOF	OE2097F	-	conserved protein	VNG0743H	4,4	17976	insecure
NOF	OE2103R	prkA2	protein kinase prkA homolog	VNG0748G	4,5	83291	trusted
NOF	OE2105F	-	protein OE2105F	VNG0750C	4,4	24981	trusted
NOF	OE2117F	-	conserved protein	VNG0755C	4,6	21004	insecure
NOF	OE2118F	tfeA	transcription initiation factor IIE alpha chain homolog	VNG0757G	4,2	20840	insecure
NOF	OE2120F	-	protein OE2120F	VNG0758C	4,5	23885	trusted
NOF	OE2122F	-	conserved protein	VNG0761G	4,4	24625	trusted
NOF	OE2126F	-	conserved protein	VNG0764C	4,8	36222	insecure
NOF	OE2128F	-	phoU protein homolog	VNG0766G	4,6	37067	trusted
NOF	OE2132F	-	protein OE2132F	VNG0769H	4,6	15276	insecure
NOF	OE2141F	-	conserved protein	VNG0779C	4,5	69081	trusted
NOF	OE2149R	-	protein OE2149R	VNG0782H	4,1	45917	insecure
NOF	OE2175F	-	protein OE2175F	VNG0798H	4,6	44790	trusted
NOF	OE2187F	-	conserved protein	VNG0804C	5,2	32471	trusted
NOF	OE2197R	-	conserved protein	VNG0814C	4,4	21199	trusted
NOF	OE2210R	-	conserved protein	VNG0821C	4,4	23048	trusted
NOF	OE2247R	-	protein OE2247R	VNG0847H	4,7	32339	trusted
NOF	OE2252R	-	conserved protein	VNG0851C	4,4	29859	manual
NOF	OE2276F	-	conserved protein	VNG0865C	5,1	24280	trusted
NOF	OE2280R	-	protein OE2280R	VNG0868H	4,6	16857	insecure
NOF	OE2306F	-	conserved protein	VNG0890G	4,8	19013	manual
NOF	OE2307F	-	NADH dehydrogenase homolog	VNG0891G	4,2	41685	trusted
NOF	OE2319R	-	protein OE2319R	VNG0906H	4,4	17328	insecure
NOF	OE2354R	-	protein kinase distant homolog	VNG0928G	4,7	55382	trusted
NOF	OE2357F	-	conserved protein	VNG0930G	4,5	35281	insecure
NOF	OE2359F	-	conserved protein	VNG0932C	4,5	13918	insecure
NOF	OE2360R	-	NADH oxidase homolog	VNG0933G	4,5	40269	trusted
NOF	OE2401F	cpcE	phycocyanin alpha phycocyanobilin lyase homolog	VNG0963G	4,5	42441	trusted
NOF	OE2402F	-	conserved protein	VNG0964C	4,9	31980	trusted
NOF	OE2404R	-	protein OE2404R	VNG0965C	5,1	31091	trusted
NOF	OE2408R	cheD	conserved chemotaxis cluster protein cheD	VNG0967G	4,2	15017	insecure
NOF	OE2428R	-	conserved protein	VNG0983C	4,1	51967	trusted
NOF	OE2472F	-	conserved protein	VNG1011C	4,6	27486	trusted
NOF	OE2492F	-	conserved protein	VNG1021C	4,6	26368	trusted
NOF	OE2497F	-	protein OE2497F	VNG1025H	5,3	30528	manual
NOF	OE2502R	-	conserved protein	VNG1029C	4,2	18996	insecure
NOF	OE2515F	-	conserved protein	-	4,6	23651	trusted
NOF	OE2527F	-	protein OE2527F	VNG1052H	4,2	24682	insecure
NOF	OE2532R	-	conserved protein	VNG1057C	4,5	50542	trusted
NOF	OE2538R	-	conserved protein	VNG1063H	5,3	38511	trusted
NOF	OE2554R	-	conserved protein	VNG1071G	4,3	13357	manual
NOF	OE2569R	-	sulfite oxidase homolog	VNG1084G	4,4	22420	insecure

NOF	OE2577R	-	conserved protein	VNG1088C	4,6	7722	manual
NOF	OE2583R	-	conserved protein	VNG1092C	4,3	41123	trusted
NOF	OE2585R	-	conserved protein	VNG1093C	4,1	31972	insecure
NOF	OE2595F	-	conserved protein	VNG1099C	4,3	30855	trusted
NOF	OE2614F	-	conserved protein	VNG1117C	4,6	35129	trusted
NOF	OE2618R	-	protein OE2618R	VNG1120H	4,7	17770	manual
NOF	OE2642R	-	protein OE2642R	VNG1144H	4,5	30979	trusted
NOF	OE2647F	-	kinase homolog (acetylglutamate kinase homolog)	VNG1148G	4,2	23987	insecure
NOF	OE2648F	-	conserved protein	VNG1149C	5,2	49824	trusted
NOF	OE2676R	-	conserved protein	VNG1168C	4,2	21957	trusted
NOF	OE2720R	-	geranylgeranyl hydrogenase homolog	VNG1198C	4,4	49412	trusted
NOF	OE2740F	-	protein OE2740F	VNG1213C	4,5	28945	insecure
NOF	OE2743F	-	protein OE2743F	VNG1214H	4,8	42655	trusted
NOF	OE2744R	-	conserved protein	VNG1215G	5,7	17452	insecure
NOF	OE2750R	-	protein OE2750R	VNG1220H	4,3	11823	insecure
NOF	OE2755R	-	protein OE2755R	VNG1227H	4,7	26828	trusted
NOF	OE2772F	-	protein OE2772F	VNG1236C	4,6	50650	trusted
NOF	OE2800R	-	conserved protein	VNG1253C	3,8	47597	trusted
NOF	OE2801R	-	conserved protein	VNG1255C	4,2	45222	trusted
NOF	OE2816F	-	protein OE2816F	VNG1268H	5,4	30271	trusted
NOF	OE2821F	-	conserved protein	VNG1272C	4,3	47079	trusted
NOF	OE2828R	-	conserved protein	VNG1276C	4,2	26728	trusted
NOF	OE2844R	trh2	transcription regulator homolog / trkA C-terminal domain protein	VNG1285G	4,6	27688	trusted
NOF	OE2856F	-	conserved protein	VNG1296C	4,6	22282	trusted
NOF	OE2857F	-	S-adenosylmethionine synthetase homolog	VNG1297C	4,4	44108	trusted
NOF	OE2859F	-	protein OE2859F	VNG1300H	4,5	16354	manual
NOF	OE2863R	-	conserved protein	VNG1303C	4,6	79039	trusted
NOF	OE2898R	-	conserved protein	VNG1325C	4,5	27620	trusted
NOF	OE2902F	-	conserved protein	VNG1327G	4,2	20044	insecure
NOF	OE2908R	-	conserved protein	VNG1336C	4,6	15568	manual
NOF	OE2913R	-	conserved protein	VNG1340C	5,1	29226	insecure
NOF	OE2918F	mer	N5,N10-methylenetetrahydromethanopterin reductase homolog	VNG1342G	4,6	36207	trusted
NOF	OE2919R	-	conserved protein	VNG1343C	4,8	24179	trusted
NOF	OE2923F	-	conserved protein	VNG1347C	4,7	26762	trusted
NOF	OE2973F	-	protein OE2973F	VNG1380H	4,7	25032	trusted
NOF	OE2989R	-	conserved protein	VNG1389C	4,5	28807	trusted
NOF	OE2991F	-	transcription factor TFB homolog	VNG1390H	4,6	10879	insecure
NOF	OE2992R	-	conserved protein	-	4,6	17721	manual
NOF	OE2998R	-	conserved protein	VNG1397C	5,2	40007	trusted
NOF	OE3028R	-	protein OE3028R	VNG1412H	4,2	31334	trusted
NOF	OE3030R	-	conserved protein	VNG1413H	4,9	56709	insecure
NOF	OE3040R	-	protein OE3040R	VNG1417H	4,9	24914	trusted
NOF	OE3045F	-	conserved protein	VNG1422H	4,2	31755	trusted
NOF	OE3050F	-	conserved protein	VNG1426H	5,1	10790	manual
NOF	OE3058F	-	conserved protein	VNG1431C	4,8	25955	insecure
NOF	OE3081F	-	conserved protein	VNG1451C	4,5	39382	trusted
NOF	OE3115F	est	3-oxoadipate enol-lactonase homolog	VNG1474G	4,8	28787	insecure
NOF	OE3132F	-	conserved protein	VNG1487H	4,5	16841	trusted
NOF	OE3134F	boa2	transcription regulator bat homolog	VNG1488G	4,7	23419	trusted
NOF	OE3153R	-	conserved protein	VNG1508C	4,5	78771	trusted
NOF	OE3155R	-	conserved protein	VNG1511C	4,1	73209	trusted



NOF	OE3162F	-	conserved protein	VNG1518H	4,1	15396	insecure
NOF	OE3188R	-	conserved protein	VNG1537C	5,3	44227	trusted
NOF	OE3203R	-	conserved protein	VNG1547C	4,7	19853	insecure
NOF	OE3227F	cobT, cobU	nicotinate-nucleotide-- dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase homolog	VNG1564H	5,5	42993	trusted
NOF	OE3284R	-	conserved protein	VNG1609C	4,2	24357	trusted
NOF	OE3286F	-	conserved protein	VNG1610C	4,7	30100	insecure
NOF	OE3299R	-	conserved protein	VNG1616C	4,5	25607	trusted
NOF	OE3322F	-	protein OE3322F	VNG1638H	4,1	39658	manual
NOF	OE3346R	-	conserved protein	VNG1658C	4,4	15260	manual
NOF	OE3355R	-	carbohydrate reductase homolog	VNG1666H	4,3	26927	trusted
NOF	OE3361F	-	protein OE3361F	VNG1672H	4,8	13135	insecure
NOF	OE3371F	-	translation elongation factor aEF-1 alpha chain homolog	VNG1676G	4,7	57060	trusted
NOF	OE3374R	-	protein OE3374R	VNG1679H	5,1	18059	trusted
NOF	OE3386F	-	conserved protein	VNG1688C	5,6	30314	insecure
NOF	OE3439F	-	conserved protein	VNG1735C	4,6	28215	trusted
NOF	OE3444F	-	protein OE3444F	VNG1737H	4,6	33853	trusted
NOF	OE3445F	-	conserved protein	VNG1739G	4,6	30749	trusted
NOF	OE3456F	-	conserved protein	VNG1746C	4,8	24886	trusted
NOF	OE3462R	-	protein OE3462R	VNG1751H	4,4	34288	trusted
NOF	OE3466R	-	conserved protein	VNG1752C	4,1	15568	insecure
NOF	OE3482R	-	conserved protein	VNG1766C	4,4	26168	trusted
NOF	OE3491R	-	heat shock protein homolog	VNG1771C	5,2	12374	insecure
NOF	OE3495R	cad	4a-hydroxytetrahydrobiopterin dehydratase homolog	VNG1773G	4,1	10471	insecure
NOF	OE3517F	-	protein OE3517F	VNG1788C	4,4	34000	trusted
NOF	OE3537R	-	protein OE3537R	VNG1798H	4,3	21403	insecure
NOF	OE3547F	-	protein OE3547F	VNG1807H	4,3	15790	insecure
NOF	OE3578R	-	conserved protein	VNG1833C	4,6	21565	trusted
NOF	OE3585R	-	conserved protein	VNG1839H	4,4	34765	trusted
NOF	OE3586R	-	protein OE3586R	VNG1842H	4,6	32355	trusted
NOF	OE3589F	-	conserved protein	VNG1843C	4,6	24028	insecure
NOF	OE3592F	-	protein OE3592F	VNG1845C	4,6	34319	trusted
NOF	OE3642F	-	conserved protein	VNG1880C	4,5	52857	trusted
NOF	OE3666F	-	conserved protein	VNG1896C	4,7	65270	trusted
NOF	OE3668F	-	conserved protein	VNG1898C	4,3	16153	manual
NOF	OE3669R	-	conserved protein	VNG1899G	4,1	38586	trusted
NOF	OE3671F	-	conserved protein	VNG1900C	4,5	29128	trusted
NOF	OE3673F	-	conserved protein	VNG1901C	4,6	34442	trusted
NOF	OE3678R	-	conserved protein	VNG1903C	4,3	28925	trusted
NOF	OE3681R	-	conserved protein	VNG1905C	4,5	57591	trusted
NOF	OE3710R	trkA6	trkA domain protein	VNG1924G	4,3	24200	trusted
NOF	OE3722F	-	conserved protein	VNG1937C	4,6	40466	trusted
NOF	OE3726F	-	conserved protein	VNG1941C	4,5	39745	trusted
NOF	OE3752R	-	mufT domain protein	VNG1962C	4,2	19858	manual
NOF	OE3770F	-	protein OE3770F	VNG1977H	4,8	35233	trusted
NOF	OE3775R	-	conserved protein	VNG1980C	4,7	20715	trusted
NOF	OE3814R	-	conserved protein	VNG2006C	4,5	21433	trusted
NOF	OE3832F	-	conserved protein	VNG2021C	4,2	55025	trusted
NOF	OE3849F	-	protein OE3849F	-	4,4	23161	insecure
NOF	OE3892R	-	beta-lactamase homolog	VNG2073C	4,6	33175	trusted
NOF	OE3936F	pchB	potassium channel protein homolog	VNG2104G	4,5	43773	trusted
NOF	OE3940F	-	conserved protein	VNG2106G	5,1	33829	trusted
NOF	OE3943R	-	conserved protein	VNG2110C	5,2	44922	trusted

NOF	OE3951R	-	conserved protein	VNG2117C	4,1	25389	insecure
NOF	OE3964R	-	conserved protein	VNG2126C	4,5	25353	trusted
NOF	OE3994F	menG	menaquinone biosynthesis methyltransferase homolog	VNG2147G	5,4	23748	trusted
NOF	OE4023F	-	conserved protein	VNG2160C	4,2	34118	trusted
NOF	OE4025F	-	protein OE4025F	VNG2162C	4,4	21140	trusted
NOF	OE4027F	-	conserved protein	VNG2163H	4,3	15393	insecure
NOF	OE4032R	-	conserved protein	VNG2166C	4,7	37047	trusted
NOF	OE4040R	-	conserved protein	VNG2172C	4,4	39936	insecure
NOF	OE4089R	-	protein OE4089R	VNG2204H	4,3	28755	trusted
NOF	OE4124R	-	conserved protein	VNG2227C	4,9	20051	trusted
NOF	OE4133R	-	conserved protein	VNG2233C	4,5	34305	insecure
NOF	OE4140R	-	conserved protein	VNG2238C	4,6	73949	trusted
NOF	OE4165R	pcn	DNA-directed DNA polymerase sliding clamp homolog	VNG2256G	4,1	26811	trusted
NOF	OE4169F	-	conserved protein	VNG2259C	4,4	54183	trusted
NOF	OE4171R	-	protein OE4171R	VNG2260H	5,7	27224	trusted
NOF	OE4184F	orc6	cell division control protein cdc6 homolog	VNG2271G	4,6	41708	trusted
NOF	OE4196R	-	conserved protein	VNG2281C	4,6	37445	trusted
NOF	OE4222F	-	conserved protein	VNG2296C	4,1	18003	trusted
NOF	OE4239F	-	conserved protein	VNG2310H	5,5	10433	manual
NOF	OE4306F	-	conserved protein	VNG2351C	4,1	31034	trusted
NOF	OE4329F	-	conserved protein	VNG2371C	4,7	20473	insecure
NOF	OE4335F	-	protein OE4335F	VNG2376H	4,2	13687	manual
NOF	OE4355R	tssA	thiosulfate sulfurtransferase homolog	VNG2393G	4,1	31594	trusted
NOF	OE4365F	-	protein OE4365F	VNG2400H	4,6	22515	trusted
NOF	OE4367R	-	protein OE4367R	VNG2403H	4,2	28010	trusted
NOF	OE4377R	gbp3	GTP-binding protein homolog	VNG2410G	4,8	24832	manual
NOF	OE4442F	-	conserved protein	VNG2452C	4,7	20613	insecure
NOF	OE4487F	-	conserved protein	VNG2488C	4,5	31657	trusted
NOF	OE4492F	-	conserved protein	VNG2493C	4,7	28440	insecure
NOF	OE4499F	-	protein OE4499F	VNG2498H	5,1	13797	manual
NOF	OE4504F	-	conserved protein	VNG2502C	5,7	42559	trusted
NOF	OE4537R	-	photosystem I biogenesis protein homolog	VNG2518C	4,4	27467	trusted
NOF	OE4540R	-	conserved protein	VNG2520C	4,5	15708	trusted
NOF	OE4543R	rimI1	protein N-acetyltransferase homolog	VNG2522C	4,1	19823	manual
NOF	OE4549R	-	protein OE4549R	VNG2525H	4,3	18022	manual
NOF	OE4559R	-	conserved protein	VNG2536C	5,1	23646	trusted
NOF	OE4560F	-	protein OE4560F	VNG2534C	4,9	29545	trusted
NOF	OE4562R	entB	N-carbamoylsarcosine amidase homolog	VNG2537G	4,8	20733	trusted
NOF	OE4565F	-	conserved protein	VNG2541C	4,7	41130	trusted
NOF	OE4568R	-	conserved protein	VNG2543C	4,3	22967	manual
NOF	OE4582R	-	conserved protein	VNG2554H	4,1	20238	trusted
NOF	OE4621F	-	ADP-ribose pyrophosphatase homolog	VNG2580C	4,3	21414	insecure
NOF	OE4628R	-	conserved protein	VNG2586C	4,4	26434	insecure
NOF	OE4643R	-	conserved protein	VNG2597C	4,1	15971	insecure
NOF	OE4644R	-	conserved protein	VNG2598G	4,4	21230	trusted
NOF	OE4650R	-	protein OE4650R	VNG2603H	4,6	12974	manual
NOF	OE4655R	-	conserved protein	VNG2607C	4,2	22992	trusted
NOF	OE4659R	-	conserved protein	VNG2608C	4,3	30854	trusted
NOF	OE4663F	-	conserved protein	VNG2610C	5,9	19376	insecure
NOF	OE4667R	-	AAA domain/ferredoxin domain protein	VNG2612G	4,4	67240	trusted
NOF	OE4671R	-	conserved protein	VNG2615C	4,2	67109	trusted
NOF	OE4680F	-	protein OE4680F	VNG2622H	4,7	33798	trusted

NOF	OE4688F	-	conserved protein	VNG2627C	4,5	50001	trusted
NOF	OE4702F	-	geranylgeranyl hydrogenase homolog	VNG2638G	4,9	38765	manual
NOF	OE4705R	-	aminomethyltransferase homolog	VNG2640G	4,8	36195	trusted
NOF	OE4712F	-	protein OE4712F	VNG2643H	4,5	14661	trusted
NOF	OE4713R	-	protein OE4713R	VNG2644C	4,3	12848	manual
NOF	OE4714F	-	protein OE4714F	-	4,1	27244	trusted
NOF	OE4716R	-	conserved protein	VNG2646C	4,1	16682	insecure
NOF	OE4718F	vacB	ribonuclease R homolog	VNG2647G	4,4	48946	insecure
NOF	OE4753R	-	transcription regulator homolog	VNG2675C	4,8	23284	trusted
NOF	OE5021F	parA3	parA domain protein	VNG6153G	4,5	31581	trusted
NOF	OE5048F	-	conserved protein	VNG6171H	4,9	22448	trusted
NOF	OE5051R	trkA2	trkA domain protein	VNG6175G	4,4	25284	insecure
NOF	OE5083R	hsp5	heat shock protein homolog	VNG6201G	4,4	14138	manual
NOF	OE5089F	-	conserved protein	VNG6205C	4,4	14828	insecure
NOF	OE5100R	trkA3	trkA domain protein	VNG6218G	4,4	22801	trusted
NOF	OE5106F	trkA7	trkA domain protein	VNG6223C	4,1	23198	trusted
NOF	OE5130F	trkA4	trkA domain protein	VNG6247G	4,3	24023	insecure
NOF	OE5141R	-	conserved protein	VNG6258C	4,5	35795	insecure
NOF	OE5162D1F	-	conserved protein	-	4,2	12741	insecure
NOF	OE5162R	orc5	cell division control protein cdc6 homolog	VNG6272G	4,7	52912	trusted
NOF	OE5211F	-	conserved protein	VNG6319H	4,9	23545	trusted
NOF	OE5254F	-	conserved protein	-	4,4	16048	trusted
NOF	OE5318F	-	protein OE5318F	-	4,5	32600	trusted
NOF	OE5392F	-	conserved protein	-	5,2	46863	insecure
NOF	OE6008R	parA5	parA domain protein	VNG6337G	4,6	32080	trusted
NOF	OE6021F	-	protein OE6021F	VNG6347H	4,9	20206	insecure
NOF	OE6037R	orc4	cell division control protein cdc6 homolog	VNG6363G	5,1	45694	trusted
NOF	OE6105R	-	conserved protein	VNG6420H	5,3	20288	trusted
NOF	OE6220R	parA6b	parA domain protein	-	4,5	30735	trusted
NOF	OE6230R	-	conserved protein (nonfunctional, N-terminal part, interrupted by ISH2)	-	4,5	25295	trusted
NOF	OE6270R	-	conserved protein	-	4,9	46948	insecure
NOF	OE6278R	-	protein kinase afsK homolog	-	4,2	39532	manual
NOF	OE7011R	-	protein OE7011R	H0073	5,1	87266	trusted
NOF	OE7100R	parA6a	parA domain protein	sojC	4,5	30735	trusted
NOF	OE7110R	-	conserved protein (nonfunctional, N-terminal part, interrupted by ISH2)	-	4,5	25295	trusted
NOF	OE7150R	-	conserved protein	H0928	4,9	46948	insecure
NOF	OE7162R	parA8	parA domain protein	sojD	4,2	28135	insecure
NOF	OE7166F	-	conserved protein	VNG6126H	5,5	10856	insecure
NOF	OE7173F	-	conserved protein	H1027	4,2	18070	insecure
NOF	OE7189F	-	conserved protein	H1232	5,3	10924	manual
NOF	OE7192F	-	protein OE7192F	H1243	4,4	23109	insecure
NOF	OE7215F	-	conserved protein	H1364	4,3	23232	trusted
NOF	OE7216F	-	conserved protein	H1373	5,2	22808	insecure
NOF	OE8006F	-	conserved protein	-	5,5	10842	insecure
NOF	OE8008F	-	conserved protein	H1027	4,2	18070	insecure
NOF	OE8020F	-	conserved protein	-	5,3	10924	insecure
NOF	OE8023F	-	protein OE8023F	-	4,4	23109	insecure
NOF	OE8047F	-	conserved protein	-	4,3	23232	trusted
NUM	OE1363F	guaAa	GMP synthase (glutamine-hydrolyzing) (EC 6.3.5.2), subunit A	VNG0228G	4,1	19557	insecure
NUM	OE1384F	dcd	dCTP deaminase (EC 3.5.4.13)	VNG0245G	4,5	21529	trusted
NUM	OE1620R	purH	phosphoribosylglycinamide	VNG0414G	4,6	58762	trusted

			formyltransferase (EC 2.1.2.2) / phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase (EC 2.1.2.3)				
NUM	OE1623F	purB	adenylosuccinate lyase (EC 4.3.2.2)	VNG0415G	4,7	49496	trusted
NUM	OE1840R	hprt, apt	hypoxanthine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.8)	VNG0559G	4,3	20596	trusted
NUM	OE1856R	dfp	probable pantothenate metabolism flavoprotein	VNG0572G	4,9	40530	trusted
NUM	OE1951F	purK	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (EC 4.1.1.21) carbon dioxide-fixation chain	VNG0632G	4,7	40561	trusted
NUM	OE2274R	purL	phosphoribosylformylglycinamide synthase (EC 6.3.5.3) component II	VNG0864G	4,1	71465	trusted
NUM	OE2292F	purM	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase (EC 6.3.3.1)	VNG0876G	3,9	33550	trusted
NUM	OE2311R	udp2	uridine phosphorylase (EC 2.4.2.3)	VNG0893G	4,4	28967	trusted
NUM	OE2458R	guaB	IMP dehydrogenase (EC 1.1.1.205)	VNG1001G	4,4	52760	trusted
NUM	OE2524R	udg1	UDPglucose 6-dehydrogenase (EC 1.1.1.22)	VNG1048G	4,2	44896	trusted
NUM	OE2579F	purA	adenylosuccinate synthase (EC 6.3.4.4)	VNG1089G	4,4	47108	trusted
NUM	OE2667F	ndk	nucleoside-diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	VNG1160G	4,4	18047	trusted
NUM	OE2805R	trxB2	thioredoxin reductase (NADPH) (EC 1.6.4.5)	VNG1259G	4,2	37751	trusted
NUM	OE2864F	purD	phosphoribosylamine--glycine ligase (EC 6.3.4.13)	VNG1305G	4,2	44693	trusted
NUM	OE3159R	tdk	thymidine kinase (EC 2.7.1.21)	VNG1515G	4,8	21313	insecure
NUM	OE3328R	nrdB2	ribonucleotide reductase (EC 1.17.4.-), B12-dependent	VNG1644G	4,2	115362	trusted
NUM	OE3363F	pyrF, ura3	probable orotidine-5'-phosphate decarboxylase (EC 4.1.1.23)	VNG1673G	4,6	29036	trusted
NUM	OE3429F	cmk	cytidylate kinase (EC 2.7.4.14)	VNG1727G	4,4	21614	insecure
NUM	OE3571R	guaAb	GMP synthase (glutamine-hydrolyzing) (EC 6.3.5.2), subunit B	VNG1829G	4,5	33712	trusted
NUM	OE3572R	pyrG	CTP synthase (EC 6.3.4.2)	VNG1830G	4,5	61117	trusted
NUM	OE3603R	-	uridine phosphorylase (EC 2.4.2.3)	VNG1850G	4,2	26456	insecure
NUM	OE3715R	tmk	dTMP kinase (EC 2.7.4.9)	VNG1929G	4,3	21670	trusted
NUM	OE3724F	purC	phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase (EC 6.3.2.6)	VNG1939G	4,4	37132	trusted
NUM	OE3731R	purQ	phosphoribosylformylglycinamide synthase (EC 6.3.5.3) component I	VNG1945G	4,4	22987	insecure
NUM	OE3953R	pyrE2	orotate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.10)	VNG2118G	4,1	18252	trusted
NUM	OE4085R	prsA	ribose-phosphate pyrophosphokinase (EC 2.7.6.1)	VNG2203G	4,2	28779	trusted
NUM	OE4508R	pyrD	dihydroorotate oxidase (EC 1.3.3.1)	VNG2507G	4,7	36925	trusted
NUM	OE4558R	pyrC	dihydroorotate (EC 3.5.2.3)	VNG2533G	4,6	44816	trusted
NUM	OE5201F	pyrB	aspartate carbamoyltransferase (EC 2.1.3.2) catalytic chain	VNG6309G	4,5	34375	trusted
NUM	OE5202F	pyrI	aspartate carbamoyltransferase (EC 2.1.3.2) regulatory chain	VNG6311G	4,5	16907	manual
REG	OE1268F	boa1	probable transcription regulator boa1	VNG0160G	4,5	86754	insecure
REG	OE2691R	-	probable transcription regulator	VNG1179C	4,5	21127	trusted
REG	OE2776F	lrpA2	probable transcription regulator	VNG1237C	4,2	17302	insecure
REG	OE2969R	asnC	probable transcription regulator	VNG1377G	4,4	16599	trusted
REG	OE3923F	lrp	global transcription regulator	VNG2094G	3,9	16698	insecure
REG	OE5209R	arcR	transcription regulator arcR	VNG6318G	4,9	29037	trusted
RMT	OE1222R	cca	tRNA adenylyltransferase (EC 2.7.7.25),	VNG0137G	4,5	48906	trusted

			CCA-adding				
RMT	OE3430F	truB	tRNA-pseudouridine synthase (EC 5.4.99.12)	VNG1729G	5,5	31833	trusted
RMT	OE3748R	tgtA2	probable archaeosine tRNA-ribosyltransferase (EC 2.4.2.-)	VNG1957G	4,7	63523	trusted
RMT	OE3917F	trm1	tRNA (guanine-N2-)-methyltransferase (EC 2.1.1.32)	VNG2088G	5,1	39833	trusted
RMT	OE4102R	endA	tRNA-intron endonuclease (EC 3.1.27.9)	VNG2210G	4,9	37860	trusted
RMT	OE4141R	-	RNAse Z	VNG2239C	4,7	32655	trusted
RRR	OE1267R	mutL	DNA mismatch repair protein	VNG0159G	4,5	67922	trusted
RRR	OE1304F	xthA	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase (EC 4.2.99.18)	VNG0183G	4,4	29153	insecure
RRR	OE1528F	topA	DNA topoisomerase I	VNG0349G	4,3	91389	trusted
RRR	OE1589F	nthA1	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase (EC 4.2.99.18) endonuclease III	VNG0398G	4,4	27505	trusted
RRR	OE1890R	nthA2	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase (EC 4.2.99.18) endonuclease III	VNG0592G	4,8	25179	trusted
RRR	OE2239F	ssrA	site-specific integrase/recombinase	VNG0838G	6,4	40305	trusted
RRR	OE2301R	top6A	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) (EC 5.99.1.3) VI chain A	VNG0884G	4,3	41441	trusted
RRR	OE2302R	top6B	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) (EC 5.99.1.3) VI chain B	VNG0885G	4,3	85870	trusted
RRR	OE2303F	gyrB	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) (EC 5.99.1.3) chain B	VNG0887G	4,7	70415	trusted
RRR	OE2304F	gyrA	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) (EC 5.99.1.3) chain A	VNG0889G	4,5	90217	trusted
RRR	OE2870R	alkA	DNA-3-methyladenine glycosidase I (EC 3.2.2.20)	VNG1311G	4,8	20881	trusted
RRR	OE2907R	phr2	deoxyribodipyrimidine photo-lyase (EC 4.1.99.3)	VNG1335G	4,9	54835	trusted
RRR	OE3010F	rhl	probable DNA repair helicase	VNG1406G	4,8	66896	trusted
RRR	OE3108F	pri	probable DNA primase	VNG1470G	4,9	47173	trusted
RRR	OE3305F	rfcB	replication factor C large chain	VNG1622G	4,6	51450	trusted
RRR	OE3467R	phr1	deoxyribodipyrimidine photo-lyase (EC 4.1.99.3)	VNG1754G	5,1	51414	trusted
RRR	OE4195F	rfcA	replication factor C small chain	VNG2280G	4,4	35351	trusted
RRR	OE4282F	recJ	single-stranded-DNA-specific exonuclease (EC 3.1.-.-)	VNG2333C	4,4	49282	trusted
RRR	OE4344F	uvrC	excinuclease ABC chain C	VNG2381G	4,9	63707	trusted
RRR	OE4466R	radA1	DNA repair protein	VNG2473G	4,7	37405	trusted
RRR	OE4699F	uvrA	excinuclease ABC chain A	VNG2636G	4,6	107565	trusted
SEC	OE2950R	srp19	signal recognition particle 19K protein	VNG1367G	4,9	10196	manual
SEC	OE4450R	srp54, ffh	signal recognition particle 54K protein	VNG2459G	4,3	50132	trusted
SIG	OE2374R	cheW2	purine-binding chemotaxis protein cheW2	VNG0942G	4,1	14125	insecure
SIG	OE2392R	htr15, htpIX	transducer protein htr15 (htpIX)	VNG0958G	3,9	67338	trusted
SIG	OE2406R	cheR	protein-glutamate O-methyltransferase (EC 2.1.1.80) cheR	VNG0966G	4,5	26938	trusted
SIG	OE2414R	cheJ	taxis protein cheJ	VNG0970G	4,4	20946	trusted
SIG	OE2415R	cheA	taxis sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-) cheA	VNG0971G	4,1	71875	trusted
SIG	OE2416R	cheB	protein-glutamate methyltransferase (EC 3.1.1.61) cheB	VNG0973G	4,2	36473	trusted
SIG	OE2417R	cheY	response regulator cheY	VNG0974G	4,3	13424	trusted
SIG	OE2419R	cheW1	purine-binding chemotaxis protein cheW1	VNG0976G	4,3	19237	trusted

SIG	OE2474R	htrXIII, htr13, htL	transducer protein htrXIII	VNG1013G	4,1	45008	trusted
SIG	OE3150R	hemAT, htr10, htB	transducer protein hemAT	VNG1505G	3,9	52836	trusted
SIG	OE4283R	-	probable signal-transducing histidine kinase	VNG2334C	4,4	141791	trusted
SIG	OE5243F	car, htr11, htrXI	transducer protein car	-	4,1	49092	trusted
TC	OE1279R	rpoeps	DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6) epsilon chain (validated)	VNG0168H	5,9	25955	trusted
TC	OE1399R	tfbG	transcription initiation factor TFB	VNG0254G	5,7	36648	trusted
TC	OE2631F	rpoD	DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6) chain D	VNG1136G	4,1	27360	trusted
TC	OE2637F	rpoN	DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6) chain N	VNG1140G	4,7	7446	manual
TC	OE2678R	rpoF	DNA-directed RNA polymerase (EC 2.67.7.6) chain F	VNG1169C	4,3	13631	insecure
TC	OE4146F	tbpE	TATA-binding transcription initiation factor	VNG2243G	4,4	20294	insecure
TC	OE4739R	rpoA2, rpoC	DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6) chain A" (chain C)	VNG2662G	4,5	43738	trusted
TC	OE4741R	rpoB1	DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6) chain B'	VNG2665G	4,8	67280	trusted
TC	OE4742R	rpoB2	DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6) chain B"	VNG2666G	4,8	59404	trusted
TC	OE7214R	tbpD1	TATA-binding transcription initiation factor	tbpD	4,1	19874	manual
TL	OE1496R	metS	methionine--tRNA ligase (EC 6.1.1.10)	VNG0326G	4,1	76288	trusted
TL	OE1522F	aatB, gatB	aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase (EC 6.3.5.-) chain B	VNG0345G	4,3	54275	insecure
TL	OE1595F	proS	proline--tRNA ligase (EC 6.1.1.15)	VNG0403G	4,5	59319	trusted
TL	OE1687F	aspS	aspartate--tRNA ligase (EC 6.1.1.12)	VNG0461G	4,3	49021	trusted
TL	OE1818R	eif2a	translation initiation factor aIF-2 alpha chain	VNG0549G	4,2	29319	trusted
TL	OE2159R	rps3aR	ribosomal protein S3a.eR	VNG0787G	4,5	23345	trusted
TL	OE2165R	rps15	ribosomal protein S15	VNG0790G	4,9	17697	trusted
TL	OE2283F	aatC, gatC	aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase (EC 6.3.5.-) chain C	VNG0870G	4,1	10116	manual
TL	OE2284F	aatA, gatA	aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase (EC 6.3.5.-) chain A	VNG0872G	4,1	43466	trusted
TL	OE2594F	cysS	cysteine--tRNA ligase (EC 6.1.1.16)	VNG1097G	4,5	54028	trusted
TL	OE2601R	rpl10	ribosomal protein L10	VNG1104G	3,8	37196	insecure
TL	OE2602R	rpl1	ribosomal protein L1	VNG1105G	4,1	23075	trusted
TL	OE2603R	rpl11	ribosomal protein L11	VNG1108G	3,7	17026	manual
TL	OE2628F	rps4	ribosomal protein S4	VNG1133G	4,9	19306	trusted
TL	OE2629F	rps11	ribosomal protein S11	VNG1134G	6,1	13424	insecure
TL	OE2633F	rpl13	ribosomal protein L13	VNG1138G	4,5	15881	manual
TL	OE2641F	rps2	ribosomal protein S2	VNG1143G	4,1	27195	insecure
TL	OE2652F	gltS	glutamate--tRNA ligase (EC 6.1.1.17)	VNG1153G	4,5	65321	trusted
TL	OE2662F	rpl7aR, rpsH6	ribosomal protein L7a.eR/HS6 (isolated from the small ribosomal subunit)	VNG1157G	4,1	12712	manual
TL	OE2809R	-	translation initiation factor aIF-2 beta chain	VNG1262G	4,3	14685	trusted
TL	OE2929R	gatE	glutamyl-tRNA (Gln) amidotransferase (EC 6.3.5.-) chain E	VNG1352G	4,3	66830	trusted
TL	OE3082R	eif2bd	translation initiation factor aIF-2B chain alpha/delta eif2bd	VNG1452G	4,7	30870	trusted
TL	OE3388F	rpl3	ribosomal protein L3	VNG1689G	5,7	36552	trusted

TL	OE3389F	rpl4R	ribosomal protein L4.eR	VNG1690G	4,8	26641	trusted
TL	OE3390F	rpl23	ribosomal protein L23	VNG1691G	4,1	9363	trusted
TL	OE3393F	rps19	ribosomal protein S19	VNG1693G	5,1	15900	trusted
TL	OE3395F	rps3	ribosomal protein S3	VNG1697G	3,9	33054	manual
TL	OE3400F	rps17	ribosomal protein S17	VNG1700G	4,8	11971	insecure
TL	OE3407F	rpl5	ribosomal protein L5	VNG1705G	4,7	19495	manual
TL	OE3410F	rps8	ribosomal protein S8	VNG1707G	4,7	14053	insecure
TL	OE3411F	rpl6	ribosomal protein L6	VNG1709G	4,2	19590	insecure
TL	OE3415F	rps5	ribosomal protein S5	VNG1715G	5,1	23010	trusted
TL	OE3416F	rpl30	ribosomal protein L30	VNG1716G	4,2	16416	insecure
TL	OE3591F	gatD	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase (EC 6.3.5.-) chain D	VNG1844G	4,3	44311	insecure
TL	OE3610R	eif2ba	translation initiation factor aIF-2B chain alpha/delta eif2ba	VNG1853G	4,7	33625	trusted
TL	OE3800F	infB	translation initiation factor IF2	VNG1997G	4,3	64414	trusted
TL	OE3812R	hisS	histidine--tRNA ligase (EC 6.1.1.21)	VNG2005G	4,3	46824	trusted
TL	OE3817R	rps19R	ribosomal protein S19.eR	VNG2010G	4,5	16424	trusted
TL	OE3826F	lysS	lysine--tRNA ligase (EC 6.1.1.6)	VNG2017G	4,4	60889	insecure
TL	OE3869R	rps24R	ribosomal protein S24.eR	VNG2048G	4,9	11478	manual
TL	OE3893F	serS	serine--tRNA ligase (EC 6.1.1.11)	VNG2072G	4,5	51974	trusted
TL	OE4068F	ileS	isoleucine--tRNA ligase (EC 6.1.1.5)	VNG2190G	4,1	119922	trusted
TL	OE4101R	trpS1	tryptophan--tRNA ligase (EC 6.1.1.2)	VNG2208G	4,2	56064	insecure
TL	OE4118R	leuS	leucine--tRNA ligase (EC 6.1.1.4)	VNG2223G	4,2	97567	trusted
TL	OE4132R	trpS2	tryptophan--tRNA ligase (EC 6.1.1.2)	VNG2232G	4,9	41920	trusted
TL	OE4139R	tyrS	tyrosine--tRNA ligase (EC 6.1.1.1)	VNG2237G	4,4	36410	trusted
TL	OE4198F	alaS	alanine--tRNA ligase (EC 6.1.1.7)	VNG2283G	4,3	100798	trusted
TL	OE4307F	glyS	glycine--tRNA ligase (EC 6.1.1.14)	VNG2352G	4,3	63221	trusted
TL	OE4459R	rpl31R	ribosomal protein L31.eR	VNG2467G	4,7	10206	insecure
TL	OE4505F	pheS	phenylalanine--tRNA ligase (EC 6.1.1.20) alpha chain	VNG2504G	4,1	54325	insecure
TL	OE4507F	pheY	phenylalanine--tRNA ligase (EC 6.1.1.20) beta chain	VNG2505G	4,3	62363	trusted
TL	OE4532F	rps6R	ribosomal protein S6.eR	VNG2514G	4,1	13725	insecure
TL	OE4572R	valS	valine--tRNA ligase (EC 6.1.1.9)	VNG2547G	4,1	99246	trusted
TL	OE4720R	rps10	ribosomal protein S10	VNG2648G	4,9	11453	insecure
TL	OE4721R	aef1a, tuf	translation elongation factor aEF-1 alpha chain	VNG2649G	4,4	45478	trusted
TL	OE4729R	aef2, fus	translation elongation factor aEF-2	VNG2654G	4,4	80385	trusted
TL	OE4735R	rps7	ribosomal protein S7	VNG2657G	5,5	22967	trusted
TL	OE5203F	argS	arginine--tRNA ligase (EC 6.1.1.19)	VNG6312G	4,2	74306	trusted
TP	OE1679R	phoX2	probable ABC-type phosphate transport system periplasmic phosphate-binding protein	VNG0457G	4,1	36484	insecure
TP	OE1781F	-	probable ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG0524G	3,9	33834	trusted
TP	OE1994F	-	probable ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG0668C	4,1	30591	trusted
TP	OE2006F	-	probable ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG0674C	4,5	34607	trusted
TP	OE2026F	trp5	ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG0689G	4,4	30830	insecure
TP	OE2316R	rbsA	ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG0901G	4,4	54527	trusted
TP	OE2317R	-	probable ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (membrane lipoprotein tmpC homolog)	VNG0903C	4,2	36432	trusted

TP	OE2358F	acaB2	probable nonspecific lipid-transfer protein (sterol carrier protein)	VNG0931G	4,4	40385	trusted
TP	OE3629R	-	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	VNG1869C	4,6	41700	trusted
TP	OE3910R	hpb	probable ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	VNG2086G	4,1	33687	trusted
TP	OE4301R	ykfD	ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG2343G	4,9	49649	trusted
TP	OE4302R	oppD2	ABC-type oligopeptide transport system ATP-binding protein	VNG2344G	4,4	39569	trusted
TP	OE4305R	dppA	ABC-type dipeptide transport system periplasmic dipeptide-binding protein	VNG2349G	4,4	68944	trusted
TP	OE4317F	oppD1	ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG2363G	4,3	36747	insecure
TP	OE4339R	nosF1	ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG2378G	4,2	31835	trusted
TP	OE4357F	-	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	VNG2395C	4,3	38642	trusted
TP	OE4359F	cysA	ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG2397G	4,5	36099	insecure
TP	OE4485R	phoX1	probable ABC-type phosphate transport system periplasmic substrate-binding protein	VNG2486G	4,1	40399	trusted
TP	OE4550F	dppF	ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG2526G	4,1	101024	insecure
TP	OE4551F	dppD	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	VNG2527G	4,2	61874	trusted
TP	OE5146R	zurA	ABC-type transport system ATP-binding protein	VNG6264G	4,7	27690	trusted
TP	OE5147R	yedH	probable ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	VNG6265G	4,5	38328	trusted
TP	OE5307F	-	ABC-type transport system ATP-binding protein	-	4,5	31435	insecure



## 7.6 Identifizierte Proteine der LC-MS/MS-Analyse

Die identifizierten Proteine der im Abschnitt 3.3.12.2 beschriebenen Auftrennung sind in diesem Abschnitt aufgelistet, die Sortierung erfolgte nach Anzahl der Helices. Proteine mit einem \* (TM-Spalte) besitzen einen (über das LAGC-Motiv vorhergesagten) Lipidanker, die Abkürzungen der vorhergesagten Funktion entsprechen denen in Abschnitt 7.5.

OE-CODE	TM	TM/ kDa	GRA VY	MW	pI	Protein-Name	Gen	FC	DaSarma- Code	Status
OE1841R	16	0,26	0,83	61994	7,3	HyfD / HycC / NADH dehydrogenase (ubiquinone) chain L homolog	-	NOF	VNG0560C	insecure
OE2548F	16	0,14	0,2	114576	4,7	probable transmembrane oligosaccharyl transferase	tot	MIS	VNG1068G	trusted
OE1965F	15	0,27	1,2	55340	5,4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain M	nuoM	EM	VNG0647G	insecure
OE5157F	15	0,22	0,76	67061	4,9	conserved protein	-	NOF	VNG6268C	trusted
OE1676R	14	0,24	0,93	58030	9,7	probable ABC-type phosphate transport system permease protein	pstA2	TP	VNG0453G	questionable
OE1967F	14	0,27	0,92	51234	4,5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain N	nuoN	EM	VNG0648G	insecure
OE3171F	13	0,28	0,99	46466	4,4	probable sodium-dependent transport protein	trp6	TP	VNG1526G	insecure
OE4070R	13	0,21	0,7	61480	9,7	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I	cox1B , coxA2	EM	VNG2193G	trusted
OE1288F	13	0,16	0,54	83046	4,5	probable cationic amino acid transport protein	cat1	TP	VNG0174G	insecure
OE1979R	13	0,20	0,52	65282	5,3	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I	cox1A , coxA1	EM	VNG0657G	trusted
OE4480R	12	0,23	0,9	53123	7,7	probable ABC-type phosphate transport system permease protein	pstA1	TP	VNG2483G	insecure
OE2076F	12	0,23	0,73	52298	8,7	conserved protein	-	NOF	VNG0727C	insecure
OE2322F	12	0,20	0,64	58703	4,5	Na <sup>+</sup> /proline symport protein	putP	TP	VNG0908G	insecure
OE1640F	11	0,26	0,93	42593	4,4	transport protein homolog	-	CHY	VNG0427G	questionable
OE1653R	11	0,20	0,81	53913	4,5	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter homolog	nhaC1	NOF	VNG0436G	trusted
OE5204R	11	0,22	0,74	50506	4,1	probable arginine/ornithin-exchanging protein	nhaC3	TP	VNG6313G	trusted
OE3118F	11	0,14	0,3	79232	4,8	conserved protein	-	NOF	VNG1476C	insecure
OE7187F	10	0,25	1,1	39514	4,9	conserved protein	-	NOF	H1224	trusted
OE8018F	10	0,25	1,1	39505	4,9	conserved protein	-	NOF	-	trusted

OE3889R	10	0,15	0,59	66517	4,6	probable potassium transport protein kefC	kefC	TP	VNG2068C	trusted
OE3418F	10	0,19	0,57	52802	6,1	protein translocase secY	secY	SEC	VNG1719G	trusted
OE2779F	10	0,13	0,39	76341	5,1	amino acid transport protein (probable phenylalanine transport protein)	pheP	TP	VNG1240G	insecure
OE1101R	9	0,23	0,57	38899	7,8	protein OE1101R	-	NOF	VNG0058H	insecure
OE6185F	9	0,17	0,44	53148	6,1	cytochrome d ubiquinol oxidase (EC 1.10.3.-) chain I	cydA2	EM	-	trusted
OE7065F	9	0,17	0,44	53148	6,1	cytochrome d ubiquinol oxidase (EC 1.10.3.-) chain I	cydA1	EM	cydA	trusted
OE1957F	8	0,22	0,87	37184	5,2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain H	nuoH	EM	VNG0639G	trusted
OE3018F	8	0,20	0,82	39565	5,3	conserved hypothetical protein	-	CHY	VNG1409C	questionable
OE4303R	8	0,14	0,36	56239	5,7	ABC-type transport system permease protein	dppC2	TP	VNG2346G	trusted
OE1534F	7	0,26	0,97	26797	6,3	conserved protein	-	NOF	VNG0354C	insecure
OE1678R	7	0,21	0,85	33022	4,8	probable ABC-type phosphate transport system permease protein	pstC2	TP	VNG0455G	insecure
OE4552F	7	0,19	0,72	37425	8,8	ABC-type transport system permease protein	dppB2	TP	VNG2529G	trusted
OE5200R	7	0,14	0,59	51781	4,6	glutamate/aspartate transport protein	gltP	TP	VNG6308G	questionable
OE3828F	7	0,11	0,46	61947	4,5	conserved protein	-	NOF	VNG2019C	trusted
OE2042F	7	0,08	0,29	87666	4,2	probable copper-transporting ATPase (EC 3.6.1.-)	yvgX	TP	VNG0700G	trusted
OE3991R	7	0,09	0,17	77159	4,3	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain I.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	atpI	EM	VNG2144G	trusted
OE3319R	6	0,26	0,98	22727	9,6	CbiM protein (unassigned function) (probable ABC-type cobalt transport system permease protein 2)	cbiM	TP	VNG1635G	questionable
OE4336R	6	0,21	0,83	28350	9,4	probable ABC-type transport system permease protein	nosY	TP	VNG2377G	trusted
OE3787R	6	0,20	0,72	29981	4,4	preprotein-export translocase chain secF	secF	SEC	VNG1988G	insecure
OE4304R	6	0,15	0,71	39638	8,7	ABC-type transport system permease protein	dppB1	TP	VNG2347G	trusted
OE4483R	6	0,16	0,66	38401	9,5	probable ABC-type phosphate transport system permease	pstC1	TP	VNG2484G	questionable

						protein				
OE1582R	6	0,15	0,53	40326	4,7	conserved protein	-	NOF	VNG0393C	trusted
OE3784R	6	0,11	0,22	53443	5,3	preprotein-export translocase chain secD	secD	SEC	VNG1987G	trusted
OE4343R	5	0,22	1,1	22408	5,2	protein OE4343R	-	NOF	VNG2380H	trusted
OE2988R	5	0,18	0,93	27584	7,1	conserved protein	-	NOF	VNG1388H	insecure
OE4267F	5	0,22	0,71	22472	6,8	conserved hem operon protein	-	MIS	VNG2324H	insecure
OE4201R	5	0,15	0,61	33142	4,5	preflagellin peptidase homolog	-	NOF	VNG2285C	trusted
OE4555F	5	0,15	0,6	33435	6,6	ABC-type transport system permease protein	dppC1	TP	VNG2531G	trusted
OE2032F	5	0,16	0,44	31855	5,1	conserved protein	-	NOF	VNG0692C	trusted
OE1874R	5	0,16	0,42	30809	5,9	probable menaquinol--cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.-) (cytochrome bc complex) cytochrome b subunit (plastoquinol--plastocyanin reductase (cyt. b6-f) cyt. b6 subunit/ ubiquinol--cytochrome-c reductase (cyt. bc1) cyt. b subunit (N-term. domain) homolog)	petB	EM	VNG0583G	questionable
OE3619R	5	0,16	0,29	31295	4,8	probable cation efflux system membrane protein (zinc/cadmium)	cef	TP	VNG1862G	questionable
OE2930R	5	0,09	0,21	54119	9,2	protein OE2930R	-	NOF	VNG1353C	insecure
OE3167F	5	0,07	-0,06	67275	4,2	transducer protein htrVIII	htrVII I, htr8, htK	SIG	VNG1523G	trusted
OE1849R	4	0,22	0,97	18361	5,1	conserved protein	-	NOF	VNG0566C	insecure
OE2944F	4	0,29	0,95	13865	8,3	protein OE2944F	-	NOF	VNG1362H	insecure
OE2503R	4	0,20	0,84	20228	5,5	conserved hypothetical protein	-	CHY	VNG1030G	questionable
OE2508F	4	0,26	0,8	15239	5,5	protein OE2508F	-	NOF	VNG1034H	trusted
OE4272F	4	0,21	0,75	18614	10,3	conserved hem operon protein	-	MIS	VNG2329C	trusted
OE4384R	4	0,22	0,66	18366	6,1	conserved protein	-	NOF	VNG2413H	trusted
OE1708R	4	0,27	0,5	15085	7,8	protein OE1708R	-	NOF	VNG0472H	trusted
OE1005F	4	0,10	0,22	38994	4,7	conserved protein	-	NOF	VNG0003C	insecure
OE3126F	4	0,09	0,14	44465	6,4	protein OE3126F	-	NOF	VNG1484H	trusted
OE1202F	4	0,06	-0,07	71318	4,5	probable ABC-type transport system ATP-binding/permease protein	trp1	TP	VNG0123G	insecure
OE3427F	4	0,12	-0,08	32193	4,1	conserved protein	-	NOF	VNG1726G	trusted

OE1872R	4	0,14	-0,11	28597	5,8	probable menaquinol--cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.-) (cytochrome bc complex) cytochrome b/c subunit (plastoquinol--plastocyanin reductase (cytochrome b6-f complex) 17K polypeptide (subunit 4) homolog)	petD	EM	VNG0582C	trusted
OE1539F	4	0,13	-0,11	31466	4,3	hypothetical protein	-	HY	VNG0359C	questionable
OE1963F	3	0,27	1,3	10958	4,9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain K	nuoK	EM	VNG0643G	insecure
OE1982R	3	0,22	0,84	13382	4,9	conserved protein	-	NOF	VNG0660H	insecure
OE1847R	3	0,24	0,77	12663	5,6	conserved protein	-	NOF	VNG0565C	trusted
OE2868R	3	0,20	0,77	15166	5,8	succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) chain C (cytochrome b-556)	sdhC	CIM	VNG1310G	insecure
OE2867R	3	0,23	0,64	13081	10,4	succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) chain D (membrane anchor protein)	sdhD	CIM	VNG1309G	trusted
OE4271F	3	0,17	0,62	17648	4,7	conserved hem operon protein	-	MIS	VNG2328H	insecure
OE1953F	3	0,20	0,55	15145	8,1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain A	nuoA	EM	VNG0635G	questionable
OE1492R	3	0,18	0,52	17077	4,3	hypothetical protein	-	HY	VNG0322H	questionable
OE2672R	3	0,09	0,22	32712	5,1	conserved hypothetical protein	-	CHY	VNG1164C	questionable
OE5193F	3	0,06	0,18	49318	4,6	hemolysin homolog	-	NOF	VNG6302C	trusted
OE2764R	3	0,06	-0,05	48530	5,1	signal-transducing histidine kinase homolog	-	NOF	VNG1234C	trusted
OE4073R	3	0,07	-0,18	43802	4,2	halocyanin hcpB	hcpB	EM	VNG2196G	trusted
OE3989R	2	0,22	1,8	8912	4,1	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain K.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	atpK	EM	VNG2143G	questionable
OE2934R	2	0,12	0,39	17010	6,8	conserved protein	-	NOF	VNG1355H	trusted
OE3958F	2	0,09	0,18	22632	4,1	conserved protein	-	NOF	VNG2121C	insecure
OE3919F	2	0,13	0,14	15490	6,3	protein OE3919F	-	NOF	VNG2089H	insecure
OE1878R	2	0,14	0,13	14679	5,8	protein OE1878R	-	NOF	VNG0585H	trusted
OE2528R	2	0,06	0,08	32749	4,8	glycosyltransferase homolog	gtl	NOF	VNG1053G	trusted
OE1501F	2	0,15	0,07	13721	5,1	protein OE1501F	-	NOF	VNG0331H	trusted
OE2121F	2	0,08	0,05	25336	5,6	protein OE2121F	-	NOF	VNG0759H	trusted
OE4238R	2	0,04	0,03	49640	4,2	hemolysin homolog	hlp	NOF	VNG2308G	insecure

OE3069R	2	0,15	-0,03	12933	4,4	conserved hypothetical protein	-	CHY	VNG1440H	questionable
OE1001F	2	0,05	-0,04	40570	4,6	conserved protein	-	NOF	VNG0001H	trusted
OE1882R	2	0,06	-0,1	32143	3,9	hypothetical protein	-	HY	VNG0587H	questionable
OE3490R	2	0,03	-0,16	59368	4,4	conserved protein	-	NOF	VNG1770C	trusted
OE2189R	2	0,02	-0,19	82067	4,2	transducer protein htr4 (htrVI)	htr4, htrVI, htrD	SIG	VNG0806G	trusted
OE4757R	2	0,03	-0,23	64669	4,9	protein OE4757R	-	NOF	VNG2678H	trusted
OE3474R	2	0,02	-0,24	85210	4,1	transducer protein cosT	cosT, htr5, htrIV, htrF	SIG	VNG1760G	trusted
OE2168R	2	0,02	-0,27	83913	4,1	transducer protein htrVI	htrVI, htr6, htrJ	SIG	VNG0793G	trusted
OE3116F	2	0,03	-0,28	57742	4,3	protein OE3116F	-	NOF	VNG1475C	trusted
OE1929R	2	0,02	-0,28	84891	4,1	transducer protein htr16	htr16	SIG	VNG0614G	insecure
OE3719F	2	0,07	-0,37	28300	4,1	protein OE3719F	-	NOF	VNG1934H	trusted
OE2444F	2	0,07	-0,4	30293	4,6	protein OE2444F	-	NOF	VNG0993H	trusted
OE4759F	2	0,02	-0,55	89742	3,6	cell surface glycoprotein precursor	csg	CE	VNG2679G	trusted
OE3612R	1*	0,02	0,04	41204	4,3	chemotactic signal transduction system periplasmic substrate-binding protein basB	basB	SIG	VNG1857C	trusted
OE3190F	1*	0,03	-0,32	28866	4,5	protein OE3190F	-	NOF	VNG1538H	trusted
OE5030R	1*	0,07	-0,39	14942	4,8	protein OE5030R	-	NOF	VNG6157H	trusted
OE1804R	1	0,06	0,15	17718	4,9	protein OE1804R	-	NOF	VNG0539C	trusted
OE1410F	1	0,03	0,09	38873	4,6	conserved protein	-	NOF	VNG0262C	trusted
OE4050F	1	0,06	0,07	17267	4,9	conserved protein	-	NOF	VNG2179H	insecure
OE2951R	1	0,03	0,06	37712	4,8	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	-	TP	VNG1369G	questionable
OE1934R	1	0,03	-0,01	30539	5,1	proteinase IV (EC 3.4.-.-)	edp	MIS	VNG0620G	trusted
OE3343R	1	0,03	-0,01	34290	4,4	protein OE3343R	-	NOF	VNG1657H	trusted
OE2469F	1	0,05	-0,03	20606	4,4	flagellin A1 precursor	flgA1	MOT	VNG1008G	trusted
OE2397F	1	0,05	-0,04	20437	4,5	flagellin B1 precursor	flgB1	MOT	VNG0960G	trusted
OE2525R	1	0,08	-0,04	12234	6,3	protein OE2525R	-	NOF	VNG1050H	trusted
OE2398F	1	0,05	-0,05	20665	4,1	flagellin B2 precursor	flgB2	MOT	VNG0961G	trusted
OE4633F	1	0,04	-0,05	24800	4,5	conserved protein	-	NOF	VNG2589C	trusted
OE2399F	1	0,05	-0,07	20503	4,8	flagellin B3 precursor	flgB3	MOT	VNG0962G	trusted
OE2470F	1	0,05	-0,09	20588	4,8	flagellin A2 precursor	flgA2	MOT	VNG1009G	trusted
OE4071R	1	0,05	-0,1	19720	4,5	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain II	cox2B, coxB2	EM	VNG2195G	insecure
OE1133F	1	0,03	-0,12	39089	4,2	protein OE1133F	-	NOF	VNG0077H	trusted
OE2186R	1	0,10	-0,13	9934	4,1	conserved protein	-	NOF	VNG0801C	trusted
OE3481R	1	0,01	-0,16	79027	4,1	transducer protein htrII	htrII, htr2	SIG	VNG1765G	trusted
OE2791R	1	0,03	-0,17	37532	3,9	protein OE2791R	-	NOF	VNG1250H	trusted
OE1536R	1	0,02	-0,19	65640	3,8	transducer protein	htr14	SIG	VNG0355G	trusted

						htr14				
OE3292F	1	0,01	-0,19	68520	4,4	protein OE3292F	-	NOF	VNG1613H	insecure
OE5134F	1	0,09	-0,21	11218	6,2	protein OE5134F	-	NOF	VNG6251H	trusted
OE3611R	1	0,01	-0,24	84816	3,9	transducer protein basT	basT, htr3, htC	SIG	VNG1856G	trusted
OE2443R	1	0,04	-0,24	25622	5,1	protein OE2443R	-	NOF	VNG0992H	trusted
OE2547R	1	0,03	-0,24	36754	4,7	probable glycosyltransferase (EC 2.-.-.)	exoM	MIS	VNG1067G	questionable
OE1490R	1	0,02	-0,34	42654	4,2	conserved protein	-	NOF	VNG0321G	trusted
OE4583F	1	0,05	-0,36	20270	3,8	ferredoxin (2Fe-2S)	fer5	EM	VNG2555C	trusted
OE5091F	1	0,03	-0,38	31269	4,8	conserved protein	-	NOF	VNG6208C	trusted
OE1465F	1	0,01	-0,39	76011	4,6	endopeptidase La (EC 3.4.21.53)	lon	MIS	VNG0303G	trusted
OE3347F	1	0,02	-0,4	56659	4,1	transducer protein htrI	htrI, htr1	SIG	VNG1659G	trusted
OE4093F	1	0,06	-0,44	16053	4,7	protein OE4093F	-	NOF	VNG2205H	trusted
OE1806R	0*	0,00	-0,12	33058	4,1	probable periplasmic protein	-	CE	VNG0540G	trusted
OE3910R	0*	0,00	-0,18	33687	4,1	probable ABC-type transport system periplasmic substrate- binding protein	hpb	TP	VNG2086G	trusted
OE1391R	0*	0,00	-0,19	82112	4,2	halocyanin hcpG	hcpG	EM	VNG0249G	trusted
OE4576F	0*	0,00	-0,2	40545	4,1	probable ABC-type transport system substrate-binding protein	-	TP	VNG2549C	trusted
OE3629R	0*	0,00	-0,22	41700	4,6	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	-	TP	VNG1869C	trusted
OE4197F	0*	0,00	-0,23	24697	4,2	conserved protein	-	NOF	VNG2282C	trusted
OE2317R	0*	0,00	-0,27	36432	4,2	probable ABC-type transport system periplasmic substrate- binding protein (membrane lipoprotein tmpC homolog)	-	TP	VNG0903C	trusted
OE2348R	0*	0,00	-0,27	41075	4,3	probable ABC-type transport system periplasmic substrate- binding protein	-	TP	VNG0924G	trusted
OE3476R	0*	0,00	-0,32	35610	4,3	chemotactic signal transduction system periplasmic substrate- binding protein cosB	cosB, proX	SIG	VNG1762G	insecure
OE1254R	0*	0,00	-0,34	24273	4,7	conserved protein	-	NOF	VNG0152G	trusted
OE5147R	0*	0,00	-0,38	38328	4,5	probable ABC-type transport system periplasmic substrate- binding protein	ycdH	TP	VNG6265G	trusted
OE4357F	0*	0,00	-0,39	38642	4,3	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	-	TP	VNG2395C	trusted

OE1679R	0*	0,00	-0,41	36484	4,1	probable ABC-type phosphate transport system periplasmic phosphate-binding protein	phoX2	TP	VNG0457G	trusted
OE2171F	0*	0,00	-0,42	17373	4,1	halocyanin hcpC	hcpC	EM	VNG0795G	questionable
OE4551F	0*	0,00	-0,45	61874	4,2	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	dppD	TP	VNG2527G	trusted
OE2703F	0*	0,00	-0,49	41171	5,3	probable copper-containing oxidoreductase	panI	MIS	VNG1187G	questionable
OE4485R	0*	0,00	-0,53	40399	4,1	probable ABC-type phosphate transport system periplasmic substrate-binding protein	phoX1	TP	VNG2486G	trusted
OE4305R	0*	0,00	-0,59	68944	4,4	ABC-type dipeptide transport system periplasmic dipeptide-binding protein	dppA	TP	VNG2349G	trusted
OE4311F	0*	0,00	-0,74	73171	4,7	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	appA	TP	VNG2358G	trusted
OE1738R	0	0,00	0,13	24420	5,5	protein OE1738R	-	NOF	VNG0492H	questionable
OE4408F	0	0,00	0,1	54426	4,3	phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	serA1	AA	VNG2424G	insecure
OE2007F	0	0,00	0,09	32426	5,6	conserved protein	-	NOF	VNG0675C	trusted
OE2481R	0	0,00	0,07	38742	5,2	protein OE2481R	-	NOF	VNG1017H	insecure
OE1854R	0	0,00	0,06	38635	5,1	conserved protein	-	NOF	VNG0571C	trusted
OE4359F	0	0,00	0,01	36099	4,5	ABC-type transport system ATP-binding protein	cysA	TP	VNG2397G	questionable
OE4360A1 F	0	0,00	0,1	23212	5,4	hypothetical protein	-	-	-	questionable
OE5187R	0	0,00	-0,01	34593	4,5	probable hydrolase	-	MIS	VNG6296C	trusted
OE2097F	0	0,00	-0,03	17976	4,4	conserved protein	-	NOF	VNG0743H	questionable
OE4339R	0	0,00	-0,04	31835	4,2	ABC-type transport system ATP-binding protein	nosF1	TP	VNG2378G	trusted
OE2170R	0	0,00	-0,04	38271	4,3	probable periplasmic substrate-binding protein (membrane lipoprotein tmpC homolog)	tmpC	MIS	VNG0794G	trusted
OE1295R	0	0,00	-0,04	34005	4,3	protein OE1295R	-	NOF	VNG0178H	trusted
OE1545F	0	0,00	-0,06	28889	4,8	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (cis-retinol dehydrogenase homolog)	rdh1	LIP	VNG0364G	trusted
OE3764F	0	0,00	-0,07	43934	4,5	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC	gpdB	CIM	VNG1971G	trusted

						1.1.99.5) chain B				
OE3238F	0	0,00	-0,08	26283	4,5	probable precorrin-6Y C5,15-methyltransferase (decarboxylating) (EC 2.1.1.132)	cbiE, cobL1	COM	VNG1568G	insecure
OE2026F	0	0,00	-0,14	30830	4,4	ABC-type transport system ATP-binding protein	trp5	TP	VNG0689G	trusted
OE1808F	0	0,00	-0,14	45620	5,1	probable phytoene dehydrogenase (EC 1.14.99.-) 3 (alternative EC 1.3.-.-)	crtI3	MIS	VNG0542C	trusted
OE3065R	0	0,00	-0,15	33991	4,9	probable dehydrogenase (EC 1.-.-.-) (D-3-phosphoglycerate dehydrogenase homolog / 2-ketogluconate reductase homolog)	serA2	AA	VNG1437G	trusted
OE4114F	0	0,00	-0,16	35358	4,4	2-oxoacid dehydrogenase (EC 1.2.4.-) E1 component beta chain (the substrate is NOT pyruvate or 2-oxoglutarate)	oxdhB	MIS	VNG2218G	trusted
OE2419R	0	0,00	-0,16	19237	4,3	purine-binding chemotaxis protein 1 cheW1	cheW	SIG	VNG0976G	questionable
OE2307F	0	0,00	-0,18	41685	4,2	NADH dehydrogenase homolog	-	NOF	VNG0891G	trusted
OE1134F	0	0,00	-0,18	15330	5,1	protein OE1134F	-	NOF	-	trusted
OE4508R	0	0,00	-0,19	36925	4,7	dihydroorotate oxidase (EC 1.3.3.1)	pyrD	NUM	VNG2507G	trusted
OE3661F	0	0,00	-0,19	26662	4,6	ABC-type transport system ATP-binding protein	trp2	TP	VNG1893G	trusted
OE4550F	0	0,00	-0,2	101024	4,1	ABC-type transport system ATP-binding protein	dppF	TP	VNG2526G	trusted
OE1932R	0	0,00	-0,2	29146	4,3	protein OE1932R	-	NOF	VNG0617H	trusted
OE3491R	0	0,00	-0,2	12374	5,2	heat shock protein homolog	-	NOF	VNG1771C	questionable
OE3533F	0	0,00	-0,21	48291	4,4	probable protoporphyrinogen oxidase (EC 1.3.3.4)	hemY	COM	VNG1795C	trusted
OE1652R	0	0,00	-0,21	9515	4,5	protein OE1652R	-	NOF	VNG0435H	trusted
OE4416R	0	0,00	-0,21	11000	4,6	conserved protein	-	NOF	VNG2432C	insecure
OE4239F	0	0,00	-0,21	10433	5,5	conserved protein	-	NOF	VNG2310H	questionable
OE3207F	0	0,00	-0,22	19767	4,7	probable precorrin-8W decarboxylase (EC 1.-.-.-)	cbiT, cobL2	COM	VNG1550G	trusted
OE3987R	0	0,00	-0,23	39137	4,3	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain C.a (A-	atpC	EM	VNG2141G	trusted



						type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)				
OE2492F	0	0,00	-0,23	26368	4,6	conserved protein	-	NOF	VNG1021C	questionable
OE1719R	0	0,00	-0,25	33719	5,5	probable oxidoreductase (protochlorophyllide reductase homolog)	-	MIS	VNG0479G	trusted
OE1859R	0	0,00	-0,26	18629	5,3	halocyanin hcpF	hcpF	EM	VNG0573C	trusted
OE3168R	0	0,00	-0,26	49462	4,6	pyridoxal phosphate- dependent aminotransferase (acetylmethionine transaminase homolog)	-	MIS	VNG1524C	trusted
OE4399F	0	0,00	-0,26	108166	4,4	probable oxidoreductase (EC 1.1.1.-) (glycerol-3- phosphate dehydrogenase homolog)	oxr8	MIS	VNG2422G	insecure
OE3226R	0	0,00	-0,26	39202	5,6	Predicted orf (overlaps real protein)	-	-	-	questionable
OE4613F	0	0,00	-0,27	71060	4,3	aconitate hydratase (EC 4.2.1.3)	acn	CIM	VNG2574G	trusted
OE3718F	0	0,00	-0,27	42039	4,3	cell division protein	ftsZ3	CP	VNG1933G	trusted
OE1270F	0	0,00	-0,27	45961	4,5	glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.-)	gdhB	AA	VNG0161G	trusted
OE3517F	0	0,00	-0,28	34000	4,4	protein OE3517F	-	NOF	VNG1788C	insecure
OE1111F	0	0,00	-0,28	1615	4,1	hypothetical protein	-	-	-	questionable
OE1614F	0	0,00	-0,29	39160	5,1	hexosyltransferase homolog	rfbU2	NOF	VNG0410G	trusted
OE1675R	0	0,00	-0,31	30594	4,3	probable ABC-type phosphate transport system ATP-binding protein	pstB2	TP	VNG0452G	trusted
OE4499F	0	0,00	-0,32	13797	5,1	protein OE4499F	-	NOF	VNG2498H	questionable
OE3214F	0	0,00	-0,32	29664	4,5	precorrin-3B C17- methyltransferase (EC 2.1.1.131) 1	cbiH1, cobJ1	COM	VNG1555G	questionable
OE3691F	0	0,00	-0,32	38523	4,5	probable anthranilate phosphoribosyltransfer ase (EC 2.4.2.18)	trpD2	MIS	VNG1912G	questionable
OE3349F	0	0,00	-0,33	42147	4,6	coenzyme F420-- quinone oxidoreductase 42K chain homolog	-	MIS	VNG1663C	trusted
OE5166F	0	0,00	-0,34	50185	4,3	probable ABC-type transport system periplasmic substrate- binding protein (sugar- binding protein / sn- glycerol-3-phosphate- binding protein)	ugpB	TP	VNG6277G	trusted

OE3985R	0	0,00	-0,34	64217	4,1	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain A.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	atpA	EM	VNG2139G	trusted
OE3908R	0	0,00	-0,34	30071	4,3	ABC-type transport system ATP-binding protein	phnC	TP	VNG2085G	insecure
OE3112R	0	0,00	-0,35	82139	4,4	AAA-type ATPase (transitional ATPase homolog)	aaa3, cdc48 b	MIS	VNG1472G	trusted
OE4721R	0	0,00	-0,35	45478	4,4	translation elongation factor aEF-1 alpha chain	aef1a, tuf	TL	VNG2649G	trusted
OE2141F	0	0,00	-0,35	69081	4,5	conserved protein	-	NOF	VNG0779C	questionable
OE1081R	0	0,00	-0,36	44730	5,1	probable glycosyltransferase (EC 2.-.-.-)	rfbU1	MIS	VNG0051G	trusted
OE3955F	0	0,00	-0,36	30999	4,4	probable proline dehydrogenase (EC 1.5.99.8)	putA	AA	VNG2120G	trusted
OE1451F	0	0,00	-0,36	26442	5,5	probable methyltransferase	pnm	MIS	VNG0294G	insecure
OE1597F	0	0,00	-0,37	18852	4,1	protein OE1597F	-	NOF	VNG0404H	trusted
OE2415R	0	0,00	-0,37	71875	4,1	taxis sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-) cheA	cheA	SIG	VNG0971G	insecure
OE3984R	0	0,00	-0,38	51946	4,1	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain B.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	atpB	EM	VNG2138G	trusted
OE3356F	0	0,00	-0,38	81647	4,6	AAA-type ATPase (transitional ATPase homolog)	aaa5, cdc48 c, cdcH	MIS	VNG1667G	trusted
OE3415F	0	0,00	-0,38	23010	5,1	ribosomal protein S5	rps5	TL	VNG1715G	insecure
OE5082R	0	0,00	-0,38	80683	4,4	AAA-type ATPase (transitional ATPase homolog)	aaa8, cdc48 d	MIS	VNG6199G	questionable
OE1954F	0	0,00	-0,39	26296	4,9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain B	nuoB	EM	VNG0636G	trusted
OE6059R	0	0,00	-0,39	79899	4,4	iron-sulfur protein homolog / glycerol-3-phosphate dehydrogenase homolog (two-domain protein)	-	NOF	VNG6379C	trusted
OE2618R	0	0,00	-0,4	17770	4,7	protein OE2618R	-	NOF	VNG1120H	trusted
OE2149R	0	0,00	-0,4	45917	4,1	protein OE2149R	-	NOF	VNG0782H	trusted
OE2648F	0	0,00	-0,41	49824	5,2	conserved protein	-	NOF	VNG1149C	trusted
OE4729R	0	0,00	-0,42	80385	4,4	translation elongation factor aEF-2	aef2, fus	TL	VNG2654G	trusted
OE3524F	0	0,00	-0,43	32733	4,8	pyridoxine biosynthesis protein	pyroA	COM	VNG1793C	trusted

OE4479R	0	0,00	-0,45	37092	4,4	probable ABC-type phosphate transport system ATP-binding protein	pstB1	TP	VNG2482G	trusted
OE4466R	0	0,00	-0,46	37405	4,7	DNA repair protein	radA1	RRR	VNG2473G	trusted
OE2865R	0	0,00	-0,48	66870	4,5	succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) chain A (flavoprotein)	sdhA	CIM	VNG1306G	trusted
OE4377R	0	0,00	-0,49	24832	4,8	GTP-binding protein homolog	gbp3	NOF	VNG2410G	questionable
OE1737R	0	0,00	-0,5	67381	4,1	dnaK-type molecular chaperone hsp70	dnaK	CHP	VNG0491G	trusted
OE1956F	0	0,00	-0,51	63429	4,3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain CD	nuoC D	EM	VNG0637G	trusted
OE2750R	0	0,00	-0,51	11823	4,3	protein OE2750R	-	NOF	VNG1220H	insecure
OE1958F	0	0,00	-0,53	17545	4,6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain I	nuoI	EM	VNG0640G	trusted
OE1876R	0	0,00	-0,54	29989	4,6	probable menaquinol--cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.-) (cytochrome bc complex) Rieske iron-sulfur protein (ubiquinol--cytochrome-c reductase (cytochrome bc1 complex) Rieske iron-sulfur protein homolog)	petA	EM	VNG0584H	trusted
OE2369A1 R	0	0,00	-0,54	20210	11,7	hypothetical protein	-	-	-	questionable
OE5208R	0	0,00	-0,56	54699	4,4	arginine deiminase (EC 3.5.3.6)	arcA	AA	VNG6317G	trusted
OE3988R	0	0,00	-0,59	21770	4,1	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain E.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	atpE	EM	VNG2142G	trusted
OE4301R	0	0,00	-0,6	49649	4,9	ABC-type transport system ATP-binding protein	ykfD	TP	VNG2343G	trusted
OE3978R	0	0,00	-0,62	25192	4,6	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain D.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	atpD	EM	VNG2135G	trusted
OE1160R	0	0,00	-0,63	19670	9,1	ribosomal protein L10.eR	rpl10 R	TL	VNG0099G	trusted
OE2159R	0	0,00	-0,68	23345	4,5	ribosomal protein S3a.eR	rps3a R	TL	VNG0787G	questionable
OE3388F	0	0,00	-0,76	36552	5,7	ribosomal protein L3	rpl3	TL	VNG1689G	trusted
OE1548A1 R	0	0,00	-0,77	28901	11,7	hypothetical protein	-	-	-	questionable

OE2866R	0	0,00	-0,8	33665	4,6	succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) chain B (iron-sulfur protein)	sdhB	CIM	VNG1308G	trusted
OE2349R	0	0,00	-0,89	33359	12,2	hypothetical protein	-	-	-	questionable
OE3992R	0	0,00	-0,9	12185	4,1	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) chain H.a (A-type ATP synthase) (previously EC 3.6.1.34)	atpH	EM	VNG2146H	insecure
OE3542R	0	0,00	-1,03	29558	11,4	protein OE3542R	-	NOF	VNG1802H	trusted
OE3972F	0	0,00	-1,14	59831	12,2	hypothetical protein	-	-	-	questionable
OE1004A1 F	0	0,00	-1,17	11261	10,8	hypothetical protein	-	-	-	questionable
OE3122A1 R	0	0,00	-1,59	46024	12,3	hypothetical protein	-	-	-	questionable

## 7.7 Aminosäurezusammensetzung der Membranproteine

Die Zusammensetzung der Membranproteine wurde in die Bereiche Transmembran (TM), cytosolischer Nahbereich (cN), periplasmatischer Nahbereich (pN), cytosolischer Loopbereich (cL) und periplasmatischer Loopbereich (pL) unterteilt. Der Nahbereich umfasst dabei die jeweiligen 6 Aminosäuren, die direkt den helikalen Bereichen folgen.

Saure Membranproteine					
	TM	cN	pN	cL	pL
<b>total</b>	39577	11441	11311	20870	42413
	100%	100%	100%	100%	100%
<b>D</b>	0,6%	6,9%	6,5%	9,6%	9,1%
<b>E</b>	0,7%	5,5%	4,9%	7,0%	7,4%
<b>K</b>	0,3%	3,1%	1,7%	1,7%	1,4%
<b>R</b>	1,0%	12,6%	4,1%	6,4%	5,2%
<b>L</b>	16,4%	6,6%	9,8%	7,0%	6,8%
<b>I</b>	6,9%	3,6%	3,4%	3,5%	3,7%
<b>V</b>	16,6%	6,0%	7,8%	9,2%	9,2%
<b>F</b>	6,6%	2,7%	4,0%	2,7%	2,5%
<b>Y</b>	3,1%	2,7%	2,6%	2,2%	2,3%
<b>W</b>	2,0%	1,5%	1,3%	1,1%	0,7%
<b>A</b>	16,5%	10,6%	11,5%	12,2%	12,5%
<b>G</b>	11,4%	7,4%	11,0%	7,9%	8,1%
<b>H</b>	0,6%	1,9%	1,8%	1,7%	1,5%
<b>S</b>	4,5%	6,6%	7,1%	6,8%	7,4%
<b>T</b>	5,7%	8,1%	7,3%	8,0%	9,3%
<b>N</b>	1,0%	2,9%	2,7%	2,6%	3,2%
<b>Q</b>	0,8%	3,6%	3,2%	3,1%	3,6%
<b>C</b>	0,4%	0,1%	0,2%	0,6%	0,3%
<b>M</b>	2,1%	2,8%	2,2%	2,0%	1,4%
<b>P</b>	2,9%	4,7%	6,9%	4,7%	4,3%

Basische Membranproteine					
	TM	cN	pN	cL	pL
<b>total</b>	22356	6630	5854	4679	5719
	100%	100%	100%	100%	100%
<b>D</b>	0,5%	5,9%	4,9%	6,1%	5,4%
<b>E</b>	0,5%	3,7%	3,2%	4,9%	2,9%
<b>K</b>	0,2%	2,5%	1,2%	1,6%	0,7%
<b>R</b>	1,4%	17,2%	5,9%	10,0%	8,0%
<b>L</b>	16,0%	6,1%	9,3%	8,4%	7,8%
<b>I</b>	5,6%	3,0%	3,0%	2,7%	3,0%
<b>V</b>	17,1%	6,3%	8,6%	8,8%	10,8%
<b>F</b>	5,9%	2,4%	4,1%	2,7%	3,0%
<b>Y</b>	3,1%	2,7%	2,5%	2,0%	2,5%
<b>W</b>	2,3%	1,5%	1,7%	1,2%	1,6%
<b>A</b>	18,3%	12,4%	11,8%	12,6%	13,7%
<b>G</b>	11,7%	7,9%	11,4%	8,6%	9,5%
<b>H</b>	0,7%	2,2%	1,7%	1,9%	1,7%
<b>S</b>	4,3%	6,6%	7,5%	7,5%	6,5%
<b>T</b>	5,3%	7,3%	6,9%	7,0%	9,6%
<b>N</b>	0,9%	1,9%	2,7%	2,2%	2,5%
<b>Q</b>	0,9%	2,8%	3,1%	3,1%	2,5%
<b>C</b>	0,6%	0,2%	0,2%	0,5%	0,4%
<b>M</b>	1,6%	2,0%	1,7%	2,8%	1,3%
<b>P</b>	3,3%	5,4%	8,6%	5,5%	6,6%

## Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. D. Oesterhelt für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Betreuung meiner Promotion. Aus Diskussionen und Hilfestellungen habe ich in dieser Zeit viel von ihm lernen können, vor allem die Herangehensweise von Problemerkennung zur Problemlösung haben mir viel geholfen.

Dr. Frank Siedler möchte ich ganz herzlichen Dank sagen für die Möglichkeit, Analytik in der von ihm geleiteten Proteomicsgruppe zu erlernen und zu verstehen. Aus den vielen Diskussionen mit ihm und seiner effektiven Art von Projekt-Koordinierung innerhalb der (immer größer werdenden) Proteomicsgruppe habe ich viel lernen können. Bea Scheffer danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit in allen Schritten der Proteomics, vor allem für die (unzähligen) MS-Messungen, Recherchen und Optimierungen. Bei Marlis Fischalek bedanke ich mich für die Unterstützung der Cytosolfraktionierung, bei Siggi Bauer für 1-D Gel Spaltungen und MALDI-Messungen. Andreas Tebbe danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen des Cytosolproteoms, Birgit Bisle danke ich für die vielen Diskussionen über die Membranreinigung. Für ihre Promotionen wünsche ich beiden viel Erfolg.

Ein weiterer Dank gilt der Bioinformatikgruppe von Dr. Friedhelm Pfeiffer für den Aufbau des Informationssystems HALOLEX. Von der Archivierung der Daten zu deren Analyse, von einer verbesserten Nachanalyse zu einer optimierten Experimentplanung mit neuen Daten entstand ein wunderbarer Kreislauf. Volker Hickmann und Jan Wolfertz danke ich für die Umsetzung dieses Projektes, Michaela Falb für die Zusammenführung der Metabolismus- und Strukturinformationen. Bei Dr. Carolina Garcia-Rizo möchte ich mich für die Analyse der posttranslationalen Modifikationen, der theoretischen Spaltungen und den Rechnungen zur Membranhilophilie bedanken.

Dr. Roman Körner und Dr. Guido Sauer danke ich für den Aufbau und die Etablierung der LC/MS/MS, was eine Identifizierung der Membranproteine erst möglich machte.

Bei der Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Lottspeich möchte ich mich für die ersten Proteinidentifikationen bedanken. Besonders Kerstin Anderson für die Spaltung, Reini für die Edmann-Sequenzierung und Moni sowohl für die MALDI-Messungen als auch für die Erfahrungen beim Aufbau der eigenen MALDI.

Für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Chemotaxis und dem Interesse an meiner Arbeit danke ich Dr. Florian Storch und Dr. Maia Kokoeva.

Bei Dr. Hans Zischka möchte ich mich ganz herzlich für unzählige Diskussionen um Proteomics im allgemeinen und Membranproteine im speziellen bedanken.

Bei der Abteilung von Prof. Dr. Wolfgang Baumeister möchte ich mich für die Benutzung des Elektronenmikroskopes bedanken, bei Guenter Pfeifer für die Einweisung und Diskussionen.

Meinen Praktikanten, Anke und Silke Klein, Indronil Chauhuri, Michael Haack, Cornelia Schmutz, Stefan Ohrnberger und Dominik Speidel danke ich für ihr Interesse und die Bearbeitung kleiner Projekte.

Für die Realisierung diverser Versuchsaufbauten danke ich Walter Erhard (mit Strom), Johann Schiefele (ohne Strom) und der MPI-Werkstatt (größeres).

Bei Dr. Peter Hufnagel (BrukerDaltonics) möchte ich mich ganz herzlich für die sehr gute Kooperation im Rahmen der (funktionierenden) Robotics bedanken.

Für die Unterstützung bei den Fluoreszenz-Versuchen möchte ich mich bei Dr. Burkhard Scheibe (AmershamBiosciences) bedanken.

Dem alten „Oe-Labor“ möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, viele Hilfestellungen und Diskussionen kamen von Bettina Brustmann, Walter Gmelin, Brigitte Kessler, Bianca Marg und Susanne von Gronau.

Bei Ursula Heider, Dr. Michael Kolbe, Dr. Benjamin Quest und Dr. Christoph Oppawsky möchte ich mich für die vielen Gespräche bedanken, die dazu beigetragen haben, vieles in einem größeren Zusammenhang zu sehen, als es zunächst erschienen ist. Bei letzterem gilt ein Dank für die reibungslose Bereitstellung von etlichen Hektolitern frisch-gebrühtem Kaffee.

Dr. Jörg Tittor danke ich für viele Diskussionen und Hilfestellungen im sowohl wissenschaftlichem und als auch im zwischenmenschlichen Sinne.

Frau Haack möchte ich meinen Dank aussprechen für die Hilfe in allen bürokratischen und verwaltungstechnischen Angelegenheiten.

Meinen Eltern und meiner Großmutter möchte ich für ihre ständige Anteilnahme und Unterstützung danken.

Meiner Frau Jill danke ich, dass sie immer Verständniss für meine Arbeit aufbrachte, zu mir stand und geholfen hat.

## Curriculum vitae

Christian Klein

Geboren am 23.08.1972 in Gelsenkirchen

### Schulbildung

07/1979-06/1983

Grundschule Essen-Frillendorf

08/1983-06/1992

Helmholtz-Gymnasium Essen

06/1992

Abschluss Abitur

### Zivildienst

09/1992-10/1993

Individuelle Schwerstbehinderten-Betreuung  
beim Arbeiter-Samariter Bund in Essen

### Studium

10/1993-05/1996

Grundstudium an der Universität Würzburg

06/1996-03/1998

Hauptstudium an der Universität Würzburg

08/1996-09/1996

Praktikum am Max-Planck Institut für Biochemie in  
Martinsried bei Prof. Dr. D. Oesterhelt

10/1996-04/1997

Physikalisch-Chemisches Praktikum des Haupt-  
studiums an der University of Wales, Swansea

03/1998-10/1998

Anfertigung der Diplomarbeit „Auftrennung  
halobakterieller Membranproteine mittels  
zweidimensionaler Gelelektrophorese“ unter der  
Betreuung von Prof. Dr. D. Oesterhelt am Max-Planck-  
Institut für Biochemie in Martinsried

11/1998

Abschluss Diplom

### Promotion

11/1998-01/2005

Promotion „Proteomanalysen an *Halobacterium  
salinarum*“ unter der Betreuung von Prof. Dr. D.  
Oesterhelt am Max-Planck Institut für Biochemie in  
Martinsried.

01/2005

Abschluss Promotion