

# **Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

**Diplom-Biologin Diana Hofmann**

aus Warstein

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2004

# **Proteinanalyse zur Charakterisierung der Lebensformen von *Stigmatella aurantiaca***

**Gutachter: Prof. Dr. Hans Ulrich Schairer  
Prof. Dr. Thomas Rausch**



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1999 bis März 2003 am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans Ulrich Schairer angefertigt.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	2
<b>1 Einleitung</b> .....	3
1.1 Myxobakterien .....	3
1.2 <i>Stigmatella aurantiaca</i> .....	4
1.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese und Massenspektrometrie .....	5
1.4 Proteolyse .....	7
<b>2 Material</b> .....	12
2.1 Geräte .....	12
2.1.1 2D-Gelelektrophorese .....	12
2.1.2 Massenspektrometer .....	12
2.1.3 Chromatographie .....	12
2.1.4 Sonstige Geräte .....	12
2.1.5 Computer und Software .....	13
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	13
2.2.1 Spezielle Chemikalien .....	13
2.2.2 Verbrauchsmaterialien .....	14
2.2.3 Reagenziensätze für biochemische Methoden .....	14
2.2.4 Antibiotika .....	14
2.2.5 Bakterienstämme .....	14
2.2.6 Kulturmedien und Kulturböden .....	15
2.2.7 Tryptonmedium .....	15
2.2.8 CY-Medium .....	15
2.2.9 Casiton-Medium .....	15
2.2.10 CTT-Medium .....	15
2.2.12 Wasseragar .....	15
2.3 Puffer und Lösungen .....	16
2.3.1 Lysepuffer für 2D-Gelelektrophorese / <i>S. aurantiaca</i> .....	16
2.3.2 Rehydratisierungspuffer / <i>S. aurantiaca</i> .....	16
2.3.3 Lysepuffer für 2D-Gelelektrophorese / <i>M. xanthus</i> .....	16
2.3.4 Rehydratisierungspuffer / <i>M. xanthus</i> .....	16
2.3.5 Äquilibrierungspuffer für 2D-Gelelektrophorese .....	17
2.3.6 Sammelgelpuffer .....	17

---

2.3.7	Trenngelpuffer.....	17
2.3.8	Laufpuffer für SDS-PAGE .....	17
2.3.9	Westernblot Transferpuffer .....	17
2.3.10	TBST Inkubationspuffer .....	18
2.3.11	Alkalische Phosphatase-Puffer (AP) .....	18
2.3.12	Substratlösung für die alkalische Phosphatase .....	18
2.3.13	Alkalische Phosphatase-Stopplösung.....	18
2.3.14	ECL Lösungen für Antikörperdetektion .....	18
2.3.15	Protein-Probenpuffer (4x) .....	18
2.3.16	Coomassie- Färbelösung für SDS-PAGE .....	19
2.3.17	Entfärbelösung für Proteingele.....	19
2.3.18	Geltrocknungspuffer.....	19
2.3.19	Ponceau-Färbelösung für Westernblots.....	19
2.3.20	Coomassie-Färbelösung für PVDF-Membranen .....	19
2.3.21	Entfärbelösung für PVDF-Membranen.....	19
2.3.22	Lysepuffer für Proteinextraktion .....	19
2.3.23	Gelfiltrationspuffer.....	20
2.3.24	Ionenaustauschpuffer .....	20
2.3.25	Reaktionspuffer für Enzymkinetik.....	20
2.3.26	Stopplösung für Enzymkinetik.....	20
2.4	Sonstige Puffer .....	21
2.4.1	PBS.....	21
2.4.2	Hepes-Puffer.....	21
2.4.3	TM-Puffer .....	21
2.5	Proteine .....	21
2.5.1	Oligopeptid-Substrat .....	21
2.5.2	Antikörper .....	21
2.5.3	Proteingrößenstandards für SDS-PAGE .....	22
2.5.4	Gelfiltrationsstandard .....	22
2.5.5	Weitere Standardproteine .....	22

---

<b>3 Methoden</b> .....	23
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	23
3.1.1 Flüssigkulturen von <i>S. aurantiaca</i> .....	23
3.1.2 Flüssigkulturen von <i>M. xanthus</i> .....	23
3.1.3 Fruchtkörperbildung bei <i>S. aurantiaca</i> .....	23
3.1.4 Indol-induzierte Sporenbildung bei <i>S. aurantiaca</i> .....	23
3.1.5 Bestimmung des Bakterientiters.....	24
3.1.6 Langzeitlagerung von <i>S. aurantiaca</i> .....	24
3.1.7 Fermentation von <i>S. aurantiaca</i> .....	24
3.2 Biochemische und physikalische Methoden.....	25
3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	25
3.2.2 Spektroskopische Proteinbestimmung.....	25
3.2.3 Western Blot Transfer.....	26
3.2.4 Proteinfällungen.....	26
3.2.5 Sucroседichtegradient-Zentrifugation (SDZ).....	27
3.2.6 Enzymaktivitätsassay.....	27
3.2.7 Gewinnung von Proteinextrakten für SDZ.....	28
3.3 Gelelektrophoretische Methoden.....	29
3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelsysteme.....	29
3.3.2 Eindimensionale (1D)-Gelelektrophorese.....	29
3.3.3 Gewinnung von Proteinextrakten für 1D-Gelelektrophorese.....	30
3.3.4 Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese.....	30
3.3.5 Gewinnung von Proteinextrakten für 2D-Gelelektrophorese.....	30
3.3.6 Isoelektrische Fokussierung mit IEF-Cell.....	31
3.3.7 Zweite Dimension.....	31
3.3.8 Trocknen von Polyacrylamidgelen.....	32
3.4 Chromatographische Methoden.....	33
3.4.1 Gelfiltrationschromatographie.....	33
3.4.2 Gewinnung von Proteinextrakten für die Gelfiltration.....	33
3.4.2 Ionentauscherchromatographie.....	34
3.5 Visualisierung von Biomolekülen.....	35
3.5.1 Coomassie-Färbung von Proteinen.....	35
3.5.2 Silberfärbung von Proteinen nach Blum.....	35
3.5.3 Silberfärbung von Proteinen nach Heukeshoven.....	36

---

3.5.4	Kolloidale Coomassie-Färbung von Proteinen .....	36
3.5.5	Ponceau-Färbung von Westernblots.....	37
3.5.6	Detektion von Antikörpern.....	37
3.6	Massenspektrometrie .....	38
3.6.1	In-Gel-Trypsinverdau .....	39
3.6.2	Elektrosprayionisation nach HPLC-Trennung .....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
4.1	Differenzierung von Wachstumszuständen bei <i>S. aurantiaca</i> .....	41
4.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	42
4.2.1	Immunologische Nachweisreaktionen (Westernblotanalyse).....	47
4.2.2	Massenspektrometrische Untersuchungen.....	49
4.3	Prüfung auf Proteasen.....	53
4.3.1	Sucrosdichtegradienten-Zentrifugation .....	53
4.3.2	Immunologische Nachweisreaktion mit spezifischem Antiserum .....	58
4.3.3	Gelfiltrationschromatographie – Superose 6.....	59
4.3.4	Anionenaustauscherchromatographie – Mono Q.....	63
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>96</b>
7.1	Massenspektrometrische Untersuchungen .....	96
7.2	Abkürzungen .....	108
7.3	Publikationen.....	110

## Danksagung



## Zusammenfassung

Um Veränderungen im Proteom während der unterschiedlichen Wachstums- und Entwicklungsphasen des Prokaryonten *Stigmatella aurantiaca* zu detektieren, wurden Proteinextrakte, die aus Zellen verschiedener Lebenszustände stammen, in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D) aufgetrennt. Tatsächlich änderten sich die Protein-Muster während der Entwicklung zum Fruchtkörper bemerkenswert. Proteinspots erscheinen und verschwinden, was auf eine entwicklungsspezifische Synthese und Degradierung von Polypeptiden schließen läßt. Eine Charakterisierung und Identifizierung dieser Polypeptide erfolgte durch die Massenspektrometrie. Partielle Sequenzen (bis zu 10 Aminosäuren), abgeleitet aus dem massenspektrometrischen Fragmentierungsmuster, wurden mit Polypeptidsequenzen in Protein-Bibliotheken verglichen. Diese Analyse resultiert in einer Zuweisung zu bestimmten bekannten Proteinen. Auf diese Weise können Polypeptide, spezifisch für vegetative Zellen, Sporen aus Indol-behandelten Zellen oder Fruchtkörper analysiert werden. Ein Protein konnte als der Elongationsfaktor TU, ein anderes als die verzweigte Kette der  $\beta$ -Untereinheit der Oxocarbonsäure Dehydrogenase (E1) von *S. aurantiaca* bestimmt werden. Eine weitere Homologie besteht zu einer ATP-abhängigen Clp Protease (Homolog CD4A der ATP-bindenden Untereinheit ClpA's) von *Lycopersicon esculentum*, der Tomate, einem Eukaryont. Somit könnte auch bei *S. aurantiaca* eine Proteolyse von Proteinen durch das clp-System stattfinden.

Für die Isolierung hochmolekularer Proteasen, die wahrscheinlich an der Entwicklung beteiligt sind, wurden Zellysate verschiedener Wachstums- und Entwicklungsstadien von *S. aurantiaca* mittels einer Sucrosedichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert. Die Enzymaktivität wurde mit einem proteasom-spezifischen Substrat bestimmt, während die übliche proteolytische Aktivität von Serin-, Aspartatsäure-, Thio- und Metalloproteasen gehemmt wurde. Das tatsächlich proteasomale Aktivität vorhanden ist, wurde durch die Verwendung eines spezifischen Antiserums gegen die 20S Untereinheit des Proteasoms des Archaea *Thermoplasma acidophilum* bestätigt. Die Verteilung der Enzymaktivität über den Sucrosedichtegradienten läßt den Schluß zu, daß *S. aurantiaca* hochmolekulare Proteasen beherbergt. Diese könnten für die Degradierung von Polypeptiden während des Entwicklungszyklus verantwortlich sein. Eine Anreicherung und Reinigung vermeintlicher hochmolekularer Proteasen wurde durch verschiedene chromatographische Verfahren erreicht. Fraktionen mit einer möglichen Proteasomaktivität wurden mittels 2D analysiert. Die bis jetzt gewonnen Daten weisen darauf hin, daß Proteine mit einer proteasomalen Funktion/Aktivität vorhanden sind, die am Entwicklungszyklus von *S. aurantiaca* beteiligt sind.

---

## Summary

To detect changes in the proteome during different growth and developmental stages of the prokaryote *Stigmatella aurantiaca*, protein extracts obtained from cells in different developmental stages were subjected to two-dimensional electrophoresis (2D). Indeed, protein patterns during development were remarkably changing. Protein spots appear and disappear suggesting development-specific synthesis and degradation of polypeptides.

For the characterisation and identification of these appearing and disappearing polypeptides, protein spots obtained by 2D were proteolyzed and subjected to mass spectrometry (MS). Partial sequences (up to 10 amino acids) deduced from the MS fragmentation pattern were compared with polypeptide sequences from protein libraries. This assists with the assignment to certain known proteins. In this way polypeptides specific for vegetative cells, indol-induced spores or fruiting bodies were analysed. One protein spot could be determined as the elongation factor TU, another one as the branched chain  $\beta$ -subunit of the keto acid dehydrogenase (E1) of *S. aurantiaca*. Another homolog was identified having similarity to an ATP-dependent Clp protease (homolog of the ATP-binding subunit of Clp A) of *Lycopersicon esculentum*, the tomato, an eukaryote. This suggests that proteolysis of proteins could proceed via the clp-system in *S. aurantiaca*.

For the isolation of high molecular weight proteases that may be involved in development cell lysates from various growth and developmental stages of *S. aurantiaca* were subjected to sucrose gradient centrifugation. The proteasomal activity was determined using a proteasome-specific substrate, while the usual protease activities of serine-, aspartic acid-, thio- and metalloproteases were inhibited. A specific antiserum against the 20S subunit of the proteasome of the archaee *Thermoplasma acidophilum* was used to approve the existence of proteasomal activity. The distribution of enzyme activity over the sucrose gradient suggests that *S. aurantiaca* harbours high molecular weight proteases. These might be responsible for the degradation of polypeptides during development. Further enrichment and purification of putative high molecular weight proteases was performed by various chromatography procedures. Fractions with a putative proteasome activity were analysed further by 2D and Data obtained so far suggest that proteins with proteasomal function/activity are present that might be related to *S. aurantiaca* development.

# 1 Einleitung

Leben ist in stetem Wandel begriffen. Dieser stete Wandel steht im Kontext äußerer und innerer Einflüsse. Äußere Einflüsse sind bestimmt durch Nahrungsbedingungen, Temperatur, Licht und komplexe Umweltfaktoren. Innere Einflüsse können bestimmt werden durch genetische und biochemische Steuerungsmechanismen und Zell-Zellkommunikation. Zelldifferenzierung und die Ausbildung spezieller Strukturen sind notwendig, um das Überleben einer Zelle zu gewährleisten. Die Differenzierung der Zelle prokaryontischer Spezies liegen z. B. in der Endosporenbildung bei *Bacillus* und Bildung von Heterocysten bei Cyanobakterien. Auffällig ist die Wandlung von einzelligen Lebensformen zum differenzierten „vielzelligen“ Organismus. Hierbei nehmen Myxobakterien eine besondere Stellung ein, da sie durch einen zweigeteilten Lebenszyklus, der abhängig ist vom Nahrungsangebot und von chemischen Einflüssen, multizelluläre Strukturen und Überdauerungsformen (Sporen) ausbilden können.

## 1.1 Myxobakterien

Myxobakterien sind gram-negative, stäbchenförmige Bodenbakterien, die sich durch besondere entwicklungsphysiologische Eigenschaften auszeichnen und weltweit verbreitet sind. Sie können sich durch Gleiten auf festen Oberflächen fortbewegen, sie sind in der Lage biologisch wirksame Sekundärmetabolite zu synthetisieren, sie zeigen ein „soziales“ Verhalten, indem sie auf verrottendem Holz, abgestorbenem Pflanzenmaterial u. a. m. gleitende Zellschwärme bilden und unter Hungerbedingungen Fruchtkörper ausbilden, die einzigartig für ihre Art sind. Diese Bodenbakterien wurden erstmal 1892 als Bakterien charakterisiert und in die Familie der Myxobacteriaceae eingeordnet [Thaxter, 1892]. Ihre DNS hat einen sehr hohen GC-Gehalt von 67 bis 70 % [Reichenbach und Dworkin, 1992] und im Vergleich zu anderen Prokaryonten haben sie eine enorme Genomgröße, die 9,45 Mbp bei *Myxococcus xanthus* (*M. xanthus*) und 9,35 Mbp bei *Stigmatella aurantiaca* (*S. aurantiaca*) beträgt [Chen, 1990; Neumann, 1992]. Myxobakterien besitzen Eigenschaften von einzelligen und mehrzelligen Organismen und stellen aufgrund ihres komplexen Lebenszyklus ein Modellsystem zur Analyse von Differenzierung und Morphogenese dar.

## 1.2 *Stigmatella aurantiaca*

Die Taxonomie der Myxobakterien basiert auf morphologischen Merkmalen. *Stigmatella aurantiaca* wird in die Familie der Cystobacteraceae zur Ordnung Myxococcales gezählt.

Das gram-negative Myxobakterium *S. aurantiaca* durchläuft während seines komplexen zweigeteilten Lebenszyklus eine Reihe von Entwicklungsstadien. Unter Hungerbedingungen gleiten die nichtbegeißelten vegetativen Zellen in Schwärmen auf unlöslich organischem Material, das aber durch sekretierte lytische Enzyme abgebaut wird. Sie bilden Aggregationszentren, die sich *in vitro* zu kreisförmigen Ansammlungen von Fruchtkörpern entwickeln. Anschaulich ist diese Beschreibung in Abbildung 1-1 dargestellt.

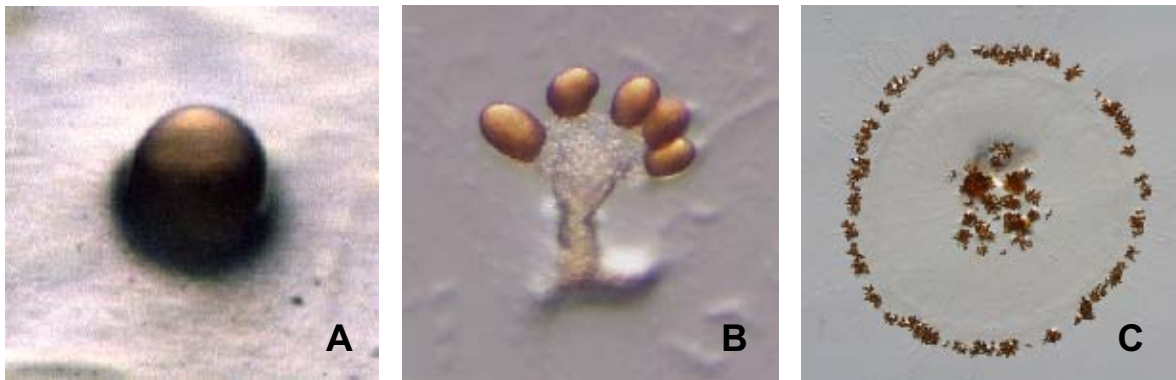


Abb. 1-1: Mikroskopische Bilder von *S. aurantiaca* für verschiedene Hungerzeiten. **A** Aggregationszentrum nach 8 h ; **B** Fruchtkörper nach 40 h, Größe ca. 80 - 100 µm; **C** Orientierung von Fruchtkörpern 40 h nach Spotten.

Im Gegensatz zum Myxobakterium *M. xanthus* bildet *S. aurantiaca* wesentlich differenziertere Fruchtkörper aus. Diese Fruchtkörper haben eine bäumchen-ähnliche Struktur, während *M. xanthus* morphologisch primitivere unstrukturierte kugelartige Erhebungen zeigt. Die Fruchtkörper enthalten in ihren Sporangien überdauerungsfähige hitzebeständige Myxosporen.

Aufgrund der vielfätigen morphologischen Wandlung, welche die Zellen und Zellaggregate von *S. aurantiaca* durchlaufen, kann man annehmen, daß eine Vielzahl von Mechanismen auf DNS- und Proteinebene ablaufen, die diese Entwicklung steuern. Im Laufe dieser Entwicklung verschwinden viele Proteine, die am vegetativen Lebenszustand beteiligt sind, während andere für Sporenbildung und Überleben notwendige Proteine neu synthetisiert werden. Es stellt sich die Frage, wie Zellen zwischen Polypeptiden differenzieren, die entfernt werden müssen und anderen, die noch erforderlich sind. Ein Weg würde darin

bestehen, Polypeptide zu markieren und anschließend durch spezifische Proteasen, die diese Markierung erkennen, abzubauen, ähnlich zur Ubiquitin-abhängigen Proteolyse in Eukaryonten. Proteasomartige hochmolekulare Proteasen könnten an der Degradierung von verschiedenen Polypeptiden beteiligt sein, die in späteren Entwicklungsstadien von *S. aurantiaca* zersetzt werden, was zu einer Änderung des Proteinspektrums führt. Somit bietet *S. aurantiaca* sehr gute Voraussetzungen um diese Fragestellung zu beantworten.

### 1.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese und Massenspektrometrie

Für die nähere Charakterisierung eines Organismus können Methoden auf DNS- und Protein-Ebene angewandt werden. Zwei herausragende Methoden auf Protein-Ebene sind die zweidimensionale Gelelektrophorese und die Massenspektrometrie.

Um komplexe Proteingemische, wie sie in einer Zelle vorkommen zu trennen, ist die zweidimensionale Gelelektrophorese die Methode der Wahl [Görg, 1998]. Diese Technik ermöglicht die gleichzeitige Auftrennung sehr vieler Proteine aus einem Proteingemisch in zwei unabhängigen Schritten. Es werden hierbei individuelle Eigenschaften der Proteine genutzt.

- Im ersten Schritt, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt. Dabei wandert jedes Protein bis zu dem Punkt eines pH-Gradienten, an dem es nach außen hin keine Netto-Ladung trägt (i. e. der pI).
- Im zweiten Schritt werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht ( $M_r$ ) in einen SDS-Polyacrylamidgel (SDS-Page) getrennt.

Man erhält so ein zweidimensionales Punktmuster, in dem bei geeigneter Auflösung jeder Punkt einem Protein entspricht und somit drei Parameter für seine Charakterisierung liefert: Protein-pI, experimentelles Molekulargewicht und Proteinmenge.

Die 2D-Gelelektrophorese wurde 1975 von O'Farrell [O'Farrell, 1975] und Klose [Klose, 1975] eingeführt. Mit Hilfe dieser Technik werden durch Vermischung von Trägerampholyten mit Polyacrylamid in Glasröhren sogenannte Röhrengel pro-

duziert. Der pH-Gradient bildet sich unter Einfluß eines elektrischen Feldes aus. Die Proben werden am kathodischen Ende aufgetragen und bei hohen Spannungen getrennt. Nach der Fokussierung werden die Gele aus den Glaskapillaren entfernt, äquilibriert und mit dem Detergenz SDS beladen. Die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgt in einem vertikalen SDS-Gel in der zweiten Dimension. Garrels verbesserte die 2D-Gelelektrophorese 1979, so daß deren Reproduzierbarkeit erhöht wurde und entwickelte darauf aufbauend eine Computer-Software, die eine quantitative Auswertung ermöglichte [Garrels, 1979].

Die IEF mit Trägerampholyten zeigt jedoch einige Schwächen, wie eine mangelnde Reproduzierbarkeit, die durch inhomogene Trägerampholyte verursacht werden. Bei langen Fokussierungszeiten tritt außerdem eine Kathodendrift auf. Der Ersatz der Trägerampholyte durch immobilisierte pH-Gradienten (IPG) löste diese Probleme und führte zu erheblichen Fortschritten in der Reproduzierbarkeit und Auflösung von 2D-Gelen [Görg, 1988, 1993, 1995 und 1999]. Mit Hilfe von Immobilinen werden diese immobilisierten pH-Gradienten hergestellt. Diese organischen Säuren und Basen, mit genau definierten pK-Werten, sind kovalent an Acrylamid gekoppelt. Durch Vermischung der Immobiline mit Acrylamid in bestimmten Mengenverhältnissen können auf Plastikträgerfolien Gele polymerisiert werden. Der Gradient bleibt im elektrischen Feld stabil und führt zu reproduzierbaren 2D-Mustern zwischen Gelen aus gleichen und verschiedenen Laboren [Corbett, 1994].

Wegen ihrer hohen Reproduzierbarkeit ist die Trennung von Polypeptiden mit der 2D-Gelelektrophorese die geeignete Voraussetzung für eine effiziente Massenspektrometrie. Erst die Massenspektrometrie führt mit ihren Ergebnissen zur eigentlichen Identifizierung von Proteinen. Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) kann das Molekulargewicht von Ionen bestimmt werden. Im Moment stellt die MS die schnellste und empfindlichste Methode zur Proteinidentifizierung dar.

Verschiedene massenspektrometrische Techniken stehen zur Verfügung. Das zu untersuchende Protein wird im allgemeinen enzymatisch in Peptide gespalten (z. B. mit Trypsin) und anschließend mit MALDI („matrix assisted laser desorption/ionization“)-Massenspektrometrie oder ESI („electrospray ionization“)-Massenspektrometrie untersucht. Es gibt eine Anzahl von Geräten und Möglichkeiten zur Proteincharakterisierung.

In Datenbanken, die Informationen über Massen, zugeordnete Sequenzen und in Organismen gefundene Proteine und/oder Gene enthalten, können massenspektrometrische Informationen verglichen werden. Durch den Abgleich mit Datenbanken lassen sich rein massenspektrometrische Informationen qualifizieren. Die Massenspektrometrie erlaubt bei bekannter Genomsequenz die eindeutige Identifizierung von Proteinen. Sie stellt durch ihre hohe Sensitivität und Geschwindigkeit die fehlende Verknüpfung zwischen Gen und Protein her [Shevchenko, 1996].

So bestehen Chancen, ein prokaryontisches Proteasom zu finden.

## 1.4 Proteolyse

Proteolyse dient in vielen Organismen dazu, die Zelle von abnormalen und missgefalteten Proteinen zu befreien. Dabei kann auch die Verfügbarkeit von regulatorischen Proteinen zeitlich und mengenmäßig kontrolliert werden. Langlebige Proteine können Halbwertszeiten von mehreren Tagen haben, wohingegen kurzlebige Proteine schon nach wenigen Minuten degradiert werden [Glickman, 2002]. Viele spezifische Proteasen sind in Prokaryonten und Eukaryonten hochkonserviert und übernehmen kritische Funktionen in der Entwicklung [Gottesman; 1996]. Die Inaktivierung regulatorischer Proteine erfüllt eine wichtige Aufgabe bei der Steuerung intrazellulärer Prozesse. So kann z. B. durch den Abbau metabolischer Proteine und die Zurückführung der freigesetzten Aminosäuren in die Proteinneusynthese die Zelle sich geänderten Umweltbedingungen besser anpassen. Intrazelluläre Proteasen übernehmen in prokaryontischen Zellen viele Aufgaben: das Abspalten von Signalpeptiden während des Proteinexports, zeitliche Inaktivierung von regulatorischen Proteinen und Entfernen von aberranten nichtfunktionalen Proteinen.

Die Proteolyse innerhalb der prokaryontischen Zelle muß kontrolliert werden, um ungewollte Degradationen zu verhindern. Um das zu erreichen kann eine Protease zu einem spezifischen Kompartiment der Zelle (z. B. periplasmatischer Raum bei gram-negativen Bakterien) gelenkt werden [De Mot, 1999].

Eine besondere Stellung beim selektiven Proteinabbau in Eukaryonten nehmen multikatalytische Proteinasen ein, die als Proteasom bezeichnet werden. Das Proteasom ist ein Protease-Komplex, bestehend aus vielen Untereinheiten, der

spezifisch markierte Proteine degradiert und auch bekannt ist als ..."the molecular chamber of doom" [Hopkin; 1997]. Proteasome treten in allen eukaryontischen Zellen auf [Mc Cormack, 1997]. Sie sind im Nukleus und Zytoplasma lokalisiert und können auch mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert sein [Rivett, 1998; Bochtler, 1999].

Das Proteasom zeigt eine hohe Beständigkeit während der eukaryontischen Evolution und einfachere Formen wurden auch in Archaea und Eubakterien gefunden [Coux, 1996]. Proteasome sind eine essentielle Komponente des ATP-abhängigen proteolytischen Abauwegs in eukaryontischen Zellen und verantwortlich für die Degradierung der meisten zellulären Proteine. Es muß bei diesen Proteasekomplexen zwischen den beiden Formen der Partikel (20S und 26S) unterschieden werden. Die 20S Proteasome sind weit verbreitet [Gille, 2003].

Zwei Haupttypen können aufgrund ihrer unterschiedlichen tertiären Struktur voneinander unterschieden werden: das 20S Proteasom und das proteasom-ähnliche Hitzeschockprotein HslV, welches durch den Hitzeschockloklus V codiert wird. Üblicherweise kann jedes biologische Reich durch seinen spezifischen Typ von Proteasom charakterisiert werden. Das 20S Proteasom tritt in Eukaryonten und Archaea auf, wohingegen die HslV Protease in Bakterien zu finden ist.

Das 20S Proteasom und sein bakterielles Gegenstück, die HslV Protease sind multimere, multi-katalytische intrazelluläre Proteasen. Beide sind N-terminale nukleophile Hydrolasen mit N-terminalen Threoninresten. Durch die Evolution und zunehmende Komplexität der Organismen veränderten sich die proteasomalen Sequenzen. Nichtsdestotrotz zeigen alle Untereinheiten eine auffallende Ähnlichkeit in ihrer tertiären Struktur [Gille, 2003].

In *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden große multimere Proteasen gefunden, bei denen die Protein- und ATP-Hydrolyse miteinander verbunden sind. ATP-abhängige Proteasen sind verantwortlich für den intrazellulären – nicht den extrazellulären Abbau von Proteinen in allen Zellen und sogar weiter verbreitet als das Ubiquitinsystem [Coux et al., 1996]. Es ist nicht bekannt, ob das Proteasomsystem in Prokaryonten ein Proteinmarkierungssystem besitzt, das dem Ubiquitinsystem in Eukaryonten äquivalent ist. Es sind keine Ubiquitin-codierende Gene in Prokaryonten gefunden worden, aber es können andere



Markierungssystem involviert sein. So gibt es in Cyanobakterien bei der Heterozystenbildung ein Markierungssystem zum Abbau des Photosystems II.

Die Isolation proteolytischer Aktivität wird erreicht durch den Zusammenbau proteolytischer Untereinheiten zu einem zylinderförmigen Komplex, wobei die aktiven Zentren sich im Inneren dieses Komplexes befinden. So ist es nur ungefalteten Proteinen möglich in den Zylinder einzutreten. Der ATPase-Komplex kann an beiden Enden des faßartigen Komplexes binden und ist wahrscheinlich involviert in die Initiation der Bindung, Entfaltung und Translokation von Substraten (Proteinen, die abgebaut werden sollen) [De Mot, 1999].

Das 20S Proteasom von Prokaryonten und Eukaryonten enthält 28 Untereinheiten, unterscheidet sich aber in der Komplexität: bei Prokaryonten besteht das Proteasom aus 14 Kopien von zwei verschiedenen aber verwandten Polypeptiduntereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , wohingegen eukaryontische Proteasome aus zwei Kopien von jeweils 7  $\alpha$ - und 7  $\beta$ -Untereinheiten gebildet werden. Trotz dieser Unterschiede ist die Architektur dieser Komplexe konserviert [Voges, 1999].

So konnten Homologien durch den Vergleich von Sequenzen zwischen den Untereinheiten eukaryontischer und bakterieller Proteasome festgestellt werden. Alle eukaryontischen Untereinheiten zeigen Übereinstimmungen mit der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheit des Archaea *Thermoplasma acidophilum* (*T. acidophilum*) [Dahlmann, 1991; Zwickl, 1992]. Ein Vergleich von Aminosäuresequenzen der beiden Untereinheiten des *Thermoplasma*-Proteasoms mit Sequenzen verschiedener eukaryontischer Untereinheiten führt zu der Annahme, daß sich eukaryontische Proteasome durch vielfältige Gen-Duplizierungs-Ereignisse aus diesem vorgängigen (ancestral) Proteasom entwickelt haben. So wird das *T. acidophilum*-Proteasom auch als „Ur-Proteasom“ bezeichnet [Zwickl, 1992].

Das 26S Proteasom stellt eine große Protein-Degradationsmaschine dar, hat eine molekulare Masse von 2500 kDa und setzt sich aus annähernd 35 verschiedenen Untereinheiten zusammen [Zwickl, 1999]. Der proteolytische Kernkomplex besteht aus dem 20S Proteasom und ein oder zwei ATP-abhängigen 19S Regulatorpartikeln, die mit den Enden des faßförmigen 20S Zylinders assoziiert sind [Lupas, 1993]. Bei Eukaryonten besteht das 26S Proteasom aus dem proteolytischen 20S-Komplex und dem regulatorischen 19S-Komplex und

degradiert ubiquitin-markierte Proteine bei Abhängigkeit von ATP. Dieser 19S-Komplex besteht aus multiplen ATPasen und anderen Komponenten, die wichtig sind, um Proteinsubstrate zu binden. ATPasen, die ein Teil des eukaryontischen 19S-Komplexes sind, gehören zu einer anderen Familie, der AAA-Familie (**ATPases associated with diverse cellular activities**).

Das Gegenstück bei den Archaea ist das 20S Proteasom, welches einfacher aufgebaut ist. Die Reaktion beim Abbau besteht zum Teil darin, daß autokatalytisch ein Propeptid abgespalten wird und somit den N-terminalen aktiven Rest, Threonin, freisetzt. Andere bakterielle Proteasen sind ClpP und HslV von *E. coli*. Im Gegensatz zum 20S Proteasom, welches aus 4 heptamerischen Ringen besteht, werden diese Komplexe nur durch 2 Ringe, die entweder hexamer (HslV) oder heptamer (ClpP) sind, gebildet. Beide Proteasen, HslV und ClpP, benötigen zum Abbau Energie und sind deswegen mit spezifischen ATPasen der Clp-Familie gekoppelt: HslU mit HslV und ClpX mit ClpA und ClpP [De Mot, 1999].

Die Charakterisierung des ersten eubakteriellen 20S Proteasomkomplexes und Ubiquitins in *Rhodococcus* zeigt, daß Ubiquitin-abhängige Proteolyse und Proteasome in allen Lebensformen auftreten. Bis zu Entdeckung des *Thermoplasma*-Proteasoms ging man davon aus, daß Proteasome ausschließlich in Eukaryonten vorhanden sind [Tamura, 1995].

Ubiquitin ist ein hochkonserviertes kleines Protein, das aus 76 Aminosäuren besteht und in allen Eukaryontenzellen gefunden wird. Ubiquitinylierte Proteine werden in der Regel vollständig vom 26S Proteasom abgebaut [Hilt, 1995].

Die Substratspezifität des *Rhodococcus*-Proteasoms ist analog der Substratspezifität des archaebakteriellen Proteasoms und die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind sehr nahe verwandt zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von Eukaryonten [Tamura, 1995].

## **Ziel dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, hochmolekulare Proteinase des Prokaryonten *Stigmatella aurantiaca*, die mit einer proteasomähnlichen Struktur oder Funktion vergleichbar sein können, zu charakterisieren.

Desweiteren sollte eine Analyse der Wachstums- und Entwicklungsphasen über die zweidimensionale Gelelektrophorese es ermöglichen, eine Korrelation zwischen Veränderung in der Morphologie und Änderung der Polypeptidspektren verschiedener Lebenszustände herstellen zu können.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

#### 2.1.1 2D-Gelelektrophorese

Protean<sup>®</sup> IEF Cell von BioRad Laboratories GmbH

Protean II Xi Kammer mit IPG Conversion Kit von BioRad Laboratories GmbH

GS-710 Calibrated Imaging Densitometer; BioRad Laboratories GmbH

#### 2.1.2 Massenspektrometer

Finnigan LCQ ESI Ion Trap Massenspektrometer, Finnigan, San Jose (CA,USA)

#### 2.1.3 Chromatographie

FPLC<sup>®</sup>-System LCC-501 Plus von Amersham Pharmacia Biotech

Superose 6 HR 10/30 Säule von Amersham Pharmacia Biotech

Mono Q<sup>®</sup> HR 5/5 Säule von Amersham Pharmacia Biotech

#### 2.1.4 Sonstige Geräte

Binokular M420, Leica

Digitale Kamera Olympus DP10, Olympus

Fluoreszenz-Spektrophotometer RF 5301PC, Shimadzu

ISF-200 Kompaktfermenter, Infors HAT GmbH

Photometer; Uvikon 810 P

Photometer Ultraspec 3000, Pharmacia

Sonifier B-15 (Mikrotip, Cuphorn), Branson

Tangentialfiltration, Pellicon 0,45 µm, Millipore

Zentrifugen, Ultrazentrifugen, Beckmann

Semidry Electrobloetter The Panther<sup>™</sup>, Peqlab

Semidry Electrobloetter Pegasus<sup>™</sup>, Phase

Multiphor II Nova Blot, Amersham Pharmacia Biotech

Gelelektrophoresekammern, Hoefer und BioRad

### 2.1.5 Computer und Software

PDQuest™ 2D Analysis Software Version 6, BioRad Laboratories

BLAST Programm zur Datenbanksuche [Altschul, 1990]

FASTA Programm zur Datenbanksuche [Pearson, 1988]

SWISS-PROT Proteindatenbank [Bairoch, 1997 und 1999]

## 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### 2.2.1 Spezielle Chemikalien

Aceton, Merck

Agarose, Gel Electrophoresis Grade, Sigma

7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC), Bachem

Ammoniumpersulfat (APS), Serva

β-Mercaptoethanol, Roth

5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP), Roth

Bromphenolblau, Serva

Casiton, Merck

CHAPS, Sigma

Complete™ und Complete™ EDTA-free, Roche

Coomassie Brilliant Blue G250 und R250 pure, Serva

Dithiotreitol (DTT), Biomol

Dimethylformamid (DMF), Sigma

Eisessig, Merck

Formaldehyd (37%), Merck

Gel 30 Acrylamid, Roth

Glutardialdehyd 25% für die Elektronenmikroskopie, Merck

Indol, Sigma

Iodoacetamid, Sigma

Luminol, Sigma

Magermilchpulver Naturaflor, Töpfer GmbH

Monochloressigsäure, Sigma

Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Serva

Natrium-Acetat, J. T. Baker

Natriumthiosulfat, Agros Organics

N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED), Serva  
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES), Serva  
p-Coumarinsäure, Sigma  
Pharmalyte pH 3-10, Amersham Pharmacia Biotech  
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Roth  
p-Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid (NBT), Roth  
Ponceau S, Sigma  
Silbernitrat, Fluka  
Sucrose für Dichtegradientenzentrifugation, Roth  
Thioharnstoff, Fluka  
Trichloressigsäure (TCA), Riedel-de Haen  
Tween 20, Merck

Standard Chemikalien wurden in p. A. Qualität verwendet.

### **2.2.2 Verbrauchsmaterialien**

Cellophanfolie, Deti GmbH  
Immobilon P PVDF-Membran, Millipore  
3 MM CHr Papier, Whatman  
Nitrozellulose-Membran, Schleicher und Schüll  
ReadyStrip™ IPG Strips, BioRad Laboratories GmbH  
Polyallomer Ultrazentrifugenröhrchen (14 x 95 mm), Beckmann

### **2.2.3 Reagenziensätze für biochemische Methoden**

BioRad Protein Assay, BioRad Laboratories GmbH  
Novex Colloidal Blue Stain Kit, Invitrogen

### **2.2.4 Antibiotika**

Streptomycinsulfat, Serva

### **2.2.5 Bakterienstämme**

*Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1(Str<sup>r</sup>) Wildtyp; [Qualls, 1978]  
*Myxococcus xanthus* DK 1622 Wildtyp; [Kaiser, 1979]

### **2.2.6 Kulturmedien und Kulturböden**

Bacto Agar, Difco Laboratories

Bacto Trypton, Difco Laboratories

Hefeextrakt, Difco Laboratories

### **2.2.7 Tryptonmedium**

1 % Trypton

0,2 %  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}_4$

pH 7,2 mit NaOH eingestellt

### **2.2.8 CY-Medium**

0,3 % Casiton

0,1 % Hefeextrakt

0,1%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

pH 7,2 mit NaOH eingestellt

### **2.2.9 Casiton-Medium**

1 % Casiton

0,15 %  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}_4$

pH 7,2 mit NaOH eingestellt

### **2.2.10 CTT-Medium**

1 % Casiton

10 mM Tris/HCl pH 7,6

1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

8,4 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}_4$

### **2.2.12 Wasseragar**

0,1 %  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Zum Verfestigen der Medien wurde 1,5 % Bacto Agar zugegeben.

Alle Medien wurden bei 121 °C und 1,5 bar 20 Minuten autoklaviert.

## 2.3 Puffer und Lösungen

### 2.3.1 Lysepuffer für 2D-Gelelektrophorese / *S. aurantiaca*

LTU     7 M Harnstoff  
          2 M Thioharnstoff  
          4 % CHAPS  
          1 % DTT  
          0,5 % Pharmalyte pH 3-10  
          Complete Proteaseinhibitor

### 2.3.2 Rehydratisierungspuffer / *S. aurantiaca*

RTU     6 M Harnstoff  
          2 M Thioharnstoff  
          2 % CHAPS  
          0,15 % DTT  
          0,5 % Pharmalyte  
          Spuren von Bromphenolblau

### 2.3.3 Lysepuffer für 2D-Gelelektrophorese / *M. xanthus*

LTM     7 M Harnstoff  
          2 M Thioharnstoff  
          50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
          2,5  $\mu$ g/ml Dnase I  
          2,5  $\mu$ g/ml Rnase I  
          4 % CHAPS  
          1 % DTT  
          2 % Pharmalyte pH 3-10  
          Complete Proteaseinhibitor

### 2.3.4 Rehydratisierungspuffer / *M. xanthus*

RTM     8 M Harnstoff  
          20 mM DTT  
          0,5 % CHAPS  
          0,5 % Pharmalyte pH 3-10



### 2.3.5 Äquibrierungspuffer für 2D-Gelelektrophorese

50 mM Tris/HCl pH 6,8    Im ersten Äquibrierungsschritt werden zu 10 ml  
6 M Harnstoff            Äquibrierungslösung 1 % DTT (w/v) hinzugegeben  
30 % Glyzerin p. A.     und der IPG-Streifen für 10 min bei RT unter  
2 % SDS                 Schütteln in einem Reagenzglas inkubiert. Im zweiten  
Schritt werden zu 10 ml Äquibrierungslösung 4 %  
(w/v) Jodacetamid hinzugegeben und der IPG-  
Streifen für 10 min bei RT unter Schütteln inkubiert.

### 2.3.6 Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl pH 6,8  
0,4 % SDS

### 2.3.7 Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl pH 8,8  
0,4 % SDS

### 2.3.8 Laufpuffer für SDS-PAGE

192 mM Glycin  
25 mM Tris  
0,1 % SDS

Der pH-Wert sollte bei 8,8 liegen. Substanzen genau einwiegen; auf keinen Fall pH durch Säure oder Base einstellen!

### 2.3.9 Westernblot Transferpuffer

Schafer-Nielsen Puffer  
48 mM Tris  
39 mM Glycin  
20% Methanol  
0,0375% SDS

Der pH-Wert sollte bei 9,2 liegen. Nicht einstellen!

### **2.3.10 TBST Inkubationspuffer**

10 mM Tris/pH 8,0  
150 mM NaCl  
0,05 % Tween-20

### **2.3.11 Alkalische Phosphatase-Puffer (AP)**

100 mM Tris/pH 9,5  
100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

### **2.3.12 Substratlösung für die alkalische Phosphatase**

NBT 50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid  
BCIP 50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid

### **2.3.13 Alkalische Phosphatase-Stopplösung**

50 mM EDTA

### **2.3.14 ECL Lösungen für Antikörperdetektion**

Puffer A: 6,8 mM p-Coumarinsäure in 100 % DMSO  
Lichtgeschützt lagern bei -20 °C.

Puffer B: 1,25 mM Luminol in 0,1 M Tris/HCL pH 8,5  
Lichtgeschützt lagern bei -20 °C.

Puffer C: 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Lichtgeschützt lagern bei 4 °C.

### **2.3.15 Protein-Probenpuffer (4x)**

250 mM Tris/HCl pH 6,8  
8 % SDS  
20 % β-Mercaptoethanol  
10 % Glyzerin  
Spuren von Bromphenolblau

### **2.3.16 Coomassie- Färbelösung für SDS-PAGE**

50 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

0,06 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

### **2.3.17 Entfärbelösung für Proteingele**

7,5 % (v/v) Essigsäure

5 % (v/v) Methanol

### **2.3.18 Gelrocknungspuffer**

40 % Methanol

5 % Glyzerin

### **2.3.19 Ponceau-Färbelösung für Westernblots**

0,1 % (w/v) Ponceau S

5 % (v/v) Essigsäure

### **2.3.20 Coomassie-Färbelösung für PVDF-Membranen**

0,1 % Coomassie R250

50% Methanol

10 % Eisessig

### **2.3.21 Entfärbelösung für PVDF-Membranen**

50 % Methanol

10 % Eisessig

### **2.3.22 Lysepuffer für Proteinextraktion**

#### **Sucroседichtegradient und Gelfiltration**

10 mM Hepes/NaOH pH 7,2

10 mM MgCl<sub>2</sub>

Complete Proteaseinhibitor

Vor Gebrauch 1 mM DTT (Endkonzentration) zusetzen.

Alle Puffer die für die Chromatographie verwendet werden, werden mit H<sub>2</sub>O dest. angesetzt, filtriert (0,2 µm) und entgast.

### 2.3.23 Gelfiltrationspuffer

Superose 6

10 mM Hepes/NaOH pH 7,2

100 mM NaCl

Vor Gebrauch 1 mM DTT und 1 mM PMSF (Endkonzentration) zusetzen.

### 2.3.24 Ionenaustauschpuffer

Anionenaustauscher/Mono Q

Laufpuffer

10 mM Hepes/NaOH pH 8

10 mM MgCl<sub>2</sub>

0,2 % CHAPS

10 mM KCl

Elutionspuffer

10 mM Hepes/NaOH pH 8

10 mM MgCl<sub>2</sub>

0,2 % CHAPS

1 M KCl

Vor Gebrauch 1 mM DTT und 1 mM PMSF (Endkonzentration) zusetzen.

### 2.3.25 Reaktionspuffer für Enzymkinetik

50 mM Tris/HCl pH 8,0

25 mM KCl

20 mM MgCl<sub>2</sub>

0,1 mM EDTA

Vor Gebrauch filtrieren (0,2 µm), entgasen, 1 mM DTT und 1 mM PMSF (Endkonzentration) zusetzen.

### 2.3.26 Stopplösung für Enzymkinetik

100 mM Monochloressigsäure

70 mM Essigsäure

30 mM Natrium-Acetat

## 2.4 Sonstige Puffer

### 2.4.1 PBS

8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

140 mM NaCl

### 2.4.2 Hepes-Puffer

100 mM Hepes/NaOH pH 7,2

10 mM CaCl<sub>2</sub>

Steril filtrieren.

### 2.4.3 TM-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 7,6

8 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

## 2.5 Proteine

### 2.5.1 Oligopeptid-Substrat

Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Bachem

Stammlösung: 10 mM in 100 % DMF; Lagerung bei 4°C.

### 2.5.2 Antikörper

#### Primärantikörper

Polyklonaler Antikörper gegen Untereinheiten des 20S Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* aus Kaninchen (AG Baumeister, MPI Martinsried)

#### Antikörperkonjugat

Alkalische Phosphatase (AP) konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper IgG (H&L), Dianova GmbH

Horse Radish Peroxidase (HRP) konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper IgG (H&L), Dianova GmbH

### **2.5.3 Proteingrößenstandards für SDS-PAGE**

SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range, BioRad Laboratories bestehend aus 9 rekombinanten Proteinen mit Molekulargewichten von 6, 14, 21, 31, 45, 66, 97, 116 und 250 kDa.

Precision Plus Protein™ Standards All Blue, Broad Range, BioRad Laboratories bestehend aus 10 rekombinanten Proteinen mit Molekulargewichten von 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa.

High Molecular Weight-SDS Calibration Kit, Amersham Pharmacia Biotech bestehend aus 5 rekombinanten Proteinen mit Molekulargewichten von 53, 76, 116, 170 und 212 kDa.

Low Molecular Weight-SDS Calibration Kit, Amersham Pharmacia Biotech bestehend aus 6 rekombinanten Proteinen mit Molekulargewichten von 14, 20, 30, 43, 67 und 94 kDa.

### **2.5.4 Gelfiltrationsstandard**

Gel Filtration Standard, BioRad Laboratories bestehend aus 5 rekombinanten Proteinen mit Molekulargewichten von 1,35, 17, 44, 158 und 670 kDa.

### **2.5.5 Weitere Standardproteine**

Albumin Standard (BSA) 2 mg/ml in Ampullen, Pierce, Rockford (IL, USA)

## 3 Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Flüssigkulturen von *S. aurantiaca*

Trypton-Medium mit 120 µg/ml Streptomycinsulfat wird mit mindestens  $10^6$  Zellen/ml angeimpft. Die Kultivierung erfolgt bei 32 °C unter Schütteln (130 rpm) und bei Licht bis zur gewünschten Zelldichte. Die Verdopplungszeit in der logarithmischen Phase beträgt ca. 7 h. Da *S. aurantiaca* Zellen in der stationären Phase sehr bald absterben, werden die Bakterienkulturen jeden zweiten Tag passagiert.

#### 3.1.2 Flüssigkulturen von *M. xanthus*

CTT-Medium wird mit mindestens  $10^6$  Zellen/ml angeimpft. Die Kultivierung erfolgt bei 32 °C unter Schütteln (130 rpm) und bei Licht bis zur gewünschten Zelldichte. Die Verdopplungszeit in der logarithmischen Phase beträgt ca. 4 h.

#### 3.1.3 Fruchtkörperbildung bei *S. aurantiaca*

Flüssigkulturen von *S. aurantiaca*, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden werden sedimentiert (4 °C/20 min/5500 rpm). Das Sediment wird im gleichen Volumen Hepes-Puffer gewaschen, erneut in Hepes-Puffer resuspendiert, so daß die Zellzahl bei  $4 \times 10^8$ /ml liegt. Von dieser Suspension werden jeweils 5 µl ( $2 \times 10^8$  Zellen) auf getrocknete Wasseragarplatten (30 min unter der Sterilbank getrocknet) aufgetropft und ca. 20 min getrocknet. Die Inkubation erfolgt für ca. 48 h bei 32 °C. Für die Untersuchungen wurden Fruchtkörper zu verschiedenen Zeitpunkten genommen (8 h, 16 h, 20 h und 40 h) und für die 2D-Gelelektrophorese aufbereitet.

#### 3.1.4 Indol-induzierte Sporenbildung bei *S. aurantiaca*

Die Sporenbildung bei *S. aurantiaca* kann durch Zugabe von Indol ausgelöst werden. Flüssigkulturen mit ca.  $2 \times 10^8$  Zellen/ml werden für 30 min, 60 min oder 90 min mit 0,5 mM Indol bei 32 °C inkubiert. Die Sporenbildung wird mikroskopisch kontrolliert [Gerth und Reichenbach, 1994].

### 3.1.5 Bestimmung des Bakterientiters

Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wird der Bakterientiter bestimmt. Die Anzahl der Bakterien in mehreren Kleinquadraten des Rasters der Zählkammer wird ermittelt, nachdem die Bakterienkultur aufgebracht wurde. Die ermittelte Zahl wird mit  $2 \times 10^7$  multipliziert und ergibt die Zellzahl/ml.

### 3.1.6 Langzeitlagerung von *S. aurantiaca*

Die Lagerung von *S. aurantiaca* muss bei  $-80\text{ °C}$  oder in Flüssigstickstoff erfolgen. Dazu werden 1,5 ml einer Kultur in der logarithmischen Phase sedimentiert ( $4\text{ °C}/20\text{ min}/5500\text{ rpm}$ ), in 1/5 des Ausgangsvolumens resuspendiert und mit sterilem Glycerin (20 %) versetzt.

### 3.1.7 Fermentation von *S. aurantiaca*

Um ausreichend Zellmaterial zu erlangen, werden 10 l Bakterienkultur kultiviert. In einem Fermenter werden 9 l Trypton-Medium für 20 min bei  $121\text{ °C}$  sterilisiert. Nach erfolgter Sterilisation und Erreichen der Fermentations-temperatur von  $32\text{ °C}$  werden 120 mg/l Streptomycinsulfat hinzugefügt. Während der Kultivierung bei Licht werden folgende Faktoren geregelt: Temperatur, pH-Wert und  $\text{O}_2$ -Partialdruck. Der pH-Wert von 7,2 wird mit 1 M NaOH und 1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  eingestellt. Im weiteren Verlauf wird der pH-Wert kontrolliert und automatisch durch Zupumpen von Säure oder Lauge gehalten. Der  $\text{O}_2$ -Partialdruck wird über das Zuluftventil geregelt. Die Sollwerte für eine Fermentation sind  $32\text{ °C}$ , pH 7,2,  $\text{pO}_2$  95 % und Rühren mit 250 Upm, während der Luftdurchfluß maximal 1 NI/min betragen sollte. Zur Animpfung des Fermenters wird eine Vorkultur *S. aurantiaca* von 1 l in Fernbachkolben kultiviert, bis eine Zellzahl von  $2 - 3 \times 10^8$ /ml erreicht ist. Der Fermenter bleibt in Betrieb, bis eine Zellzahl von mindestens  $2 \times 10^8$ /ml erreicht ist. Die Zellen werden geerntet und durch Tangentialfiltration und Zentrifugation aufkonzentriert. Die so erhaltenen Sedimente werden nach einmaligem Waschen in PBS mit 1 mM PMSF in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.



## 3.2 Biochemische und physikalische Methoden

### 3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Da die Proteinbestimmung nach Bradford gegen Harnstoff und SDS relativ unempfindlich ist, kann sie auch bei entsprechend aufbereiteten Proteinlösungen verwendet werden. Sie beruht darauf, daß das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G-250 in sauren Lösungen abhängig von der Proteinkonzentration von 465 auf 595 nm verschoben wird [Bradford, 1976]. Zur Durchführung der Methoden nach Bradford wurde der BioRad Protein Assay verwendet. Dabei werden zu 50 µl Proteinlösung 1 ml 1:5 verdünnte Farblösung gegeben. Parallel zu den Proben werden zur Erstellung einer Eichgerade Standards mit definierten Proteinkonzentrationen (50, 100, 200, 300, 400 µg BSA/ml) gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben kann dann anhand der Eichgerade bestimmt werden. Enthält die Probe harnstoffhaltigen Puffer, so werden auch die Standards mit der entsprechenden Harnstoffmenge versetzt. Die Ermittlung der Proteinkonzentration der unbekanntenen Probe erfolgt mit der erstellten Eichgeraden.

### 3.2.2 Spektroskopische Proteinbestimmung

Die Anwesenheit von Tyrosin- und Tryptophanresten in Proteinen führt dazu, daß Proteine normalerweise ein Absorptionsmaximum bei 280 nm zeigen. Für eine 0,1%ige Lösung eines "Durchschnittsproteins" findet man eine Extinktion bei 280 nm von 1,0 für einen Lichtweg von 1 cm. Einzelne Proteine können aufgrund ihres Trp- oder Tyr-Gehaltes deutlich hiervon abweichen. Da sich solche Abweichungen bei Proteingemischen herausmitteln, kann bei Gemischen in der Regel vom "Durchschnittswert" ausgegangen werden. Da Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei etwa 260 nm zeigen, läßt sich durch die Messung bei 260 nm und 280 nm die Nukleinsäureabsorption bestimmen, wenn diese im Vergleich zur Proteinabsorption nicht zu groß ist. Das Verfahren beruht auf einer Arbeit von Warburg und Christian über Enolase und Hefenukleinsäure [Warburg und Christian, 1941]. Die Probe wird in einer Quarzküvette (1 cm Lichtweg) bei 280 nm und 260 nm vermessen. Als Referenz wird eine entsprechende Pufferlösung eingesetzt. Gegebenenfalls muß die Probe verdünnt werden, damit eine

photometrische Messung möglich ist. Die Proteinkonzentration läßt sich aus folgender Formel berechnen [Stoscheck, 1990; Methods in Enzymology, 1957]:

$$1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260} = \text{Proteinkonzentration in mg/ml}$$

### 3.2.3 Western Blot Transfer

Für die Immunfärbung von Proteinen werden diese nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran übertragen („geblottet“). Dafür werden mehrere Lagen Whatman-Papier, Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran und das Gel in Schafer-Nielsen-Puffer ca. 5 - 10 min äquilibriert. PVDF-Membranen müssen zum Befeuchten vorher 15 s in Methanol und 5 min in H<sub>2</sub>O dest. inkubiert werden. In einer SemiDry-Blotkammer wird luftblasenfrei ein Sandwich bestehend aus Whatman-Papier, Nitrozellulose bzw. PVDF-Membran, Gel und Whatman-Papier zusammen-gesetzt. Der Transfer erfolgt bei konstanter Spannung von maximal 40 V und einer Stromdichte von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 30 bis 60 min. Danach können die Proteine reversibel durch kurze Inkubation der Membran in Ponceau-Färbelösung visualisiert werden. Irreversibel können auf der Membran fixierte Proteine durch Inkubation in Coomassie-Lösung sichtbar gemacht werden.

### 3.2.4 Proteinfällungen

Die Fällung von Proteinen mit TCA ist eine schnelle und effektive Methode, um Proteinlösungen zu entsalzen oder zu konzentrieren, bei der allerdings die Proteine so stark denaturiert werden, daß selbst eine Resuspension in Protein-Probenpuffer schwierig werden kann. Der Vorteil gegenüber der milderen Methanol- und Acetonfällung ist aber neben der hohen Effektivität das geringe Reaktionsvolumen. Für die Fällung werden zu 1 ml Proteinlösung mit mindestens 5 µg Protein 250 µl 50%ige TCA (10 % Endkonzentration) gegeben. Nach Inkubation bei 4 °C für 30 min werden die gefällten Proteine 20 min bei 14000 g und 4 °C sedimentiert und einmal mit 1 ml 80%igem Aceton gewaschen. Danach wird erneut 15 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wird kurz bei Raumtemperatur getrocknet und dann sofort in Proteinprobenpuffer oder Lyse-puffer aufgenommen.

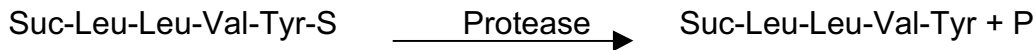
### 3.2.5 Sucroседichtegradient-Zentrifugation (SDZ)

Durch Zentrifugation von Proben durch einen Sucroседichtegradienten können Proteine, DNA, RNA und andere Partikel fraktioniert werden. Die Trennung erfolgt aufgrund der verschiedenen Dichte der Partikel und deren Sedimentationsverhalten im Medium. Zur Trennung von Proteinextrakten von *S. aurantiaca* wird ein 10 - 40%iger Sucrose-Dichtegradient verwendet. Hierzu werden 10%ige bzw. 40%ige Sucroselösungen in Lysepuffer (s. 2.3.20) hergestellt. In einem Gradientenmischer wird die Kammer mit Ausfluss mit 6 ml der 10%igen und die verschlossene Kammer mit 6 ml der 40%igen Sucroselösung befüllt. In beiden Kammern befinden sich zusätzlich kleine Magnetrührfische. Nach Öffnen des Verbindungsventils werden Polyallomer-Röhrchen langsam durch eine an den Ausfluß des Gradientenmischers angeschlossene Kanüle befüllt. Es entsteht ein linearer Gradient, der von oben nach unten eine zunehmende Sucrosekonzentration hat. Sucroselösungen und fertig gegossene Gradienten sollten bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Gradienten werden vorsichtig mit dem Überstand der aufgebrochenen Zellen beladen (s. 3.2.7). Eine Verwirbelung sollte dabei vermieden werden. Die Röhrchen müssen bis auf ca. 2 bis 3 mm unterhalb des Rands aufgefüllt werden, um ein Kollabieren der Röhrchen während der Ultrazentrifugation zu vermeiden. Es ist unbedingt auf eine exakte Tarierung der Röhrchen zu achten! Zur Zentrifugation wird ein SW40 Rotor verwendet. Es gelten folgende Laufbedingungen: 40000 rpm,  $\omega^2t = 1 \times 10^{12}$ rad/s (= 15 h 50 min), 4 °C. Nach der Zentrifugation werden vorsichtig Fraktionen von oben abgezogen.

### 3.2.6 Enzymaktivitätsassay

Proteinextrakte von *S. aurantiaca* werden mit Hilfe eines proteasomspezifischen Oligopeptidsubstrats (s. 2.5.1) auf eine mögliche proteolytische Aktivität hin untersucht. Die endständige Gruppe des verwendeten Oligopeptidsubstrats ist 4-Methyl-7-Coumarylamid (**S**). Nach einer enzymatischen Reaktion wird als Produkt (**P**) 7-Amino-4-Methyl-Coumarin – ein Fluorogen – freigesetzt. Die Extinktion des freigesetzten Fluorogens beträgt 380 nm, die Emission 470 nm. Die Messung wird in einem Fluoreszenz-Spektrophotometer RF 5301PC von Shimadzu mit einer Spaltbreite von 5 nm und einer Messdauer von 1 s durchgeführt. Es werden

Fluoreszenz-Quarzküvetten mit einem Durchmesser von 10 mm und einem Messvolumen von 1 ml verwendet.



Reaktionsansatz: 1 ml Reaktionspuffer (s. 2.3.25)

20  $\mu\text{M}$  Oligopeptidsubstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC

5 – 20  $\mu\text{l}$  der zu messenden Probe

Die Proben werden bei 37 °C im Wasserbad für 1 h inkubiert, danach wird die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Stopplösung (s. 2.3.24) beendet. Parallel zu den Proben werden zur Erstellung einer Eichgerade Standards mit definierten AMC-Konzentrationen vermessen. Hierzu wird aus einer 10 mM AMC-Stammlösung in 100 % DMF eine 100  $\mu\text{M}$  Arbeitslösung hergestellt. Die Verdünnung der Stammlösung erfolgt in  $\text{H}_2\text{O}$  dest.. Die Endkonzentrationen der Eichlösungen betragen zwischen 0,1  $\mu\text{M/ml}$  und 1,0  $\mu\text{M/ml}$ . Um eine Verfälschung der Messung zu vermeiden, werden auch den Eichlösungen 100  $\mu\text{l}$  Stopplösung zugesetzt, so daß das Endvolumen 1,1 ml beträgt. Die Ermittlung der proteolytischen Aktivität der unbekanntes Probe erfolgt mit der erstellten Eichgeraden.

### 3.2.7 Gewinnung von Proteinextrakten für SDZ

*S. aurantiaca*-Sedimente werden in Lysepuffer (s. 2.3.20) resuspendiert und unter ständiger Kühlung bei 4 °C durch acht 15 s lange Ultraschallimpulse im Cuphorn eines Branson-Sonifiers aufgeschlossen. Hierbei ist darauf zu achten, daß die Proben nicht denaturieren und eine Schaumbildung vermieden wird. Unlösliche Bestandteile werden sedimentiert (13000 rpm/4 °C/20 min) und Überstand 1 wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Sediment wird nochmals in ca. 200 bis 300  $\mu\text{l}$  Lysepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (14000 g/4 °C/10 min). Überstand 2 wird mit Überstand 1 vereinigt und die Proteinkonzentration wird mit Hilfe des Bradford-Assays ermittelt. Desweiteren wird die Enzymaktivität (s. 3.2.6) bestimmt. Es ist darauf zu achten, daß die Proben immer im Eisbad aufbewahrt werden, um eine Proteolyse zu verhindern.

### 3.3 Gelelektrophoretische Methoden

#### 3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelsysteme

##### Trenngel:

Komponente/% AA	10 %	12,5 %	15 %
30% AA (29/1)	10 ml	12,5 ml	15 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
H <sub>2</sub> O oder 2 % Glycerin	12,5 ml	10 ml	7,5 ml
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl
10 % APS	300 µl	300 µl	300 µl
Gesamtvolumen	30 ml		

##### Sammelgel:

Komponente/% AA	4,5 %
30% AA (29/1)	3 ml
Trenngelpuffer	5 ml
H <sub>2</sub> O oder 2 % Glycerin	12 ml
TEMED	20 µl
10 % APS	100 µl
Gesamtvolumen	20 ml

#### 3.3.2 Eindimensionale (1D)-Gelelektrophorese

Die eindimensionale elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt in SDS-Tris/Glycin-Polyacrylamidgelen nach der Methoden von Laemmli [Laemmli, 1970] und nach der Anleitung des Herstellers der jeweilig verwendeten Gelelektrophoresekammern. Je nach zu erwartenden Molekulargewichten der Proben werden 7,5 bis 15%ige Gele gegossen: nach Anleitung in 3.3.1 wird die entsprechende Trenngellösung zusammen pipettiert. APS wird erst direkt vor dem Gießvorgang zugesetzt. Das gegossene Trenngel wird mit Isopropanol überschichtet und polymerisiert innerhalb von 30 min. Danach wird das Trenngel mit einem ca. 1,5 cm hohem Sammelgel überschichtet und die Kämme werden eingesetzt. Das Sammelgel polymerisiert innerhalb von 45 min. Nach Waschen der entstandenen Taschen mit Wasser und Auffüllen der oberen und unteren Kammer mit SDS-Tris/Glycin-Laufpuffer können die Proben eingefüllt werden. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes trennt man einen entsprechenden Proteinmarker parallel auf. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel, bis die Lauffront das Gelende erreicht hat. Die Gesamtlaufzeit beträgt ca. 45 bis 60 min.

### 3.3.3 Gewinnung von Proteinextrakten für 1D-Gelelektrophorese

*S. aurantiaca* Sedimente, entweder von vegetativen Zellen oder indolbehandelten Zellen (Sporen) werden in Lysepuffer (s. 2.3.1) resuspendiert (ca.  $1 \times 10^{10}$  Zellen in 200  $\mu$ l Lysepuffer), im Cuphorn eines Branson-Sonifiers 8 x 15 s bei 4 °C zerschallt und in einer Ultrazentrifuge sedimentiert (30 min/35000 rpm/15 °C). Im Überstand wird mittels Bradford die Proteinmenge bestimmt und durch Vermischen mit Proteinprobenpuffer (s. 2.3.13) werden die gelösten Proteine der SDS-PAGE zugänglich gemacht. Sedimente zur Proteinextraktion aus Fruchtkörpern von *S. aurantiaca* werden wie folgt gewonnen: nach Inkubation bei Licht und 32 °C auf Wasseragarplatten (s. 3.1.3) werden die Fruchtkörper-Spots mit HEPES-Puffer (s. 2.4.2) von der Platte gespült, sedimentiert (20 min/5500 rpm/4 °C) und in PBS mit 1 mM PMSF (Endkonzentration) gewaschen (10 min/5500 rpm/4 °C). Die Sedimente können bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

### 3.3.4 Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese wird mit immobilisierten pH-Gradienten nach den Anleitungen von A. Görg [Görg 1988; 1995; 1998; 2000].

### 3.3.5 Gewinnung von Proteinextrakten für 2D-Gelelektrophorese

*S. aurantiaca* Sedimente, entweder von vegetativen Zellen oder indolbehandelten Zellen (Sporen) werden in Lysepuffer (s. 2.3.1) resuspendiert (ca.  $1 \times 10^{10}$  Zellen in 200  $\mu$ l Lysepuffer), im Cuphorn eines Branson-Sonifiers 8 x 15 s bei 4 °C zerschallt und in einer Ultrazentrifuge sedimentiert (30 min/35000 rpm/15 °C). Der klare Überstand wird in Aliquots bei -80 °C gelagert, nachdem die Proteinmenge mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt wurde. Sedimente zur Proteinextraktion aus Fruchtkörpern von *S. aurantiaca* werden wie folgt gewonnen: nach Inkubation bei Licht und 32 °C auf Wasseragarplatten (s. 3.1.3) werden die Fruchtkörper-Spots mit HEPES-Puffer (s. 2.4.2) von der Platte gespült, sedimentiert (20 min/5500 rpm/4 °C) und in PBS mit 1 mM PMSF gewaschen (10 min/5500 rpm/4 °C). Die Sedimente können bei -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert werden. Die Proteinkonzentration der Extrakte sollte zwischen 3 mg/ml bis 6 mg/ml liegen.

### 3.3.6 Isoelektrische Fokussierung mit IEF-Cell

Die Protean<sup>®</sup> IEF Cell dient zur gleichzeitigen Rehydratisierung und Fokussierung von IPG-Streifen. Die Streifen werden in die Vertiefungen des IEF-Trays mit der Probe zusammen gequollen und dabei oder anschließend direkt fokussiert. Dazu pipettiert man ein von der Streifenlänge abhängiges Volumen Probenlösung, bestehend aus Proteinlösung und Rehydratisierungspuffer in die Mitte der Vertiefung, wobei zu beachten ist, daß die Lösung den Boden gleichmäßig bedeckt. Nach Entfernung der Schutzfolie wird der IPG-Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten in die Vertiefung gelegt. Jede Rehydratisierung erfolgt für 12 h bei 50 V und 20 °C. Die anschließende Fokussierung findet bei einer Stromstärke von 0,03 bis 0,05 mA/Streifen und 20 °C statt. Je nach verwendeter Streifenlänge, pH-Gradient und aufgetragener Proteinmenge ändert sich das Protokoll:

IPG-Streifen 17 cm, pH 3 – 10, 50 µg oder 100 µg Protein

Step	Volt	Ramp	Time	
Step 01	200	rapid	1 h	
Step 02	500	rapid	1 h	Bei einer Proteinmenge von 150 µg
Step 03	10 000	linear	1 h	verlängert sich die Fokussierungszeit um
Step 04	10 000	slow	2,5 h	1 Stunde von 2,5 h auf 3,5 h (Step 04).
Step 05	500	rapid	hold	

IPG-Streifen 7 cm, pH 3 – 10, 50 µg Protein

Step	Volt	Ramp	Time
Step 01	200	rapid	1 h
Step 02	500	rapid	1 h
Step 03	4000	linear	0,5 h
Step 04	4000	slow	1,5 h
Step 05	500	rapid	hold

### 3.3.7 Zweite Dimension

#### Äquibrierung

Bevor die IPG-Streifen in der zweiten Dimension getrennt werden können, müssen diese mit SDS beladen und erneut mit DTT und Jodacetamid behandelt werden. Dazu inkubiert man die IPG-Streifen je zweimal 10 min in 10 ml Äquibrierungspuffer (für 1 oder 2 Streifen 10 ml Puffer) in einem Reagenzglas unter leichtem

Schütteln. Im ersten Schritt wird mit 1 % DTT behandelt, im zweiten Schritt mit 4 % (w/v) Jodacetamid.

### **Auftrennung**

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgt in vertikalen Polyacrylamid-Tris/Glycin-SDS-Gelen. Für 17 cm lange IPG-Streifen wird die BioRad Protean Xi-Kammer mit 20 x 20 cm<sup>2</sup> großen Gelen verwendet. Nach Anleitung in 3.3.1 wird die entsprechende Gellösung zusammen pipettiert, nach Zusatz von APS zwischen die Glasplatten bis zum oberen Rand gefüllt und der Kamm eingesetzt, ohne daß sich Luftblasen bilden. Für 20 x 20 cm<sup>2</sup> große Gele wird der Gießstand dafür gut vorgekühlt, um ein vorzeitiges Polymerisieren zu verhindern. Nach einer Stunde ist das Gel polymerisiert. Nach Ziehen des Kamms wird die Probentasche mit H<sub>2</sub>O dest. gespült. Der Äquilibrierte IPG-Streifen wird an der Plastikseite kurz mit H<sub>2</sub>O dest. abgespült, in Laufpuffer getaucht, direkt zwischen den Glasplatten auf das SDS-Gel gelegt und luftblasenfrei mit handwarmer Agaroselösung (0,8 % in H<sub>2</sub>O dest.) fixiert. Die Laufbedingungen bei 20 °C mit angeschlossener Kühlung in der Biorad Protean Xi Kammer betragen 20 mA/Gel für 1 h, 40 mA/Gel für 1 h, danach wird die Stromstärke auf 50 mA/Gel erhöht, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat (ca. 2 bis 3 h). Die Gesamtlaufzeit beträgt ca. 4 bis 5 h. Die Auftrennung in der Hoefer Mighty Small oder BioRad Mini2D-Kammer erfolgt bei konstanter Stromstärke von 20 mA/Gel, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat. Die Gesamtlaufzeit beträgt ca. 1,5 bis 2 h.

### **3.3.8 Trocknen von Polyacrylamidgelen**

Um große (20 x 20 cm<sup>2</sup>) Polyacrylamidgele auf Dauer haltbar zu machen, können sie zwischen Cellophanfolien getrocknet werden. Die gefärbten Gele werden 10 min bei leichtem Schütteln in Geltrocknungspuffer (s. 2.3.16) inkubiert. Zwei Cellophanfolien werden in H<sub>2</sub>O dest. gewässert. In einem Rahmen wird ein Sandwich bestehend aus Folie, Gel und Folie aufgebaut und mit Klammern fixiert. Werden kleine (8 x 10 cm<sup>2</sup>) Polyacrylamidgele getrocknet, kann auf eine Inkubation in Geltrocknungspuffer verzichtet werden. Die Gele benötigen 1 bis 2 Tage um vollständig durchzutrocknen.



### 3.4 Chromatographische Methoden

Alle chromatographischen Methoden werden auf einer FPLC<sup>®</sup>-System LCC-501 Plus-Anlage von Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Alle Puffer und Laufmittel werden durch Filter (0,2 µm Porengröße) gereinigt und vor Gebrauch entgast.

#### 3.4.1 Gelfiltrationschromatographie

Zur Gelfiltration (Säulenchromatographie) wird eine Superose 6 HR 10/30 Säule von Amersham Pharmacia Biotech verwendet, die gemäß den Anleitungen des Herstellers vorbereitet wird. Maximal können 200 µl Probenvolumen aufgetragen werden. Entweder wird die Säule manuell gefahren oder folgendes Programm wird angewendet:

Volume/ml	Instruction	Value
0.00.	Conc %B	0.0
0.00	ml/min	0.40
0.00	cm/ml	1.00
1.00	Value.Pos	1.2
1.00	Clear Data	
1.00	Monitor	1
1.00	Level %	5.0
1.00	ml/Mark	1.0
1.00	Integrate	1
2.00	Valve.Pos	1.1
6.00	Port.Set	6.1
30.00	Port.Set	6.0
30.00	Integrate	0
30.00	Prt Pk	1.05
30.00	Conc %B	0.0

#### 3.4.2 Gewinnung von Proteinextrakten für die Gelfiltration

*S. aurantiaca*-Sedimente werden in Lysepuffer (s. 2.3.20) resuspendiert, in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und unter ständiger Kühlung bei 4 °C durch 6 bis 8 mal 15 s lange Ultraschallimpulse im Cuphorn eines Branson-Sonifiers aufgeschlossen. Hierbei ist darauf zu achten, daß die Proben nicht denaturieren und eine Schaumbildung vermieden wird. Unlösliche Bestandteile werden sedimentiert (13000 rpm/4 °C/20 min) und Überstand 1 wird in ein frisches

Reaktionsgefäß überführt. Das Sediment wird nochmals in ca. 200 bis 300 µl Lysepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (14000g/4 °C/10 min). Überstand 2 wird mit Überstand 1 vereinigt, filtriert (0,2 µm) und die Proteinkonzentration wird mit Hilfe des Bradford-Assays ermittelt. Desweiteren wird die Enzymaktivität (s. 3.2.6) bestimmt. Es ist darauf zu achten, daß die Proben immer im Eisbad aufbewahrt werden, um eine Proteolyse zu verhindern.

### 3.4.2 Ionentauscherchromatographie

Die Ionentauscher-Chromatographie (Säulenchromatographie) wird mit einer Mono Q<sup>®</sup> HR 5/5 Säule von Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt, die gemäß den Anleitungen des Herstellers vorbereitet wird. Da es sich um eine adsorptive Technik handelt, können auch große Volumina verdünnter Lösungen aufgetragen werden. Es werden die entsprechenden Puffer für Anionentauscher verwendet. Folgendes Programm wird angewendet:

Volume/ml	Instruction	Value
0.00.	Conc %B	0.0
0.00	ml/min	1.0
0.00	cm/ml	0.5
3.00	Conc %B	0.0
3.00	Port.Set	6.1
13.00	Conc %B	50.0
18.00	Conc %B	100.0
23.00	Conc %B	100.0
23.00	Conc %B	0.0
23.00	Port.Set	6.0
28.00	Conc %B	0.0

## 3.5 Visualisierung von Biomolekülen

### 3.5.1 Coomassie-Färbung von Proteinen

Nach der Elektrophorese wird das Gel 30 bis 45 min in Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Entfärbung erfolgt unter leichtem Schütteln in Coomassie-Entfärbelösung, die mehrmals gewechselt wird. Das Gel kann in H<sub>2</sub>O dest. für ca. 2 Wochen bei 4 °C gelagert und dann zwischen Cellophanfolie getrocknet werden.

### 3.5.2 Silberfärbung von Proteinen nach Blum

Die Silberfärbung nach Blum wird standardmäßig für 2D-Gele eingesetzt [Blum, 1987]. Da die Proteine nicht mit Glutardialdehyd vernetzt werden, ist die Färbung mit der Massenspektrometrie kompatibel. Alle Schritte erfolgen unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Alle Lösungen werden in H<sub>2</sub>O dest. angesetzt, Ethanol kann vergällt sein. Für zwei 20 x 20 cm<sup>2</sup> große 2D-Gele werden ca. 500 ml Lösung benötigt.

- Fixierung: über Nacht oder mindestens 2 h in 40 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Eisessig
- Waschen: dreimal für 20 min mit 30 % (v/v) Ethanol
- Sensitivierung: 1 min in 0,1 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in 500 ml H<sub>2</sub>O dest. inkubieren
- Waschen: dreimal für 20 s mit H<sub>2</sub>O dest.
- Färbung: 20 min in 1 g AgNO<sub>3</sub> und 125 µl Formaldehyd (37 %) in 500 ml H<sub>2</sub>O dest.
- Waschen: zweimal 20 s mit H<sub>2</sub>O dest.
- Entwickeln: mit 15 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 250 µl Formaldehyd (37 %) in 500 ml H<sub>2</sub>O dest. bis die Proteine dunkel genug gefärbt sind
- Waschen: zweimal 20 s mit H<sub>2</sub>O dest.
- Stop: 10 min in 1 % Glycin
- mehrmals mit H<sub>2</sub>O dest. waschen

Das gefärbte Gel kann für eine Woche bei 4 °C gelagert und dann zwischen Cellophanfolie getrocknet werden.

### 3.5.3 Silberfärbung von Proteinen nach Heukeshoven

Die Silberfärbung nach Heukeshoven dient speziell der Anfärbung von basischen Proteinen [Heukeshoven, 1988]. Allerdings ist sie nicht mit der Massenspektrometrie kompatibel, da die Proteine mit Glutardialdehyd vernetzt werden. Alle Schritte erfolgen unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Alle Lösungen werden in H<sub>2</sub>O dest. angesetzt, Ethanol kann vergällt sein. Für zwei 20 x 20 cm<sup>2</sup> große 2D-Gele werden 600 ml von jeder Lösung benötigt.

- Fixierung: 30 min in 40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Eisessig  
1 h in 30 % (v/v) Ethanol, 0,2 % (w/v) Na-Acetat,  
7,8 % (w/v) Glutardialdehyd und 0,2 % (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
über Nacht oder mindestens 1 h in 30 % (v/v) Ethanol  
und 5 % (v/v) Eisessig
- Waschen: 1,5 h bis 2 h mit H<sub>2</sub>O dest. (mehrmals wechseln)
- Färbung: 30 min in 0,1 % (w/v) AgNO<sub>3</sub>  
und 300 µl (0,02 % v/v) Formaldehyd (37 %)
- Waschen: zweimal 20 sec mit H<sub>2</sub>O dest.
- Entwickeln: mit 3 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 150 µl  
und (0,04 % v/v) Formaldehyd (37 %)
- Waschen: zweimal 20 sec mit H<sub>2</sub>O dest.
- Stop: 10 min in 1 % Glycin
- mehrmals mit H<sub>2</sub>O dest. waschen

Das gefärbte Gel kann für eine Woche bei 4°C gelagert und dann zwischen Cellophanfolie getrocknet werden.

### 3.5.4 Kolloidale Coomassie-Färbung von Proteinen

Die kolloidale Coomassie-Färbung wird mit dem Novex Colloidal Blue Stain Färbekit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und beruht auf der Methode von Neuhoff et al. [Neuhoff, 1988]. Alle Lösungen werden mit H<sub>2</sub>O dest. angesetzt.

Fixierung: 2 h oder über Nacht 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig

Färbung: (für 1 Gel 16 x 16 cm oder 20 x 20 cm<sup>2</sup>)

Für mindestens 12 h 100 ml der Färbelösung (i. e. 55 ml H<sub>2</sub>O dest.,  
20 ml Methanol, 25 ml Stainer A und 100 ml Stainer B) hinzugeben.

Nach 1 h bis 2 h sieht man die Proteinspots vor einem klaren Hintergrund. Nach 12 h kann mit H<sub>2</sub>O dest. entfärbt werden bis der Hintergrund klar ist. Ein weiteres Mal färben steigert die Sensitivität geringfügig. Die kolloidale Färbung eignet sich besonders für die massenspektrometrische Analyse. Die Nachweisgrenze liegt dabei nach Angaben des Herstellers bei ca. 10 ng BSA pro Bande.

### 3.5.5 Ponceau-Färbung von Westernblots

Nach dem Western-Transfer können Proteine auf Nitrozellulose Membranen durch Färbung mit Ponceau S sichtbar gemacht werden. Hierzu wird die Membran kurz in 0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % Essigsäure inkubiert und der überschüssige Farbstoff mit H<sub>2</sub>O dest. abgewaschen. Diese Art der Färbung ist reversibel.

### 3.5.6 Detektion von Antikörpern

Nachdem Proteine auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert wurden, können sie mittels spezifischer Antikörper detektiert werden. Hierzu werden die Membranen vor Antikörperinkubation blockiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern. Die Blockierung der Membran erfolgt für 1 h bei RT in TBS-T mit 5% Magermilchpulver. Bevor die Membran mit dem ersten Antikörper inkubiert wird, wird die Membran 3 x 5 – 10 Minuten mit TBS-T bei RT gewaschen. Anschließend wird die Membran mit dem ersten Antikörper in geeigneter Verdünnung in TBS-T für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran (s. o.) erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT. Der sekundäre Antikörper wird ebenfalls in geeigneter Verdünnung in TBS-T eingesetzt. Nach nochmaligem Waschen der Membran (s. o.) erfolgt die Entwicklung der Membran. Da zwei verschiedene gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet wurden (gekoppelt an alkalische Phosphatase und Meerrettich-Peroxidase) müssen unterschiedliche Detektionsmethoden angewendet werden.

#### **Detektion von Meerrettich-Peroxidase konjugiertem sekundären Antikörper**

Die Chemolumineszenz- (ECL-) Methode basiert auf der Detektion von Lichtemission. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol. Nach der Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase markierten sekundären Antikörper wird die Membran 1 Minute bei RT mit ECL-Lösung (0,1 ml Puffer A + 10 ml Puffer B + 3 µl Puffer C; s. 2.3.12) inkubiert. Das Signal der Lichtemission wird mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

#### **Detektion von alkalische Phosphatase konjugiertem sekundären Antikörper**

Nach der Inkubation mit dem alkalische Phosphatase markierten sekundären Antikörper wird die Membran erst kurz in AP-Puffer (s. 2.3.11) äquilibriert. Danach werden die Signale durch Inkubation in Substratlösung (s. 2.3.12) sichtbar gemacht. Die Reaktion wird durch Inkubieren der Membran in Stopplösung (s. 2.3.13) gestoppt.

### 3.6 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine physikalische Trennmethode mit der auch in der Proteinanalytik hochaufgelöste Massenbestimmungen erreicht werden. Sie basiert auf dem Prinzip, daß ionisierte Teilchen (Molekülionen, Fragmentionen) im Vakuum auf einer bestimmten Strecke beschleunigt werden und anschließend in einem Magnetfeld entsprechend ihrer Masse unterschiedlich abgelenkt werden. Die Genauigkeit der Massenbestimmungen ist bei einer Auflösung von  $(m/\Delta m) \sim 20$  ppm sehr hoch.

Der allgemeine Aufbau eines Massenspektrometers aus Ionenquelle, Trennstrecke und Detektor ist besonders entsprechend spezieller Anforderungen der Ionisierung der zu untersuchenden Teilchen in der Baueinheit Ionenquelle sehr differenziert. Die Ionisation von Biomolekülen wird bevorzugt mit zwei Methoden durchgeführt: Elektrospray-Ionisierung (ESI) und Matrix-unterstützte Laser-Desorption (MALDI).

Aus den Massenspektren, bei denen die Proteine mit Elektrospray ionisiert werden, erhält man die Molekülmassen; die Erzeugung mehrfach geladener Molekülionen erschwert allerdings die Analyse von Mischungen.

Terminologie: MS-Spektren.

Bei der ESI wird die Probelösung in eine Strecke mit einigen kV Potentialdifferenz gesprüht. Das Lösungsmittel im elektrostatisch geladenen Tröpfchen verdampft im Gasstrom. Das Makromolekül mit mehreren Ladungen  $z$  erscheint bei niedrigem  $m/z$ . Für Proteine gilt  $m/z = 600 \dots 2000$  auch für 200 kDa-Proteine.

Bei der MALDI-Methode geschieht die Ionisation aus einer in eine feste Matrix eingeschlossenen Probe durch gepulste Laserstrahlung und Verdampfung. Es handelt sich um eine sanfte Ionisation (meist) ohne Fragmentation.

In der für die eigene Arbeit bevorzugten Tandem-Massenspektrometrie (Terminologie: MS/MS-Spektren) wird die Fragmentierung ionisierter Proteine durch Kollisionen mit einem Neutralgas (CID = collision-induced dissociation) bewirkt. Im Anschluß wird aus dem Molekularionen-Cluster ein einziges monoisotopisches  $C^{12}$ -Ion isoliert und in einer zweiten Kammer analysiert.

Für die Proteinanalytik besteht die Notwendigkeit der weitgehenden Vortrennung der zu untersuchenden Proteine, da sonst die Zahl der detektierten Massen und/oder Molekülfragmente so hoch wäre, daß eine Zuordnung zum untersuchten Protein/gemisch schwierig wird. Die Identifizierung der detektierten Massen findet

sinnvollerweise im Vergleich mit bestehenden Datenbanken statt. Der Informationsgehalt der vollen MS-Spektren (Vorläuferionenspektren, „precursor ion scan“) besteht in der Massenbestimmung der Ionen, welche in einem zweiten Analytikschritt dann fragmentiert werden. Die MS/MS-Spektren liefern die Massen der Fragmentationen.

### **3.6.1 In-Gel-Trypsinverdau**

Im 1D- oder 2D-Gel aufgetrennte Proteine können für die massenspektrometrische Analyse im Gel mit Trypsin verdaut und aus dem Gel eluiert werden. Die Trypsinspaltung läuft C-terminal von Lysin und Arginin.

### **3.6.2 Elektrosprayionisation nach HPLC-Trennung**

Die Eluate aus der vorgeschalteten HPLC gelangen über eine Kapillare in die Elektrospray-Ionenquelle. Nach Verdampfung des Lösungsmittels findet die schonende Ionisation zu 2 bis 3fach positiv geladenen Ionen statt, deren Massen in der Ionenfalle ermittelt werden. Die Massen mit der höchsten und zweithöchsten Ionenmenge (Signalstärke) werden für die Fragmentation durch Kollision mit Heliumatomen (collision induced decay, CID) ausgewählt und die Fragmentmassenspektren gefahren.

## 4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, eine hochmolekulare Proteinase, eventuell eine proteasomähnliche Struktur, aus *Stigmatella aurantiaca* zu isolieren und gegebenenfalls zu charakterisieren.

Dazu wurden hauptsächlich proteinbiochemische Methoden verwendet; die Nachweise wurden über Westernblotanalyse mit einem proteasomspezifischen Antiserum, Enzymaktivitätsmessungen mit einem proteasomspezifischen Substrat, zweidimensionale Gelelektrophorese, Sucroседichtegradienten-Zentrifugation, Gelfiltration, Anionenaustauscherchromatographie und Elektronenmikroskopie geführt.

Zur besseren Übersicht der vielfältigen und komplexen Ergebnisse ist in Abb. 4-1 das Schema der Verknüpfungen dargestellt.

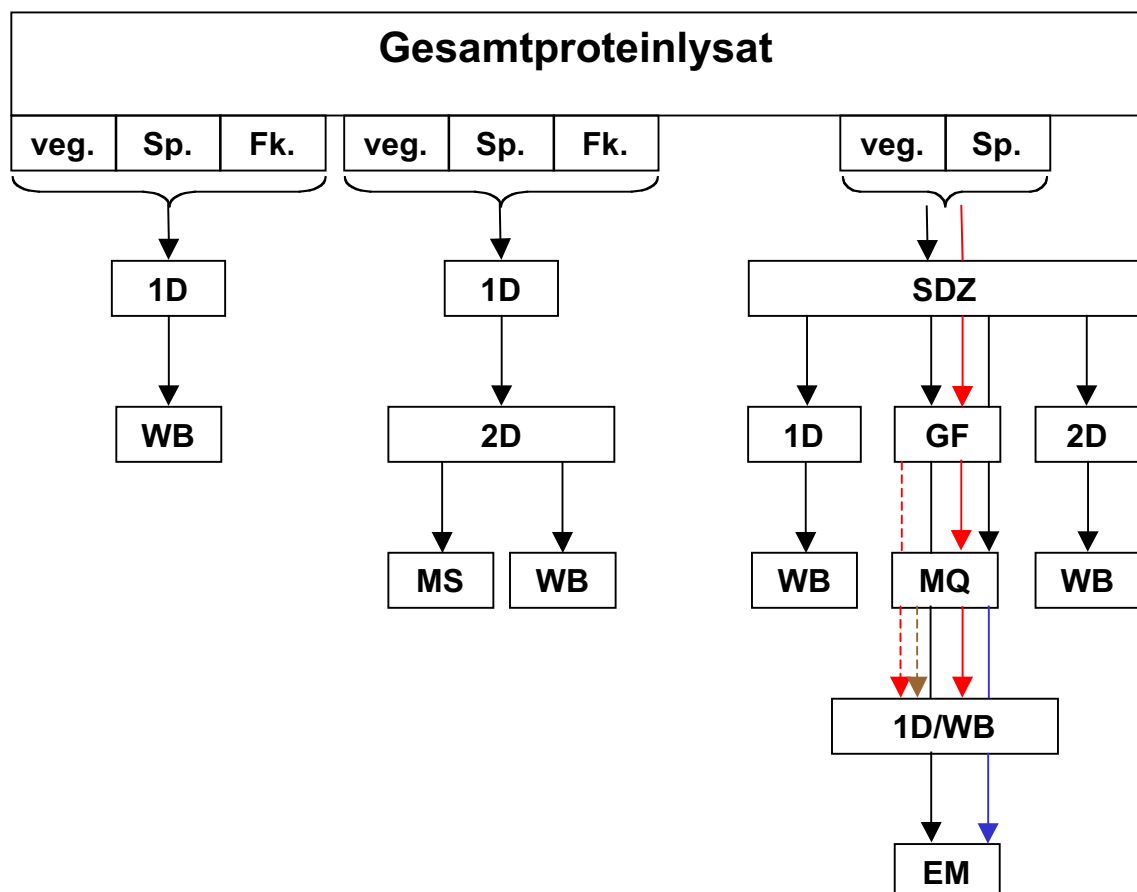


Abb. 4-1: Verknüpfung der Methoden nach denen die Ergebnisse dargestellt werden. Es bedeuten: 1D eindimensionale Proteingelelektrophorese; WB Westernblot; 2D zweidimensionale Proteingelelektrophorese; MS Massenspektrometrie; GF Gelfiltration; MQ Anionenaustauscherchromatographie; veg. vegetative Zellen; Sp. Sporen; Fk. Fruchtkörper.



Die Schematisierung der angewandten Methoden und Untersuchungsabläufe mündet in der nachfolgenden Ergebnisbeschreibung nicht in allen Details. Ursache ist, daß auch bei manchen unterschiedlichen Untersuchungsabläufen gleiche Ergebnisse erzielt wurden und eine multiple monotone Wiederholung keine weiteren Erkenntnisse gebracht hätte.

#### 4.1 Differenzierung von Wachstumszuständen bei *S. aurantiaca*

*S. aurantiaca* durchläuft in seinem zweigeteilten Lebenszyklus verschiedene Wachstums- und Entwicklungszustände. Läßt man vegetative Zellen auf Wasseragarplatten hungern, beginnt die Bildung von Aggregaten, in deren Endstadium Fruchtkörper entstehen, die in ihren Sporangien Sporen enthalten. Diese Veränderungen der morphologischen Struktur lassen sich auch im Proteinbandenmuster des jeweiligen Entwicklungs- und Wachstumszustandes nachvollziehen, wenn Proteinextrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt werden.

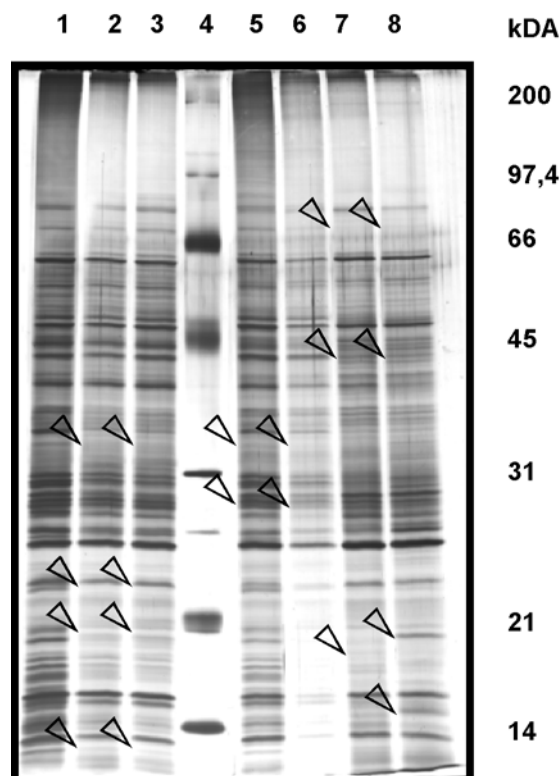


Abb. 4.1-1: 12,5%ige SDS-Page von verschiedenen Wachstumszuständen von *S. aurantiaca* Spur 1: vegetative Zellen; Spur 2: Sporen aus 30 min Indol-behandelten Zellen; Spur 3: Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen; Spur 4: Molekulargewichtsmarker; Spur 5: 8 h Fruchtkörper (FK); Spur 6: 16 h FK; Spur 7: 20 h FK; Spur 8: 40 h FK. Jede Spur – mit Ausnahme von Spur 4 – wurde mit 15 µg beladen. Die Proteine wurden mit Silber nach der Methode von Heukeshoven gefärbt.

Die Abb. 4.1-1 zeigt die Auftrennung von Gesamtproteinlysaten verschiedener Wachstums- und Entwicklungszustände. Aufgetrennt wurden Gesamtproteinlysate vegetativer Zellen, Sporen und Fruchtkörpern. Im Vergleich zur Spur 1 (vegetative Zellen), kann man feststellen, daß nicht nur Banden fehlen, sondern auch neue Proteinbanden auftreten. Es sind keine markanten Unterschiede im Proteinbandenmuster zwischen Sporen aus 30 min und 60 min Indol-behandelter Zellen festzustellen. Hingegen lassen sich Unterschiede zwischen Fruchtkörpern, die zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Entwicklung geerntet wurden, feststellen. Besonders auffällige Veränderungen im Proteinbandenmuster der aufgetrennten Gesamtproteinlysate sind mit Pfeilen markiert. Das Auftreten und Verschwinden von Proteinbanden findet man im hochmolekularen als auch im niedermolekularen Bereich. Das ist ein erstes Anzeichen dafür, daß Proteolyse bei *S. aurantiaca* stattfindet und eine Differenzierungen verschiedener Wachstumszustände aufgrund der Proteinzusammensetzung möglich ist.

## 4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Um genauere Kenntnis über die Proteinmuster der unterschiedlichen Entwicklungs-zustände zu erhalten, wurden die jeweiligen Gesamtproteinlysate mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht. Die Proteinlysate werden in der ersten Dimension aufgrund ihres isoelektrischen Punktes fokussiert und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode ist in Kapitel 3.3.6, S. 29 zu finden.

Im weiteren wurden zuerst die Proteinspotmuster 30 min und 60 min Indol-behandelter Zellen miteinander verglichen, um festzustellen ob sich die Aussage der SDS-Page (siehe 4.1) bestätigen läßt. Demnach sollten keine Unterschiede im Proteinspotmuster feststellbar sein. In Abbildung 4.2-1 sind die zweidimensionalen Gele von Gesamtproteinextrakten aus vegetativen Zellen nach 30- und 60minütiger Indol-Behandlung (Sporen) dargestellt.

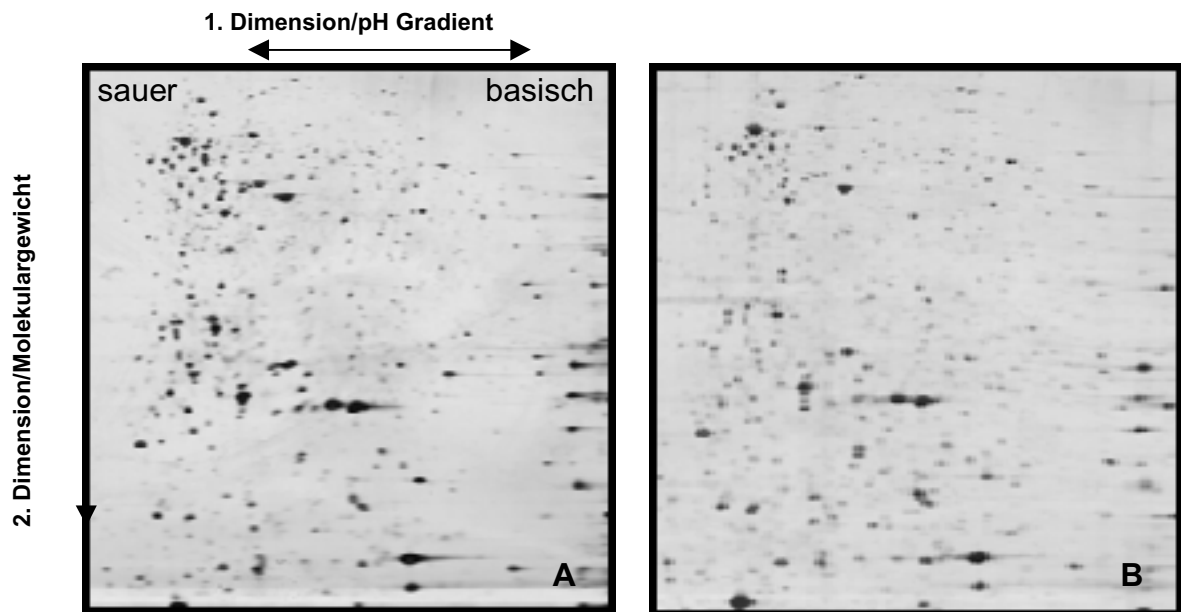


Abb. 4.2-1: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Sporen aus 30 min und 60 min Indol-behandelten Zellen. Jeweils 50 µg Gesamtproteinlysate wurden in einem linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 in der ersten Dimension und in einer 12,5%igen SDS-Page in der zweiten Dimension getrennt. Die Proteine wurden mit Silber nach der Methode von Heukeshoven gefärbt. **A** 30 min Indol-behandelt; **B** 60 min Indol-behandelt.

Es sind keine signifikanten Unterschiede (fehlende Spots, neu hinzugekommene Spots) zwischen den Proteinspotmustern 30 min (A) und 60 min (B) Indol-behandelter Zellen feststellbar. Allerdings ist festzustellen, daß die Intensitäten einiger Spots unterschiedlich sind. Somit ist die Aussage, die oben getroffen wurde, aufgrund der Proteinbandenmuster in der SDS-Page, experimentell bestätigt. Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese lassen sich ca. 1200 Proteinspots detektieren.

Da keine Unterschiede feststellbar sind zwischen den Proteinspotmustern 30 min und 60 min Indol-behandelter Zellen wurde zum weiteren Vergleich der Proteinspotmuster unterschiedlicher Entwicklungs- und Wachstumszuständen das Muster von Sporen aus 60 min Indol-behandelter Zellen aus der zweidimensionalen Gelelektrophorese herangezogen.

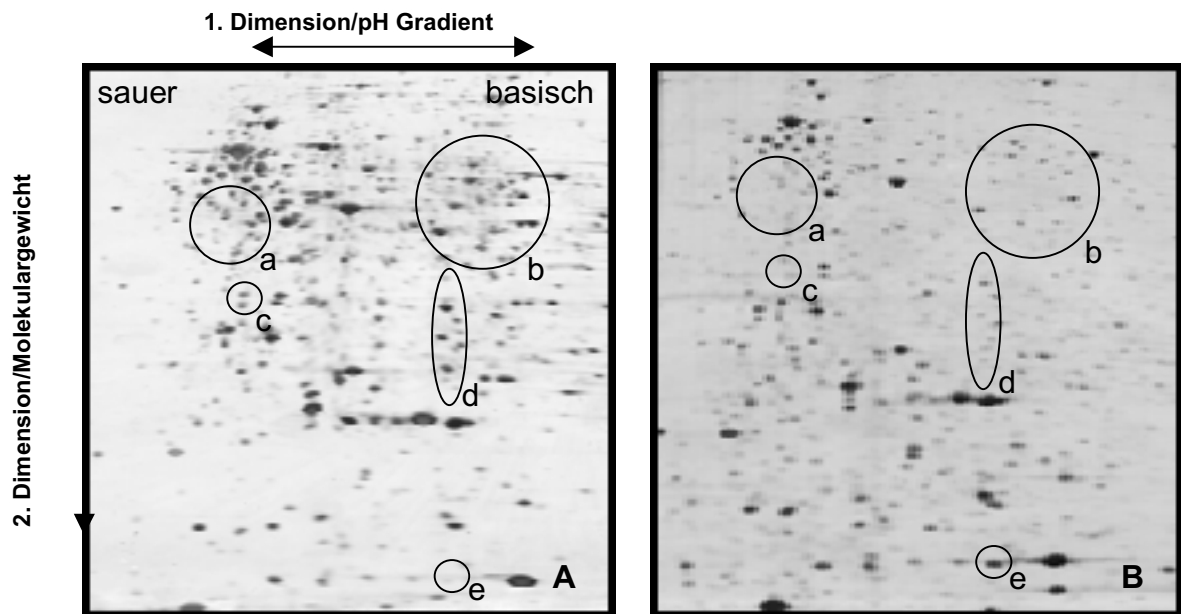


Abb. 4.2-2: Zweidimensionale Gelelektrophorese vegetativer und Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen. Jeweils 50  $\mu$ g Gesamtproteinlysate wurden in einem linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 in der ersten Dimension und in einer 12,5%igen SDS-Page in der zweiten Dimension getrennt. Die Proteine wurden mit Silber nach der Methode von Heukeshoven gefärbt. **A** vegetative Zellen; **B** Sporen.

Beim Vergleich der Proteinspotmuster vegetativer und 60 min Indol-behandelter Zellen ist festzustellen, daß Proteinspots fehlen und neue Proteinspots auftreten. Von vielen Unterschieden sind einige auffällige markiert. Die Expression von Proteinen vegetativer Zellen und das damit einhergehende Proteinspotmuster in einem zweidimensionalen Gel unterscheidet sich eindeutig von dem Spotmuster der Sporen. Die Proteinspots in den Markierungen a, b, c und d in Bild A verschwinden zu starken Anteilen in Bild B. Hingegen tritt ein neuer Proteinspot e in Bild B auf. Wiederum läßt sich die Aussage über unterschiedliche Proteinbandenmuster in der SDS-Page experimentell bestätigen. Somit ist ein weiterer Hinweis auf eine stattfindende Proteolyse bei *S. aurantiaca* gegeben.

Da die Vermutung nahe liegt, daß sich während der Entwicklung der Fruchtkörper (morphologische Änderung der Fruchtkörper) die Proteinzusammensetzung ändert, könnten sich auch Unterschiede in den Ergebnissen der zweidimensionalen Gelelektrophorese ergeben. Aus diesem Grunde wurden Gesamtproteinlysate von Fruchtkörpern, die zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Entwicklung geerntet wurden, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht. Das Erscheinen oder Fehlen von Spots gibt Hinweise auf die Dynamik

der Entwicklung. Für die Untersuchungen wurden Fruchtkörper nach 8 h, 16 h, 20 h und 40 h Entwicklungszeit untersucht.

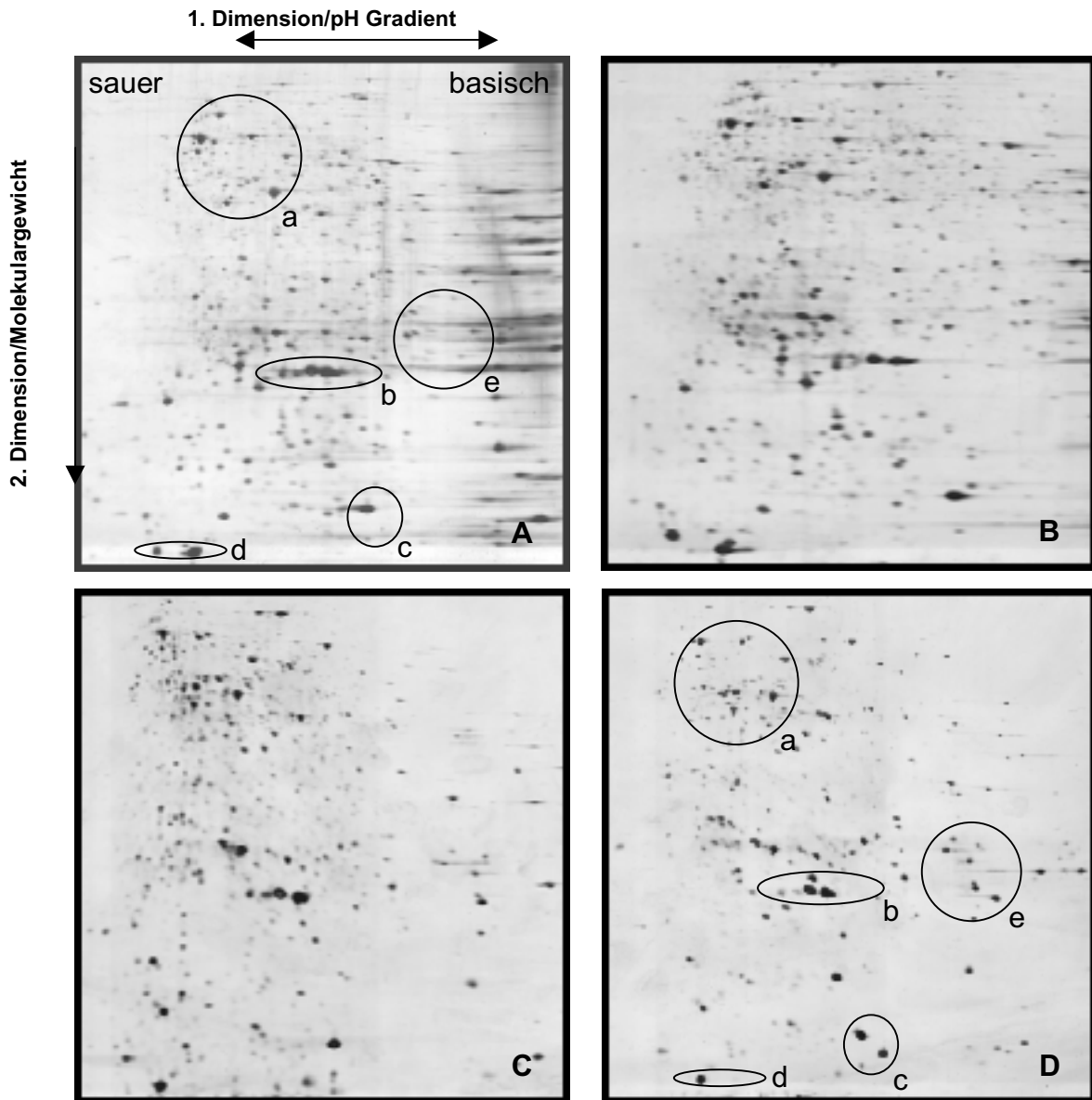


Abb. 4.2-3: Zweidimensionale Gelelektrophorese. Jeweils 50  $\mu$ g Gesamtproteinlysate wurden in einem linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 in der ersten Dimension und in einer 12,5%igen SDS-Page in der zweiten Dimension getrennt. Die Proteine wurden mit Silber nach der Methode von Heukeshoven gefärbt. **A** Fruchtkörper 8 h; **B** Fruchtkörper: 16 h; **C** Fruchtkörper 20 h; **D** Fruchtkörper 40 h.

Der Vergleich der Proteinspotmuster von Fruchtkörpern in zeitlich unterschiedlichen Wachstumsphasen aus der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigt, daß es signifikante Unterschiede zwischen den Proteinspotmustern von Fruchtkörpern gibt.

Die in Bild A (8 h Fruchtkörper) markierten Areale a, b und d zeigen im Vergleich mit den gleichen Arealen im Bild D (40 h Fruchtkörper) eine viel höhere Anzahl

von Proteinspots. Dagegen treten in Areal c und e in Bild D Proteinspots auf, welche in Bild A fehlen. Die meisten Veränderungen im Proteinspotmuster treten auf zwischen sehr frühen Fruchtkörpern (8 h), die als Aggregationszentren bezeichnet werden und voll ausgebildeten Fruchtkörpern (40 h), wobei generell weniger Proteinspots bei Fruchtkörpern als bei vegetativen Zellen und Sporen aus Indol-behandelten Zellen zu detektieren sind.

So könnte ein Zusammenhang hergestellt werden zwischen den unterschiedlichen Proteinspotmustern und dem mikroskopischen Erscheinungsbild. Der Beweis eines solchen Zusammenhangs setzt die Kenntnis von Daten (DNS-Sequenz des Organismus und deren Annotierung) voraus, die für *S. aurantiaca* in 2003 noch nicht zur Verfügung standen.

### 4.2.1 Immunologische Nachweisreaktionen (Westernblotanalyse)

Über Immunreaktionen lässt sich nachweisen, ob Polypeptide vorhanden sind, die mit einem spezifischen Antiserum kreuzreagieren, der gegen die 20S Untereinheit des Proteasoms eines Archaea (*Thermoplasma acidophilum*<sup>\*</sup>) gerichtet ist. Im folgenden sind die Westernblots, in denen unterschiedliche Gesamtproteinlysate verschiedenartig gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, dargestellt.

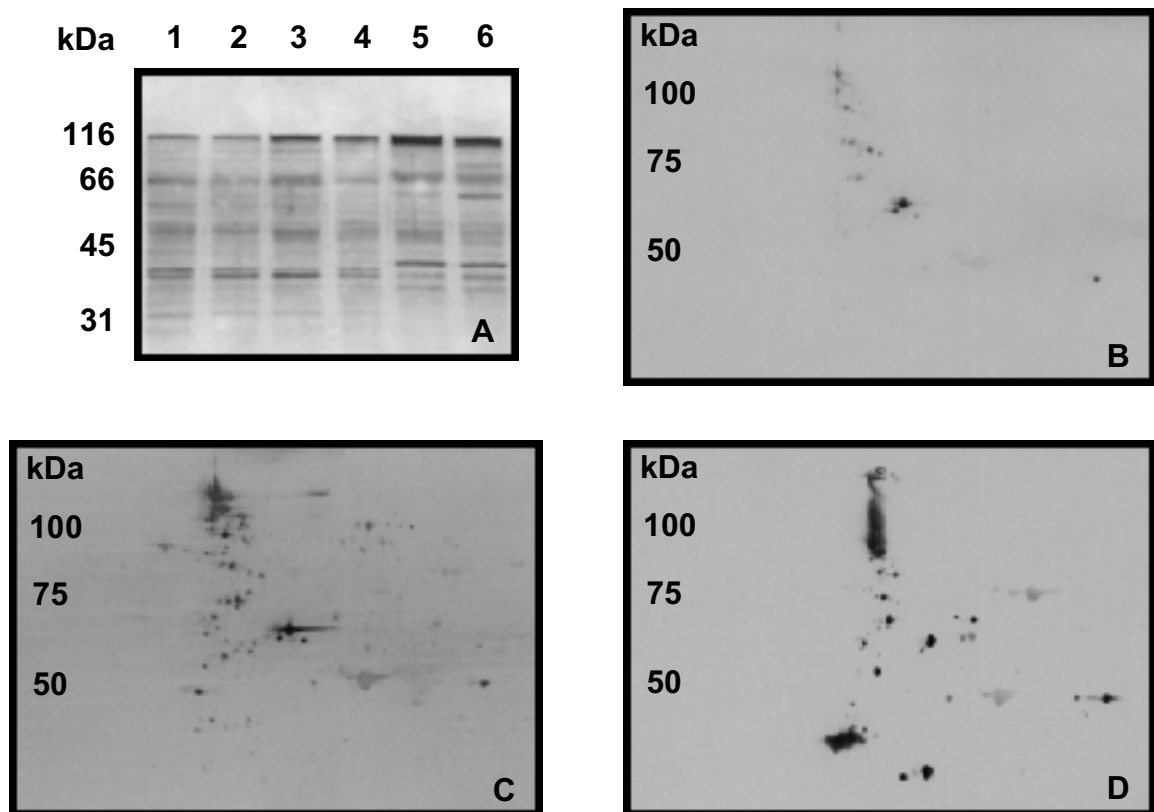


Abb. 4.2-4: Westernblotanalyse.

**A** Westernblot nach 12,5%iger SDS-PAGE; Folgende Zellextrakte wurden verwendet: Spur 1: vegetative Zellen, Spur 2: Sporen aus 30 min Indol-behandelten Zellen, Spur 3: Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen, Spur 4: 8 h Fruchtkörper, Spur 5: 16 h Fruchtkörper, Spur 6: 20 h Fruchtkörper. Jede Spur wurde mit 10 µg Proteinextrakt beladen. **B** 2D-Westernblot von Zellextrakten vegetativer Zellen, **C** 2D-Westernblot von Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen und **D** 2D-Westernblot von 16 h Fruchtkörpern. Jedes Gel wurde mit 150 µg Gesamtproteinlysate beladen und in einem linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 in der ersten Dimension und in einer 12,5%igen SDS-Page in der zweiten Dimension getrennt. Gezeigt werden Details von 2D-Gelen zwischen pH 5 bis 7. Antiserum  $\alpha$ -20S Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* (1:20000).

\* Für die Bereitstellung des Antiserums danke ich Herrn Prof. Dr. W. Baumeister, MPI für Biochemie in Martinsried.

Die Westernblotanalysen zeigen, daß die Anzahl der kreuzreagierenden Polypeptide von vegetativen Zellen über Sporen zu Fruchtkörpern hin zunimmt. Dieses läßt sich auch feststellen, wenn die Westernblotanalysen bei zweidimensionalen Gelen mit Proteinlysaten von verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsphasen von *S. aurantiaca* durchgeführt werden. Korrespondierend zu der SDS-Gelelektrophorese, wo eine starke Proteinbande im 100 kDa-Bereich bei 16 h und 20 h Fruchtkörper-Proteinextrakten auftritt, findet sich auch im 100 kDa-Bereich in dem zweidimensional gelelektrophoretisch aufgetrennten 16 h Fruchtkörper-Proteinextrakt eine starke immunologische Reaktion.



## 4.2.2 Massenspektrometrische Untersuchungen

Ein Analyseverfahren zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen ist die Massenspektrometrie\*. Sie hat zum Ergebnis Fragmentierungsmuster oder/und Molekülmassenpeaks. Die Fragmentierung von Peptiden führt zu deren Aminosäuresequenzen. Abbildung 4.2-5 und 4.2-6 zeigen die Peptide Map eines Proteins und die Fragmentierung eines Peptids.

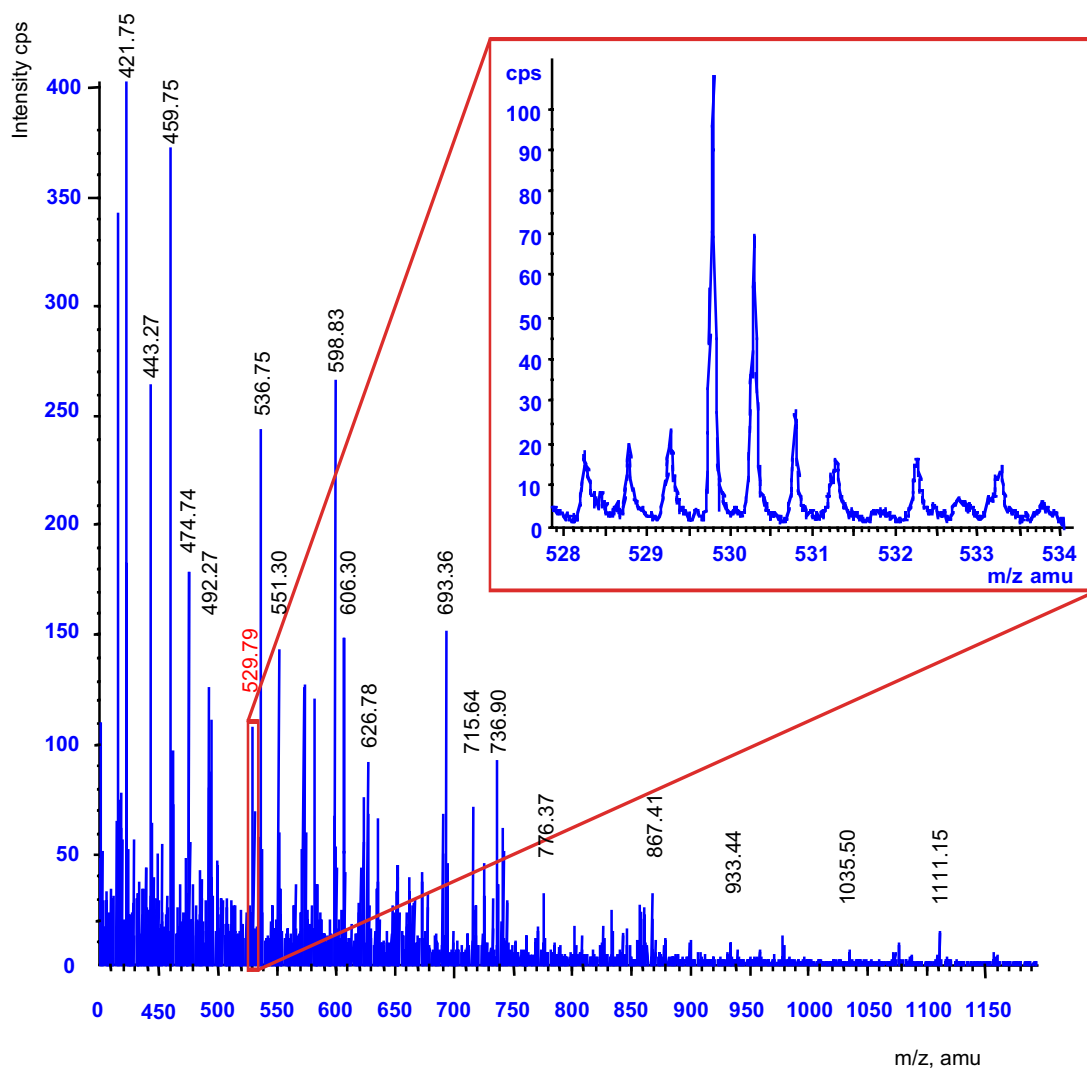


Abb. 4.2-5: Peptide Map eines Proteins und isotopisches Muster einer Fragmentierung.

\* Für die Ausführung der Massenspektrometrie danke ich den Herren Dr. Thomas Ruppert und Armin Bosserhoff, ZMBH in Heidelberg.

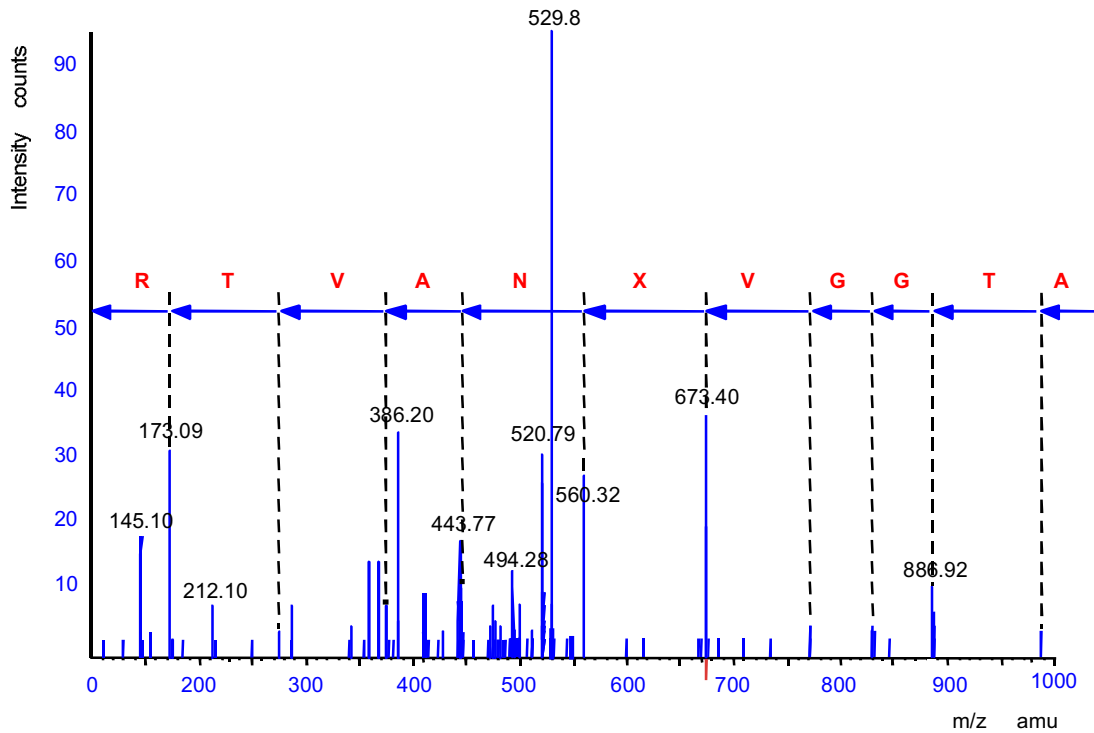


Abb. 4.2-6 Fragmentierung eines einzelnen Peptids.

Die Informationen der Massenspektrometrie definiert ausgesuchter Proteinspots sind im Anhang in Tabellen zusammengefasst. Massenspektrometrisch untersucht wurden insgesamt 62 Proteinspots aus 8 kolloidal Coomassie-gefärbten zweidimensionalen Gelen von Zellextrakten verschiedener Entwicklungs- und Wachstumszustände, wovon 28 über einen Abgleich mit Datenbanken zugeordnet werden konnten. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 4.2-1 dargestellt.

Tab. 4.2-2: Zusammenfassung der massenspektrometrischen Daten.

Zellextrakte/Gel-Nr.	Proteinspots	MS	MS-Match	MS/MS	MS/MS-Match
Vegetative Zellen/107	12			12	2
Vegetative Zellen/154	4			4	1
30 min Sporen/162	7	7	1	7	3
60 min Sporen/158	7	7	2	7	3
8 h Fruchtkörper/164	5	5	3	5	1
16 h Fruchtkörper/166	13			13	9
20 h Fruchtkörper/167	9			9	3
40 h Fruchtkörper/113	11			11	

Obwohl keine Sequenzinformation auf DNS-Ebene vorhanden ist, konnten einige Proteine über die Massenspektrometrie direkt *S. aurantiaca* zugeordnet werden (Tab. 4.2-2: Spot 3 aus Gel 107; vegetative Zellen und Spot 12 aus Gel 166; 16 h Fruchtkörper). Andererseits wurden über die Datenbankabfrage auch Homologien zu artfremden Spezies gefunden, die vordergründig überhaupt keinen Zusammenhang zu *S. aurantiaca* aufzeigen (Tab. 4.2-2: Spot 5 aus Gel 107; vegetative Zellen und Spot 5 aus Gel 162; 30' Sporen).

Tab. 4.2-2: Auffällige Identifizierungen aus der Massenspektrometrie.

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid	m/z	Ladung
Spot 3 Gel 107	239-248 1151.60 TVITGVEMFR ELONGATION FACTOR TU (EF-TU)			...XTGVEMFR	- 1151,6	577	2
	Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Rank Peptide 5 576.82 1151.62 1151.60 0.02 0 34 1 TVITGVEMFR						
	Proteins matching the same set of peptides: Mass: 41285 Total score: 34 Peptides matched: 1 (X76870) elongation factor Tu [ <i>Stigmatella aurantiaca</i> ]						
Spot 5 Gel 107				XPNF....K	803,6	403	2
	Mass: 52740 Total score: 57 Peptides matched: 1 large subunit of riblose-1,5- bisphosphatecarboxylase/oxygenase [ <i>Lotus japonicus</i> ]						
	Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Rank Peptide 576.82 402.76 803.50 803.45 0.05 0 57 1 IPNAYVK						
Spot 5 Gel 162	hypothetical conserved protein [ <i>Oceanobacillus ihyensis</i> ]	14KD	5.41	...NXD[FMox]XR	1003,6	503	2
Spot 12 Gel 166	branched chain keto acid dehy- drogenase (E1) beta subunit [ <i>Stigmatella aurantiaca</i> ]	38KD	5.13	...TVVSYGR	1345,8	450	3

Das Ergebnis einiger weniger Massenidentifizierungen gibt Hinweis auf erfolversprechende Analytik bei *S. aurantiaca* in Bezug auf das Proteom.

Eine Besonderheit zeigte sich bei der massenspektrometrischen Analyse einiger Proteinspots, die in einem zweidimensionalen Gel von Zellextrakten aus 40 h alten Fruchtkörpern identifiziert wurden. Spot 1 und 2 und Spot 3 und 4 haben dieselbe Aminosäuresequenz, unterscheiden sich aber in ihrem isoelektrischen Punkt und ihrem Molekulargewicht (Abb. 4.2-6). Bei den Proteinspots 2 und 4 könnte es sich um Abbauprodukte der Proteinspots 1 und 3 handeln.

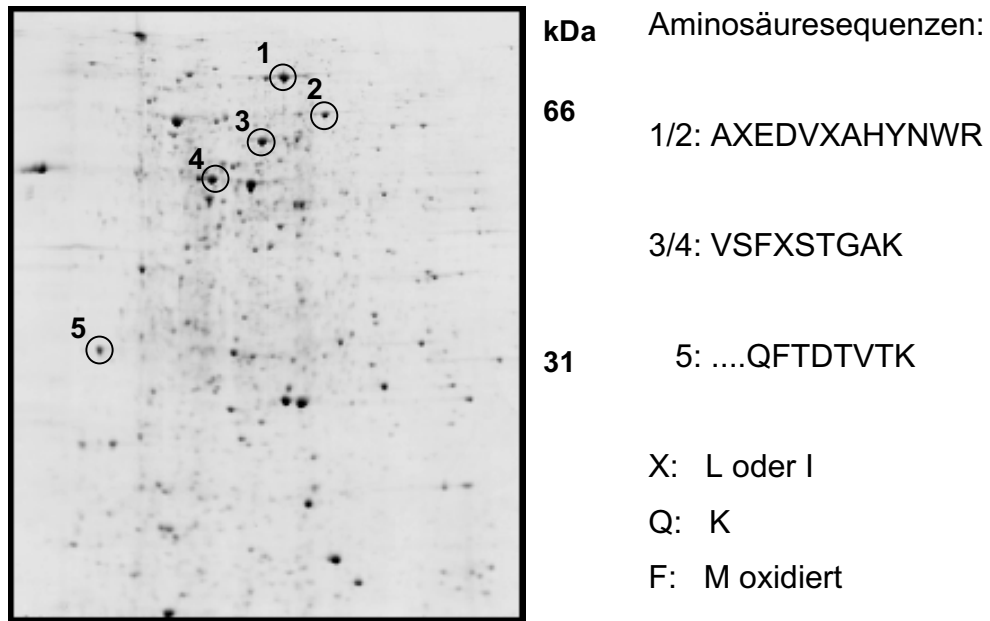


Abb. 4.2-6: Zweidimensionale Gelelektrophorese von 40 h Fruchtkörpern. 150 µg Gesamtproteinlysate wurden in einem linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 in der ersten Dimension und in einer 12,5%igen SDS-Page in der zweiten Dimension getrennt. Die Proteine wurden mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die markierten Spots wurden massenspektrometrisch analysiert.

Der Datenbankabgleich (blast-Suche) von vielen Aminosäuresequenzen von *S. aurantiaca* aus der Massenspektrometrie gegen das Genom von *M. xanthus* hat keine Ergebnisse gezeigt. So konnten keine Homologien zwischen *S. aurantiaca* zu *M. xanthus* über die Aminosäuresequenzen ermittelt werden.

### **4.3 Prüfung auf Proteasen**

Die Prüfung auf Proteasen kann auf unterschiedlichste Weise erfolgen. Hier wurde einmal die Enzymreaktion mit spezifischem Substrat und die Kopplung mit spezifischen Antiseren eingesetzt. Eine Voraussetzung zur Ermittlung von Enzymaktivität eines möglichen Proteasoms mit Hilfe eines proteasom-spezifischen Substrats ist die Fraktionierung des Gesamtproteinlysats. Die erhaltenen Fraktionen werden auf ihre Enzymaktivität hin beurteilt und weiter mit Gelfiltration, Anionenaustauscherchromatographie, Westernblotanalyse und Elektronenmikroskopie untersucht.

#### **4.3.1 Sucrosdichtegradienten-Zentrifugation**

Das Gesamtproteinlysate vegetativer Zellen und Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen wurde auf einen 10% - 40%igen Sucrosegradienten aufgetragen, um Fraktionen des Lysats zu erhalten. Hierbei sedimentieren die Proteine nach ihrer jeweiligen Dichte. Das Sediment wurde fraktioniert und die gesammelten Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, um die Effizienz der Trennung zu überprüfen. Beim Aufschluss der Zellen durch Zertrümmern der Zellwände durch Ultraschall wurde ein Gemisch von Protease-Inhibitoren zugegeben. Somit werden die üblichen Proteaseaktivitäten von Serin-, Aspartatsäure-, Thio- und Metalloproteasen unterbunden und es wird eine Degradierung des Proteinlysats weitgehend verhindert. In Abbildung 4.3-1 ist die gelelektrophoretische Trennung der Fraktionen aus einem Sucrosedichtegradient von vegetativen Zellen dargestellt.

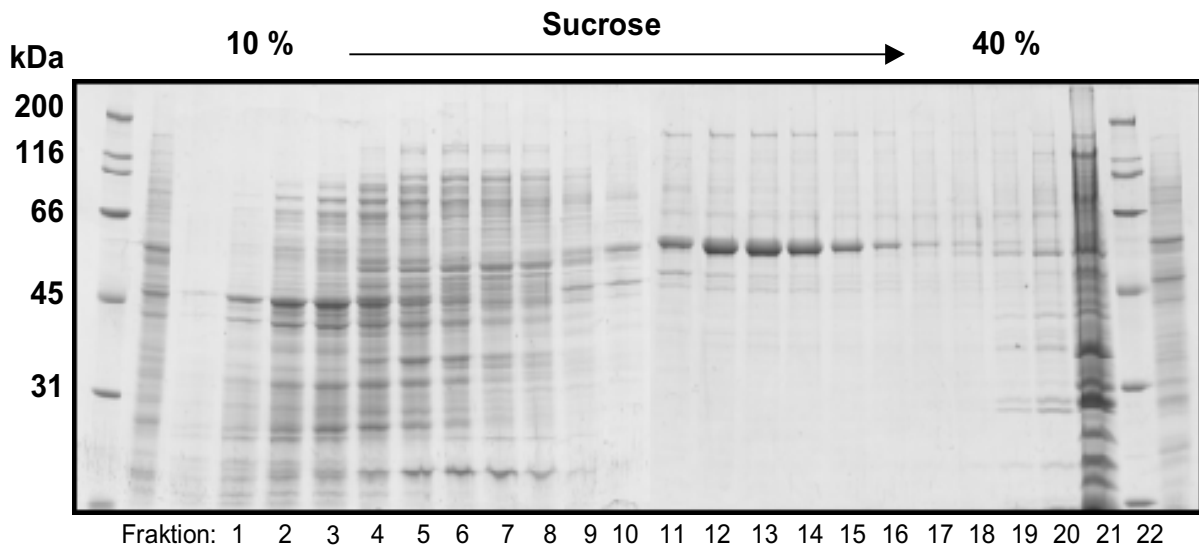


Abb. 4.3-1: 12,5%ige SDS-Page von Fraktionen des Sucrosegradienten aus vegetativen Zellen. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt.

Die Sucroседichtegradienten-Zentrifugation führt zu einer Vortrennung des Gesamtproteinlysats. Die Fraktionen aus der Auftrennung von Gesamtproteinlysaten vegetativer Zellen und Sporen nach Indol-Behandlung über Sucroседichtegradienten-Zentrifugation zeigen ein sehr ähnliches Muster in der SDS-Gelelektrophorese. Abbildung S4.3-1 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Fraktionen aus einer Sucroседichtegradienten-Zentrifugation von Sporen nach 60minütiger Indol-Behandlung von vegetativen Zellen.

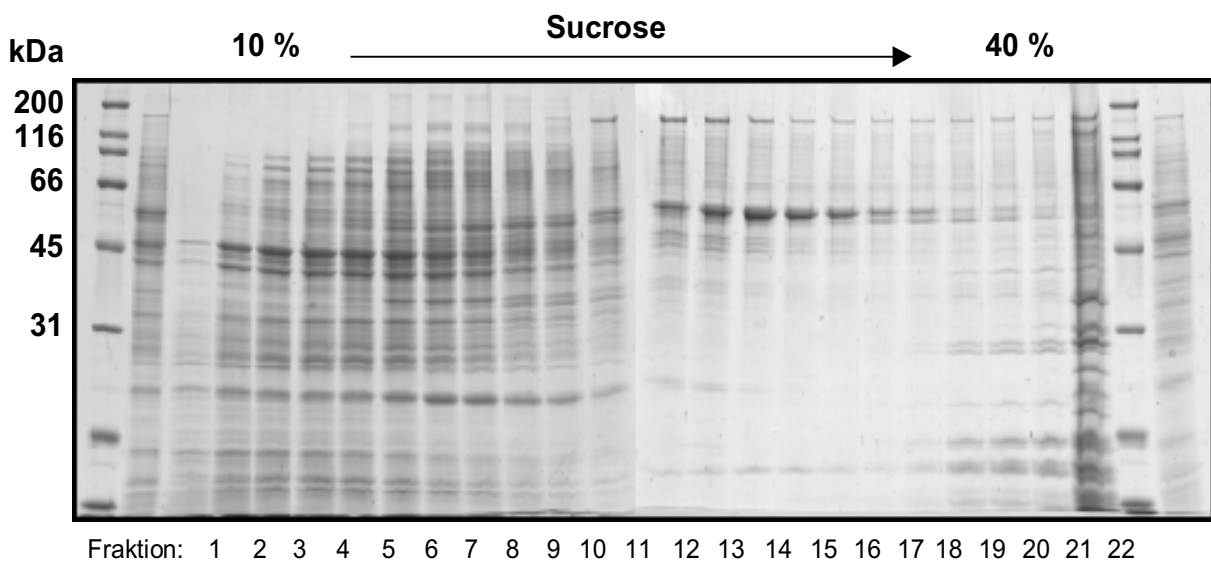


Abb. S4.3-1: 12,5%ige SDS-Page von Fraktionen des Sucrosegradienten aus 60 min Indol-behandelten Zellen (Sporen). Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt.

Durch den Sucrosegradienten erfolgt eine Auftrennung des Proteinlysats aufgrund der verschiedenen Massen der Partikel und deren Sedimentationsverhalten im Medium. Die in Abb. 4.3-1 und S4.3-1 bezeichneten Fraktionen unterscheiden sich mit zunehmender Fraktionsnummer folgend dem Sucroседichtegradienten durch zunehmenden Gehalt an Proteinen höheren Molekulargewichts.

Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre Enzymaktivität geprüft. Das Ergebnis ist im Diagramm in Abb. 4.3-2 dargestellt.

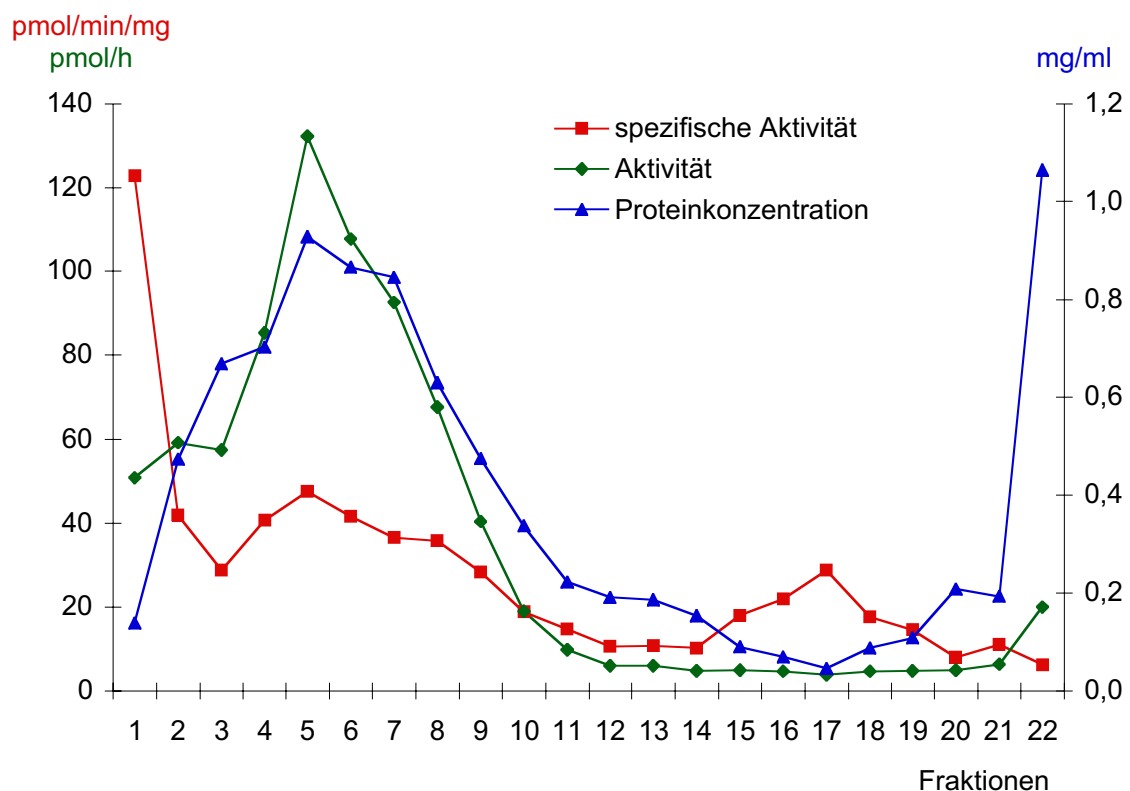


Abb. 4.3-2: Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität in Anhängigkeit zur Proteinkonzentration in Fraktionen des Sucroседichtegradienten des Gesamtproteinlysats vegetativer Zellen mit proteasomspezifischem Substrat.

Die Enzymaktivitätskurve zeigt ein charakteristisches Profil der Verteilung der Fraktionen des Sucroседichtegradienten. Wurden verschiedene Gradienten gefahren, so blieb die Verteilung sehr konstant. Es ist eine hohe spezifische Aktivität in den ersten Fraktionen (4 bis 8) und eine sehr hohe spezifische Aktivität in den letzten Fraktionen (16 und 17) zu finden. Das Verteilungsmuster bezüglich der Fraktionen kann leicht variieren, bleibt aber in den Relationen sehr ähnlich.

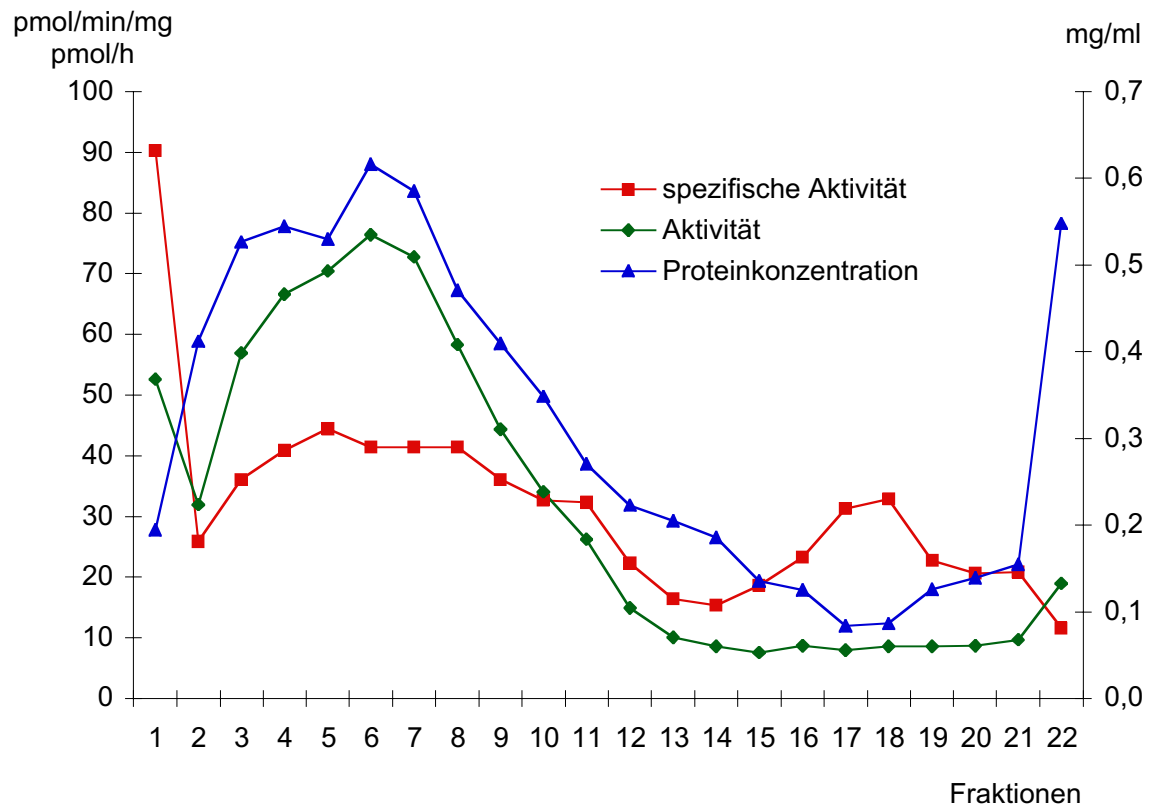


Abb. S4.3-2: Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration in Fraktionen des Sucroседichtegradienten des Gesamtproteinlysats von Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen mit proteasom-spezifischem Substrat.

Das Verteilungsmuster der Enzymaktivitätskurve bei Sporen aus 60 min Indol-induzierten Zellen ist dem von vegetativen Zellen sehr ähnlich. Auch hier ist eine hohe spezifische Aktivität in den ersten Fraktionen (3 bis 10) und eine sehr hohe spezifische Aktivität in den letzten Fraktionen (17 und 18) zu finden. Insofern verhalten sich Gesamtproteinlysate, ob aus vegetativen oder Indol-behandelten Zellen gewonnen und über eine Sucroседichtegradient-Zentrifugation aufgetrennt, gleich. Auch hier wurde festgestellt, daß das Verteilungsmuster bezüglich der Fraktionen leicht variieren kann, aber in den Relationen sehr ähnlich bleibt.



## Auswirkung von Fraktionsentnahme und Zentrifugation

Der mechanische Aufschluß wurde entweder zentrifugiert oder ultrazentrifugiert. Die Überstände wurden auf einen Sucroedichtegradienten geladen und fraktioniert. Zwei wichtige Beobachtungen können folgend charakterisiert werden:

1. Es machte keinen Unterschied ob die Fraktionierung „dynamisch“ (von unten abgezogen; tropfenweise) oder „statisch“ (von oben abgezogen; pipettiert) durchgeführt wurde.
2. Die Ultrazentrifugierung hatte zur Folge, daß enzymatische Aktivität verschwunden ist (Abb 4.3-3)

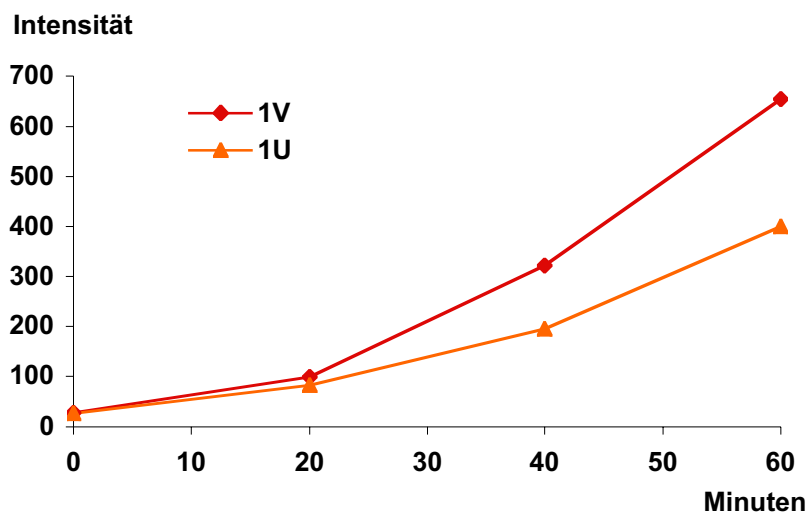


Abb. 4.3-3: Vergleich der Enzymaktivitätsmessungen aus Ultrazentrifugation (1U) und Zentrifugation (1V).

Bei einer Ultrazentrifugation werden Partikel/Moleküle sedimentiert, die einen Einfluß auf die enzymatische Aktivität haben. Im Diagramm der Abb 4.3-3 ist der Vergleich zwischen Ultra- und Zentrifugation zu sehen. Rechnerisch resultiert ein Verlust von 39% an Enzymaktivität, wenn die mechanisch aufgeschlossene Proteinlösung ultrazentrifugiert wird.

Wegen der oben festgestellten Verluste der enzymatischen Aktivität nach einer Ultrazentrifugation wurde diese in Folge nicht mehr angewandt. Fraktionen mit hoher spezifischer Aktivität und hoher Aktivität wurden weiteren Trennungsv erfahren zugeführt. Zusätzlich wurden die Fraktionen in einem Westernblot analysiert.

### 4.3.2 Immunologische Nachweisreaktion mit spezifischem Antiserum

Über Immunreaktionen lässt sich nachweisen, ob Polypeptide vorhanden sind, die kreuzreagieren und damit ein mögliches Proteasom indizieren. Eingesetzt wurde ein spezifisches Antiserum, das gegen die 20S Untereinheit des Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* gerichtet ist.

Die Westernblotanalysen aus dieser Untersuchung sind in Abb 4.3-3 zu sehen.

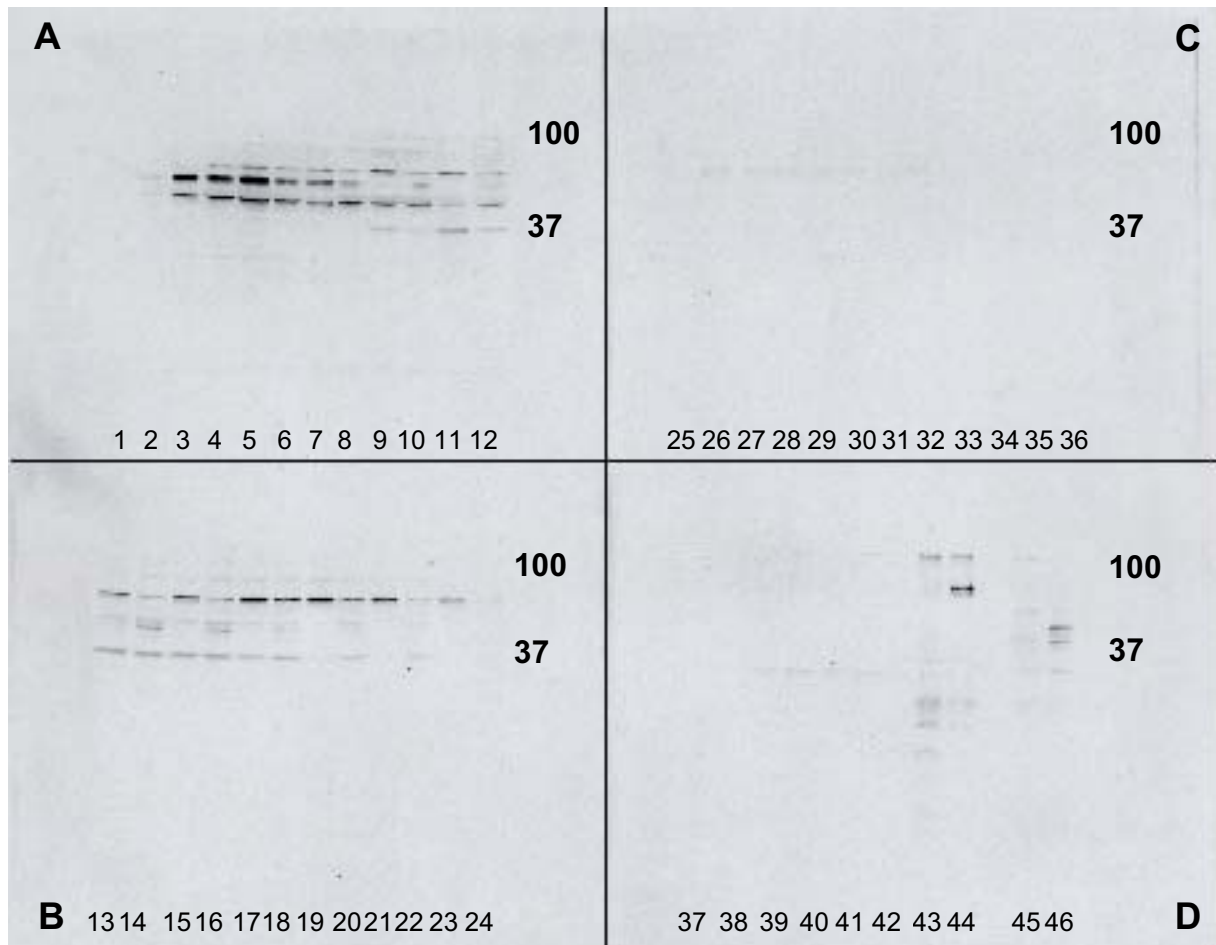


Abb. 4.3-4: Westernblotanalyse von Fraktionen aus Sucroседichtegradienten von vegetativen Zellen und Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen. Ausgewählte Bereiche von Markerbanden (kDa) sind gekennzeichnet. Westernblot nach 12,5%iger SDS-Page.

**A** Fraktionen 1 bis 6; **B** Fraktionen 7 bis 12; **C** Fraktionen 13 bis 18 und **D** 19 bis 22 und Ausgangsmaterial. Antiserum  $\alpha$ -20S Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* (1:20000) **Spurbelegung: s. Tabelle 4.3-1.**

Um eine bessere Übersicht zu geben wurde die Spurbelegung ausführlich in einer Tabelle (Tab. 4.3-1) zusammengefasst und dargestellt. Es wurden immer dieselben Fraktionsnummern eines Sucroседichtegradienten vegetativer Zellen und von Sporen aus 60 min Indol-behandelter Zellen nebeneinander auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet wurde.

Tab. 4.3-1: Zuordnung der Spuren bezüglich Fraktionen und des Ausgangsuntersuchungsmaterials (AM).

A			B			C			D		
Spur	Fraktion	Art	Spur	Fraktion	Art	Spur	Fraktion	Art	Spur	Fraktion	Art
1	1	vegetativ	13	7	vegetativ	25	13	vegetativ	37	19	vegetativ
2	1	Sporen	14	7	Sporen	26	13	Sporen	38	19	Sporen
3	2	vegetativ	15	8	vegetativ	27	14	vegetativ	39	20	vegetativ
4	2	Sporen	16	8	Sporen	28	14	Sporen	40	20	Sporen
5	3	vegetativ	17	9	vegetativ	29	15	vegetativ	41	21	vegetativ
6	3	Sporen	18	9	Sporen	30	15	Sporen	42	21	Sporen
7	4	vegetativ	19	10	vegetativ	31	16	vegetativ	43	22	vegetativ
8	4	Sporen	20	10	Sporen	32	16	Sporen	44	22	Sporen
9	5	vegetativ	21	11	vegetativ	33	17	vegetativ	45	AM	vegetativ
10	5	Sporen	22	11	Sporen	34	17	Sporen	46	AM	Sporen
11	6	vegetativ	23	12	vegetativ	35	18	vegetativ			
12	6	Sporen	24	12	Sporen	36	18	Sporen			

Es wurden die jeweils gleichen Fraktionen eines Sucroedichtegradienten von vegetativen und Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen abwechselnd nebeneinander aufgetragen; ungerade Zahlen → vegetative Fraktionen, gerade Zahlen → Sporenfraktionen. Aus Abb. 4.3-4 ergibt sich, daß Kreuzreaktionen in den Spuren 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, und 43 (des fraktionierten Gesamtproteinlysats vegetativer Zellen), sowie in den Spuren 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 44 und 46 (des Gesamtproteinlysats von Sporen aus 60 min Indol-induzierten Zellen) stattgefunden haben. Bei genauer Analyse sind qualitative und quantitative Differenzierungen zu beobachten (z. B. Spuren 43 bis 46).

### 4.3.3 Gelfiltrationschromatographie – Superose 6

Die Gelfiltration wird eingesetzt zur Reinigung und Fraktionierung von Proteingemischen unterschiedlicher Herkunft und trennt die Moleküle nach Masse.

Es wurden sowohl Gesamtproteinlysate als auch Sucroedichtegradienten-Fractionen gelfiltriert. Der Grund der unterschiedlichen Vorgehensweise lag zum einen in der Problematik ausreichend Substanz zu erhalten und andererseits einer möglichen Degradierung von Proteinen mit der Zeit entgegenzuwirken. Der Gelfiltration wurden Fraktionen aus der Sucroedichtegradienten-Zentrifugation mit hoher Enzymaktivität

und hoher spezifischer Aktivität zugeführt. Sucroседichtegradienten-Fractionen gleicher Ordnung wurden zur Erreichung höherer Ausbeute vereinigt.

In Abb. 4.3-5 ist die Auftrennung vereinigter Fraktionen einer Sucroседichtegradienten-Zentrifugation des Gesamtproteinlysats vegetativer Zellen dargestellt. Dieses Proteingemisch zeigte bei der enzymatischen Kontrolle zwar keine hohe spezifische Aktivität aber eine hohe Aktivität und hohen Proteingehalt.

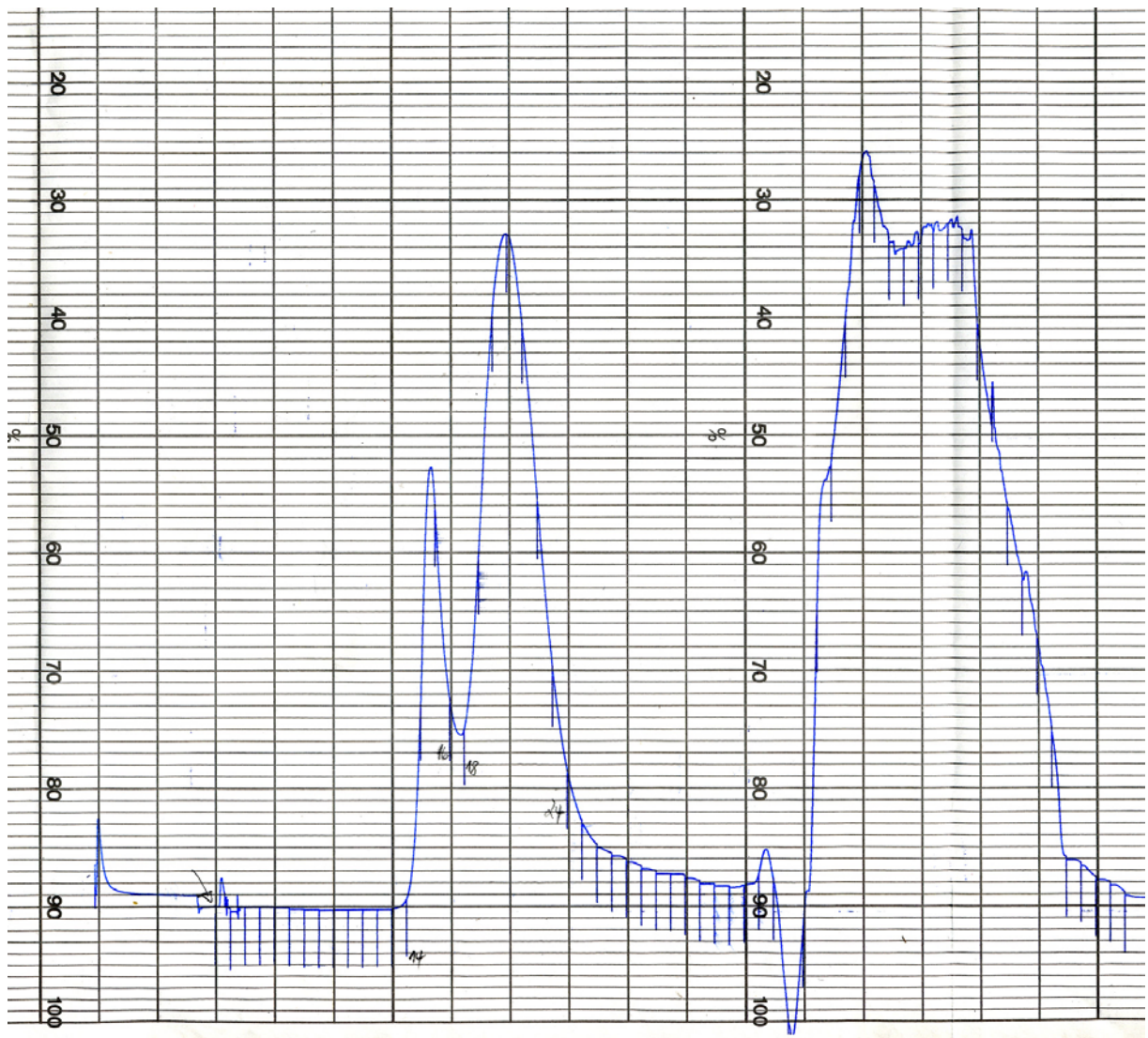


Abb.4.3-5 Schreiberprofil - Registrierung aus der Gelfiltration. Auf der Abzisse Fraktionierungsintervalle. In der Ordinate Intensität aus dem Durchflußphotometer. Photometer: 280 nm bei einer Empfindlichkeit von 0,2; Fluß: 0,4 ml/min; Fraktionsgröße: 0,5 ml. Es sind hier zwei gut getrennte Peaks zu sehen: Fraktionen 14 bis 16 und 18 bis 24.

Auch wenn die Peaks der Registrierung den Eindruck erwecken, daß ausreichend Substanz zur Weiterverarbeitung vorhanden ist, ergaben die Proteinkonzentrationsbestimmungen, daß nur über die Sammlung mehrerer Gelfiltrationsläufe eine für die Weiterverarbeitung ausreichende Substanzmenge zu erhalten war. Die Fraktionen wurden enzymatisch und spektroskopisch auf Enzymaktivität und Proteingehalt untersucht. Die Daten sind in Tab. 4.3-2 aufgelistet.

Tabelle 4.3-2: Bestimmung der Enzymaktivität ausgewählter Fraktionen aus der Gelfiltration.

Chi-Square: 0,69779 Number of Points: 11				
ID	Conc.	Int.		
0	0,03510	39,654		
14	0,02712	31,155		
15	0,2492	266,985	36,73 µg/ml Protein	4857,57 pmol/min/mg Aktivität
16	0,2332	250,057	56,19 µg/ml Protein	2937,98 pmol/min/mg Aktivität
18	0,04907	54,516		
19	0,04913	54,583		
20	0,02616	30,137		
21	0,01766	21,088		
22	0,05913	65,218		
23	0,07358	80,583		
24	0,01570	19,002		

Der in Abb. 4.3-5 dargestellte Ablauf einer Gelfiltration zeigt die Auftrennung einer Probe aus einer Sucroседichtegradienten-Zentrifugation vegetativer Zellen mit hoher enzymatischer Aktivität. Wie der Tabelle 4.3-2 zu entnehmen ist, zeigen Fraktionen 15 und 16 der Gelfiltration immer noch enzymatische Aktivität und wurden daher elektronenmikroskopisch untersucht, um festzustellen, ob eine proteasomähnliche Struktur bei *S. aurantiaca* vorhanden ist.

Die Partikelkonzentration in Fraktion 15 betrug  $2,77 \times 10^{13}$  Partikel/ml und in Fraktion 16  $4,23 \times 10^{13}$  Partikel/ml. Beide Fraktionen wurden für erste elektronenmikroskopische Aufnahmen verwendet und zeigten dieselben diffusen Strukturen.\*

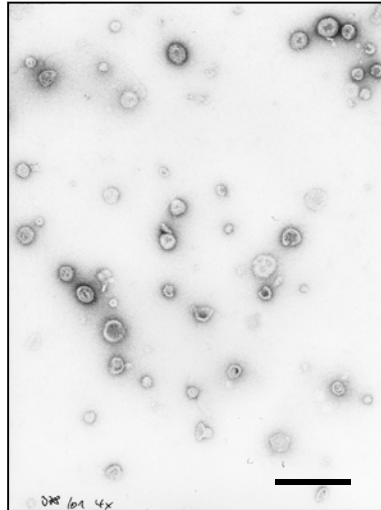


Abb. 4.3-6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Fraktion 16 aus der Gelfiltration eines Proteinlysats vegetativer Zellen. EM-Vergrößerung 28000:1; Balken 100 nm

Eine eindeutige proteasomtypische Struktur ist nicht zu erkennen.

Alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus verschiedensten Trennungsschritten zeigten diffuse Strukturen wie in Abb. 4.3-6.

Der Fall eines positiven Nachweises in Abbildung 4.3-7 ist der Literatur entnommen.

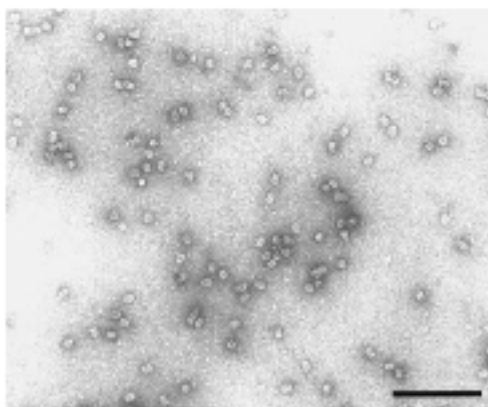


Fig. 4. Electron micrograph of 20S proteasome from *Frankia*, negatively stained with uranyl acetate. The picture shows ring-shaped end-on views, representing projections along the cylinder axis and rectangular side views corresponding to projections perpendicular to the cylinder axis. Bar, 100 nm.

Pouch, M-N, Cournoyer, B, Baumeister, W  
**Characterization of the 20S proteasome from the actinomycete *Frankia***

Molecular Microbiology (2000) 35, 368-377

\* Für die Aufnahmen danke ich Herrn Prof. H. W. Zentgraf, ATV in Heidelberg.

*Abb. 4.3-7 Elektronenmikroskopischer Strukturnachweis eines Proteasoms.*

Es sind weitere Analyseversuche zur Definition einer proteasomähnlichen Struktur unternommen worden. Die Analysefolge ist vereinfacht folgend dargestellt:

- a) Gesamtproteinlysate  $\Rightarrow$  Sucroседichtegradient  $\Rightarrow$  Gelfiltration
- b) Gesamtproteinlysate  $\Rightarrow$  Gelfiltration  $\Rightarrow$  Anionentauscher
- c) Gesamtproteinlysate  $\Rightarrow$  Sucroседichtegradient  $\Rightarrow$  Anionentauscher

Es wurden immer Fraktionen mit hoher Aktivität und hoher spezifischer Aktivität weiterverarbeitet und analysiert.

#### **4.3.4 Anionenaustauscherchromatographie – Mono Q**

Die Anionenaustauscherchromatographie nutzt Wechselwirkungen zwischen geladenen Partikeln aus. Die Ladungseigenschaften von Proteinen werden von Anionenaustauschern optimal zu Trennungen genutzt.

Fraktionen gleicher Ordnung aus Sucroседichtegradienten-Zentrifugationen wurden vereinigt, der Anionenaustauscherchromatographie (Mono Q) zugeführt und fraktioniert. In den Abbildungen 4.3-8 bis 4.3-10 sind der Schreiberdruck, SDS-Gelelektrophorese und Enzymdiagramm der fraktionierten Sucroседichtegradienten-Zentrifugations-Fraktionen 4 bis 7 zu sehen. Abbildungen 4.3-11 bis 4.3-13 zeigen die Auftrennung durch Anionenaustauscherchromatographie, SDS-Gelelektrophorese und Enzymdiagramm der Sucroседichtegradienten-Zentrifugations-Fraktionen 15 bis 18.

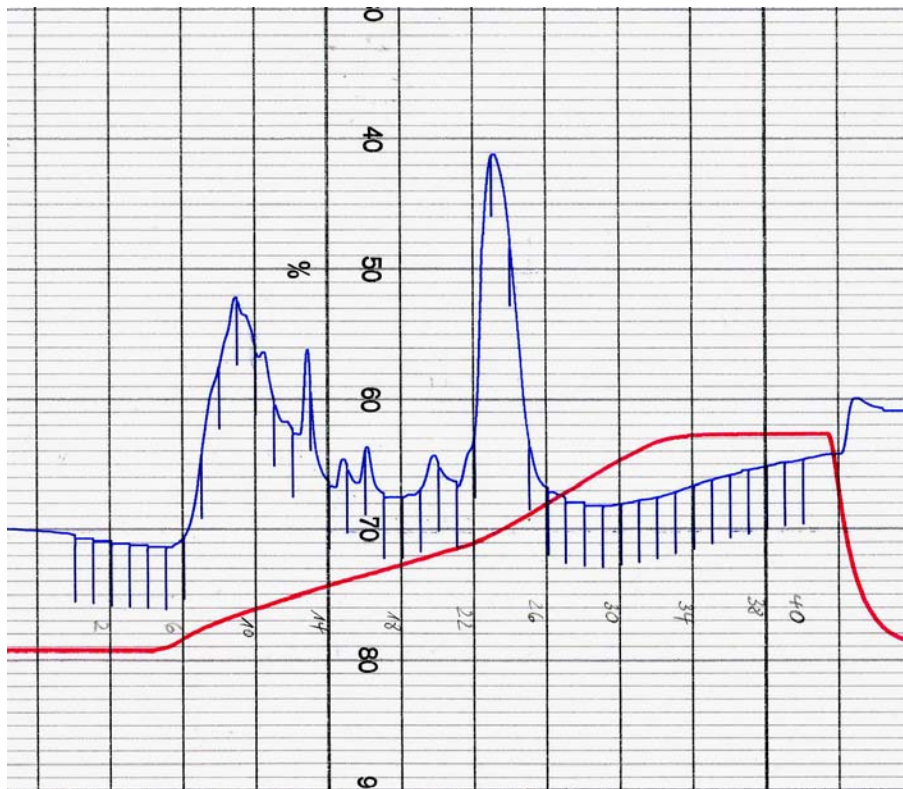


Abb. 4.3-8: Registrierung aus der Anionenaustauscherchromatographie. Auf der Abzisse Fraktionierungsintervalle. In der Ordinate Intensität aus dem Durchflußphotometer. Es sind hier zwei gut getrennte Peaks zu sehen. Fraktionen 7 bis 15, 16 und 17 und 22 bis 26. Photometer: 280 nm bei einer Empfindlichkeit von 0,2; Fluß: 0,5 ml/min; Fraktionsgröße: 0,5 ml

Die Fraktionen der Peaks wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und ihre Enzymaktivität mit einem proteasomspezifischen Substrat bestimmt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung aus den ausgewählten Fraktionen der Anionenaustauscherchromatographie ist in den Abbildungen 4.3-9 und 4.3-10 dargestellt.



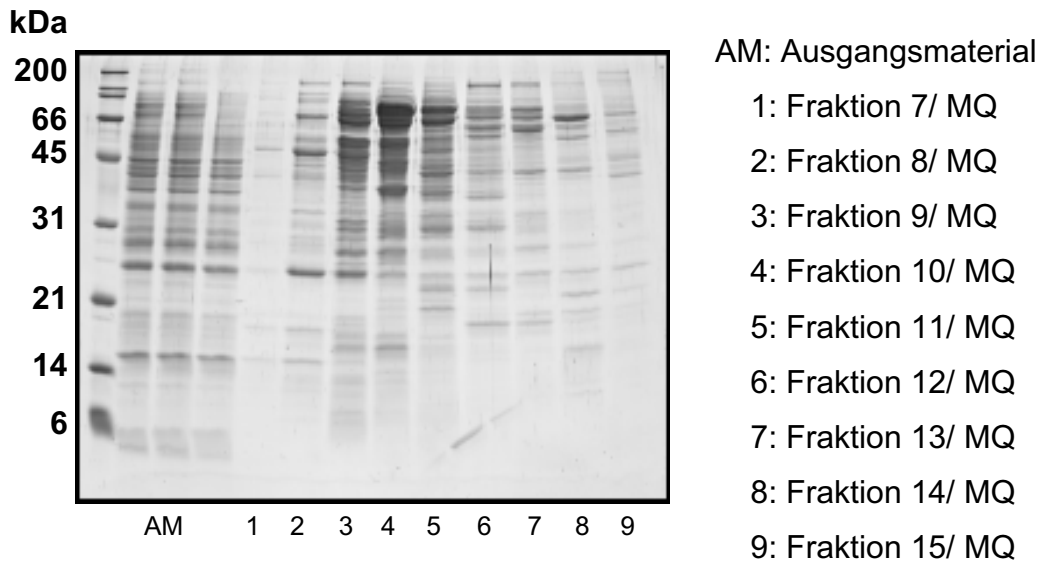


Abb. 4.3-9: 15%ige SDS-Page von Fraktionen des MonoQ-Säulenlaufs aus den Fraktionen 4-7 einer Sucrosedichtegradienten-Zentrifugation vegetativer Zellen. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt. MQ = MonoQ Anionenaustauscherchromatographie.

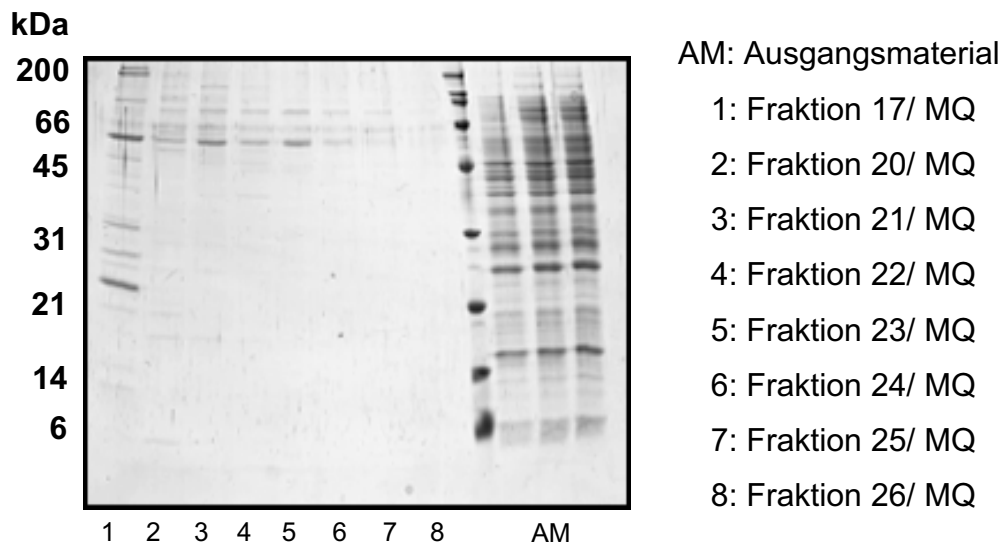


Abb. 4.3-10: 15%ige SDS-Page von Fraktionen des MonoQ-Säulenlaufs aus den Fraktionen 4-7 einer Sucrosedichtegradienten-Zentrifugation vegetativer Zellen. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt. MQ = MonoQ Anionenaustauscherchromatographie.

Das Ergebnis der Bestimmung der Enzymaktivität ist im Diagramm in Abb. 4.3-11 dargestellt.

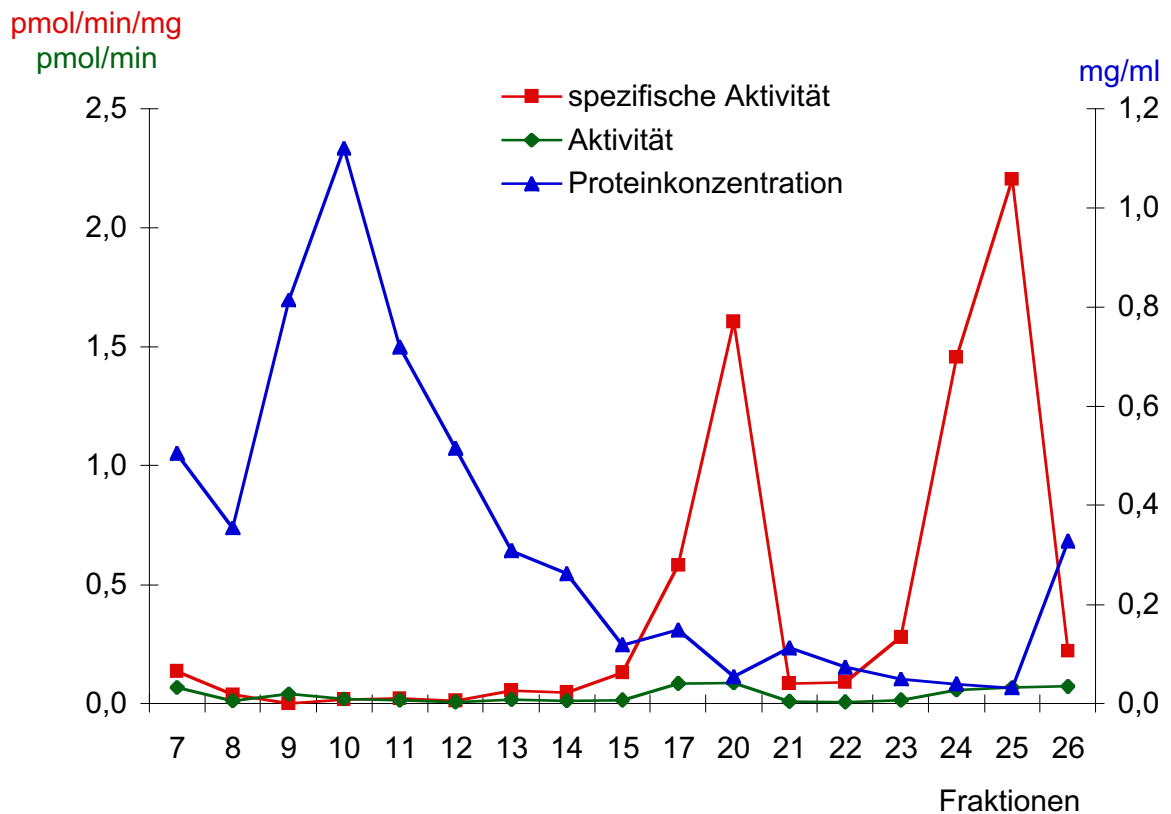


Abb.4.3-11: Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration in Fraktionen des Anionenaustauschers. Fraktioniert wurden Fraktion 4 bis 7 der Sucroседichtegradienten-Zentrifugation.

Enzymatisch vermessen wurden die Peaks, die aus der Fraktionierung durch die Anionenaustauscherchromatographie erhalten wurden. Hierbei ist festzustellen, daß die Fraktionen 7 bis 15 zwar einen hohen Proteingehalt haben, aber keine enzymatische Aktivität zeigen. Enzymaktivität ist in Fraktion 17, 20, 24 und 25 vorhanden und aufgrund des niedrigen Proteingehalts eine daraus folgende hohe spezifische Aktivität.

Die ausgewählten Fraktionen (15 bis 18) aus der Sucroedichtegradienten-Zentrifugation zeigten nach der Anionenaustauscherchromatographie (Abb. 4.3-12) folgende Verteilungseigenschaften.

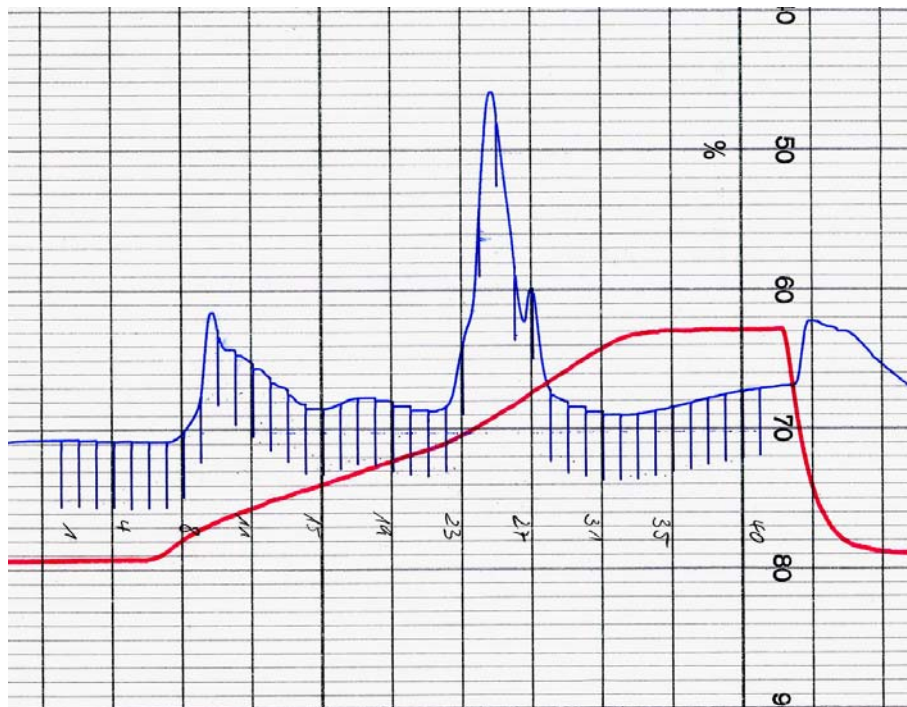


Abb. 4.3-12: Registrierung aus der Anionenaustauscherchromatographie. Auf der Abzisse Fraktionierungsintervalle. In der Ordinate Intensität aus dem Durchflußphotometer. Es sind hier zwei gut getrennte Peaks zu sehen, wobei der zweite Peak eine Schulter aufweist. Fraktionen 8 bis 15, 23 bis 26 und 27 bis 28. Photometer: 280 nm bei einer Empfindlichkeit von 0,2; Fluß: 0,5 ml/min; Fraktionsgröße: 0,5 ml.

Das Schreiberregistrierung zeigt eine ähnliche Charakteristik wie bei den vereinigten Sucroedichtegradient-Fraktionen 4 bis 7 vegetativer Zellen, die ebenfalls über eine Anionenaustauscherchromatographie fraktioniert wurden.

Die gelelektrophoretische Auftrennung aus den ausgewählten Fraktionen der Anionenaustauscherchromatographie aus den vereinigten Sucroedichtegradient-Fraktionen 15 bis 18 vegetativer Zellen ist in Abbildung 4.3-13 dargestellt. Das Diagramm 4.3-14 zeigt die Enzymaktivität, die mit einem proteasomspezifischen Substrat bestimmt wurde.

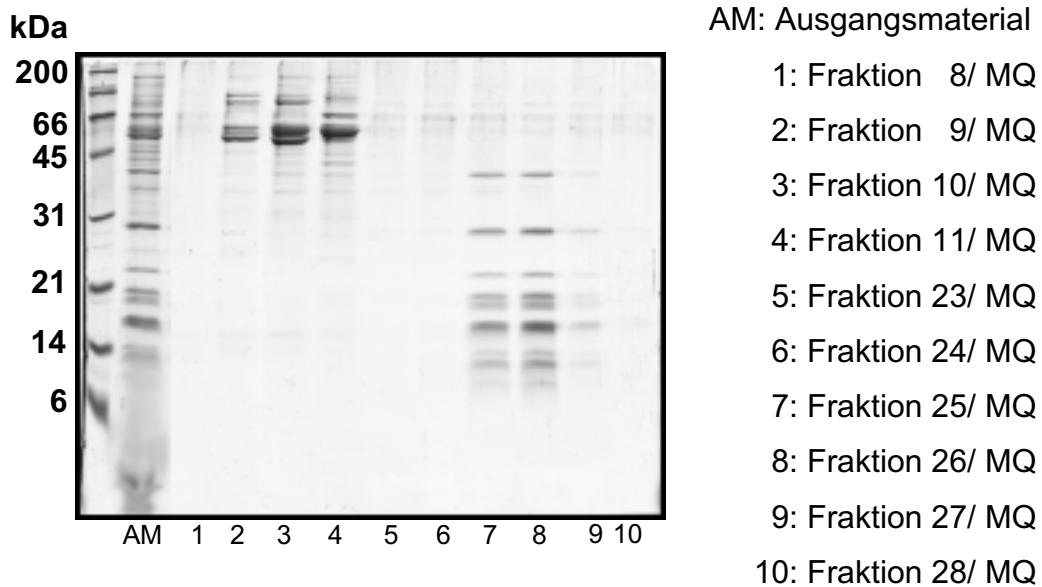


Abb. 4.3-13: 15%ige SDS-Page von Fraktionen des MonoQ-Säulenlaufs aus den Fraktionen 15-18 einer Sucroседichtegradienten-Zentrifugation vegetativer Zellen. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt. MQ = MonoQ Anionenaustauscherchromatographie.

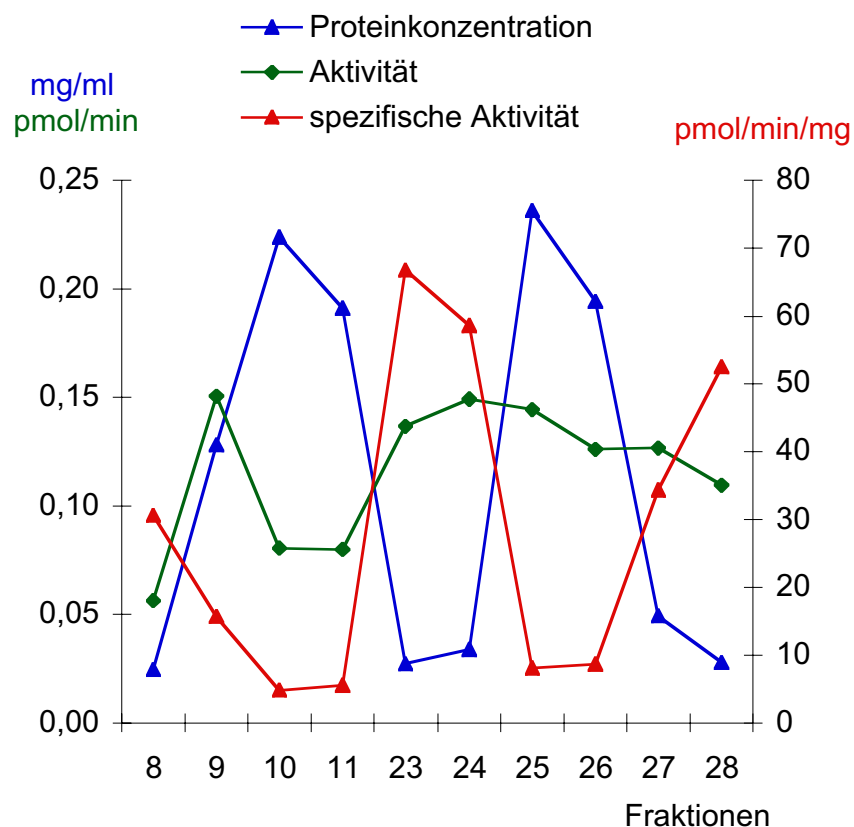


Abb.4.3-14: Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität in Anhängigkeit zur Proteinkonzentration in Fraktionen des Anionenaustauschers. Fraktioniert wurden Fraktion 15 bis 18 der Sucroседichtegradienten-Zentrifugation.

Enzymatisch vermessen wurden die Peaks, die aus der Fraktionierung durch die Anionenaustauscherchromatographie erhalten wurden. Hierbei ist festzustellen, daß die Fraktionen 9 bis 11 zwar einen hohen Proteingehalt haben und enzymatische Aktivität zeigen, aber kaum spezifische Aktivität. Eine spezifische Enzymaktivität ist in Fraktion 23, 24 und 28 vorhanden, was auf den niedrigen Proteingehalt zurückzuführen ist.

Wie bereits erwähnt, wurden unterschiedliche Untersuchungsabläufe angewandt. Ein weiterer Analyseweg erfolgte über die Auftrennung des Gesamtproteinlysats über Gelfiltrationschromatographie, eine sich daran anschließende Anionenaustauscherchromatographie und den immunologischen Nachweis von so aufgereinigten und angereicherten Polypeptiden mit einem spezifischen Antiserum, nachdem diese aufgrund ihres isoelektrischen Punktes in der ersten Dimension und ihres Molekulargewichts in der zweiten Dimension in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt und daran anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Dieser Untersuchungsablauf ist in den wichtigsten Punkten in Kapitel 4.4 beschrieben.

#### 4.4 Immunologische Nachweisreaktionen mit definierten Fraktionen

Anhand der Abfolge der Trennung des Gesamtproteinlysats über Gelfiltrationschromatographie mit anschließender Anionenaustauscherchromatographie und Analysierung der so gewonnenen Proteinfractionen im Westernblot, wird im folgenden ein kompletter Analysengang beschrieben an dessen Ende der immunologische Nachweis von Proteinen, steht:

1. Gewinnung des Gesamtproteinlysats aus vegetativen Zellen und Sporen.
2. Trennung des Proteinlysats über eine Gelfiltration und Bestimmung der Enzymaktivität.
3. Überführung enzymaktiver Fraktionen auf die Anionenaustauscherchromatographie und Bestimmung der Enzymaktivität.
4. Trennung der enzymaktiven Fraktionen aus der Gelfiltration und des Anionenaustauschers mittels SDS-Gelelektrophorese mit nachfolgendem Westernblot.

Die Beobachtungen aus der Westernblotanalyse und die Bestimmung der Enzymaktivität führte zur Auswahl bestimmter Fraktionen, die gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im Westernblot analysiert wurden.

*Tab 4.4-1: Gefundene Proteinmengen und Aktivitäten bezüglich vegetativer Zellen und Sporen nach Indol-Behandlung vegetativer Zellen. Es bedeuten: GP Gesamtproteinlysats; GF Gelfiltration; MQ Anionenaustauscher. Folgende Zahlen geben die Fraktionsnummer an.*

Vegetativ			Sporen		
Analysenspezifikation	$\Sigma$ Protein [mg]	$\Sigma$ Aktivität [pmol/min]	Analysenspezifikation	$\Sigma$ Protein [mg]	$\Sigma$ Aktivität [pmol/min]
GP	54,40	3405	GP	20,20	1603
GF 1	4,10	76,70	GF 1	2,80	170,20
GF 2	8,10	37,50	GF 2	3,50	180,00
GF 4	10,90	352,20	GF 4	6,70	387,40
MQ 9 / GF 1	0,16	38,00	MQ 10 / GF 1	0,15	6,50
MQ 12 / GF 1	0,10	19,70	MQ 10 / GF 2	0,15	7,30
			MQ 16 / GF 2	0,15	5,00
			MQ 18 / GF 2	0,15	3,90
			MQ 7 / GF 4	0,35	3,86
			MQ 9 / GF 4	0,28	3,87

Die in der Tabelle 4.4-1 aufgeführten Fraktionen und Gesamtproteinlysate wurden nach einer SDS-Page auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem Antiserum, das gegen die 20S-Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* gerichtet ist, inkubiert, um festzustellen, ob Polypeptide mit diesem spezifischen Antiserum kreuzreagieren.

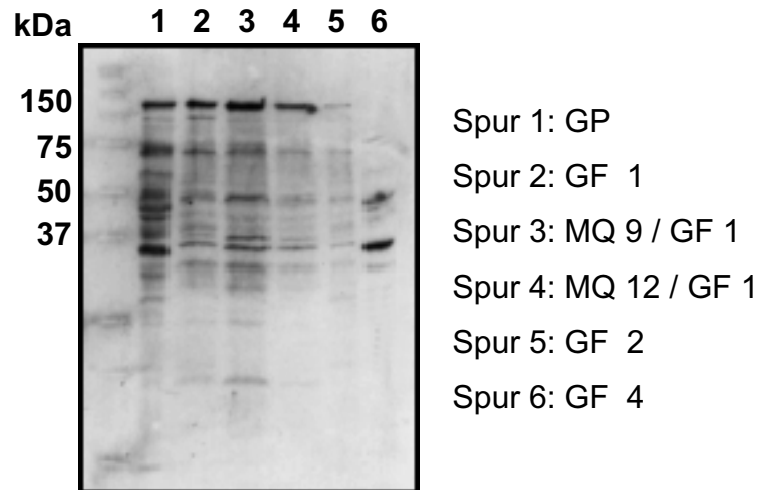


Abb. 4.4-1: Westernblot nach 12,5%iger SDS-PAGE; vegetative Zellextrakte . Es wurden Gesamtproteinlysate und Fraktionen der Gelfiltrations- und Anionenaustauscherchromatographie getestet. Es bedeuten GP Gesamtproteinlysate; GF Gelfiltration und MQ Anionenaustauscher; Bsp.: MQ 9 / GF 1 Fraktion 9 der Anionenaustauscherchromatographie, gewonnen aus der Fraktion 1 der Gelfiltration. Antiserum  $\alpha$ -20S Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* (1:20000).

Die Westernblotanalyse zeigt, daß bei Proteinlysaten vegetativer Zellen, die über Gelfiltrations- und Anionenaustauscherchromatographie Polypeptide vorhanden sind, die mit dem spezifischen Antiserum kreuzreagieren. Insbesondere zeigt die Fraktion 4 der Gelfiltration eine spezifische Bande bei ca. 37 kDa, die auch im Gesamtproteinlysate bei ca. 37 kDa zu finden ist. Im übrigen sind Banden (Spur 1 bis 4) im Bereich von ca. 150 kDa zu sehen, die eine eindeutige Kreuzreaktion mit dem Antiserum gegen die 20S Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* zeigen.

Abbildung 4.4-2 zeigt ebenfalls einen Westernblot, diesmal mit Extrakten von Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen, die über den oben beschriebenen Analyseweg analysiert wurden.

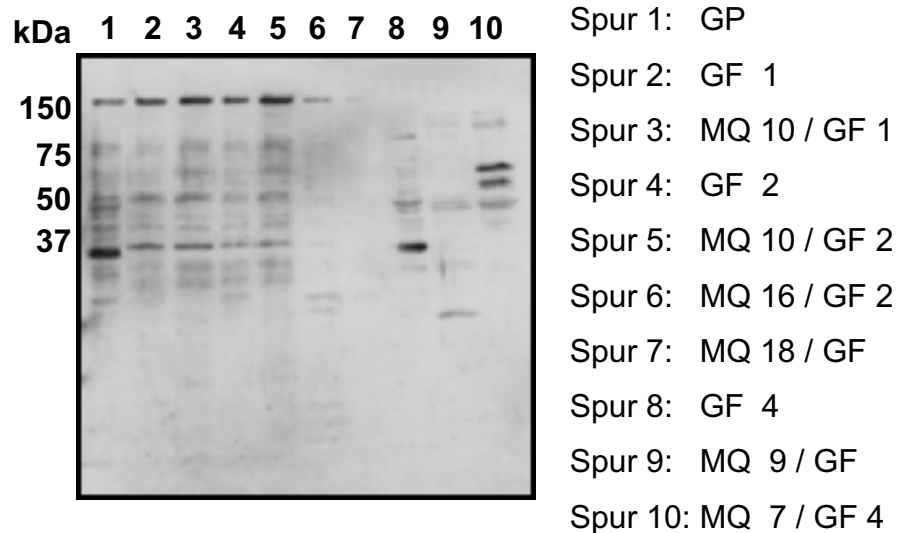


Abb. 4.4-2: Westernblot nach 12,5%iger SDS-PAGE; Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen. Es wurden Gesamtproteinlysate und Fraktionen der Gelfiltrations- und Anionenaustauscherchromatographie getestet. Es bedeuten GP Gesamtproteinlysate; GF Gelfiltration und MQ Anionenaustauscher; Bsp.: MQ 10 / GF 1 Fraktion 10 der Anionenaustauscherchromatographie, gewonnen aus der Fraktion 1 der Gelfiltration. Antiserum  $\alpha$ -20S Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* (1:20000).

Hier ist ebenfalls, wie beim Westernblot in Abb. 4.4-1 eine Bande bei ca. 37 kDa (Spur 8) zu sehen, die eindeutig mit dem spezifischen Antiserum kreuzreagiert. Auch hier handelt es sich um die Fraktion 4 der Gelfiltration. Eine Bande bei ca. 37 kDa findet sich auch im Gesamtproteinlysate. In Spur 1 bis 5 ist eine Bande bei ca. 150 kDa zu sehen. Besonders auffällig sind zwei Banden in Spur 10. Sie befinden sich zwischen 50 und 75 kDa, zeigen eine eindeutige Kreuzreaktion mit dem spezifischen Antiserum und stammen aus Fraktion 7 der Anionenaustauscherchromatographie. Hierzu wurde Fraktion 4 der Gelfiltration herangezogen.

Desweiteren wurden bestimmte Fraktionen der Sucrosedichtegradienten-Zentrifugation vegetativer Zellen und Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese mit einer anschließenden Westernblotanalyse untersucht. Als Auswahlkriterium diente das Auftreten einer eindeutigen Kreuzreaktion mit einem spezifischen Antiserum gegen die 20S Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* im Westernblot oder eine hohe spezifische Aktivität, die durch die Anwendung eines proteasomspezifischen Substrats ermittelt wurde.

Zur Volumenreduktion für die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden die Proteine der einzelnen Fraktionen mit TCA präzipitiert.



Um die TCA-Fällung zu überprüfen, wurden die Fraktionen auf einem SDS-Gel aufgetrennt und zusätzlich geblottet.

Abbildung 4.4-3 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der TCA-präzipitierten Proteine. In Abbildung 4.4-4 ist der Westernblot dieser Proteine dargestellt. Zur Detektion wurde das Antiserum gegen die 20S Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* verwendet.

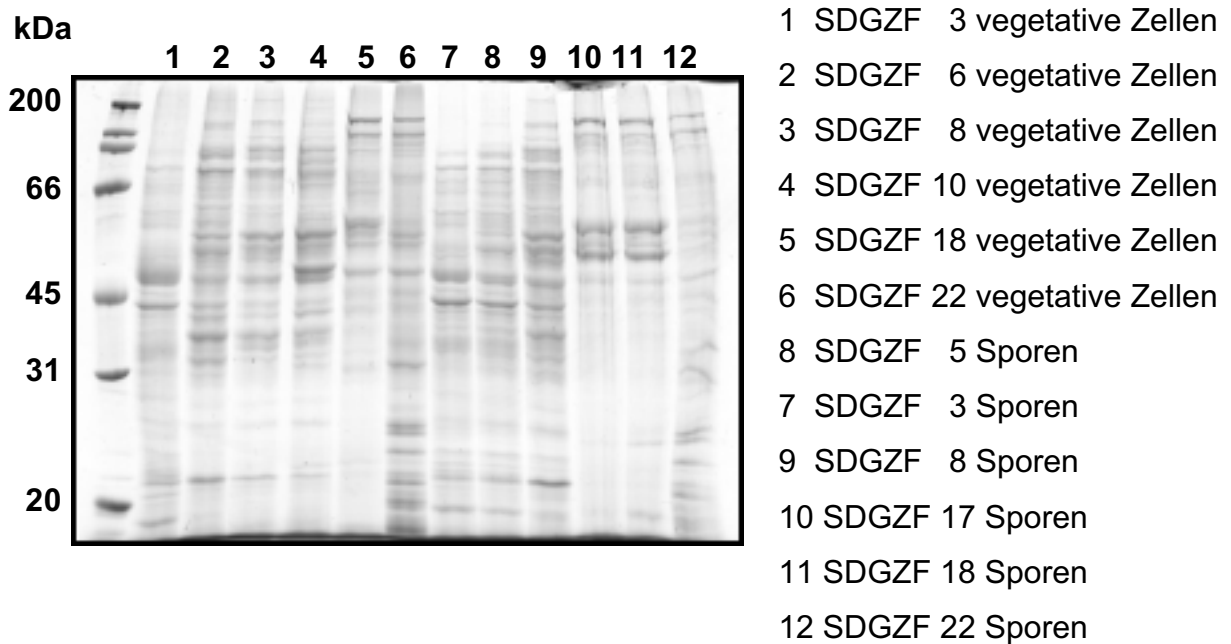


Abb. 4.4-3: 12,5%ige SDS-Page von Fraktionen von Sucrosegradienten aus vegetativen Zellen und Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt. Es bedeutet SDGZF Sucroседichtegradienten-Zentrifugations-Fraktion; folgende Zahlen bezeichnen die Fraktionnummer. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt.

Die SDS-Gelelektrophorese zeigt, daß die Präzipitation der Sucroседichtegradient-Fraktionen, die entweder eine hohe Aktivität oder eine hohe spezifische Aktivität zeigten, erfolgreich war und im übrigen immer noch ein Unterschied in der Proteinzusammensetzung der einzelnen Sucroседichtegradient-Fraktionen erkennbar ist.

Die so überprüften Fraktionen wurden in einem Westernblot mit einem spezifischen Antiserum auf mögliche Immunreaktionen hin getestet. In Abbildung 4.4-4 ist der Westernblot dargestellt.

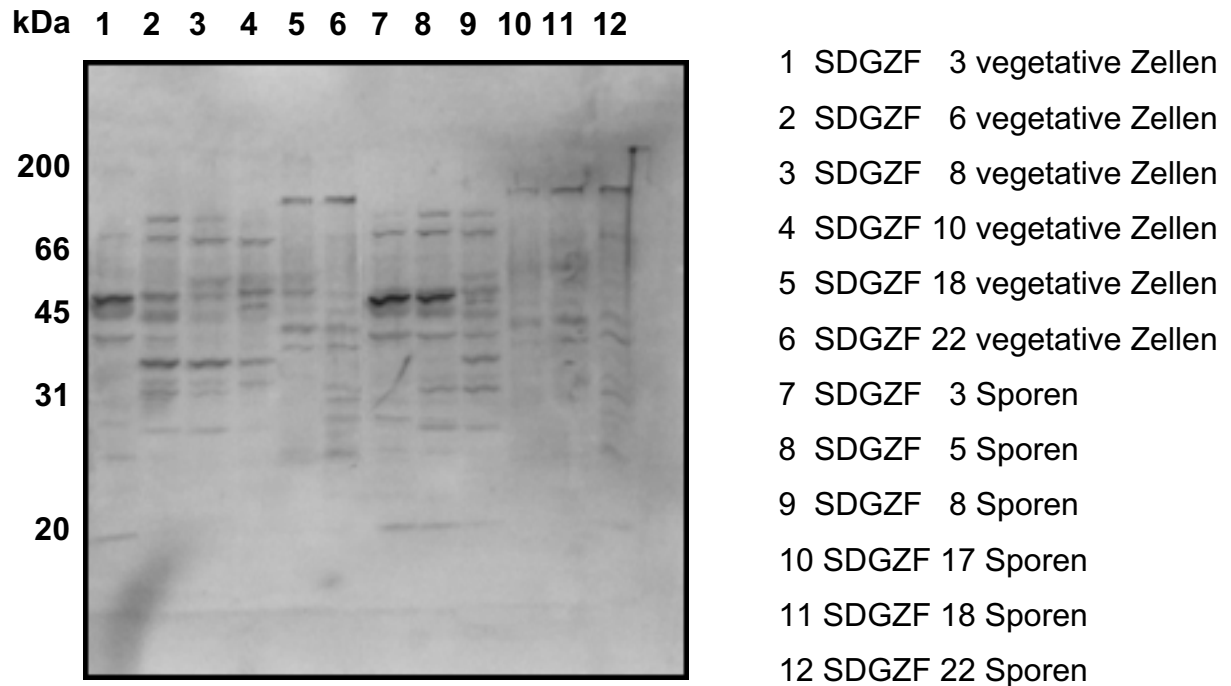


Abb. 4.4-4: Westernblot nach 12,5%iger SDS-PAGE von Fraktionen aus Sucroседichtegradienten-Zentrifugation von vegetativen Zellen und Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen. Es bedeutet SDGZF Sucroседichtegradienten-Zentrifugations-Fraktion; folgende Zahlen bezeichnen die Fraktionnummer. Antiserum  $\alpha$ -20S Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* (1:20000).

In Spur 1, 7 und 8 treten Banden bei ca. 45 kDa auf, die eine eindeutige Kreuzreaktion mit dem spezifischen Antiserum zeigen. Hierbei wurde in Spur 1 die Fraktion 3 aus der Sucroседichtegradienten-Zentrifugation vegetativer Zellen, in Spur 7 die Fraktion 3 und in Spur 8 die Fraktion 5 von Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen aufgetragen.

Präzipitate, die entweder im Westernblot eine eindeutige Kreuzreaktion zeigten oder aber aufgrund ihrer Enzymaktivität interessant erschienen, wurden einer zweidimensionalen Gelelektrophorese zugeführt und ebenfalls mit einem spezifischen Antiserum gegen die 20S Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* getestet.

Wie bereits erwähnt, wurden durch eine TCA-Fällung die Proteine der ausgewählten Fraktionen konzentriert.

Folgende Fraktionen wurden in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht getrennt und anschließend über einen Westernblot

näher charakterisiert: Sucrosedichtegradient-Fraktion 3, 5 und 22 aus Sporen und Fraktion 22 aus vegetativen Zellen.

In Abbildung 4.4-5 ist der Westernblot nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung in der ersten und zweiten Dimension dargestellt.

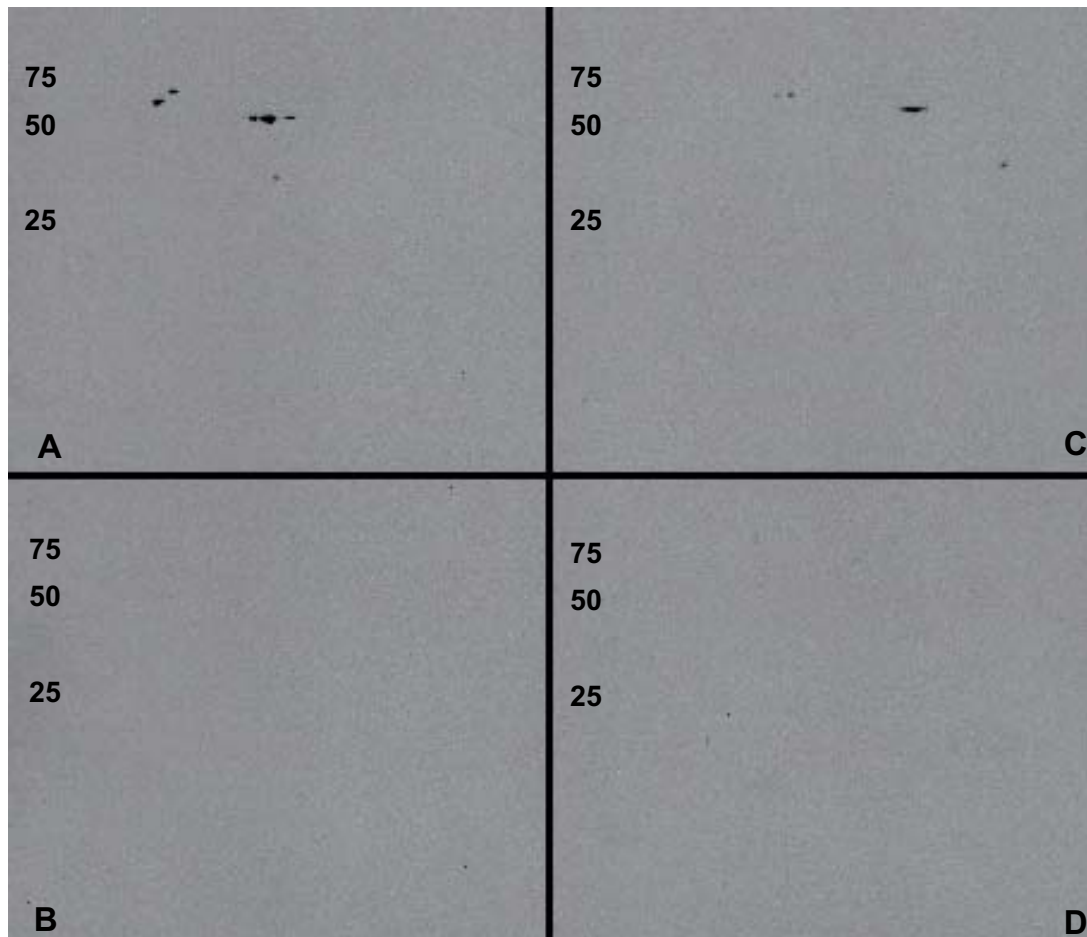


Abb. 4.4-5: Westernblotanalyse nach zweidimensionaler Gelelektrophorese. TCA-Präzipitate wurden in einem linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 in der ersten Dimension und in einer 12,5%igen SDS-Page in der zweiten Dimension getrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Es wurden jeweils 50 µg Protein aufgetragen. **A** Fraktion 3 / Sporen; **B** Fraktion 22 / Sporen; **C** Fraktion 5 / Sporen; **D** Fraktion 22 / vegetative Zellen.

Hierbei zeigten nur Fraktion 3 und 5 von Sporen aus 60 min Indol-behandelten Zellen eine eindeutige Kreuzreaktion mit dem spezifischen Antiserum, der gegen die 20S Untereinheit des Proteasoms von *T. acidophilum* gerichtet ist. Trotz hoher spezifischer Aktivität zeigen die Fraktionen 22 vegetativer Zellen und Sporen keine immunologische Reaktion.

## 5 Diskussion

Aufgrund seines zweigeteilten Lebenszyklus bietet *S. aurantiaca* mit seinem unterschiedlichen Erscheinungsbild gute Voraussetzungen, die damit einhergehenden Veränderungen im Proteom zu untersuchen. Für die Analyse dieser Lebensformen, die in Änderungen des Peptidspektrums zum Ausdruck kommen, wurden etablierte Verfahren wie zweidimensionale Gelelektrophorese, Massenspektrometrie, Säulenchromatographie, Sucroседichtegradienten-Zentrifugation, bildgebende Verfahren (Elektronenmikroskopie) und Westernblot-Analyse eingesetzt. Die Voraussetzungen detaillierter Untersuchungen ist zunächst der Aufschluss von Zellmaterial. Besonders muß bei den Untersuchungen darauf geachtet werden, daß die Strukturen erhalten bleiben (z. B. Verhinderung der Degradation durch Oxidation und Proteolyse), und ausreichende Mengen an funktionellen Strukturen vorhanden sind, um deren Nachweisgrenze zu überschreiten. Die Erreichung der Ziele kann und muß auf unabhängigen Wegen erfolgen, um die Ergebnisse zu sichern. Diese Forderung wurde in der eigenen Arbeit durch die Verknüpfung der verschiedenen Analysewege erfüllt.

Mit SDS-Page konnte nachgewiesen werden, daß die Veränderungen der Proteinverteilung mit definierten Entwicklungszuständen einhergehen. So sind eindeutige Veränderungen zwischen den Proteinbandenmustern von vegetativen Zelllysaten, Lysaten von Sporen, die durch Indol-Behandlung vegetativer Zellen hervorgerufen werden und Fruchtkörperproteinlysaten zu sehen. Eindeutige Veränderungen gibt es auch bei den Proteinbandenmustern von Fruchtkörperlysaten, die aus Fruchtkörpern unterschiedlichen Entwicklungsalters gewonnen wurden. Die Antwort auf Stress (Einwirkung von Indol auf vegetative Zellen) zeigte bezüglich der 30 und 60minütigen Einwirkungsdauer hingegen kaum Unterschiede im Proteinbandenmuster. Diese Veränderungen werden hervorgerufen durch Degradation und Neusynthese von Proteinen.

Es gibt zwei Hauptmechanismen für die Degradation von Proteinen. Diese Mechanismen unterscheiden sich grundlegend bei Eukaryoten und Prokaryoten voneinander.

Bei Eukaryonten ist das Ubiquitinsystem bekannt, welches Polypeptide markiert und erkennt, um sie durch das Proteasom proteolytisch zu spalten und abzubauen. Das Proteasom ist hoch konserviert in der eukaryontischen Evolution zu finden, eine essentielle Komponente des ATP-abhängigen proteolytischen Abauwegs in eukaryontischen Zellen und verantwortlich für die Degradierung vieler zellulärer Proteine.

Das Proteasom der Eukaryonten setzt sich aus einem 20S-Komplex mit Proteaseaktivität, der verschiedene Peptidaseaktivitäten besitzt, und dem regulatorischen 19S-Komplex, welcher aus multiplen ATPasen und anderen Komponenten besteht, um Proteinsubstrate zu binden, zusammen. Der Gesamtkomplex wird als 26S-Proteasom bezeichnet und degradiert ubiquitinylierte Proteine. Einfachere Formen dieses Proteasoms wurden in Archaea und Eubakterien gefunden [Coux et al. 1996].

Prokaryonten wie *S. aurantiaca* besitzen kein Ubiquitinsystem und somit auch kein 26S-Proteasom. Trotzdem muß auch dieses Bakterium in der Lage sein, auf Umwelteinflüsse und veränderte Lebensbedingungen zu reagieren, die wie bereits oben beschrieben, auch eine Veränderung des Proteoms zur Folge haben können. Diese Veränderungen können z. B. durch Proteolyse hervorgerufen werden. Es erhebt sich die Frage, auf welche Art abzubauende Polypeptide erkannt werden, um durch Proteasen degradiert zu werden.

Mit Hilfe der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese ist eine gute Voraussetzung geschaffen für die Identifizierung von Proteinen durch die zusätzliche Auftrennung von Proteinen aus einem Gesamtproteinlysate nach ihren isoelektrischen Punkten und ihren Molmassen. Die Anwendung dieser Methode mündet in sichtbaren Unterschieden einzelner Proteinspotmuster von verschiedenen Differenzierungszuständen. Die Verteilungsmuster der Polypeptide in Zelllysaten aus vegetativen Zellen nach 30 und 60minütiger Indol-Behandlung sind ähnlich; doch unterscheiden sie sich in den Intensitäten der einzelnen Polypeptidspots. Diese Unterschiede können auf eine positive oder negative Regulation dieser Polypeptide bei der Expression hinweisen. Das Verschwinden von Proteinen (nicht mehr vorhandene Spots) kann nur über Proteolyse erfolgen, sowie das Entstehen neuer Proteine (zusätzliche Spots) eine Synthese voraussetzt. In Abb. 4.2-3 sind diese Phänomene eindeutig sichtbar

nachzuvollziehen (generell weniger Proteinspots bei Fruchtkörpern als bei vegetativen Zellen und Sporen). Durch Stresszustände (Hunger, ... ) sind die Zellen gezwungen, überflüssige Aktivitäten herunterzufahren, mit dem Ziel zu überleben. Vegetative Zellen exprimieren mehr Polypeptide als Fruchtkörper, die in ihren Sporangiole Sporen enthalten.

Die Information, die man aus dem Vergleich der verschiedenen Gesamtproteinlysate in der zweidimensionalen Gelelektrophorese erhält ist zwar nützlich, sagt aber noch nichts über Mechanismen aus, sondern ist die Voraussetzung für weitere Identifikationsmethoden, wie z. B. die hochauflösende Massenspektrometrie.

Die massenspektrometrischen Daten sind zuallererst nur Angaben von Molekülmassen, bzw. Massen von Peptidfragmenten. Bei der Anwendung hochauflösender Massenspektrometrie können aus diesen Daten Aminosäuresequenzen zugeordnet werden. Dies ist die Voraussetzung, zum Vergleich homologer Sequenzen von relevanten Proteinen in Datenbanken. Beim untersuchten Organismus *S. aurantiaca* ist das Genom nicht sequenziert, was zur Folge hat, daß Peptidsequenzen nicht eindeutig zugeordnet werden können.

In der eigenen Arbeit wurden durch die MS/MS-Analytik und Datenbankabgleich ATP-abhängige Clp-Proteasen gefunden.

Bei 8 h alten Fruchtkörpern wurde ein ClpA-Homolog "ATP-dependent clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4A" (Matchergebnis aus Datenbankabgleich) gefunden; das bedeutet die Identifizierung einer spezifischen Aminosäuresequenz. Dieser Befund beweist das Vorhandensein von Clp-Proteasen in *S. aurantiaca*.

Bei anderen Prokaryonten, z. B. *E. coli* kennt man Clp-Proteasen, die eine ähnliche Funktion besitzen wie das Proteasom bei Eukaryonten. Im Gegensatz zu *E. coli* ist *S. aurantiaca* ein weitaus komplexerer Organismus, der aufgrund seiner mannigfaltigen Veränderungen während seiner Entwicklung ein effizientes System zur Proteindegradation benötigt. Da keine Ubiquitin-codierende Gene in Prokaryonten bekannt sind, könnten alternative Markierungssysteme involviert sein. So zum Beispiel die Modifikation von N-terminalen Resten durch Aat (Leu/Phe-tRNA-protein transferase) und einer anschließenden Degradation durch ClpAP stellt ein System der N-terminalen Erkennung in *E. coli* dar.

Die periplasmatische Protease Tsp, die cytoplasmatischen Proteasen ClpXP und ClpA und die membrangebundenen Protease FtsH erkennen in *E. coli* C-terminale Peptid Tags, die über die 10Sa RNA (tmRNA) eingeführt werden. Homologe des tmRNA Gens *ssrA* wurden in vielen Bakterien identifiziert. Tsp-ähnliche Proteasen werden potenziell von den meisten bakteriellen Genomen codiert; dies bedeutet, daß solche Markierungsmechanismen allgemein bei Bakterien auftreten [De Mot et al., 1999]. Es gibt keinen Grund, diesen Markierungsmechanismus bei *S. aurantiaca* auszuschließen.

In der eigenen Arbeit gab es aber auch über Datenbankabgleichen die Zuordnung von Proteinen zu homologen Proteinen von *Lotus japonicus* und *Oceanobacillus iheyensis*, die vordergründig in keinem Zusammenhang mit *S. aurantiaca* stehen. Es kann allerdings nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß doch eine Verbindung besteht. Eine gewisse Problematik besteht darin, daß für eine valide Zuordnung die Aminosäuresequenzen zu wenig Identitätsdichte (Redundanz) haben.

Die Beobachtung, daß in zwei Spots, denen unterschiedliche Molekulargewichte und isoelektrische Punkte zugeordnet werden, die gleichen Aminosäuresequenzen nachgewiesen worden sind, ist unterschiedlich interpretierbar: Einerseits kann es sich um eine Modifikation des Ausgangsproteins handeln. Das bedeutet, daß dieses Protein während der Entwicklung *S. aurantiaca* zum Fruchtkörper verkürzt worden sein kann, in dem eventuell eine mögliche Signalsequenz erkannt wurde, so daß ein Teil des Polypeptids proteolysiert wurde. Andererseits ist das Protein als Komplex relativ instabil und „zerfällt“ trotz Zugabe von Proteaseinhibitoren während der Aufbereitung des Proteinlysats für die zweidimensionale Gelelektrophorese.

Die MS/MS-Analytik bringt zwar wertvolle Ergebnisse, ist aber abhängig von der Vortrennung durch die zweidimensionale Gelelektrophorese. So werden z. B. bei der Herstellung von Zellextrakten nicht alle membrangebundenen Proteine und unlösliche Proteine aufgeschlossen. Ebenso fallen Proteine mit extremen isoelektrischen Punkten aus dem Raster.

Die andere analytische Vorgehensweise zur Identifizierung von Proteinen erfolgte durch chromatographische Methoden nach einer Sucroседichtegradienten-Zentrifugation. Damit war die Möglichkeit gegeben, auch materielle Strukturen durch Elektronenmikroskopie nachzuweisen. Durch diese Art der nativen Auftrennung war es auch möglich, enzymatische Aktivitätstests durchzuführen.

Durch den nicht-denaturierenden Aufschluss unter Zugabe von Proteaseinhibitoren und der Vereinigung von Fraktionen gleicher Ordnung, die eine enzymatische Reaktion mit einem proteasomspezifischen Substrat zeigten, waren die Voraussetzungen geschaffen, geordnete Strukturen elektronenmikroskopisch nachzuweisen. Das heißt aber auch, daß der elektronenmikroskopische Nachweis solcher Strukturen nicht zwingend das Vorhandensein eines Proteasoms bei *S. aurantiaca* beweist. Es wurde keine geordnete Struktur gefunden wie z. B. bei Pouch (2000) für den Actinomyceten *Frankia*. Die Möglichkeit, daß zu wenig Substanz für einen positiven elektronenmikroskopischen Nachweis zur Verfügung stand, kann ausgeschlossen werden, da bei einem Vergleich der zu Untersuchung vorgelegten Mengen in der eigenen Arbeit eine ca.  $10^7$ -fache Menge eingesetzt wurde.

Proteasome sind hochmolekulare Komplexe mit 700 KDa (20S-Proteaseom) und 2000 KDa (26S Proteasom). Die Trennungen mit Sucroседichtegradientenzentrifugation und Gelfiltration erlauben eine Molekulargewichtsbestimmung. Die begleitende enzymatische Kontrolle sollte bei Vorhandensein besonders von Molekülkomplexen im Bereich 700 KDa Aktivitäten zeigen. Die Enzymtests wurden mit einem proteasomspezifischen Substrat durchgeführt. Bei diesen Tests zeigten Fraktionen mit hochmolekularen Proteinen eine Reaktivität im Gegensatz zu Fraktionen mit niedermolekularen Polypeptiden. Dies ist ein Hinweis dafür, daß bei *S. aurantiaca* Proteasen mit einer proteasomähnlichen Aktivität vorhanden sind. Allerdings läßt diese Art des Nachweises keine Aussage über das Vorhandensein einer proteasomähnlichen Struktur zu.

Eine weitere unabhängige Methode, die Fragestellung zu lösen besteht darin, Antikörperreaktionen auszunutzen. Hierzu ist das Westernblotverfahren geeignet. Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteingemische wurden auf Membranen



übertragen und mit einem spezifischen Antiserum inkubiert. Diese Analyse wurde mit Proteingemischen durchgeführt, die aus unterschiedlichen Auftrennungsverfahren kommen, welche die Denaturierung beinhalten.

Man kann eindeutig differenzieren bezüglich der Intensität und der Lage der Proteinbanden. Bei Gesamtproteinlysaten von Fruchtkörpern treten zusätzliche Proteinbanden im Vergleich zu den Proteingemischen von vegetativen Zellen und Zellen nach 30 und 60minütiger Indol-Behandlung auf. Die Intensität der Proteinbanden korreliert scheinbar auch mit der Länge der Stressdauer. Dieses Phänomen wird bestätigt über die Westernblotanalyse nach einer zweidimensionalen Gelelektrophorese.

Zur Bestätigung des Vorhandenseins von hochmolekularen Proteinen, die eine möglicherweise eine proteasomähnliche Funktion in *S. aurantica* übernehmen könnten, wurden für die Westernblotanalyse auch nativ gewonnene Fraktionen aus Sucroседichtegradienten-Zentrifugation und Gelfiltration eingesetzt. Diese Fraktionen zeigten, wie bereits oben beschrieben, eine spezifische Enzymaktivität. Mit diesen zwei Nachweismethoden (Verwendung eines proteasomspezifischen Substrats; Verwendung eines proteasomspezifischen Antiserums), kann die Aussage, daß in *S. aurantiaca* hochmolekulare Proteinkomplexe eine dem Proteasom ähnliche Funktion haben, unabhängig voneinander bestätigt werden. In der Tat zeigen Polypeptide dieser Fraktionen eine eindeutige Reaktion mit dem Antiserum. Allerdings konnten hierbei nur aufgetrennte Proteinlysate aus vegetativen Zellen und Zellen nach 60minütiger Indol-Behandlung getestet werden, da es nicht möglich ist, genügend Substanz aus Fruchtkörpern für die Sucroседichtegradienten-Zentrifugation und Gelfiltration zu gewinnen.

Die bisherige Diskussion provoziert besonders im Hinblick auf den eindeutigen Nachweis einer proteasomähnlicher Struktur für *S. aurantiaca* methodenkritische Überlegungen:

- Eigenschaften von Sonden und Eignung der eingesetzten Sonden
- Bedeutung von Datenbanken
- Bedingung für analytische Nachweise bezüglich vorhandener Substanzmengen und –reinheiten

Die Spezifität einer Sonde steigt mit der Anzahl der aufeinanderfolgenden Bausteine, somit ist es klar, daß nur große sequenzbestimmte Abschnitte die Wahrscheinlichkeit einer Aussage/Zuordnung steigern. Für *S. aurantiaca* wurde eine proteasomähnliche Struktur gesucht, welche in *T. acidophilum* schon gefunden wurde. Die für *T. acidophilum* zutreffende Sonde könnte auch bei *S. aurantiaca* reagieren. Die Sonde hat tatsächlich reagiert und es liegt vordergründig nahe daß *S. aurantiaca* eine Struktur mit proteasomaler Aktivität besitzt. Es kann aber durchaus sein, daß die Sequenzen aus *S. aurantiaca*, die mit der Sonde reagiert haben, nichts mit einer proteasomähnlichen Struktur zu tun haben. Das Antiserum gegen die 20S Untereinheit des Proteasom von *T. acidophilum* muß nicht zwangsläufig spezifisch genug sein, um als Sonde bei *S. aurantiaca* den gesicherten Beweis hochmolekularer Proteinkomplexe mit proteasomähnlicher Funktion erbringen zu können.

Spezifische Enzymaktivität bedeutet, daß für einen definierten biochemischen Vorgang eine spezifische Substanz eine Katalyse ermöglicht. Die spezifischen Enzymaktivitäten, die durch die Verwendung eines proteasomspezifischen Substrats gemessen wurden, sind abhängig von der Reinheit und Menge des eingesetzten Materials und lassen keine Aussage darüber zu, wie wahrscheinlich sie für *S. aurantiaca* sind.

Von großem Vorteil ist die Existenz von Genomdatenbanken mit annotierten Sequenzen (s. *E. coli*), weil dann ein Vergleich von Sequenzen, die aus der Massenspektrometrie erhalten wurden und auch der Abgleich von proteasom-spezifisch homologen Sequenzen anderer Organismen erfolgen kann. Das Genom von *S. aurantiaca* ist aber noch nicht sequenziert.

Es gibt allerdings auch Beispiele für proteolytische Funktionen in Bakterien ohne Vorhandensein eines Proteasoms. Diese proteolytischen Funktion werden nachgewiesenermaßen erfüllt durch die cytoplasmatischen Proteasen ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpP, ClpX, La und Ftsh [Gille et al., 2003]. Der Versuch eine proteasomähnliche Struktur in *S. aurantiaca* zu finden, kann deswegen auch in eine Sackgasse führen, da Proteolysefunktionen auch durch die erwähnten cytoplasmatischen Proteasen möglich sind.

Es wurden über die Ermittlung der spezifischen Enzymaktivität zwar viele aktive Proteine gefunden. Der entscheidende Parameter ist aber die Molmasse, die korreliert ist mit der Fraktionsnummer. Der Nachweis von Enzymaktivität bei hochmolekularen Fraktionen gibt einen starken Hinweis auf proteasomähnliche Funktionen, da Proteasome nur in diesem Molekulargewichtsbereich zu erwarten sind.

Eine hohe (spezifische) Aktivität kann durch sehr geringe Polypeptidmengen zustande kommen, wobei das Protein in der bestimmten Fraktion hoch reaktiv ist. Allerdings kann es dann sein, daß es nicht möglich ist, diese geringe Mengen an Protein z. B. in der Westernblotanalyse zu detektieren.

Das Vorhandensein eines Proteasoms ist nicht auf Eukaryonten und ihre unmittelbaren Vorfahren beschränkt, da proteasomale Sequenzen auch in Eubakterien gefunden wurden. Das Proteasom repräsentiert vielmehr ein angestammtes Protein, das ubiquitär zu finden ist, ähnlich dem Ribosom – seinem funktionalen Gegenpart [Lupas et al., 1994]

## **Ausblick**

Die Identifizierung des 20S Proteasomkomplexes von *Rhodococcus*, einem Eubakterium, welches Analogien zeigt zum Proteasom von *T. acidophilum* und Eukaryonten und der in dieser Arbeit geführte Nachweis von Proteinen, die eine proteasomähnliche Funktion zeigen, läßt eine Fortführung der Isolierung materieller Mengen eines proteolytischen Makromoleküls aus *S. aurantiaca* sinnvoll erscheinen. Es besteht dann die Möglichkeit der kompletten Aufklärung der Aminosäuresequenzen und der Ermittlung der Struktur mittels Röntgendiffraktometrie und Elektronenmikroskopie.

## 6 Literatur

### *Einleitung & Diskussion*

**Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. & Huber, R. (1999).** The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**, 295-317.

**Chen, H., Keseler, I. M. & Shimkets, L. J. (1990).** Genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol* **172**, 4206-4213.

**Corbett, J. M., Dunn, M. J., Posch, A. & Görg, A. (1994).** Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* **15**, 1205-1211.

**Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A. L. (1996).** Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**, 801-847.

**Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Hegerl, R., Pfeifer, G. & Baumeister, W. (1991).** The multicatalytic proteinase (prosome, proteasome): comparison of the eukaryotic and archaeobacterial enzyme. *Biomed Biochim Acta* **50**, 465-469.

**De Mot, R., Nagy, I., Walz, J. & Baumeister, W. (1999).** Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes. *Trends Microbiol* **7**, 88-92.

**Gille, C., Goede, A., Schloetelburg, C., Preissner, R., Kloetzel, P. M., Gobel, U. B. & Frommel, C. (2003).** A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. *J Mol Biol* **326**, 1437-1448.

**Garrells, J. I. (1979).** Two dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. *J Biol Chem* **254**, 7961-7977.

**Glickman, M. H. & Ciechanover, A. (2002).** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428.

**Görg, A. (1993).** Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: current state. *Biochem Soc Trans* **21**, 130-132.

**Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A. & Weiss, W. (1995).** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-DALT): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* **16**, 1079-1086.

**Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C. & Weiss, W. (1998).** Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis* **19**, 1516-1519.

- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G. & Weiss, W. (1999).** Recent developments in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: wide gradients up to 12, longer separation distances and simplified procedures.. *Electrophoresis* **20**, 712-717.
- Görg, A., Postel, W. & Gunther, S. (1988).** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**, 531-546.
- Gottesman, S. (1996).** Proteases and their targets in Escherichia coli. *Annu Rev Genet* **30**, 465-506.
- Hilt, W., Wolf, D H. (1995).** Komplexe Proteasen führen zu einem neuen Verständnis der zellulären Regulation durch Proteolyse. *Naturwissenschaften Aufsätze* **82**, 257-268.
- Hopkin, K. (1997).** Regulating cellular processes: the power of protein degradation. *J NIH Res* **9**, 36-42.
- Klose, J. (1975).** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-243.
- Lupas, A., Koster, A. J. & Baumeister, W. (1993).** Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enzyme Protein* **47**, 252-273.
- Lupas, A., Zwickl, P. & Baumeister, W. (1994).** Proteasome sequences in eubacteria. *Trends Biochem Sci* **19**, 533-534.
- Mc Cormack, T., Baumeister, W., Grenier, L., Moomaw, C., Plamondon, L., Pramanik, B., Slaughter, C., Soucy, F., Stein, R., Zuhl, F. & Dick, L. (1997).** Active site-directed inhibitors of Rhodococcus 20 S proteasome. Kinetics and mechanism. *J Biol Chem* **272**, 26103-26109.
- Neumann, B., Pospiech, A. & Schairer, H. U. (1992).** Size and stability of the genomes of the myxobacteria *Stigmatella aurantiaca* and *Stigmatella erecta*. *J Bacteriol* **174**, 6307-6310.
- O'Farrell, P. H. (1975).** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-4021.
- Reichenbach, R. & Dworkin, M. (1992).** The order Myxobacteriales, *Vol I* (Berlin: Springer-Verlag KG).
- Rivett, A. J. (1998).** Intracellular distribution of proteasomes. *Curr Opin Immunol* **10**, 110-114.

**Shevchenko, A. Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Boucherie, H. & Mann, M. (1996)** Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two-dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14440-14445.

**Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R. & Baumeister, W. (1995).** The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol* **5**, 766-774.

**Thaxter, R. (1892).** Contribution from the Cryptogamic Laboratory of Harvard University, XVIII. On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot Gaz* **14**, 389-406.

**Voges, D., Zwickl, P. & Baumeister, W. (1999).** The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**, 1015-1068.

**Zwickl, P., Grziwa, A., Puhler, G., Dahmann, B., Lottspeich, F. & Baumeister, W. (1992).** Primary structure of the *Thermoplasma* proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry* **31**, 964-972.

**Zwickl, P., Voges, D. & Baumeister, W. (1999).** The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1501-1511.

### ***Material & Methode***

**Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

**Bairoch, A. A., R. (1997).** The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement. *TrEMBL Nucleic Acids Res* **25**, 31-36.

**Bairoch, A. A., R. (1999).** The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement. *TrEMBL in 1999 Nucleic Acids Res* **27**, 49-54.

**Blum, H., Beiers, H. & Gross, H. J. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.

**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.

- Gerth, K. & Reichenbach, H. (1994).** Induction of myxospores in *Stigmatella aurantiaca* (myxobacteria): analysis of inducer-inducer and inducer-inhibitor interactions by dose-response curves. *Microbiology* **140**, 3241-3247.
- Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C. & Weiss, W. (1998).** Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis* **19**, 1516-1519.
- Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A. & Weiss, W. (1995).** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* **16**, 1079-1086.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. & Weiss, W. (2000).** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-1053.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988).** Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.
- Kaiser, D. (1979).** Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5952-5956.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. (1988).** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Pearson, W. R. L., D. J. (1988).** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2444-2448.
- Qualls, G. T., Stephens, K. & White, D. (1978).** Morphogenetic movements and multicellular development in the fruiting Myxobacterium, *Stigmatella aurantiaca*. *Dev Biol* **66**, 270-274.
- Stoscheck, C. M. (1990).** Quantitation of protein. *Methods in Enzymology* **182**, 50-68.
- Warburg, O. C., W. (1941).** Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem Z* **310**, 384-421.

---

**Weiterführende Literatur**

- Akopian, T. N., Kisselev, A. F. & Goldberg, A. L. (1997).** Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem* **272**, 1791-1798.
- Baumeister, W. & Lupas, A. (1997).** The proteasome. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 273-278.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. & Seemuller, E. (1998).** The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380.
- Benoist, P., Muller, A., Diem, H. G. & Schwencke, J. (1992).** High-molecular-mass multicatalytic proteinase complexes produced by the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia* strain BR. *J Bacteriol* **174**, 1495-1504.
- Bohley, P. (1995).** The fates of proteins in cells. *Naturwissenschaften* **82**, 544-550.
- Dahlmann, B., Kuehn, L., Grziwa, A., Zwickl, P. & Baumeister, W. (1992).** Biochemical properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *Eur J Biochem* **208**, 789-797.
- De Mot, R., Nagy, I. & Baumeister, W. (1998).** A self-compartmentalizing protease in *Rhodococcus*: the 20S proteasome. *Antonie Van Leeuwenhoek* **74**, 83-87.
- Fernandez Murray, P., Biscoglio, M. J. & Passeron, S. (2000).** Purification and characterization of *Candida albicans* 20S proteasome: identification of four proteasomal subunits. *Arch Biochem Biophys* **375**, 211-219.
- Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K. & Niedermann, G. (1999).** A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* **283**, 978-981.
- Gerards, W. L., de Jong, W. W., Boelens, W. & Bloemendal, H. (1998).** Structure and assembly of the 20S proteasome. *Cell Mol Life Sci* **54**, 253-262.
- Glickman, M. H. (2000).** Getting in and out of the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 149-158.
- Glickman, M. H. & Maytal, V. (2002).** Regulating the 26S proteasome. *Curr Top Microbiol Immunol* **268**, 43-72.
- Goldberg, A. L. (1995).** Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science* **268**, 522-523.



- Goldberg, A. L., Akopian, T. N., Kisselev, A. F., Lee, D. H. & Rohrwild, M. (1997).** New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. *Biol Chem* **378**, 131-140.
- Gottesman, S. & Maurizi, M. R. (1992).** Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev* **56**, 592-621.
- Gottesman, S., Squires, C., Pichersky, E., Carrington, M., Hobbs, M., Mattick, J. S., Dalrymple, B., Kuramitsu, H., Shiroza, T., Foster, T. & et al. (1990).** Conservation of the regulatory subunit for the Clp ATP-dependent protease in prokaryotes and eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3513-3517.
- Gottesman, S., Wickner, S. & Maurizi, M. R. (1997).** Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev* **11**, 815-823.
- Graves, P. R. & Haystead, T. A. (2002).** Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 39-63.
- Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Steven, A. C. & Maurizi, M. R. (1998).** Enzymatic and structural similarities between the Escherichia coli ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J Biol Chem* **273**, 12476-12481.
- Grimm, L. M. & Osborne, B. A. (1999).** Apoptosis and the proteasome. *Results Probl Cell Differ* **23**, 209-228.
- Grunenfelder, B., Rummel, G., Vohradsky, J., Roder, D., Langen, H. & Jenal, U. (2001).** Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4681-4686.
- Grziwa, A., Maack, S., Puhler, G., Wiegand, G., Baumeister, W. & Jaenicke, R. (1994).** Dissociation and reconstitution of the Thermoplasma proteasome. *Eur J Biochem* **223**, 1061-1067.
- Gupta, R. S. (2000).** The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 367-402.
- Hayes, S. A. & Dice, J. F. (1996).** Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol* **132**, 255-258.
- Heidelbach, M., Skladny, H. & Schairer, H. U. (1993).** Purification and characterization of SP21, a development-specific protein of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J Bacteriol* **175**, 905-908.
- Herman, C. & D'Ari, R. (1998).** Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. *Curr Opin Microbiol* **1**, 204-209.

- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1992).** The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* **61**, 761-807.
- Hilt, W. & Wolf, D. H. (1995).** Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: genes, structure and functions. *Mol Biol Rep* **21**, 3-10.
- Hochstrasser, M. (1996).** Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* **30**, 405-439.
- Horwich, A. L., Weber-Ban, E. U. & Finley, D. (1999).** Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11033-11040.
- Hoskins, J. R., Pak, M., Maurizi, M. R. & Wickner, S. (1998).** The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12135-12140.
- Hoskins, J. R., Sharma, S., Sathyanarayana, B. K. & Wickner, S. (2001).** Clp ATPases and their role in protein unfolding and degradation. *Adv Protein Chem* **59**, 413-429.
- Jenal, U. & Fuchs, T. (1998).** An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *Embo J* **17**, 5658-5669.
- Jensen, R. B. & Shapiro, L. (2000).** Proteins on the move: dynamic protein localization in prokaryotes [In Process Citation]. *Trends Cell Biol* **10**, 483-488.
- Klose, J. (1975).** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-243.
- Knipfer, N. & Shrader, T. E. (1997).** Inactivation of the 20S proteasome in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **25**, 375-383.
- Koster, A. J., Walz, J., Lupas, A. & Baumeister, W. (1995).** Structural features of archaeobacterial and eukaryotic proteasomes. *Mol Biol Rep* **21**, 11-20.
- Link, A. J., Ed. (1999).** 2-D Proteome Analysis Protocols. Humana Press Totowa, USA.
- Lord, J. M. (1996).** Go outside and see the proteasome. Protein degradation. *Curr Biol* **6**, 1067-1069.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. & Huber, R. (1995).** Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539.
- Lünsdorf, H., Schairer, H. U. & Heidelberg, M. (1995).** Localization of the stress protein SP21 in indole-induced spores, fruiting bodies, and heat-shocked cells of *Stigmatella aurantiaca*. *J Bacteriol* **177**, 7092-7099.

- Lupas, A., Zuhl, F., Tamura, T., Wolf, S., Nagy, I., De Mot, R. & Baumeister, W. (1997).** Eubacterial proteasomes. *Mol Biol Rep* **24**, 125-131.
- Lupas, A., Zwickl, P., Wenzel, T., Seemuller, E. & Baumeister, W. (1995).** Structure and function of the 20S proteasome and of its regulatory complexes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 515-524.
- Maupin-Furlow, J. A., Aldrich, H. C. & Ferry, J. G. (1998).** Biochemical characterization of the 20S proteasome from the methanoarchaeon *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol* **180**, 1480-1487.
- Maurizi, M. R. (1998).** Proteasome assembly: biting the hand. *Curr Biol* **8**, R453-456.
- Mayr, J., Seemuller, E., Muller, S. A., Engel, A. & Baumeister, W. (1998).** Late events in the assembly of 20S proteasomes. *J Struct Biol* **124**, 179-188.
- Missiakas, D., Schwager, F., Betton, J. M., Georgopoulos, C. & Raina, S. (1996).** Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *Embo J* **15**, 6899-6909.
- Muller, M. (1992).** Proteolysis in protein import and export: signal peptide processing in eu- and prokaryotes. *Experientia* **48**, 118-129.
- Nagy, I., Geert, S., Jos, V. & De Mot, R. (1997).** Further sequence analysis of the DNA regions with the *Rhodococcus* 20S proteasome structural genes reveals extensive homology with *Mycobacterium leprae*. *DNA Seq* **7**, 225-228.
- Nagy, I., Tamura, T., Vanderleyden, J., Baumeister, W. & De Mot, R. (1998).** The 20S proteasome of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **180**, 5448-5453.
- Neumann, B., Pospiech, A. & Schairer, H. U. (1993).** A physical and genetic map of the *Stigmatella aurantiaca* DW4/3.1 chromosome. *Mol Microbiol* **10**, 1087-1099.
- O'Connor, K. A. & Zusman, D. R. (1991).** Analysis of *Myxococcus xanthus* cell types by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Bacteriol* **173**, 3334-3341.
- Pals-Rylaarsdam, R. (1998).** The proteasome. *Curr Biol* **8**, R902.
- Peters, J. M. (1994).** Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci* **19**, 377-382.
- Peters, J. M., Cejka, Z., Harris, J. R., Kleinschmidt, J. A. & Baumeister, W. (1993).** Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol* **234**, 932-937.

- Peters, J. M., Harris, J. R. & Kleinschmidt, J. A. (1991).** Ultrastructure of the approximately 26S complex containing the approximately 20S cylinder particle (multicatalytic proteinase/proteasome). *Eur J Cell Biol* **56**, 422-432.
- Pouch, M. N., Cournoyer, B. & Baumeister, W. (2000).** Characterization of the 20S proteasome from the actinomycete *Frankia*. *Mol Microbiol* **35**, 368-377.
- Powers, J. C., Odake, S., Oleksyszyn, J., Hori, H., Ueda, T., Boduszek, B. & Kam, C. (1993).** Proteases--structures, mechanism and inhibitors. *Agents Actions Suppl* **42**, 3-18.
- Rabilloud, T., Ed. (2000).** Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. Springer Verlag Berlin.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 597-635.
- Reichenbach, H., Voelz, H. & Dworkin, M. (1969).** Structural changes in *Stigmatella aurantiaca* during myxospore induction. *J Bacteriol* **97**, 905-911.
- Rivett, A. J., Mason, G. G., Thomson, S., Pike, A. M., Savory, P. J. & Murray, R. Z. (1995).** Catalytic components of proteasomes and the regulation of proteinase activity. *Mol Biol Rep* **21**, 35-41.
- Rubin, D. M. & Finley, D. (1995).** Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr Biol* **5**, 854-858.
- Ruepp, A., Eckerskorn, C., Bogyo, M. & Baumeister, W. (1998).** Proteasome function is dispensable under normal but not under heat shock conditions in *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* **425**, 87-90.
- Saeki, Y., Toh-e, A. & Yokosawa, H. (2000).** Rapid isolation and characterization of the yeast proteasome regulatory complex. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 509-515.
- Schauer, T. M., Nesper, M., Kehl, M., Lottspeich, F., Muller-Taubenberger, A., Gerisch, G. & Baumeister, W. (1993).** Proteasomes from *Dictyostelium discoideum*: characterization of structure and function. *J Struct Biol* **111**, 135-147.
- Schliephacke, M., Kremp, A., Schmid, H. P., Kohler, K. & Kull, U. (1991).** Prosomes (proteasomes) of higher plants. *Eur J Cell Biol* **55**, 114-121.
- Schmidt, M., Lupas, A. N. & Finley, D. (1999).** Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 584-591.

- Schmidt, M., Schmidtke, G. & Kloetzel, P. M. (1997).** Structure and structure formation of the 20S proteasome. *Mol Biol Rep* **24**, 103-112.
- Seeger, M., Ferrell, K. & Dubiel, W. (1997).** The 26S proteasome: a dynamic structure. *Mol Biol Rep* **24**, 83-88.
- Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R. & Baumeister, W. (1995).** Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* **268**, 579-582.
- Seemuller, E., Lupas, A., Zuhl, F., Zwickl, P. & Baumeister, W. (1995).** The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease. *FEBS Lett* **359**, 173-178.
- Sherman, M. Y. & Goldberg, A. L. (1996).** Involvement of molecular chaperones in intracellular protein breakdown. *Exs* **77**, 57-78.
- Shimkets, L. J. (1990).** Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **54**, 473-501.
- Skladny, H., Heidelbach, M. & Schairer, H. U. (1994).** Cloning and characterization of the gene encoding the major sigma factor of *Stigmatella aurantiaca*. *Gene* **143**, 123-127.
- Smith, C. K., Baker, T. A. & Sauer, R. T. (1999).** Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6678-6682.
- Sousa, M. C., Trame, C. B., Tsuruta, H., Wilbanks, S. M., Reddy, V. S. & McKay, D. B. (2000).** Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell* **103**, 633-643.
- Sproer, C., Reichenbach, H. & Stackebrandt, E. (1999).** The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 3**, 1255-1262.
- Squires, C. & Squires, C. L. (1992).** The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J Bacteriol* **174**, 1081-1085.
- Stephens, K. & White, D. (1980).** Morphogenetic effects of light and guanine derivatives on the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J Bacteriol* **144**, 322-326.
- Stock, D., Nederlof, P. M., Seemuller, E., Baumeister, W., Huber, R. & Lowe, J. (1996).** Proteasome: from structure to function. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 376-385.

- Suzuki, C. K., Rep, M., van Dijl, J. M., Suda, K., Grivell, L. A. & Schatz, G. (1997).** ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem Sci* **22**, 118-123.
- Tanaka, K. (1998).** Molecular biology of the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 537-541.
- Tanaka, K. (1998).** Proteasomes: structure and biology. *J Biochem (Tokyo)* **123**, 195-204.
- Tanaka, K. & Chiba, T. (1998).** The proteasome: a protein-destroying machine. *Genes Cells* **3**, 499-510.
- Tanaka, K. & Tsurumi, C. (1997).** The 26S proteasome: subunits and functions. *Mol Biol Rep* **24**, 3-11.
- Thony-Meyer, L., Bock, A. & Hennecke, H. (1992).** Prokaryotic polyprotein precursors. *FEBS Lett* **307**, 62-65.
- Tong, W., Link, A., Eng, J. K. & Yates, J. R., 3rd (1999).** Identification of proteins in complexes by solid-phase microextraction/multistep elution/capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **71**, 2270-2278.
- Ueki, T. & Inouye, S. (2001).** SigB, SigC, and SigE from *Myxococcus xanthus* homologous to sigma32 are not required for heat shock response but for multicellular differentiation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 287-293.
- Urban, S. & Freeman, M. (2002).** Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 512-518.
- Vasquez, G. M., Qualls, F. & White, D. (1985).** Morphogenesis of *Stigmatella aurantiaca* fruiting bodies. *J Bacteriol* **163**, 515-521.
- Vierstra, R. D. (1996).** Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Mol Biol* **32**, 275-302.
- Volker, C. & Lupas, A. N. (2002).** Molecular evolution of proteasomes. *Curr Top Microbiol Immunol* **268**, 1-22.
- Wang, C. C. & Tsou, C. L. (1998).** Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes. *FEBS Lett* **425**, 382-384.
- Wenzel, T. & Baumeister, W. (1993).** *Thermoplasma acidophilum* proteasomes degrade partially unfolded and ubiquitin-associated proteins. *FEBS Lett* **326**, 215-218.
- Westermeier, R. (1997).** *Electrophoresis in Practice*, Second Edition VCH, Weinheim.

- White, D., Shropshire, W., Jr. & Stephens, K. (1980).** Photocontrol of development by *Stigmatella aurantiaca*. *J Bacteriol* **142**, 1023-1024.
- Wickner, S., Gottesman, S., Skowrya, D., Hoskins, J., McKenney, K. & Maurizi, M. R. (1994).** A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12218-12222.
- Wickner, S. & Maurizi, M. R. (1999).** Here's the hook: similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8318-8320.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. & Gottesman, S. (1999).** Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893.
- Wilson, H. L., Aldrich, H. C. & Maupin-Furlow, J. (1999).** Halophilic 20S proteasomes of the archaeon *Haloferax volcanii*: purification, characterization, and gene sequence analysis. *J Bacteriol* **181**, 5814-5824.
- Wissing, J., Heim, S., Flohe, L., Bilitewski, U. & Frank, R. (2000).** Enrichment of hydrophobic proteins via Triton X-114 phase partitioning and hydroxyapatite column chromatography for mass spectrometry [In Process Citation]. *Electrophoresis* **21**, 2589-2593.
- Wlodawer, A. (1995).** Proteasome: a complex protease with a new fold and a distinct mechanism. *Structure* **3**, 417-420.
- Zwickl, P. (2002).** The 20S proteasome. *Curr Top Microbiol Immunol* **268**, 23-41.
- Zwickl, P., Baumeister, W. & Steven, A. (2000).** Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPase-assisted proteases. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 242-250.
- Zwickl, P., Lottspeich, F. & Baumeister, W. (1992).** Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **312**, 157-160.
- Zwickl, P., Lottspeich, F., Dahlmann, B. & Baumeister, W. (1991).** Cloning and sequencing of the gene encoding the large (alpha-) subunit of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* **278**, 217-221.
- Zwickl, P., Pfeifer, G., Lottspeich, F., Kopp, F., Dahlmann, B. & Baumeister, W. (1990).** Electron microscopy and image analysis reveal common principles of organization in two large protein complexes: groEL-type proteins and proteasomes. *J Struct Biol* **103**, 197-203.

## 7 Anhang

### 7.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

#### Sporen 30 min

#### MS-Ergebnisse

#### Gel 162

Probe	Protein	MW	IP	Score	Abdeckung
Spot 1	Keratin				
Spot 2	Urease accessory protein ureG	22 kD	4.96	74	36
Spot 3	kein Datenbankeintrag				
Spot 4	kein Datenbankeintrag				
Spot 5	kein Datenbankeintrag				
Spot 6	kein Datenbankeintrag				
Spot 7	kein Datenbankeintrag				

#### Sporen 60 min

#### MS-Ergebnisse

#### Gel 158

Probe	Protein	MW	IP	Score	Abdeckung
Spot 1	RAD50 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	155 kD	6.64	88	11
Spot 2	kein Datenbankeintrag				
Spot 3					
Spot 4	ATP synthase beta chain	52 kD	5.11	116	27
Spot 5	kein Datenbankeintrag				
Spot 6					
Spot 7	Keratin				



## Fruchtkörper 8 h

## MS-Ergebnisse

## Gel 164

Probe	Protein	MW	IP	Score	Abdeckung
Spot 1	ATP-dependent clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4A	103 kD	6.24	77	17
Spot 2	kein Datenbankeintrag				
Spot 3	kein Datenbankeintrag				
Spot 4	elongation factor Tu [ <i>Stigmatella aurantiaca</i> ]	41 kD	5.60	121	34
Spot 5	osmolarity sensor protein EnvZ, putative [ <i>Brucella suis</i> 1330]	53 kD	5.40	77	17

## vegetativ

## Gel 107

## MSMS-Ergebnisse

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 1				VTXNX.....R	884,6	443	2
				FFFNMSR	947,4	475	2
				ATGGVXNAVTR	1057,6	530	2
					1650,9	551	3
				..TSGAT[W od. VS] <sub>ex</sub> K	1161,6	582	2
				XQXVD.....GR	1195,6	599	2
					1210,5	606	2
				<sub>Nx</sub> GTVMEDMSR	1251,4	627	2
					1902,9	635	3
				...DVEXXGY <sub>sq</sub> K	1377,7	690	2
Spot 2				...VATVSXPR	1337,7	447	3
					1008,4	505	2
				<sub>yx</sub> NXXGNAXGGR	1259,6	631	2
				.....VQP....	1384,2	693	2
				..XXMXDNDXT..XESSX.. VXEG	2662,4	888	3
				.....VQP....	1384,2	693	2
				..XXMXDNDXT..XESSX.. VXEG	2662,4	888	3

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung	
Spot 3					2282,1	762	3	
	1498.73 22-35			...TFXAYDQXDK	1498,8	750	2	
	TGGATFLAYDQIDK							
	239-248 1151.60 TVITGVEMFR			...XTGVE <sub>MFR</sub>	1151,6	577	2	
	ELONGATION FACTOR TU (EF-TU)							
	Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Rank Peptide 5 576.82 1151.62 1151.60 0.02 0 34 1 TVITGVEMFR							
	Proteins matching the same set of peptides: Mass: 41285 Total score: 34 Peptides matched: 1 (X76870) elongation factor Tu [ <i>Stigmatella aurantiaca</i> ]							
						1084,6	543	2
						2913,5	729	4
	22-35 1498.73				TGGATFLAYDQIDK	1498,7	501	3
					1008,5	505	2	
43-56 1546.80				GITISTAHVEYQTK	1546,8	517	3	
					1337,8	447	3	
224-238 1652.91				VGEEVEIVGIRPTQK	1652,9	552	3	
250-265 1656.85				LLDEGMAGDNIGALLR	1656,8	829	2	
					2661,4	888	3	
Spot 5				XPNF....K	803,6	403	2	
	Mass: 52740 Total score: 57 Peptides matched: 1 large subunit of riblose-1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase [ <i>Lotus japonicus</i> ]							
	Query Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Score Rank Peptide 576.82 402.76 803.50 803.45 0.05 0 57 1 IPNAYVK							
	Vorschlag aus Mascot:			XATP.....R	855,6	429	2	
	LATGEPLK							
				...WVVS <sub>SAAH</sub>	983,6	493	2	
					1125,6	564	2	
				XCPTEXAEFGK	1263,6	633	2	
Spot 7				...VXEDVK	798,38	400	2	
				TXYPXAK	804,4	403	2	
				...DDNVDR		463		
				...VWGK		489		
				...ADEVD...R	1129,4	566	2	
				YQETXFXVK	1140,4	571	2	
				...DXTDDNVDR	1158,4	580	2	

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
<b>Spot 8</b>				...PGSQTXXR	1200,6	401,2	3
				...XWDXRK	1415,1	472,7	3
				...AXVDXGYK	1155,5	578,7	2
				...DTGMVVXSK	1191,5	596,7	2
				...XPGSQVDXR	1201,5	601,8	2
				...AVEXXESR	1257,5	629,8	2
				...DEXSAA....R	1348,5	675,2	2
				...EQFX....R		747,0	
<b>Spot 10</b>				...NDTXXFSK	1007,4	505	2
				:::XFXRNK	1017,4	510	2
				:::EHXXR	1080,4	541	2
				:::EDVXRXEK	1129,5	566	2
				:::DWEHXXR	1193,5	598	2
<b>Spot 12</b>				...VEQPK	826,3	414	2
				...VVXANAQNK	1433,4	479	3
				...GEAWXVK	1464,6	489	3
				...XEA...K	1057,4	530	2
				...EXQXT...	1178,4	590	2
				...FTVVXAQNK	1433,6	718	2

**vegetativ**                      **Gel 154**                      **MSMS-Ergebnisse**

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 1	k. Ergebnis						
Spot 2	k. DB-Eintrag			XXAEDXGK	970,6	486	2
	k. DB-Eintrag			XDAXTXADXGR	1156,6	579	2
	60 kDa chaperonin [ <i>Yersinia pestis</i> ]	57 kD	4.91	SFGSPTXTK	936,6	469	2
				GVNXXADAVK	998,6	500	2
Spot 3	k. DB-Eintrag			NXNXDFXR	1003,6	503	2
	k. DB-Eintrag			NPFEVPK	829,4	416	2
	k. DB-Eintrag			...GVGVETX...R	1372,8	687	2
	k. DB-Eintrag			...QQGGQPVS AVR	1168,6	585	2
Spot 4	k. DB-Eintrag			...ASGO[Mox]P XKXXAR	1341,8	672	2
	k. DB-Eintrag			...PPXV[KQ]R	926,6	464	2

**Sporen 30 min**                      **Gel 162**                      **MSMS-Ergebnisse**

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 1	k. DB-Eintrag			...EEX[KQ]XT[KQ]R	1764,9	589	3
	k. DB-Eintrag			...[KQ]SXSDV[KQ]R	1715,7	573	3
	OAR PROTEIN PRECURSOR	115 kD	5.14	TGXXP...R	917,4	460	2
	k. DB-Eintrag			...ED[FMox]ESS[KQ]GK	2566,2	856	3
Spot 2	OAR PROTEIN PRECURSOR	115 kD	5.14	TGXXPFDR	917,6	460	2
				...AXVD...	1194,6	598	2
				VTXNXGLR	884,6	443	2
Spot 4	k. DB-Eintrag			...XSPDSGYNPMNR	1796,8	899	2
	k. DB-Eintrag			...XPAGTP[KQ]PR	1433,7	479	3
Spot 5	hypothetical conserved protein [ <i>Oceanobacillus ihyensis</i> ]	14 kD	5.41	...NXD[FMox]XR	1003,6	503	2

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 6	k. DB-Eintrag			...ANAANPVSAVR	1624,8	543	3
	k. DB-Eintrag			...XX[FMox]EALAEK	1190,6	596	2
	ähnl. Spot 5						
	k. DB-Eintrag			...[KQ]XPA...PR	1434	479	3
	k. DB-Eintrag			...VATVNG[FMox]A..	1459,6	731	2
Spot 7	ähnl. Spot 6						
	k. DB-Eintrag			XGYXSPDSGYNPM..R	1797	600	3
	k. DB-Eintrag			...[KQ]XPAGTP[KQ]PR	1434	479	3
	k. DB-Eintrag			YETXSXSDLGR	1252,8	627	2

**Sporen 60 min**      **Gel 158**      **MSMS-Ergebnisse**

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 1				TGXXP...R	917,4	460	2
				[FM]D[KQ]SP...	1071,4	537	2
	k. DB-Eintrag			VGGSSXXTDGSLNR	1384,6	693	2
Spot 2	k. DB-Eintrag			VV[KQ]SAYAPMVR	1219,6	611	2
	k. DB-Eintrag			...GVGVETXTVXR	1372,6	687	2
	k. DB-Eintrag			NXNXD[FMox]XR	1003,4	503	2
Spot 3	ATP synthase subunit beta	50 kD	4.99	TVXX[FMox]EXXR	1102,6	552	2
	k. DB-Eintrag			VVPEXNDEMoxAK	1259,6	631	2
	k. DB-Eintrag			...XXF[KQ][FMox]XPR	1190,6	596	2
Spot 4	ATP synthase subunit beta	50 kD	4.99	TVXX[FMox]EXXR	1102,6	552	2
	ATP synthase beta chain	51 kD	5.11	XGX[FMox]NAGVGK	974,4	488	2
				...[KQ]AGSEVSAXXGR	1434,6	718	2
				VXDXXG...TR	1145,6	574	2
	k. DB-Eintrag			PAST[FMox]VE[KQ]DVR	1257,6	630	2

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 5				TXGVG...	1001,4	502	2
	k. DB-Eintrag			...G[KQ]AAX[KQ]TXK	1084,6	543	2
	k. DB-Eintrag			VVXXGXDTEPR	1210,6	606	2
	k. DB-Eintrag			XAXEDEGWTXR	1301,6	652	2
Spot 6	Keratin						
Spot 7				VXENX...R	897,4	450	2
				EXEYX...K	1119,6	561	2
	k. DB-Eintrag			...SXE[FMox]XEGR	1849,8	618	3

**Fruchtkörper 8 h    Gel 164    MSMS-Ergebnisse**

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 1	k. DB-Eintrag			VTXNXGXR	884,4	443	2
	k. DB-Eintrag			[FMox][FMox][FMox]MN SR	947,4	475	2
	k. DB-Eintrag			...VYPXK	816,4	409	2
Spot 2	k. DB-Eintrag			...VEEXS...	1883,4	629	3
	k. DB-Eintrag			...SXEVDSTR	1018,4	510	2
	k. DB-Eintrag			...XX[FMox]EAXAEK	1190,6	596	2
	k. DB-Eintrag			...PEXN[FMox]EWK	1259,6	631	2
	k. DB-Eintrag			V[KQ]VEEXSPVEK	1255,6	629	2
Spot 3	k. DB-Eintrag			...XSPDSGYNPMNNR	1796,8	899	2
	k. DB-Eintrag			...VATVNG[FMox]A..	1459,8	731	2
Spot 4	elongation factor Tu [ <i>Stigmatella aurantiaca</i> ]	41 kD	5,60	TVXTGVEMoxFR	1167,6	585	2
				ELVEMEV	1003,6	503	2
				ALEGDTSDX...XXK	1587,8	795	2
				TVXT...MFR	1151,6	577	2
	k. DB-Eintrag			...ATVSXPR	1003,6	503	2
Spot 5	k. DB-Eintrag			...VEEXS...	1255,6	629	2

**Fruchtkörper 16 h****Gel 166****MSMS-Ergebnisse**

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 1	k. DB-Eintrag			EXTS[KQ]TWG XK	1161,6	582	2
	OAR PROTEIN PRECURSOR	115 kD	5.14	VTXNX...	884,6	443	2
				TGXXPFDR	917,6	460	2
				XGAXVDP...	1194,6	598	2
				...SGTPXNYLQHPVYXD DEAFVXPR	2814,3	939	3
				...DAVTXYXNR	1341,6	672	2
Spot 2				...PNTDGCDSTXWKR	2142,9	715	3
	OAR PROTEIN PRECURSOR	115 kD	5.14	...SGTPLNYL[KQ]HPVY XDDEAFVXPR	2814,3	939	3
	k. DB-Eintrag			...XFPXVAVX...	2364,3	789	3
Spot 3				...TDGSXNR	1384,8	463	3
				...PXNXWR	1479,9	494	3
				ATNVXNAVTR	1057,6	530	2
	OAR PROTEIN PRECURSOR	115 kD	5.14	VTLNLGXR	884,6	443	2
				IGAIVDPXANGR	1194,6	598	2
Spot 4	k. DB-Eintrag			VVXXGXDTEPR	1210,6	606	2
	k. DB-Eintrag			[FMox][FMox][FMox]MN SR	947,4	475	2
	OAR PROTEIN PRECURSOR	115 kD	5.14		884,4	443	2
					917,4	460	2
					1194,6	598	2
Spot 5	k. DB-Eintrag			...[KQ][FMox][KQ]GWR	1019,6	511	2
	k. DB-Eintrag			XAWXTNDR	987,6	495	2
	k. DB-Eintrag			...XATXGX...R	1286,8	644	2
	k. DB-Eintrag			...[FMox]GXNS...K	1433,8	718	2
Spot 6	trigger factor [Aquifex aeolicus]	54 kD	5.00	VVVPEXNDE[FMox]AK	1259,6	631	2
	k. DB-Eintrag			V[KQ]VEEXS...EK	1255,6	629	2
	k. DB-Eintrag			NP[FMox]EVPK	829,4	416	2
Spot 7	k. DB-Eintrag			...G[KQ]AAX...	1084,6	543	2
	k. DB-Eintrag			...DADGDGVXD XTR	1415,6	709	2

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 8	major membra- ne protein I [ <i>Mycobacterium leprae</i> ]	33 kD	5.03	XPGT[FMox]VDYETSPR	1877,1	627	3
				V[KQ]VXP[KQ]EXR	1080,6	541	2
	k. DB-Eintrag			DEAXAGXAAR	1433,7	479	3
	k. DB-Eintrag			XPDEXETEX...	1380,8	691	2
Spot 9	Keratin, Trypsin				0		
Spot 10	k. DB-Eintrag			...DAVTXYXNR	1341,6	672	2
	OAR PROTEIN PRECURSOR	114 kD	5.14	TGXXP[FMox]DR	917,4	460	2
				...GVVGWYEVVANTR	1448	725	2
	k. DB-Eintrag			NEAGMDDVNP[FMox] R	3330,4	834	4
Spot 11	OAR PROTEIN PRECURSOR	114 kD	5.14	TGXXPFDR	917,6	460	2
				...VGWYEVVANTR	2172	725	3
				...YEVATX[KQ]K	1392,9	465	3
Spot 12	branched chain keto acid dehy- drogenase (E1) beta subunit [ <i>Stigmatella aurantiaca</i> ]	38 kD	5.13	...TVVSYGR	1345,8	450	3
				...GVDAEVXDXR	1315,6	659	2
				...WNS...ER	1228,6	615	2
Spot 13	k. DB-Eintrag			VEVVS[KQ]PAGV...K	1583,8	793	2
	k. DB-Eintrag			...SAYVEAVR	1219,8	408	3
	k. DB-Eintrag			XSAEVDSTR	1018,6	510	2
	k. DB-Eintrag			A[KQ]P[FMox]S[FMox]EAR	1123,6	563	2



**Fruchtkörper 20 h Gel 167 MSMS-Ergebnisse**

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 1	k. DB-Eintrag			...TSGTTEXXR	1290,6	646	2
	k. DB-Eintrag			X[KQ]XVD...	1194,6	598	2
	k. DB-Eintrag			[KQ]VTVTVPR	898,4	450	2
Spot 2	k. Spektren				0		
Spot 3	k. DB-Eintrag			[FMox][FMox][FMox]MS R	947,6	475	2
	OAR PROTEIN PRECURSOR	114 kD	5.14	...XGAXVDPXANGR	1194,6	598	2
				VTXNXGLR	884,6	443	2
	k. DB-Eintrag			VGGPSXXTD...R	1384,8	693	2
Spot 4	OAR PROTEIN PRECURSOR	114 kD	5.14	TGXXP[FMox]DR	917,6	460	2
Spot 5	k. DB-Eintrag			YDXV[FMox]PXX	993,6	498	2
	k. DB-Eintrag			XATXGX...R	1286,8	644	2
	k. DB-Eintrag			VXDEXVDTK	1030,6	516	2
Spot 6	k. DB-Eintrag			[KQ]AP[FMox][FMox]S.. .R	1051,6	527	2
	k. DB-Eintrag			...P[KQ]VTNS...K	1584	529	3
	k. DB-Eintrag			NXNXDYPR	1003,6	503	2
	k. DB-Eintrag			MNPVSAVR	1624,8	543	3
	k. DB-Eintrag			[Fmox]GVDXXR	818,4	410	2
	k. DB-Eintrag			SAXX[FMox]EAXAEK	1190,6	596	2
Spot 7	OAR PROTEIN PRECURSOR	114 kD	5.14	RGXXPFDR	917,6	460	2
Spot 9	k. DB-Eintrag			V[KQ]A[FMox]EGER	991,6	497	2
				V[KQ][FMox]EENR			
				V[KQ][FMox]D[KQ]R			
	k. DB-Eintrag			A[KQ]P[FMox][FMox]S EAR	1051,6	527	2
	k. DB-Eintrag			...DYA[FMox]P[FMox]... XAR	1968,9	657	3
	k. DB-Eintrag			XGX[FMox]...[KQ]R	974,6	488	2

**Fruchtkörper 40 h****Gel 113****MSMS-Ergebnisse**

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 1					1344,8	673,4	2
					1404,7	703,3	2
					1089,6	545,8	2
					1863,1	622,0	3
					2268,1	757,0	3
Spot 2					948,6	475,3	2
				XDAAGTXHXR	1356,8	453,3	3
				FTFVTSAPAK	1067,6	534,8	2
				AXEDVXAHYNWR	1485,8	496,3	3
					1105,6	553,8	2
					1193,6	597,8	2
						614,3	1
					1362,6	682,3	2
					1508,7	755,4	2
					1569,7	785,8	2
Spot 3					1089,6	545,8	2
					1863,0	622,0	3
				VSFXSTGAK	908,5	455,3	2
				TSSXXXMR	919,6	460,8	2
				TSSXXXMoxR	935,6	468,8	2
				...PEAGXAAR	953,5	477,8	2
					955,8	478,9	2
					1080,6	541,3	2
					1635,8	546,3	3
					1028,5	515,3	2
					2204,9	736,0	3
					1255,7	419,6	3
					837,4	419,7	2
				838,4	420,2	2	
				1299,7	434,2	3	
Spot 4				VSFXSTGAK	908,6	455,3	2
				XSYDVSGXK	980,5	491,3	2
					1433,8	478,9	3
				VQVX...XR	1080,7	541,4	2
					1238,7	620,3	2
					1713,0	572,0	3
					1380,8	691,4	2
					1433,8	717,9	2
					1713,0	857,5	2
					919,6	460,8	2
Spot 5					953,6	477,8	2
					1147,7	574,8	2
					2160,1	541,0	4
				...QFTDTVTK	1126,6	564,3	2
					2122,1	708,4	2
					1593,8	797,9	2
					1939,9	647,6	3
					2144,0	537,0	4
				..TPAE...	1019,5	510,8	2
				1012,6	507,3	2	
				983,5	492,7	2	
				988,5	495,3	2	

Probe	Protein	MW	IP	Sequenz	Peptid- masse	m/z	Ladung
Spot 7				...XYOXAK	804,4	403,2	2
				...DXTDDNVDR	1385,4	462,8	3
				...ADEVD...	1129,4	565,7	2
				...QETXFXVK		571,2	1
				...DXTDDNVDR	1158,4	580,2	2
				...WNXR	906,3	454,2	2
				...XNVS...		492,8	1
Spot 8				...XGGYAWTXR	1264,4	633,3	2
				...DPVTVDXXTR	1656,6	553,2	3
				...PVTVDX...	1694,5	565,9	3
				...XEXXNF...	1517,6	759,9	2
Spot 9				...TSY...K	995,4	498,3	2
				...DA...	1045,4	523,8	2
				FDADV...K	1061,4	531,8	2
				...AETP...	1148,4	575,2	2
				...DADVVGXVK	1159,4	530,7	2
				...VEDGPXX...R	1313,5	657,8	2
Spot 10				...ETAVWXDGK		566,8	
				...GXPSAEXDVR	1183,4	592,8	2
				...QFDXQ...	1365,5	683,8	2
				:::XDGDNAVAV...	1445,6	773,9	2
Spot 11				...XVRK...		405,1	
				...DDTXNFSK	1009,4	505,9	2
				...XFXRDNK	1019,4	510,9	2
				...SSPAVMH...	1141,4	521,9	2
				...DVNRNEK	1131,5	567,1	2
				...PWXNT...		599,2	

## 7.2 Abkürzungen

$\alpha$	Anti- (bei Benennung von Antiseren)
A	Ampere
AA	Acrylamid
AMC	7-Amino-4-Methyl-Coumarin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
Cm	Chloramphenicol
D	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigungskonstante (= 9,8 m/s <sup>2</sup> )
h	Stunde
H <sub>2</sub> O dest.	destilliertes Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kpb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
$\mu$	Mikro (= 10 <sup>-3</sup> )
m	Milli
min	Minute

---

MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrum
MS/MS	Massenspektrum der zweiten Ordnung
MW	Molekulargewicht
n	Nano (= $10^{-9}$ )
NBT	Nitro-Blautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
p	Piko (= $10^{-12}$ )
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
pmol	Pikomol (= $10^{-12}$ Mol)
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotation per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDZ	Sucroседichtegradienten-Zentrifugation
s	Sekunde
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit (Enzymeinheit)
üN	über Nacht
üNK	über-Nacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen-/Volumenverhältnis
W	Watt
w/v	Gewichts-/Volumenverhältnis

---

## 7.3 Publikationen

### Publikationen und Präsentationen

#### Publikationen

Pyrowolakis, G., Hofmann, D. and Herrmann, R. (1998). The subunit b of the F0F1-type ATPase of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* is a lipoprotein. J Biol Chem 273, 24792-6.

#### Vorträge

Hofmann, D. and Schairer, H. U. (2000)  
Developmental Proteolysis – 2D-analysis of protein patterns of *S. aurantiaca* cells from different stages of development.  
27th International Conference on the Biology of the Myxobacteria, Winter Park, Colorado, USA, 3. – 6. August.

Hofmann, D. and Schairer, H. U. (2001)  
Proteases of *Stigmatella aurantiaca*  
28th International Conference on the Biology of the Myxobacteria, Warwick, England; 18. – 22. Juli.

Hofmann, D. and Schairer, H. U. (2002)  
Proteases of *Stigmatella aurantiaca* revisited.  
29th International Conference on the Biology of the Myxobacteria, Quebec, Kanada, 7. – 10. Juli.

---

PräsentationenPoster

Müller S., Hofmann, D., Silakowski, B. and Schairer, H. U. (2000) Transcriptional analysis of genes involved in the fruiting body formation of *Stigmatella aurantiaca* and 2D-Analysis of different developmental stages.

Jahrestagung der VAAM, München.

Hofmann, D., Milosevic, A. and Schairer, H. U. (2001)

Analysis of the C-factor, a cell signaling protein and putative proteases, responsible for different developmental stages of *Stigmatella aurantiaca*.

Jahrestagung der VAAM, Oldenburg.

Hofmann, D. Ruppert, T., Bosserhoff, A. and Schairer, H. U. (2001)

Proteases of *Stigmatella aurantiaca*

Internationales Proteom Forum, München.

Hofmann, D. and Schairer, H. U. (2002)

Proteases of *Stigmatella aurantiaca*

1. International Symposium of the DFG Priority Program 1132

Proteolysis in Prokaryotes: Protein Quality Control and Regulatory Principles

25. – 27. Oktober, Schwetzingen.

Hofmann, D. and Schairer, H. U. (2003)

Proteases of *Stigmatella aurantiaca*

Jahrestagung der VAAM, Berlin.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Hans Ulrich Schairer für die Bereitstellung des Themas, seine Betreuung und die Möglichkeit mich weiterzubilden.

Herrn Professor Dr. Thomas Rausch danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Thomas Ruppert, Armin Bosserhoff und Margrit Ellis danke ich für die massenspektrometrischen Analysen.

Bei Professor Dr. Hanswalter Zentgraf, DKFZ Heidelberg, bedanke ich mich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Desweiteren möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen des ZMBH - insbesondere des 3. OG - für ihre Unterstützung bedanken.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mich immer unterstützt und meine Ausbildung gefördert haben.