

ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien an moderaten, halophilen Bakterien initiiert. Diese Arbeiten haben sich meist auf ökologische, physiologische und taxonomische Studien und ihre phylogenetische Relationen beschränkt. Für die Klärung der Fragen zum Überleben und zum Wachstum solcher Mikroorganismen unter hohen Stressbedingungen, besonders bei erhöhten Temperaturen und unter hypersalinen Konditionen, sind solche Untersuchungen essentiell. Ein Verständnis der einzigartigen Toleranzmechanismen der moderaten Halophilen würde neue Ansätze für wissenschaftliche Studien und zur Anwendung auf die Biotechnologie eröffnen. Mit Hilfe von Proteomics-Studien können wertvolle neue Informationen über die Proteinexpression unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen erhalten werden, selbst wenn das Genom dieser Stämme noch nicht oder nicht vollständig zur Verfügung steht. Daher sind Proteom-analytische Untersuchungen an moderat halophilen Bakterien sinnvoll, um wichtige physiologische Daten zu erhalten.

Diese Arbeit wurde initiiert durch Isolierung von 11 unbekanntem, bakteriellen Proben von der Calmati Salz-Area nahe Izmir. Das Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Protokolle für die Isolierung und für direkte Proteomics-Studien zu erarbeiten, um über Typ und Physiologie dieser Bakterienstämme Auskünfte zu gewinnen, auch im Vergleich zu möglichen bekannten Bakterien. Auf der Basis von vorläufigen biochemischen Studien wurde das moderate, halophile Bakterium DSMZ 5928 als Modellorganismus im Vergleich zu einem der Proben, dem Isolat Nr.6 für diese Proteomics-Studien ausgewählt. Es sollten Unterschiede in den Expressionsraten der Proteine und homologe Proteine identifiziert werden. Dazu wurden die Gesamtproteingemische durch hochauflösende 2DE-Gelelektrophorese getrennt und interessante Proteine mittels verschiedener massenspektrometrischen Techniken und durch N-terminale Edman-Sequenzierung analysiert. Dieser Proteom-analytische Ansatz erwies sich als effektiv für vergleichende Studien dieser moderaten halophilen Bakterien.

Für die massenspektrometrische Identifizierung der selektierten Proteine wurden deren tryptische Peptidgemische verschiedenen MS-Techniken unterworfen, wie

Elektrospray- Tandem-Quadrupole-TOF-MS/MS (ESI-QqTOF(time-of-flight)-MS/MS), MALDI-Quadrupole-TOF-MS (MALDI-QqTOF MS) und Tandem-TOF-MS (MALDI TOF/TOF MS). ESI-QqTOF MS/MS der tryptischen Peptide von ausgewählten Protein-Spots gaben zufriedenstellende Ergebnisse, um diese Proteine eindeutig zu identifizieren oder homologen Proteinen aus Datenbanken zuzuordnen. Zusätzlich wurden N-terminale Sequenzanalysen durchgeführt, kombiniert mit "BLAST" Vergleichen, die zum Teil sehr gute Ergebnisse lieferten. Wie natürlich erwartet werden konnte, ergaben Proteine, die noch nicht in den vorhandenen Datenbanken vorkommen oder von denen keine Homologe mit den Suchmaschinen gefunden werden konnten, keine Identifizierungsmöglichkeiten, selbst wenn ausgezeichnete MS-Spektren erhalten wurden.

Die Annotation der identifizierten Proteine wurde durch Bioinformatics-Suchmaschinen in den Datenbanken erleichtert, wie z.B. dem ExPASy Proteomics Server, der NCBI website, der KEGG Datenbank (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) mit Suchmaschinen für Taxonomie, Zellzyklen, Stoffwechseldiagrammen, wie mit BRITE, BIOCyc und METACyc, und durch viele Links zu verschiedenen Themen der biochemischen Forschung. Zusätzlich zu intensiven Literaturrecherchen erlaubte die Anwendung der Bioinformatics Suchmaschinen den Vergleich der experimentell gefundenen Ergebnisse mit theoretischen Daten und hat die Anbindung an andere Fachgebiete wie Toxikologie, Phylogenie, Physiologie, Pharmakologie und zu industriellen Anwendungen ermöglicht.

Wie die vorliegende Studie zeigte, helfen Proteomics-Studien bei neu isolierten Organismen auf verschiedene Weise effektive Ergebnisse zu erzielen, selbst wenn ihre Genomdaten noch nicht bekannt oder unvollständig sind. Obwohl die Genomanalyse als Basisinformation im Prinzip unverzichtbar ist, können Unterschiede bei den neu isolierten Mikroorganismen durch vergleichende Expressionsstudien unter verschiedenen Kulturbedingungen mittels hochauflösender 2DE-Gelelektrophorese in Kombination mit Massenspektrometrie, bzw. durch N-terminale Sequenzierung sinnvoll untersucht werden. Wie gezeigt wurde, kann die direkte Proteom-Analyse durchaus viele Fragen in Verbindung mit den nötigen Bioinformatik-Maschinen angehen.

Insgesamt wurden 15 Proteine von *Halomonas salina* mit massenspektrometrischen Mitteln identifiziert, 2 von ihnen sind Aconitathydrase und hypothetisches Protein ECA3428, aus zwei der studierten Gele. 7 der identifizierten Proteine sind wichtige Enzyme, z.B. involviert in Energiemetabolismus, TCA Zyklus, Nukleotid- und Aminosäure-Stoffwechsel; 2 Proteine sind am Transport beteiligt, 2 sind

hypothetische Proteine; die anderen sind bei der Translation, bei DNA Replikation, Respiration und beim Metabolismus der Co-Faktoren, bzw. Vitamin-Stoffwechsel beteiligt.

Die Proteine, ihr Code, ihre Identifikationsmethode und ihre wahrscheinliche Funktion sind in der Tabelle 5.3 and 6.3 verzeichnet.

Vom Isolat Nr.6 konnten 16 Proteine mittels Massenspektrometrie und Edman-Sequenzierung identifiziert werden. 11 der identifizierten Proteine sind ebenfalls wichtige Enzyme, involviert in Energie-Stoffwechsel, TCA-Zyklus, Aminosäure- und Fettsäure-Metabolismus, Glykolyse, Ectoin- und Osmoprotektant-Synthese und Zellsignaling. Andere identifizierte Proteine spielen eine Rolle bei Diffusion, Strukturfestigkeit, Transport, Proteinbiosynthese oder sind Defensive gegen Stress. Diese Proteine, ihr Code, ihre Identifizierung, identifizierte Homologe und ihre wahrscheinliche Funktion sind in Tabelle 5.4 und 6.2 zusammengefasst.