

***Expression Profiling* und
rationale Expressionsoptimierung
am Beispiel eines prokaryontischen
Wirt-/Vektor-Systems**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von

Heike Schmidt

geb. am 27.02.1978 in Bad Hersfeld

Mainz, Juni 2008

Für die Liebe im Allgemeinen.

Für Felix im Besonderen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	i
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	iii
1 Einleitung	1
1.1 <i>Expression Profiling</i> : Globale Stoffwechselanalyse	1
1.2 Expressionsoptimierung	6
1.3 Zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese	10
1.4 Datenqualität in Proteomanalysen.....	14
1.5 Das Modellsystem: rekombinante Glukose-Dehydrogenase	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Chemikalien und Medienbestandteile.....	19
2.2 Puffer, Lösungen und Kulturmedien	19
2.3 Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide	23
2.4 Kultivierung von Bakterien.....	25
2.5 Proteinchemische Methoden.....	26
2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	26
2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.5.3 Western Blot	27
2.5.4 ELISA.....	27
2.5.5 Bestimmung der Enzymaktivität	29
2.5.6 2-D Gelelektrophorese	30
2.5.7 Massenspektrometrische Analyse.....	32
2.6 Molekularbiologische Methoden	32
2.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
2.6.2 Sequenzierung von DNA.....	33
2.6.3 DNA-Gelelektrophorese	33
2.6.4 Isolierung von DNA.....	33
2.6.5 DNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.6.6 Durchführung von DNA-Modifikationen	34
2.6.7 Herstellung von Kalibrations- und Expressionsvektoren	35
2.6.7.1 Konstruktion von pQE80L-Var-dxs	35
2.6.7.2 Konstruktion von pQE80L-pUC-Var.....	35
2.6.7.3 Konstruktion von pQE80L-p15A-Var.....	36
2.6.7.4 Konstruktion von pBAD-p15A-oppA.....	36
2.6.8 Transformation von Bakterien	37
2.6.9 Plasmidkopienzahlbestimmung	37

3	Ergebnisse	39
3.1	Das Modellsystem	39
3.1.1	Prokaryontisches Wirt-/Vektor-Expressionssystem	39
3.1.2	Charakterisierung des Wuchsverhaltens	39
3.1.3	Untersuchung des Expressionsverhaltens	40
3.1.4	Probenauswahl für die Proteomanalyse	41
3.2	Expression Profiling	44
3.2.1	2-D Gelelektrophorese	44
3.2.2	Statistische Aspekte	48
3.2.2.1	Fehlerquellen bei der Datenauswertung	49
3.2.2.2	Statistische Versuchsreihe	50
3.2.2.3	Präferenzreaktionen bei der Proteinmarkierung	53
3.2.2.4	Versuchsdesign	54
3.3	Expressionsanalyse	55
3.3.1	Durchführung der Expressionsanalyse	55
3.3.2	Auswertung der Expressionsanalyse	56
3.3.2.1	Hauptkomponentenanalyse	56
3.3.2.2	Bildanalyse	58
3.3.2.3	Massenspektrometrische Analyse	59
3.3.2.4	Stoffwechsellanalyse	59
3.4	Expressionsoptimierung	69
3.4.1	Einfluss der Plasmidkopienzahl	69
3.4.1.1	Nachweis unterschiedlicher Plasmidkopienzahlen	69
3.4.1.2	Erhöhung der Plasmidkopienzahl	71
3.4.2	Löslichkeitsverbesserung	75
3.4.2.1	Reduktion der Plasmidkopienzahl	75
3.4.2.2	Coexpression eines Löslichkeitsvermittlers	77
3.4.2.3	Renaturierung	80
4	Diskussion	85
5	Zusammenfassung	109
6	Literatur	110
7	Anhang	I

Abkürzungen

2-DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat]
ACP	Acyl-Carrier-Protein
Amp ^R	Ampicillin (Resistenz)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BVA	<i>biological variation analysis</i>
CA	<i>carrier ampholytes</i>
cAMP	zyklisches 2', 3'-Adenosinmonophosphat
CE	Kapillar-Elektrophorese
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propan-sulfonat
Cm ^R	Chloramphenicol (Resistenz)
CoA	Coenzym A
CP	<i>Threshold cycle</i> in der QPCR
Da	Dalton
DDS	Diamino-dioxaoctan-disuccinimidylsuberat
DH	Dehydrogenase
Dig	Digoxigenin
DIA	<i>difference in-gel analysis</i>
DIGE	differenzielle Gelelektrophorese
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxy ribonucleic acid</i> (Deoxyribonukleinsäure)
dNTP	deoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Erlenmeyer-Kolben
ELISA	<i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
ESI	<i>electrospray ionization</i>
FTICR	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
FTIR	Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie
GC	Gas-Chromatographie
GSH	Glutathion-reduziert
GSSG	Glutathion-oxidiert (Glutathion-Disulfid)
h	Stunde (n), stündig
HPLC	<i>high performance liquid chromatographie</i>
IgG	Immunglobulin G
IMP	Inosin-5-Monophosphat
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
K	Kaninchen

Kan ^R	Kanamycin (Resistenz)
KAS	β-Ketoacyl-ACP-Synthase
LB	Luria-Bertani (-Medium)
Lsg.	Lösung
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
MES	4-Morpholin-ethan-sulfonsäure
min	Minute(n), minütig
mRNA	<i>messenger</i> RNA
M _r	relative Atommasse
MS	Massenspektrometrie
NL	nicht linear
NMR	Kern-Magnet-Resonanz-Spektroskopie
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
POD	Peroxidase
PRPP	5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PQQ	Pyrrolo-quinolin-quinon
QPCR	quantitative PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SA-MT	Streptavidin-markierte Mikrotiterplatten
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SELDI	<i>surface enhanced laser desorption ionization-time of flight</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGS	Tris-Glycin-SDS
THF	Tetrahydrofolat
TSS	<i>transformation and storage solution</i>
U	<i>unit(s)</i> , Enzymeinheit(en)
ÜK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
v	<i>volume</i> (Volumen)
Var	Expressionssystem der Enzymvariante
w	<i>weight</i> (Gewicht)
WT	Expressionssystem des Wildtyp-Enzyms
XOSu	X(ε-Aminocaprinsäure)-O-Succinimid

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1:** Übersicht der ,omics'-Technologien und deren Beitrag zur globalen Betrachtung zellphysiologischer Zusammenhänge.
- Abb. 2:** Einfluss der ,omics'-Technologien auf die Expressionsoptimierung.
- Abb. 3:** Übersicht der CyTM-Farbstoff-Proteinmarkierung.
- Abb. 4:** Einfluss des internen Standards auf die Interpretation von Proteomdaten.
- Abb. 5:** Schema der 2-D Gel-Auswertung mit der DeCyderTM Software.
- Abb. 6:** Reaktionsschema der Blutzucker-Umwandlung.
- Abb. 7:** Testprinzip des Gluc-DH ELISA.
- Abb. 8:** Unterschiedliches Wuchsverhalten des Expressionsmodells.
- Abb. 9:** SDS-PAGE Analyse zur Gluc-DH Expression.
- Abb. 10:** Wuchsverhalten der Expressionssysteme ab dem Zeitpunkt der Induktion.
- Abb. 11:** Western Blot zur unterschiedlichen Expressionsleistung des Modellsystems.
- Abb. 12:** Einfluss des Probenauftrags auf die Qualität der 2-D Gele.
- Abb. 13:** Verlauf der Methodenoptimierung in der 2-D Gelelektrophorese.
- Abb. 14:** Abschätzung des β -Fehlers anhand der statistischen Vorversuche.
- Abb. 15:** Hauptkomponentenanalyse der Expressionsprofile von Hoch- und Niedrigproduzent.
- Abb. 16:** Expressionsprofil von OppA zu den Kultivierungszeitpunkten t_i .
- Abb. 17:** 2-D Gele mit den Proteinspots des LacI Repressors.
- Abb. 18:** Bestimmung der Plasmidkopienzahlen im Expressionsmodell.
- Abb. 19:** Effekte der Plasmidkopienzahl-Erhöhung auf das Wuchsverhalten.
- Abb. 20:** Analyse zur Expressionsoptimierung der Gluc-DH Enzymvariante.
- Abb. 21:** Nachweis der Plasmidkopienzahl-Erniedrigung im Var-p15A Expressionssystem.
- Abb. 22:** Effekte der Plasmidkopienzahl-Erniedrigung auf die Proteinexpression.
- Abb. 23:** Vektorsystem für die Coexpression von OppA.
- Abb. 24:** SDS-PAGE Analyse zur OppA-Expression.
- Abb. 25:** Renaturierung der Gluc-DH aus der unlöslichen Zellfraktion.
- Abb. 26:** Analyse der löslichen Fraktion vor und nach Denaturierung.
- Abb. 27:** Einfluss von PQQ auf die Renaturierung der Gluc-DH.

- Tab. 1:** Methoden für die *in vitro*-Markierung quantitativer Proteom-Analysen.
- Tab. 2:** Übersicht der unterschiedlichen Analysestrategien auf Metabolom-Ebene.
- Tab. 3:** Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.
- Tab. 4:** Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide.
- Tab. 5:** Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.
- Tab. 6:** Protokoll für die isoelektrische Fokussierung (IEF).
- Tab. 7:** Übersicht zur Durchführung der statistischen Versuchsreihe.
- Tab. 8:** Übersicht zur kombinatorischen Auswertung der statistischen Versuchsreihe.
- Tab. 9:** Finales Versuchsdesign für die Aufnahme von Expressionsprofilen zum Kultivierungszeitpunkt t_i .
- Tab. 10:** Globale Stoffwechselanalyse der Expressionsprofil-Daten.
- Tab. 11:** Übersicht der detektierten Proteine für die Nukleinsäure-Synthese im Bereich der Regeneration bestehenden Zellmaterials.
- Tab. 12:** Übersicht der in der Expressionsanalyse identifizierten Proteasen.
- Tab. 13:** Plasmidkopienzahlbestimmung mit dem Kalibratorplasmid.
- Tab. 14:** Einfluss von PQQ, Zeit und Enzymkonzentration auf die Renaturierung der Gluc-DH.
- Tab. 15:** Detektierte Proteine aus dem Bereich des *envelope stress*.

1 Einleitung

Die Entwicklung rekombinanter DNA-Technologien (Caskey, 1978) ermöglicht die gezielte Herstellung biotechnologischer Produkte. Indem geeignete Wirtsorganismen genetisch manipuliert werden, kann deren Stoffwechselaktivität für die Produktion homo- oder heterologer Proteine ausgenutzt werden (Bronson, 1978). Als erstes Produkt wurde die rekombinante Herstellung von humanem Insulin in *E. coli* beschrieben (Goeddel *et al.*, 1979). In den letzten 30 Jahren hat die Biotechnologie für die Herstellung pharmazeutischer und diagnostischer Produkte zunehmend an Bedeutung gewonnen. Bislang wurden 165 rekombinante Biopharmazeutika von der *Food and Drug Administration* (FDA) für den US-Markt zugelassen (Walsh, 2006). Viele weitere Produkte befinden sich in der präklinischen Entwicklungsphase, so dass deren Umsatz im Jahr 2010 voraussichtlich 70 Milliarden US \$ erreichen wird (Pavlou & Reichert, 2004; Pavlou & Belsey, 2005).

Einer der meist verwendeten Organismen für die Herstellung rekombinanter Proteine ist das Bakterium *Escherichia coli* (Gold, 1990; Baneyx, 1999; Swartz, 2001). Generell zählen die einfache genetische Manipulierbarkeit, das schnelle Zellwachstum und die hohen Produktausbeuten zu dessen Vorteilen (Graumann & Premstaller, 2006). Obwohl viel über die Genetik und Molekularbiologie von *E. coli* bekannt ist, wird nicht jedes Produkt effizient exprimiert. Dies kann unter anderem mit den strukturellen Eigenschaften der Gensequenz, der Stabilität und/oder Translations-Effizienz der mRNA, der Proteinfaltung und -degradation, der *codon usage* oder einer möglichen Produkt-Toxizität zusammen hängen (Jana & Deb, 2005). Um die Expression in *E. coli* zu verbessern, wurden bislang einzelne genetische oder physiologische Aspekte untersucht. Im Gegensatz dazu haben die Entwicklungen auf dem Gebiet der sog. ‚omics‘-Technologien die ganzheitliche Analyse mehrerer zellphysiologischer Ebenen ermöglicht (Joyce & Palsson, 2006).

1.1 *Expression Profiling: Globale Stoffwechselanalyse*

Mit Hilfe der sog. ‚omics‘-Technologien werden Organismen in einem globalen Stoffwechsel-Zusammenhang betrachtet. Die Analysen können auf verschiedenen Ebenen des Zellmetabolismus durchgeführt werden, die unter der Abkürzung ‚omics‘ zusammengefasst werden (Abb. 1).

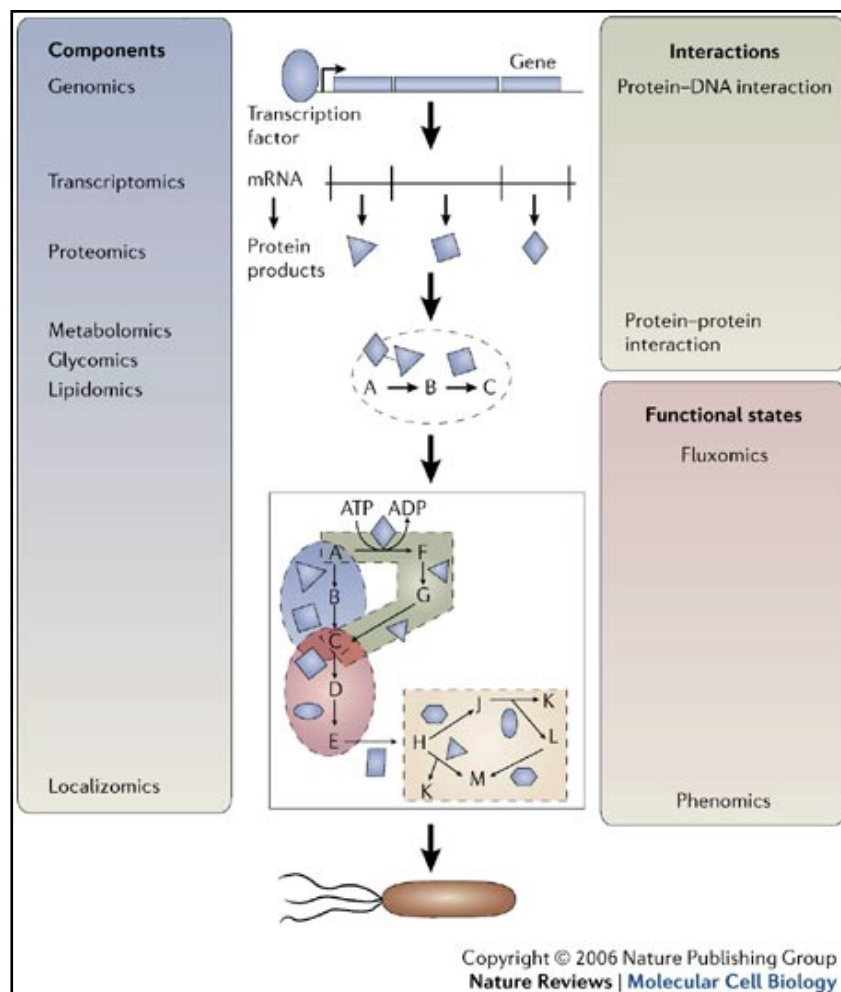


Abb. 1: Übersicht der ‚omics‘-Technologien und deren Beitrag zur globalen Betrachtung zellphysiologischer Zusammenhänge. Die Analysen können in die Bereiche Zell-Komponenten (*components*) sowie Interaktionen (*interactions*) und funktioneller Zustand der Komponenten (*functional states*) eingeteilt werden. Der Bereich Komponenten umfasst alle molekularen Bestandteile einer Zelle, die mit der DNA (Fachgebiet *Genomics*) beginnen. Diese wird in mRNA transkribiert (Fachgebiet *Transcriptomics*) und anschließend in Proteine translatiert (Fachgebiet *Proteomics*). Die Proteine sind an den Stoffwechselreaktionen und ihren Zwischenprodukten (Fachgebiet *Metabolomics*) sowie am Umsatz von Glykoproteinen, Oligosacchariden (Fachgebiet *Glycomics*) und Lipiden (Fachgebiet *Lipidomics*) beteiligt. Die Zelllokalisierung dieser Komponenten umfasst das Gebiet der *Localizomics*. Im Rahmen der Stoffwechselregulation interagieren einzelne Komponenten miteinander. Hier werden Protein-DNA- und Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht (Interaktionen). Weiterhin können alle Komponenten und Interaktionen im metabolen Netzwerk (Fachgebiet *Fluxomics*) und deren Auswirkungen auf den Phänotyp der Zelle (Fachgebiet *Phenomics*) untersucht werden (Abb. aus Joyce & Palsson, 2006).

Für die Analyse von Mikroorganismen, die für die biotechnologische Produktion verwendet werden, sind die Transkriptom-, Proteom- und Metabolom-Ebenen von besonderem Interesse. Die globale Stoffwechselanalyse (*expression profiling*) kann das grundlegende, biologische Verständnis zellphysiologischer Zusammenhänge erhöhen. Die Zellen können unter verschiedenen Umweltbedingungen wie beispielsweise der Veränderung des pH-Wertes oder

der Temperatur, oxidativem Stress, Hungerbedingungen oder in der Stationärphase untersucht werden. Durch den Vergleich der Stress-Antworten kann das gesamte metabolische Netzwerk der Zellen analysiert werden (Han & Lee, 2006). Für die Analyse der Transkriptom-, Proteom- und Metabolom-Ebenen steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung.

Transkriptom-Analyse

Bei der Transkriptom-Analyse werden die mRNA-Transkripte einer Zelle untersucht. Klassische Techniken wie die Northern Blot Analyse sind nicht genau quantifizierbar oder eignen sich wie die RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) nicht für die Hochdurchsatz-Analyse genomweiter DNA-Transkripte. Für komplexe Genexpressions-Analysen können ‚Tag‘- oder ‚Array‘-basierte Methoden verwendet werden. Die Durchführung von ‚Tag‘-Verfahren wurde mit der Entwicklung von SuperSAGE (*super serial analysis of gene expression*, Matsumura *et al.*, 2003) und der Pyrosequenzierung (Ronaghi *et al.*, 1996) beschleunigt. Der experimentelle Aufwand ist im Vergleich zu den ‚Array‘-Technologien jedoch größer. Bei der Herstellung von DNA-Microarrays werden für ein Gen charakteristische DNA-Sequenzmotive auf einem Microchip fixiert (Schena *et al.*, 1995). Je nach Länge der Nukleotide werden cDNA-Arrays, kurze Oligonukleotid-Arrays (25 - 30 nt) oder lange Oligonukleotid-Arrays (60 - 70 nt) unterschieden (Draghici *et al.*, 2006). Durch Inkubation mit der Probe werden DNA-Hybride gebildet, die mittels Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden (Schena *et al.*, 1995). Inzwischen sind kommerziell erhältliche DNA-Chips für viele Mikroorganismen erhältlich (z. B. Affymetrix Inc., Santa Clara/CA; NimbleGen Systems Inc., Madison/WI). Die Weiterentwicklungen in der Herstellung der Microarrays und der entsprechenden Auswerteprogramme hat wesentlich zur Verbesserung der mRNA-Analytik beigetragen (Barrett & Kawasaki, 2003; Draghici *et al.*, 2006).

Proteom-Analyse

Für die Proteom-Analyse steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Grundsätzlich können hierbei gelbasierende und nicht-gelbasierende Methoden unterschieden werden (Han & Lee, 2006). Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) ist die für *Proteomics*-Studien am meisten genutzte, gelbasierende Technologie. Die Proteine werden hierbei in zwei Dimensionen entsprechend ihres isoelektrischen Punkts (pI) und ihres Molekulargewichts (M_r) innerhalb einer Gel-Matrix getrennt (1.3). Die Verwendung eines internen Standards hat die Qualität der 2-DE-Technologie verbessert. Hierbei werden mehrere Proben auf einem Gel analysiert, indem die Proteine vor der Trennung mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert werden.

Für die Analyse können die DIGE- (*difference gel electrophoresis*, Ünlü *et al.*, 1997) oder die ALIS-Technologie (*Alexa-labeled internal standard*, Wheelock *et al.*, 2006) verwendet werden. Die Identifizierung der Proteine erfolgt mittels Massenspektrometrie (MS).

Bei nicht-gelbasierenden Methoden kann die Quantifizierung der Expressionsunterschiede entweder durch den Vergleich von Signalintensitäten reiner massenspektrometrischer Analysen oder mit Hilfe von Isotopen-markierten Proben erfolgen (Yan & Chen, 2005). Generell ist die Analyse komplexer Proteingemische mit nicht-gelbasierenden Methoden problematisch. Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht sind aus einem Gemisch schlecht aufzulösen und die Spektren nicht gut reproduzierbar. Um die Komplexität der Proben zu reduzieren, werden die Proben fraktioniert. Dies wird durch die Kombination mehrerer Methoden gewährleistet. Hierfür werden die MALDI-TOF-, SELDI-TOF-, ESI- und FTICR-MS verwendet. Der massenspektrometrischen Separation können *n*-dimensionale Flüssigkeitschromatographie-Säulen (*n*LC) vorgelagert werden. Hierzu zählen beispielsweise die AIX LC-HIC LC (*anion exchange column LC-hydrophobic interaction resin LC*), die SCX-RPLC (*strong cation exchange-reversed phase LC*) oder die SEC-RPLC (*size exclusion LC-RPLC*). Bei Verwendung der ESI- oder FTICR-MS wird häufig die Kapillar-IEF (cIEF, *capillary IEF*) eingesetzt (Han & Lee, 2006). Die Kombination mehrerer nicht-gelbasierender Analysen wurde zudem in Technologien wie der COFRADIC- (*combined fractional diagonal chromatography*; Gevaert *et al.*, 2002), der MudPIT- (*multidimensional protein identification technology*; McDonald & Yates, 2002) oder der GIST-Methode (*global internal standard technology*, Chakraborty & Regnier, 2002) beschrieben.

Bei Analysen, die auf der Verwendung von stabilen Isotopen basieren, können die Proben entweder *in vivo* oder *in vitro* markiert werden. Bei der *in vivo*-Markierung werden die Isotope dem Nährmedium während der Kultivierung z. B. in Form von ^{15}N oder markierten Aminosäuren wie ^2H -Leucin oder ^{13}C -Lysin (SILAC-Technologie, *stable isotope labelling with amino acids in cell culture*; Ong *et al.*, 2002; Everley *et al.*, 2004) zugefügt. Diese werden von der Zelle metabolisch verwertet, so dass in der Analyse schwere und leichte Peptide miteinander verglichen werden können. Bei der *in vitro*-Markierung werden die Peptide mit geeigneten Reagenzien amino-/N-terminal, carboxyl-/C-terminal oder an spezifischen Aminosäuren (Cysteine, Lysine etc.) chemisch markiert (Yan & Chen, 2005). Tab. 1 stellt einige dieser Methoden gegenüber.

Tab. 1: Methoden für die *in vitro*-Markierung quantitativer Proteom-Analysen.

Peptid-Markierung	Technologie	Referenz
N-terminal	iTRAQ™: <i>isobaric tags for relative and absolute quantitation</i> ; Kopplungsreagenz mit isotoper Reporter-Gruppe, reaktiver NHS-Gruppe und einer Gruppe für den Massenausgleich, die isobare Tags bei der Verwendung unterschiedlicher Isotope gewährleistet.	Ross <i>et al.</i> , 2004
	NIT: <i>N-terminal isotope-encoded tagging</i> ; Acylierung des N-Terminus nach der Umwandlung von Lysin in Homoarginin; keine Ladungsverschiebung, keine unerwünschte Acylierung der ε-Aminogruppe von L-Lysinen	Zhang <i>et al.</i> , 2002
C-terminal	Proteolyse mit Trypsin und markiertem Wasser, Einbau von Sauerstoff-Isotopen (¹⁶ O/ ¹⁸ O)	Mirgorodskaya <i>et al.</i> , 2000; Wang <i>et al.</i> , 2001; Stewart <i>et al.</i> , 2001; Yao <i>et al.</i> , 2001
	Veresterung der Carboxylgruppe mit Hilfe von isotopenmarkiertem Methanol	Goodlett <i>et al.</i> , 2001
Aminosäure-spezifisch	ICAT™: <i>isotope-coded affinity tags</i> ; Kopplungsreagenz mit Biotin-Tag, Isotopen-Linker und reaktiver Iodacetamid-Gruppe, die an den Thiol-Rest der proteinogenen Cysteine koppelt, Reinigung mittels Avidin-Affinitäts-Chromatographie	Gygi <i>et al.</i> , 1999; Zhang & Regnier, 2002; Zhou <i>et al.</i> , 2002
	MCAT: <i>mass-coded abundance tagging</i> ; Markierung der ε-Aminogruppe der L-Lysine durch Guanidin	Cagney & Emili, 2002
	Modifikation von Tryptophan-Resten durch (¹² C/ ¹³ C) 2-Nitrobenzoesulphenylchlorid, Reinigung mittels Sephadex-Chromatographie	Kuyama <i>et al.</i> , 2003
	Anreicherung von Phosphotyrosin-haltigen Peptiden mittels Antikörperbasierten-Antiphosphotyrosin-Reinigung	Ibarrola <i>et al.</i> , 2004

Metabolom-Analyse

Die Analyse der Metabolite umfasst im Vergleich zu den Genen bzw. Proteinen der Zelle eine geringere Anzahl Parameter. Die chemische Variabilität der Proben ist jedoch wesentlich höher. Die Analysemethoden müssen sich beispielsweise für den Nachweis von kleinen, polaren Molekülen wie Ethanol, für hochmolekulare, polare Glykoside oder unpolare Lipide als auch für große Konzentrationsunterschiede (pM - mM) eignen (Dunn *et al.*, 2005). Die Metabolom-Analysen können in die Bereiche *metabolomics*, *metabonomics*, *metabolite target analysis*, *metabolite/metabolic profiling*, *metabolic fingerprinting* und *metabolic footprinting* unterteilt werden (Tab. 2).

Tab. 2: Übersicht der unterschiedlichen Analysestrategien auf Metabolom-Ebene (Dunn *et al.*, 2005).

Strategie	Erläuterung
Metabolomics	Identifizierung und Quantifizierung aller Metabolite eines biologischen Systems.
Metabonomics	Quantifizierung metaboler Zellantworten auf pathophysiologische Reize oder genetische Modifikationen.
Metabolite/metabolic profiling	Analyse zur Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten ähnlicher chemischer Eigenschaften oder ähnlicher Stoffwechselwege. Verwendung chromatographischer Trenntechniken vor der Detektion, geringere Probenmengen erforderlich.
Metabolite target analysis	Quantitative Bestimmung einer oder weniger Metabolite eines bestimmten Stoffwechselweges nach gezielter Probenvorbereitung.
Metabolic fingerprinting	Schnelle Hochdurchsatz-Methode zum Screening grober Zellextrakte, keine Identifizierung und Quantifizierung.
Metabolic footprinting	Globale Hochdurchsatz-Analyse von Metaboliten, die aus der Zelle in das Kulturmedium sekretiert wurden.

Die Technologien zur Metabolit-Analyse sind entsprechend vielfältig. Die Vergleiche können ebenso wie bei der Proteomanalyse auf den Signalstärken spektrometrischer (z. B. GC-MS, HPLC-MS, CE-MS, NMR) oder spektroskopischer Analysen (FTIR, Raman-Spektroskopie) basieren (Dunn *et al.*, 2005; Hollywood *et al.*, 2006). Ebenso wie bei der Proteom-Analyse können die Proben mit stabilen Isotopen markiert werden. Diese werden zumeist *in vivo* mit ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O oder ^2H durchgeführt. Durch den Vergleich markierter und nicht markierter Proben können verschiedene Stoffwechselreaktionen untersucht werden (Birkemeyer *et al.*, 2005). Die metabolische Flux-Analyse (*metabolic flux analysis*, MFA) ermöglicht anschließend die computergestützte Berechnung der Energieflüsse innerhalb der Zelle (Wiechert, 2001).

1.2 Expressionsoptimierung

Die *omics*-Technologien haben erstmals auf dem Gebiet der *Genomics* einen Beitrag zur Expressionsoptimierung geleistet. Zuvor wurden zufallsbasierte, ungerichtete Mutagenese-Ansätze (z. B. durch UV-Licht, Nitrosoguanidin, 5-Bromuracil, etc.) in Kombination mit geeigneten *screening*-Prozessen für die Verbesserung von Produktionsstämmen eingesetzt (Parekh *et al.*, 2000). Die DNA-Sequenzdaten ermöglichen die Verwendung genomisch definierter Wirtsstämmen. Die Organismen werden anhand von Genen manipuliert, welche die rekombinante Expression fördern bzw. stören (*genome breeding*) oder indem nicht essentielle Gene deletiert werden, um zusätzliche metabolische Lasten des Organismus zu vermeiden

(*genome engineering*; Hermann, 2004). Diese Entwicklungen prägten den Begriff *metabolic engineering*. Per Definition wird hierunter die Verbesserung von Mikroorganismen zur Herstellung biologischer Produkte verstanden, indem spezifische Gene mittels rekombinanter DNA-Technologie deletiert, inseriert, amplifiziert oder mutagenisiert werden (Lee & Papoutsakis, 1999).

In den letzten Jahren wurden für die Optimierung von Wirt-/Vektor-Systemen viele empirische Richtlinien erarbeitet, die einzelne zellphysiologische Aspekte berücksichtigen (Makrides, 1996). Hierzu zählen neben der Auswahl des Wirtsstammes das Design des Expressionsvektors, die *gene dosage*, die Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene (z. B. die Verwendung bestimmter Promotoren oder Terminatoren), die Regulation auf Translationsebene (z. B. die Berücksichtigung der mRNA-Stabilität oder bestimmter Terminationsfaktoren), die *codon usage* sowie die Kultivierungs- und Fermentationsbedingungen (Jana & Deb, 2005). Die Methoden zur Messung von Kultivierungsparametern wie beispielsweise Temperatur, pO₂, pH-Wert, Osmolalität oder die Analyse einzelner Stoffwechselprodukte wie Lactat, Acetat oder CO₂ sind vielfältig (Schmidt, 2005). Alle Optimierungsansätze repräsentieren Teilaspekte aus den Umweltveränderungen, die während der Kultivierung auftreten. Die Analysen ermöglichen jedoch keinen vollständigen Einblick in den Zell-Stoffwechsel, so dass das Verständnis von metabolischen Veränderungen während der rekombinanten Proteinexpression eingeschränkt ist (Gupta & Lee, 2007). Die Verbesserung der Expressionssysteme basiert somit auf Erfahrungswerten und muss im *trial-and-error*-Versuch durchgeführt werden.

Die Entwicklungen auf dem Gebiet der Transkriptom-, Proteom- und Metabolom-Analysen ermöglichen die gesamtphysiologische Betrachtung der Zelle (*expression profiling*). Die *omics*-Technologien (1.1) können einen Beitrag in der Prozessentwicklung rekombinanter Produkte leisten, indem bekannte Stressantworten während der Proteinexpression identifiziert werden (Gupta & Lee, 2007; Chou, 2007). Für die biotechnologische Anwendung können somit unterschiedliche Wirtsstämme miteinander verglichen, ein Expressionssystem unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen oder induzierte und nicht induzierte Kultivierungsverläufe analysiert werden. Die Optimierungsstrategien können daher von einer lokalen Betrachtung einzelner Stoffwechselwege auf eine ganzheitliche Zellanalyse ausgerichtet werden (Park *et al.*, 2005; Abb. 2).

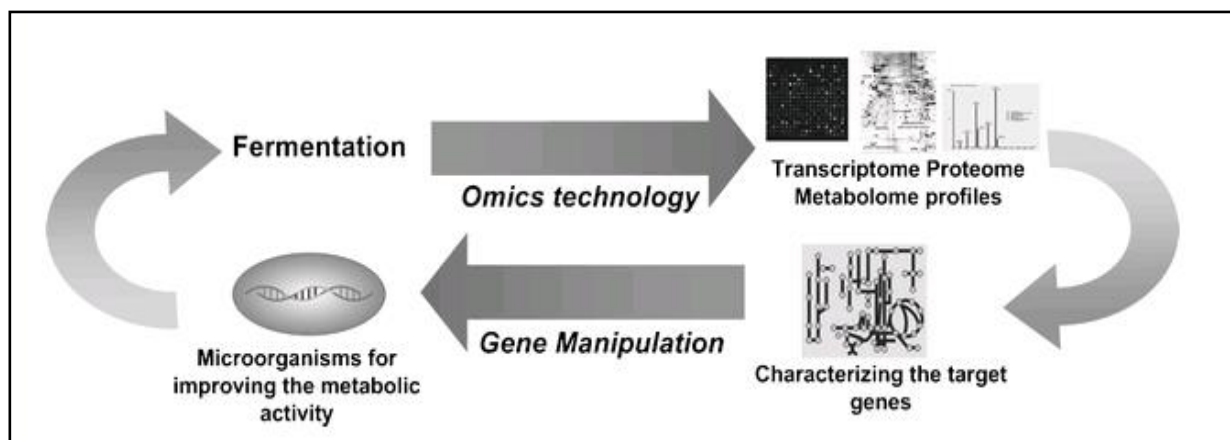


Abb. 2: Einfluss der ,omics'-Technologien auf die Expressionsoptimierung.

Die Anwendung der Transkriptom-, Proteom- und Metabolom-Methoden ermöglicht die globale, zellphysiologische Analyse rekombinanter Mikroorganismen. Durch den Vergleich unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen oder Stoffwechselmodifikationen können Gene identifiziert werden, die sich für die zielgerichtete Expressionsoptimierung eignen. Die Expressionssysteme können daraufhin genetisch modifiziert und für den Produktionsprozess optimiert werden (Abb. aus Park *et al.*, 2005).

Auf Basis der ,omics'-Daten werden computergestützte Modelle biologischer Systeme erstellt. Die Modellierung der Transkriptom-, Proteom- und Metabolom-Strukturen und des Reaktionsverhaltens ihrer Komponenten ist Grundlage der System-Biologie. Hierunter wird die gesamtphysiologische, computergestützte Betrachtung komplexer, biologischer Systeme und deren fundamentaler Eigenschaften verstanden (Huang & Wikswo, 2006). Die Anwendung der ,omics'- und *in silico*-basierten Analyse auf rekombinante Mikroorganismen sowie der Einsatz der Daten für die Prozessentwicklung und -optimierung wird unter dem Begriff System-Biotechnologie (*systems biotechnology*, *systems level metabolic engineering*) zusammengefasst (Lee *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Die zukünftige Expressionsoptimierung wird demzufolge auf Basis experimenteller Daten und *in silico*-Analysen durchgeführt werden. Mit Hilfe der ,omics'-Technologien werden Stoffwechselreaktionen auf bestimmte Umweltveränderungen hin untersucht und die Zellreaktionen am Computer simuliert. Durch die iterative Anpassung von Modellbildung und experimentellem Design wird das Verständnis für zellphysiologische Vorgänge in Produktionsprozessen in Zukunft weiter erhöht (Lee *et al.*, 2005).

Für diese Entwicklungen ist neben der Verfügbarkeit bioinformatischer Werkzeuge der Informationsgewinn über zellphysiologische Vorgänge entscheidend. Bislang wurden mit Hilfe von ,omics'-Technologien überwiegend Produktionsprozesse mit den Expressionssystemen *Corynebacterium glutamicum* (z. B. Hermann *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2003), *Bacillus subtilis* (z. B. Hecker, 2003; Hecker & Volker, 2004; Jürgen *et al.*, 2005), *Clostridium acetobutylicum* (z. B. Tummala *et al.*, 2003) und *Escherichia coli* (z. B. Jürgen *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001; Yoon

et al., 2003; Lee *et al.*, 2003) untersucht. In den Studien konnten zelluläre Antwortsignale (Hitzeschock, Hungersignale, etc.) identifiziert werden und damit das Verständnis für unterschiedliche Produktionsleistungen erhöhen. Darüber hinaus können die Ergebnisse dazu genutzt werden, die Ausbeuten rekombinanter Proteine durch zielgerichtete genetische Veränderungen zu verbessern (Gupta & Lee, 2007).

Die erfolgreiche Expressionsoptimierung auf Basis des *expression profiling* ist in deutlich weniger Studien beschrieben. In *E. coli* zählen hierzu beispielsweise die Optimierung von IGF-I exprimierenden Zellen (Choi *et al.*, 2003), die Verbesserung der Expression Serin-reicher Proteine (Han *et al.*, 2003), die Fermentationsoptimierung für die Überproduktion von L-Threonin (Hermann & Rieping, 2003; Rieping *et al.*, 2003), der positive Einfluss der kleinen Hitzeschockproteine IbpA und IbpB (*small heat shock proteins*, sHsp, < 20 kDa) auf die Bildung von *inclusion bodies* (Han *et al.*, 2004), die Fermentationsoptimierung für die Herstellung eines Antikörper-Fragments (Aldor *et al.*, 2005) oder die Prozessentwicklung für die Expression von L-Valin (Park *et al.*, 2007).

Bei der Auswahl geeigneter *expression profiling*-Methoden müssen die technischen Voraussetzungen im Laborbetrieb und die Eigenschaften der Wirtsorganismen berücksichtigt werden. Die Analysen auf der Metabolom-Ebene sind sehr komplex. Neben dem experimentellen Aufwand ist die Auswertung der Daten vielschichtig und erfordert fundierte bioinformatische Kenntnisse. Die Methoden für die Transkriptom-Analyse wurden technisch verbessert. Werden sie als Basis für die Expressionsoptimierung verwendet, müssen bei *E. coli* die Halbwertszeit der mRNA (1 - 3 min) und die hohe Geschwindigkeit der Transkriptionskontrolle (< 0,5 min; Schweder & Hecker, 2004) berücksichtigt werden. Hierdurch können viele Informationen mit einem kleinen Signal-Rausch-Verhältnis generiert werden, so dass die Aussagen zu sehr vom Zeitpunkt der Probennahme und den äußeren Umgebungsbedingungen abhängen können. Die metabolischen Veränderungen auf Proteinebene stellen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der bakteriellen Genregulation dar. Die Proteomdaten unterliegen geringeren Schwankungen, so dass sie unter Berücksichtigung eines geeigneten Versuchsdesigns zu aussagekräftigeren Informationen führen können.

1.3 Zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese

In der 2-D Gelelektrophorese (2-DE) werden Proteine in zwei Schritten mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) und anschließender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) separiert (O'Farrell, 1975; Klose, 1975). Bei der konventionellen 2-DE werden die Proteine nach der Trennung mit geeigneten Methoden wie der Coomassie-, Silber- oder Fluoreszenzfärbung detektiert (Miller *et al.*, 2006).

Die Silberfärbetechnik besitzt im Vergleich zur Coomassie-Färbung eine höhere Sensitivität (Faktor 100), die Färbereaktion ist jedoch wesentlich schlechter reproduzierbar und eignet sich daher weniger für quantitative Analysen (Görg *et al.*, 2004). Bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen können die Proteine auf konventionelle Weise nach der Gelelektrophorese gefärbt (z. B. mit Sypro Ruby) oder vor der IEF mit Fluorophoren kovalent markiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden cyaninbasierende Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchführung der Vergleichsanalyse verwendet (Waggoner *et al.*, 1993). Diese Technologie wird als zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese (2-D DIGE) bezeichnet (Ünlü *et al.*, 1997). Die Fluoreszenz-Färbung ist gegenüber dem Coomassie-Farbstoff ca. um Faktor 100 sensitiver und im Vergleich zur Silberfärbung reproduzierbarer. Die untere Nachweisgrenze beträgt 125 pg Protein und die Signalstärke nimmt über einen Bereich von 10^5 linear zu. Der Cyanin-Farbstoff besitzt eine reaktive N-hydroxy-succinimid-Ester-Gruppe (NHS-Ester), die durch eine Amidbrücke an die ϵ -Aminogruppe der L-Lysin-Reste in den Proteinen bindet. Da die Farbstoffe in der Reaktion als limitierendes Agens eingesetzt werden (*minimal labelling*), bindet statistisch gesehen ein Farbstoffmolekül an ein Protein. Dabei erfolgen ein äquivalenter Ladungsaustausch und eine Masseverschiebung von 500 Da (Abb. 3).

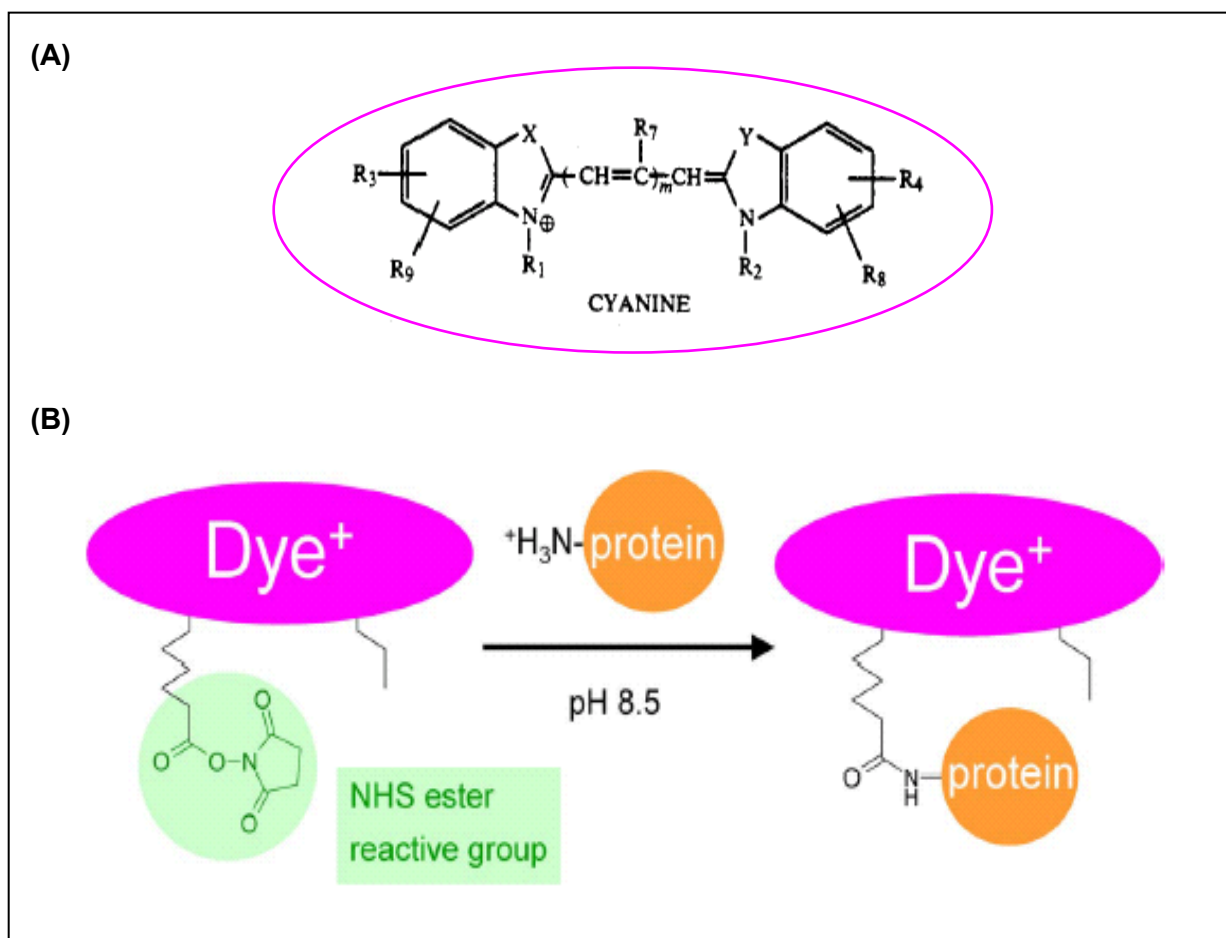


Abb. 3: Übersicht der CyTM-Farbstoff-Proteinmarkierung.

Die Fluoreszenzfarbstoffe weisen ein Cyanin-Grundgerüst mit einem heterocyclischen aromatischen Ringsystem auf. Es können drei unterschiedliche Farbstoffe verwendet werden (CyTM2, CyTM3 und CyTM5), die sich durch die Reste (R_i) voneinander unterscheiden (A). Die Farbstoffe binden mit einer reaktiven NHS-Gruppe an die ε-Aminogruppe der proteinogenen L-Lysine und werden als limitierender Faktor in der Reaktion eingesetzt (B). Da nur 1 - 2 % der Proteine markiert werden, reagieren diese statistisch gesehen mit je einem Farbstoffmolekül (*minimal labelling*, Abb. aus Waggoner *et al.*, 1993 (A) bzw. Ettan DIGE User Manual (B)).

Indem mehrere Fluoreszenzfarbstoffe (CyTM2, CyTM3 und CyTM5, GE Healthcare) verwendet werden, können Vergleichsproben unterschiedlich markiert werden (2.5.6). Aufgrund der individuellen Anregungs- und Emissionswellenlängen der Farbstoffe können bis zu drei Proben auf einem Gel analysiert werden (*multiplexing*). Einer der Fluoreszenzfarbstoffe kann als interner Standard verwendet werden. Dieser setzt sich zu gleichen Teilen aus allen Proben eines Experiments zusammen. Im Gegensatz zur konventionellen 2-DE können somit Gel-zu-Gel-Variationen von realen Proteinunterschieden unterschieden werden (Abb. 4).

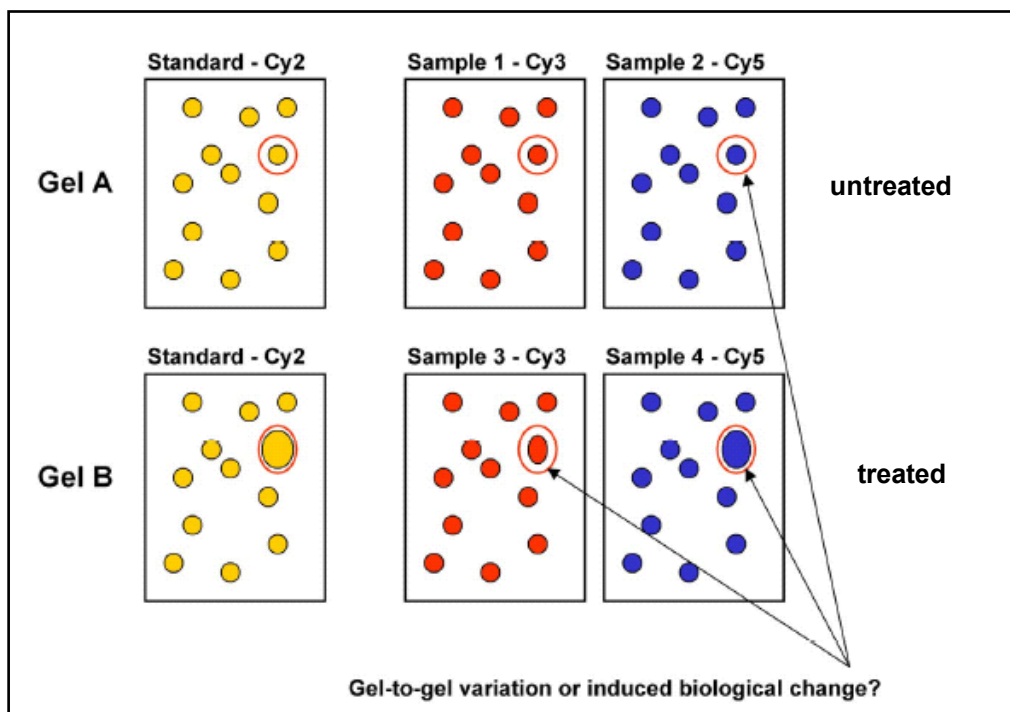


Abb. 4: Einfluss des internen Standards auf die Interpretation von Proteomdaten.

Bei der Datenauswertung ohne den internen Standard würde zwischen den unbehandelten Proben 1 und 2 kein Unterschied bestehen (Gel A). Nach der Behandlung scheint der hervorgehobene Proteinspot in beiden Proben höher exprimiert zu werden und der Effekt bei Probe 4 stärker als bei Probe 3 zu sein (Gel B). Unter Berücksichtigung des internen Standards, der sich zu gleichen Teilen aus allen untersuchten Proben zusammensetzt, können Gel-zu-Gel-Variationen detektiert werden. Die höhere Expression des markierten Proteinspots ist durch den Vergleich des internen Standards der Gele A und B auf eine technische Variation zurückzuführen. Demnach hat die Behandlung keinen Effekt auf Probe 4 und im Gegensatz zur Interpretation ohne internen Standard eine geringere Expression in Probe 3 zur Folge (Abb. aus Ettan DIGE User Manual).

Die Auswertung der 2-D Gele wird mit der DeCyder™ Software (GE Healthcare) durchgeführt, die eine automatische Spotdetektion, die Berechnung von Hintergrundsignalen sowie die Quantifizierung und Normalisierung der Proteinspots gewährleistet. Die Expressionsunterschiede werden im Verhältnis von Probe zu internem Standard berechnet. In einer ersten Analyse werden die Proteinspots eines Gels analysiert, indem die Cy™2-, Cy™3- und Cy™5-Gelbilder ausgewertet werden (*differential in-gel analysis*, DIA). In einem zweiten Schritt werden diese Daten zwischen verschiedenen Gelen miteinander verglichen (*biological variation analysis*, BVA; Abb. 5).

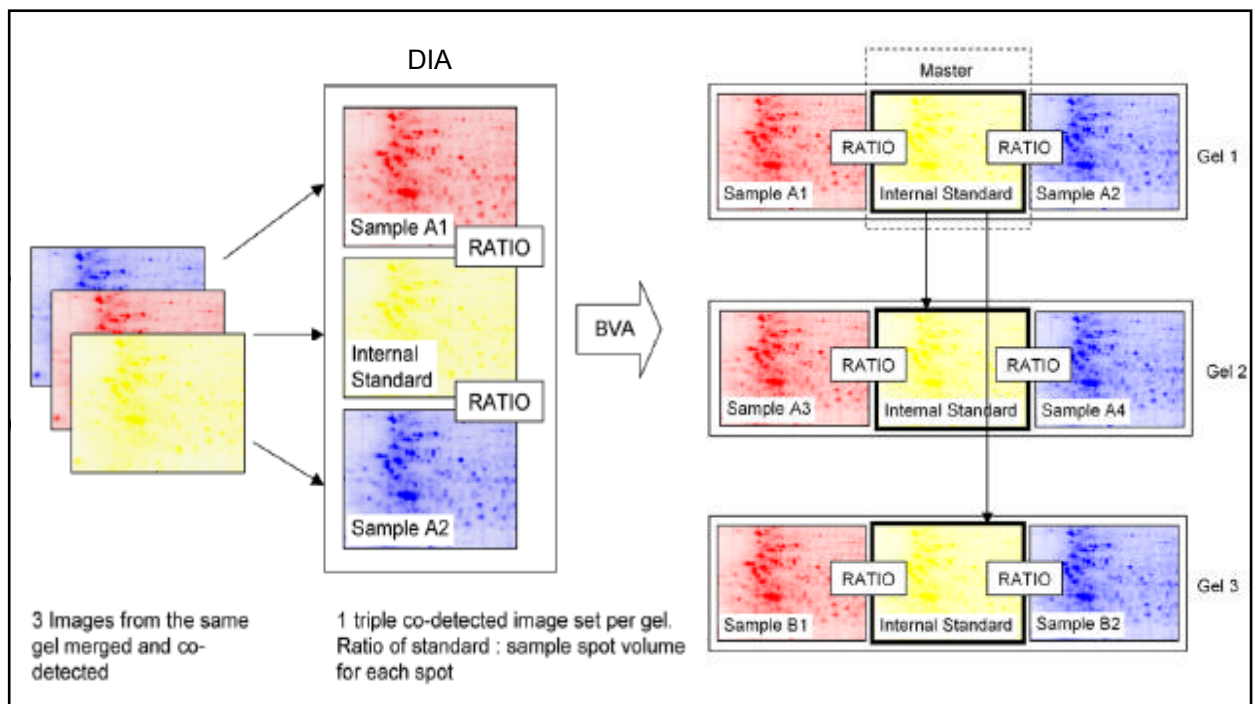


Abb. 5: Schema der 2-D Gel-Auswertung mit der DeCyder™ Software.

Bei der Verwendung der Cy™-Fluoreszenzfarbstoffe können bis zu drei Proben auf einem 2-D Gel analysiert werden. Einer der Farbstoffe wird für die Markierung des internen Standards verwendet (gelb), der sich zu gleichen Teilen aus allen Analyten zusammensetzt. Bei der DIA-Auswertung (*differential in-gel analysis*) werden die Expressionsunterschiede innerhalb eines Gels berechnet. Hierfür werden die Fluoreszenzsignale der Proteinspots A1 bzw. A2 im Verhältnis zum internen Standard berechnet. Bei der BVA-Auswertung (*biological variation analysis*) werden die Expressionsunterschiede mehrerer Gele berücksichtigt. Diese werden mit einem Referenzgel (*Master*) verglichen, auf dem die meisten Proteinspots detektiert wurden (modifizierte Abb. aus Ettan DIGE User Manual).

Die Verwendung der DIGE-Technologie stellt eine signifikante Verbesserung der 2-D Gelelektrophorese dar. Die Fluoreszenz-Färbung ist gegenüber dem Coomassie-Farbstoff sensitiver und im Vergleich zur Silber-Färbung reproduzierbarer. Der experimentelle Aufwand wird im Vergleich zur konventionellen 2-DE reduziert, da mehrere Proben auf einem Gel analysiert werden können. Ferner können durch den Einsatz eines internen Standards technische von biologischen Variationen unterschieden werden (Ünlü *et al.*, 1997; Görg *et al.*, 2004; Marouga *et al.*, 2005).

1.4 Datenqualität in Proteomanalysen

Vor über 10 Jahren wurde das Fachgebiet *Proteomics* definiert. Viele der verwendeten Technologien wurden seither weiter bzw. neu entwickelt und in zahlreichen Studien zur Klärung biologischer Fragestellungen verwendet. In den Proteom-Analysen werden große Datenmengen erzeugt. Die Stringenz, die für die Erhebung der Daten erforderlich ist, wurde in einigen Studien suboptimal berücksichtigt, so dass die Aussagekraft einiger Publikationsdaten rückwirkend überprüft und/oder validiert werden müssen (Wilkins *et al.*, 2006). Um die Qualität der generierten Informationen zu erhöhen, müssen in zukünftigen Studien die Art und Anzahl der verwendeten Replikate, die Reproduzierbarkeit der Daten sowie das experimentelle Design besser berücksichtigt werden (Wilkins *et al.*, 2006; Karp & Lilley, 2007). Eine Bewertung der verwendeten Technologie unter statistischen Aspekten ist sowohl für das grundlegende Stoffwechselverständnis als auch für darauf basierende Arbeiten von Bedeutung. Durch den Ansatz des *expression profiling* auf 2-D Gel-Basis werden mehrere Proben miteinander verglichen. Das Ziel dieser Proteomstudien ist die Detektion unterschiedlich exprimierter Stoffwechselproteine. Der Expressionsunterschied zwischen einzelnen Proteinen dient als Hinweis für Variationen im Metabolismus. In Abhängigkeit von den Vergleichsproben und der Analysemethoden wird der detektierte Expressionsunterschied von vielen Parametern beeinflusst. Hierbei muss unter anderem zwischen technischen und biologischen Variationen unterschieden werden (Molloy *et al.*, 2003).

Technische und biologische Variationen

Technische Variationen entstehen innerhalb der Methode, die für die Aufnahme von Expressionsprofilen verwendet wird. Experimentell wird die technische Variation durch den mehrfachen Vergleich einer definierten Probe bewertet. Damit handelt es sich bei den 2-D Gelen derselben Probe um technische Replikate. Alle Expressionsunterschiede, die im Rahmen dieser Auswertung detektiert werden, sind auf die Analysetechnik und nicht auf real existierende Unterschiede zurückzuführen.

Biologische Variationen umfassen das unterschiedliche Stoffwechselverhalten der Zellen. Werden im Gegensatz zur technischen Variation mehrere, identisch durchgeführte Experimente mit neuen Vorkulturen analysiert, kann die Biologie der Zelle in der Auswertung der Daten berücksichtigt werden. Hierdurch wird die Qualität der generierten Daten erhöht und die Wahrscheinlichkeit für Ergebnisartefakte minimiert. Die Bestimmung der absoluten biologischen Variation ist methodisch nicht möglich, da die Analyse biologischer Replikate

stets die technische Variation der Analysenmethode beinhaltet. Somit müssen Proben individuell und voneinander unabhängig hergestellter Experimente für die Einschätzung der biologischen inklusive der technischen Variation verwendet werden.

Abhängig von der technischen Variation der Analysenmethode sowie der biologischen Variation der Zelle, kann durch den Vergleich identischer Proben ein minimal nachweisbarer Expressionsunterschied (*fold change*, fc) bestimmt werden.

Fehlerquellen bei der Auswertung und experimentelles Design

Bei der Auswertung der Proteomdaten müssen zwei mögliche Fehlerquellen berücksichtigt werden. Zum einen können Expressionsunterschiede detektiert werden, die in der Realität nicht existieren. Dabei handelt es sich um falsch-positive bzw. α -Fehler. Zum anderen können real existierende Expressionsunterschiede nicht detektiert werden. In diesem Fall entstehen falsch-negative bzw. β -Fehler (Dell *et al.*, 2002). Vor der Analyse von Vergleichsproben sollte demzufolge eine statistische Versuchsreihe durchgeführt werden, um signifikante Expressionunterschiede von Ergebnisartefakten unterscheiden zu können. Für die *expression profiling*-Analyse sollte darauf aufbauend ein geeignetes Versuchsdesign ausgewählt werden (Karp *et al.*, 2007). Hierdurch kann die Qualität der generierten Daten erhöht und eine verlässliche Basis für Anschlussarbeiten geschaffen werden (3.2.2).

1.5 Das Modellsystem: rekombinante Glukose-Dehydrogenase

Die D-Glukose-(PQQ)-1-oxidoreduktase (Glukose-Dehydrogenase, Gluc-DH, EC 1.1.5.2, ehemals 1.1.99.17) ist ein Pyrroloquinolinquinon- (PQQ-) abhängiges Enzym, das D-Glukose zu Glukonolakton oxidiert. In der Diagnostik wird das Enzym für die Blutzuckermessung eingesetzt (Kaufmann, 1997; Abb. 6).

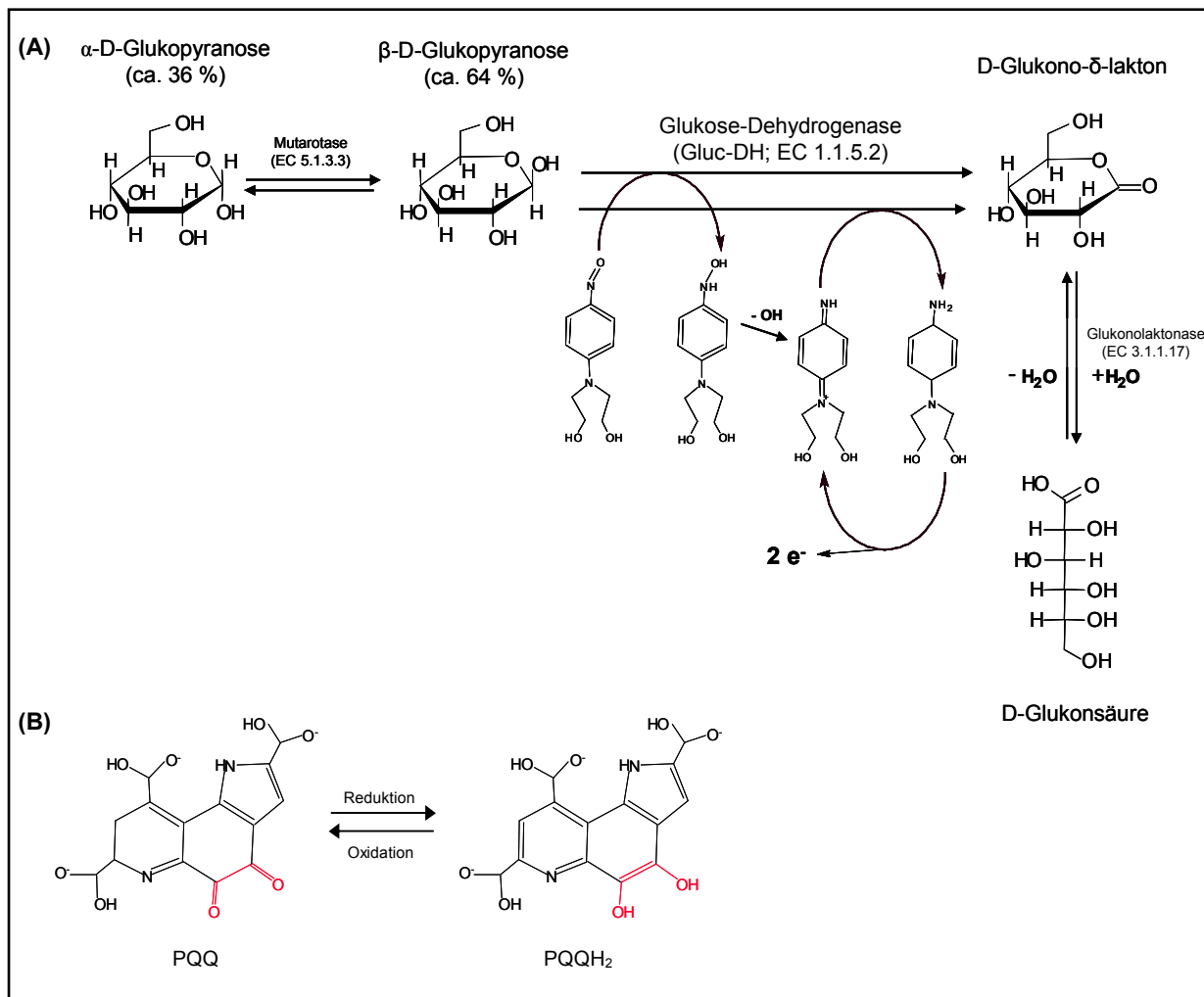


Abb. 6: Reaktionsschema der Blutzucker-Umwandlung.

Die PQQ-abhängige Gluc-DH oxidiert den Blutzucker (β -D-Glukopyranose), der in einem Mutarotationsgleichgewicht mit α -D-Glukopyranose steht, zu Glukonolaktone. Die Glukonolaktone wandelt D-Glukono- δ -laktone in D-Glukonsäure um (A). Auf dem Glukose-Teststreifen der Roche Diagnostics GmbH (Accu-Chek[®]) ist die Oxidation von Glukose durch die Glukose-Dehydrogenase an einen Mediator geknüpft. Dieser wird in Form eines p-Nitrosoanilin-Derivates zugesetzt. PQQ, das bei der Glukose-Oxidation zu PQQH₂ reduziert wird (B), überträgt die Elektronen auf den Mediator. Unter Bildung eines Chinondiimin-Zwischenprodukts wird PQQ regeneriert. Bei der weiteren Umsetzung von Glukosemolekülen erfolgt die Regeneration von PQQH₂ indem das Quinondiimin zu Phenylendiamin reduziert wird. Anschließend wird Phenylendiamin zum Quinondiimin (re-)oxidiert, indem Elektronen abgegeben werden. Diese werden entweder elektrochemisch gemessen oder in einer Farbreaktion auf den Indikator 2,18-Phosphomolybdat übertragen. Dieser wird zu Heteropolyblau reduziert und die Glukosekonzentration durch eine photometrische Messung berechnet.

Die Gluc-DH ist ein basisches ($pI = 9,5$) Homodimer (Dokter *et al.*, 1986), das mit einem Molekül PQQ und drei Ca^{2+} -Ionen pro Monomer katalytisch aktiv ist. Zwei Ca^{2+} -Ionen werden hierbei für die Assoziationen der Untereinheiten und ein Ca^{2+} -Ion für die Bindung an PQQ benötigt (Olsthorn & Duine, 1996; Olsthorn *et al.*, 1997; Oubrie *et al.*, 1999). Das Monomer besteht aus 454 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 50 kDa und besitzt eine Disulfidbrücke (338Cys-345Cys; Dokter *et al.*, 1986). Der Vorteil PQQ-abhängiger Glukose-

Dehydrogenasen gegenüber Glukose-Oxidasen ist die Sauerstoff-Unabhängigkeit (Olsthoorn & Duine, 1996). Damit ist eine störungsfreie Überwachung des Blutzuckers unabhängig vom Sauerstoff-Partialdruck gewährleistet. Die Roche Diagnostics GmbH verwendet für die Blutzuckermessung die lösliche, PQQ-abhängige Gluc-DH aus *Acinetobacter calcoaceticus* (Cleton-Jansen *et al.*, 1989). Ein Nachteil dieses Enzyms ist sein breites Substratspektrum, so dass neben Glukose weitere Zucker wie Maltose (105 %), Galaktose (49 %), Laktose (76 %), Mannose (43 %) und Xylose (43 %) umgesetzt werden (2.5.5). Wie bekannt lassen sich durch den Austausch einzelner Aminosäuren die Eigenschaften von Proteinen beeinflussen. Das primäre Ziel zur Generierung neuer Gluc-DH-Enzymvarianten war die Reduktion der Affinität für Maltose. Diese wurden in einem zielgerichteten Mutagenese-Ansatz (*directed evolution*) erzeugt. Die in dieser Arbeit verwendete Enzymvariante unterscheidet sich durch sechs Substitutions- und eine Insertionsmutation vom Wildtyp-Enzym (Boenitz-Dulat *et al.*, 2007). Dies betrifft die Aminosäuren Asn122Lys, Leu169Phe, Tyr171Gly, Glu245Asp, Met341Val, Thr348Gly und ins429Pro (s. Anhang). Im Vergleich zur Wildtyp-Gluc-DH wurde hierdurch die Umsetzung von Maltose auf 3 % gesenkt. Zum einen ist dies auf hydrophobe Abstoßungskräfte von Aminosäureresten zurückzuführen, die das Maltose-Molekül in eine andere Bindungskonfiguration zwingen. Zum anderen wurde die Konformation der Gluc-DH so beeinflusst, dass die Bindung des Disaccharids sterisch behindert ist (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg).

Für die rekombinante Expression der Gluc-DH wird das Bakterium *Escherichia coli* eingesetzt. Aufgrund der Ausbildung von Disulfid-Brücken wird das Enzym in das Periplasma sekretiert. Hierfür wird die Signalsequenz des Maltose-Bindeproteins aus *Salmonella typhimurium* verwendet (Dahl *et al.*, 1989). Der Expressionsvergleich in sonst isogenen Wirt-/Vektor-Systemen zeigt, dass die Proteine in unterschiedlichen Mengen exprimiert werden, obwohl sie sich nur durch wenige Aminosäureaustausche voneinander unterscheiden (3.1).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die rekombinante DNA-Technologie wird in der pharmazeutischen Industrie für die biotechnologische Herstellung interessanter Proteine genutzt. Die Optimierung der Expressionsleistung basiert derzeit auf der Messung einzelner Stoffwechsel-Parameter und auf Erfahrungswerten, die einzelne Aspekte, nicht jedoch den globalen Zusammenhang der Zellphysiologie berücksichtigen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der

Ansatz des *expression profiling* für die Expressionsoptimierung eines diagnostisch interessanten Enzyms genutzt werden kann.

Für die globale Stoffwechselanalyse sollte eine geeignete *expression profiling*-Methode ausgewählt und etabliert werden. Die Studie sollte anhand eines prokaryontischen Wirt-/Vektor-Systems für die heterologe Expression der Glukose-Dehydrogenase (Gluc-DH) durchgeführt werden. Das Enzym wurde bezüglich der Substratspezifität für den Einsatz in der Blutzuckermessung optimiert. Die Enzymvariante wird im Vergleich zur Wildtyp-Gluc-DH in signifikant geringeren Mengen exprimiert, obwohl das gleiche Wirt-/Vektor-System verwendet wird. Die Expressionsmodelle unterscheiden sich somit nur durch sieben Aminosäureaustausche im Zielprotein voneinander und sind ansonsten isogen. Mit dem Ansatz des *expression profiling* sollten Unterschiede im globalen Stoffwechselverhalten identifiziert werden, indem Hoch- und Niedrigproduzent miteinander verglichen werden. Die Analysen sollten in einem ersten Schritt dabei helfen, die unterschiedlichen Expressionsleistungen zu verstehen. Weiterführend sollten die Erkenntnisse dazu genutzt werden, die Expression der Enzymvariante auf rationaler Basis zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Medienbestandteile

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in p. a.-Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), GE Healthcare (Uppsala, Schweden), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Medienkomponenten wurden bei den Firmen Becton Dickinson (Sparks, USA) und Merck (Darmstadt) erworben.

2.2 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Alle verwendeten Puffer, Lösungen und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser hergestellt und vor ihrem Gebrauch sterilfiltriert (0,20 µm Membranfilter, Sartorius, Göttingen) bzw. autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min).

Acrylamidgele:	41,7 % (v/v)	Rotiophorese Gel 30 (Acrylamid)
	0,4 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,1 % (v/v)	SDS
	0,05 % (v/v)	Ammoniumpersulfat
	0,03 % (v/v)	TEMED
Ampicillin:	100 mg/ml	Stammlösung, 1000x
Aufschlusspuffer:	20 mM	Tris-HCl, pH 8
	100 mM	CaCl ₂
Boratpuffer:	50 mM	Borsäure
	50 mM	Tris-HCl, pH 8

Chloramphenicol:	34 mg/ml	Stammlösung, 1000x gelöst in Ethanol
Denaturierungspuffer:	6 M 5 mM 100 mM 1 mM	Guanidin-HCl EDTA Tris-HCl, pH 8 DTT
Equilibrierpuffer:	6 M 50 mM 30 % (v/v) 2 % (v/v) 0,05 % (w/v)	Harnstoff Tris-HCl, pH 8,8 Glycerin SDS Bromphenolblau Harnstoff lösen und eine Stunde mit Ionentauscher AG 501-X8 (D) Resin (Bio-Rad, München) rühren. Das Granulat abfiltrieren und die weiteren Pufferbestandteile zugeben.
Fixierlösung:	10 % (v/v) 50 % (v/v)	Essigsäure Ethanol
Glukoselösung:	1 M	Glukose gelöst in 0,2 M Citratlösung, pH 5,8
IPTG:	1 M	Stammlösung, 1000x
Kanamycin:	30 mg/ml	Stammlösung, 1000x
Kochsalzlösung, physiologisch:	0,9 % (w/v)	NaCl
LB-Medium:	15 g/l 5 g/l 5 g/l	Trypton-Wasser Hefeextrakt NaCl
Lysispuffer:	10 mM 4 % (w/v) 2 % (v/v)	Tris-HCl, pH 8 SDS β-Mercaptoethanol

M9-Salze:	6 g/l	Na ₂ HPO ₄
	3 g/l	KH ₂ PO ₄
	1 g/l	NH ₄ Cl
	3 mg/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
Markierungspuffer:	2 % (v/v)	Ampholine (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)
	2 % (w/v)	DTT
	gelöst in Probenpuffer	
Probenpuffer:	7,7 M	Harnstoff
	2,2 M	Thioharnstoff
	30 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	4 % (w/v)	CHAPS
	Lösung eine Stunde mit Ionentauscher AG 501-X8 (D) Resin (Bio-Rad, München) rühren und Granulat abfiltrieren.	
PBSCT:	1 % (w/v)	Crotein C
	0,1 % (v/v)	Tween 20
	gelöst in PBS (Roche Diagnostics, Mannheim)	
PBST:	0,05 % (v/v)	Tween 20
	gelöst in PBS (Roche Diagnostics, Mannheim)	
Rehydrierungslösung:	0,5 % (v/v)	Ampholine (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gelöst in DeStreak (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)
Rekonstitutionslösung:	0,0556 mM	PQQ
	0,05 M	Hepes, pH 7
	15 mM	CaCl ₂
	0,1 % (v/v)	Triton® X-100

Renaturierungspuffer:	100 mM	Tris-HCl, pH 8
	5 mM	GSH
	0,5 mM	GSSG
	5 mM	CaCl ₂
	0,5 M	L-Arginin
SB-Medium:	48 g/l	Trypton-Wasser
	20 g/l	Hefeextrakt
	5 mM	NaOH
Substratlösung:	3 mg/ml gelöst in Methanol	4-Chlor-1-Naphthol
TBS:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
TBST:	0,1 % (v/v) gelöst in TBS	Tween 20
Testpuffer:	N-substituiertes 4-Nitrosoanilin (BM 53.0861) gelöst in 0,2 M Citratpuffer, pH 5,8 und 1 mM CaCl ₂ Die Lösung muss bei $\lambda = 422$ nm und einer 1:20 Verdünnung mit 0,2 M Citratpuffer eine Absorption von 0,80 aufweisen (Beckman Coulter DU 7400).	
Verdrängungslösung:	0,4 M	Tris-HCl, pH 8,8
	50 % (v/v)	Glycerin
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
Verstärkerlösung:	15 mg/ml gelöst in Acetonitril	Dimethylphenyldiamin

2.3 Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide sind in den Tabellen 3, 4 bzw. 5 aufgeführt. Die Synthese der Oligonukleotide wurde bei den Firmen Microsynth (Balgach, Schweiz) oder Metabion (München) in Auftrag gegeben.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> KS474	F- <i>ΔlacX74 galE galk thi rpsL (strA) phoA (pvull) degP::kan^r</i>	Strauch <i>et al.</i> , 1989

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide.

Vektor	genetische Marker	Quelle
pACYC Duet-1	p15A P _{T7} <i>lacI</i> Cm ^R	Novagen, Madison, USA
pBAD202/D-TOPO	pUC P _{BAD} <i>araC</i> Kan ^R	Invitrogen, Karlsruhe
pBAD-p15A	p15A P _{BAD} <i>araC</i> Cm ^R	diese Arbeit
pBluescript II KS (+)	pUC P _{lac} <i>lacZ'</i> f1(+) Amp ^R	Stratagene, Heidelberg
pQE80L	ColE1 P _{T5} <i>lacI^q</i> Amp ^R	Qiagen, Hilden
pQE80L-p15A	p15A P _{T5} <i>lacI^q</i> Amp ^R	diese Arbeit
pQE80L-pUC	pUC P _{T5} <i>lacI^q</i> Amp ^R	diese Arbeit
Plasmid	genetische Marker	Quelle
pBAD202/D-TOPO-oppA	pBAD202/D-TOPO-Vektor mit 1,65 kb <i>NcoI</i> -/ <i>SacI</i> -Fragment von <i>oppA</i>	diese Arbeit
pBAD-p15A-oppA	pBAD-p15A-Vektor mit 1,65 kb <i>NcoI</i> -/ <i>SacI</i> -Fragment von <i>oppA</i>	diese Arbeit
pQE80L-p15A-Var	pQE80L-p15A-Vektor mit 1,47 kb <i>Bam</i> HI-/ <i>Eco</i> RI-Fragment der Gluc-DH Enzymvariante	diese Arbeit

Tab. 4 (Fortsetzung)

Plasmid	genetische Marker	Quelle
pQE80L-pUC-Var	pQE80L-pUC-Vektor mit 1,47 kb <i>Bam</i> HI-/ <i>Eco</i> RI-Fragment der Gluc-DH Enzymvariante	diese Arbeit
pQE80L-Var	pQE80L-Vektor mit 1,47 kb <i>Bam</i> HI-/ <i>Eco</i> RI-Fragment der Gluc-DH Enzymvariante	Roche Diagnostics, Penzberg
pQE80L-Var X	pQE80L-Vektor mit 1,47 kb <i>Bam</i> HI-/ <i>Eco</i> RI-Fragment einer Gluc-DH Enzymvariante X	Roche Diagnostics, Penzberg
pQE80L-Var-dxs	pQE80L-Var-Plasmid mit 118 bp <i>Pst</i> I-Fragment des Kalibratorgens dxs	diese Arbeit
pQE80L-WT	pQE80L-Vektor mit 1,46 kb <i>Bam</i> HI-/ <i>Eco</i> RI-Fragment der Wildtyp Gluc-DH	Roche Diagnostics, Penzberg

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung	Quelle
amp-fw-not	GAGCGGCCGCGGTCTGACAGTTAC CAATGC	PCR	diese Arbeit
bla-fw	CTACGATACGGGAGGGCTTA	QPCR	Lee <i>et al.</i> , 2006a
bla-rev	ATAAATCTGGAGCCGGTGAG	QPCR	Lee <i>et al.</i> , 2006a
dxs-fw	CGAGAAACTGGCGATCCTTA	PCR, QPCR	Lee <i>et al.</i> , 2006a
dxs-rev	CTTCATCAAGCGGTTTCACA	QPCR	Lee <i>et al.</i> , 2006a
dxs-rev-pst	GATCCTGCAGCTTCATCAAGCGGTT TCACA	PCR	diese Arbeit
lacI-rev-spe	GAAGTAGTAGGGTGGTGAATGTGAA ACC	PCR	diese Arbeit
oppA-fw-nco	GATCGACCATGGATGACCAACATCA C	PCR	diese Arbeit

Tab. 5 (Fortsetzung)

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung	Quelle
oppA-rev-sac	GATCGAGCTCTTATCAGTGCTTCAC AATGTA	PCR	diese Arbeit
oppA-Mut-fw	CGATCGGCATGCTGTTATTCGTCAT GTCGATTTCACTACTAC	Mutagenese	diese Arbeit
oppA-Mut-rev	GTAGTGGTGAAATCGACATGACGAA TAACAGCATGCCGATCG	Mutagenese	diese Arbeit
p15A-fw-spe	GAAC TAGTCCGGACATCAGCGCTA GCGG	PCR	diese Arbeit
p15A-rev-not	GAGCGGCCGCCATGAGAATTACAA CTTATA	PCR	diese Arbeit
pUC-fw-spe	GAAC TAGTGAAAGAACATGTGAGCA AAAG	PCR	diese Arbeit
pUC-rev-not	GAGCGGCCGCCAGACCCCGTAGAA AAGATC	PCR	diese Arbeit
var-Mut-fw	CGGAAATCCAGTCCAAAAAGATGAT GGCTCAGTAAC	Mutagenese	diese Arbeit
var-Mut-rev	GTTACTGAGCCATCATCTTTTTGGA CTGGATTTCCG	Mutagenese	diese Arbeit

2.4 Kultivierung von Bakterien

E. coli-Zellen wurden bis zu einem Volumen von 4 ml in LB-Medium bei 37 °C und 250 Upm (Infors HT Inkubator) kultiviert. Als Inokulum wurde eine Einzelkolonie oder eine Glycerinkultur verwendet, welche zuvor aus einer Einzelkolonie hergestellt wurde. Die Kultivierung plasmidtragender Stämme erfolgte unter entsprechendem Antibiotika-Selektionsdruck. Kulturen mit mindestens 16 h Inkubationsdauer wurden als Übernachtskulturen (ÜK) bezeichnet. Kultivierungen bis zu einem Volumen von 20 ml erfolgten entweder in LB-Medium oder in SB-Medium, welches mit M9-Salzen, 0,4 % (w/v) Glukose und entsprechenden Antibiotika versetzt wurde. Als Inokulum diente 0,1 OD₆₀₀ einer ÜK. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 250 Upm (Infors HT Minitron Schüttler) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert.

Kultivierungen, die im Rahmen der Aufnahme von Expressionsprofilen und der Expressionsoptimierung durchgeführt wurden, erfolgten bei analoger Medienzusammensetzung und Temperatur im 400 ml Maßstab. Hierfür wurden 2000 ml 1-Schikanen-Erlenmeyerkolben bei einer Schüttlergeschwindigkeit von 150 Upm (Infors HT Minitron Schüttler) verwendet.

Die Induktion der rekombinanten Proteinexpression erfolgte für die pQE80L-Plasmide (Tab. 4) bei einer OD_{600} von 1,2 bis 1,4 durch 1 mM IPTG. Bei Coexpression mit dem pBAD-p15A-oppA Plasmid (Tab. 4) wurden die Kulturen zusätzlich mit 0,5 % (w/v) L-Arabinose induziert.

Alle Zelldichten wurden mit einem Spektralphotometer (Beckman Coulter DU 7400) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt und auf ein Volumen von 1 ml bezogen (OD_{600}). Zur Herstellung von Dauerkulturen (Gefrierkulturen) wurden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase mit 15 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assays photometrisch bestimmt (Beckman Coulter DU 7400). Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA). Alle Proteinkonzentrationen wurden als Doppel-, im Falle der Probenvorbereitung für die 2-D Gele als Dreifachbestimmungen getestet.

2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte mit NuPAGE® Novex® 10 % Bis Tris Mini-Gelen (Invitrogen, Karlsruhe). Zur Gewinnung von Ganzzellextrakten wurden die Zellen in Lysispuffer (2.2) aufgenommen. Die Probenvorbereitung erfolgte durch 10 min Inkubation bei 95 °C in NuPAGE® LDS Running Buffer (Invitrogen, Karlsruhe). Anschließend wurden die Proteine unter Verwendung des NuPAGE® MES SDS Running Buffers (Invitrogen, Karlsruhe) in der XCellSureLock Gelapparatur (Invitrogen, Karlsruhe) bei 200 V für 35 min getrennt (Invitrogen Power Ease

500). Als molekularer Größenstandard wurden 10 µl MultiMark® bzw. 10 µl Novex® Sharp Protein Standard eingesetzt (Invitrogen, Karlsruhe). Die Proteine wurden mit SimplyBlue™ SafeStain gefärbt (Invitrogen, Karlsruhe).

2.5.3 Western Blot

Zum Antikörper-basierten Nachweis wurden die Proteine nach der SDS-PAGE entweder mit dem XCell II™ Blot Module oder mit dem iBlot™-System auf Membranen übertragen (Invitrogen, Karlsruhe). Bei Verwendung des XCell II™ Blot Moduls wurde die PVDF-Membran (Invitrogen, Karlsruhe) für 15 min in Ethanol aktiviert und die Proteine anschließend mit Boratpuffer (2.2) für 1 h bei 25 V übertragen. Die Proteinübertragung mittels iBlot™ erfolgte auf Nitrocellulose-Membranen (Invitrogen, Karlsruhe) für 5 min bei 20 V.

Die Membranen wurden anschließend mit 5 % (w/v) Membrane Blocking Agent (GE Healthcare UK Limited) in TBST (2.2) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit TBST wurden die Proteine für 1 h mit dem ersten Antikörper inkubiert. Hierfür wurde PAK<Gluc-DH>K-IgG (2.5.4) 1:70000 in TBST verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut mit TBST gewaschen. Als Detektionsantikörper wurde <Kaninchen>IgG-POD (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Dieser wurde 1:45000 in TBST verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2x mit TBST und 1x mit TBS (2.2) gewaschen. Die Detektion erfolgte in 25 ml TBS, 5 ml Substratlösung, 15 µl 30 % (v/v) H₂O₂ und 15 µl Verstärkerlösung (2.2) für 15 min.

2.5.4 ELISA

Testprinzip

Für die Quantifizierung der Gluc-DH wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Sandwich-ELISA etabliert. Abb. 7 verdeutlicht dessen Aufbau.

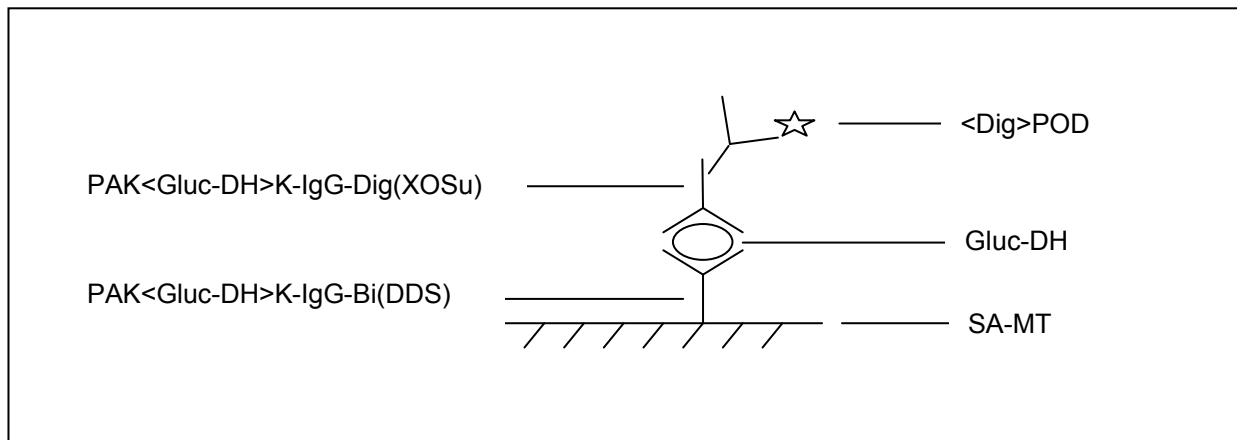


Abb. 7: Testprinzip des Gluc-DH ELISA.

Eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (SA-MT) wurde mit dem ersten, biotinylierten Fangantikörper (PAK<Gluc-DH>K-IgG-Bi(DDS)) inkubiert. Nach Inkubation mit dem Probenmaterial (Gluc-DH) wurde der zweite, digoxygenylierte Antikörper (PAK<Gluc-DH>K-IgG-Dig(XOSu)) an das Antigen gekoppelt. Durch den Auftrag des Anti-Digoxygenin-POD-Konjugates (<Dig>POD) und durch Zugabe des Substrates ABTS wurde die Detektionsreaktion gestartet.

Herstellung der markierten Antikörper

Als Ausgangsmaterial für die Biotinylierung und Digoxygenylierung Gluc-DH spezifischer Antikörper diente Kaninchen-Rohserum (PAK<Gluc-DH>K-RS, Roche Diagnostics, Penzberg). Für die IgG-Isolierung wurde eine Caprylsäure- und Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Die Abtrennung von Albumin erfolgte durch die Zugabe von 25 μ l Caprylsäure pro ml Rohserum. Die Fällung wurde bei pH 4 und RT für 30 min durchgeführt und das gefällte Albumin mittels Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde IgG mit 2 M Ammoniumsulfat für 30 min bei RT und pH 7 gefällt. Die unlösliche Fraktion wurde in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 8,5 aufgenommen und über Nacht bei 4 °C dialysiert. Das erhaltene PAK<Gluc-DH>K-IgG wurde für die Western Blots (2.5.3) und als Ausgangsmaterial für die Bi- und Digoxygenylierung verwendet.

Die Biotinylierung von PAK<Gluc-DH>K-IgG wurde im Verhältnis 1:10 (IgG:Bi(DDS)), die Digoxygenylierung im Verhältnis 1:3,5 (IgG:Dig(XOSu)) durchgeführt. Biotin (Bi(DDS)) bzw. Digoxygenin (Dig(XOSu)) wurden zuvor in DMSO gelöst. Die Kopplungsreaktion wurde für 60 min bei RT durchgeführt und durch die Zugabe von 1 M Lysin gestoppt. Die Ansätze wurden mittels Gelfiltration (Superdex 200 HR 200 10/30, GE Healthcare) gereinigt und die Konzentration der Proben photometrisch bei $\lambda = 280$ nm bestimmt (UVikon[®] 710, Fa. Kontron). Die bi- und digoxygenylierten Antikörper wurden mit 6,5 % (w/v) Saccharose stabilisiert.

Durchführung

Für den Gluc-DH ELISA wurde eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (StreptaWell High Bind, Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet und mit dem Fangantikörper PAK<Gluc-DH>K-IgG-Bi(DDS) versetzt. Der Antikörper wurde auf eine Konzentration von 0,6 µg/ml mit PBSCT (2.2) verdünnt und unter Schütteln für 1 h inkubiert. Nach einem Waschschriff mit PBST (2.2) wurden Proben mit Gluc-DH-Konzentrationen zwischen 0 und 13 ng/ml aufgetragen. Als Referenzsubstanz diente gereinigtes Wildtyp-Enzym. Für die Analyse von Zelllysaten wurden ganze Zellen in Probenpuffer (2.2) aufgenommen und mittels Ultraschall (Sonics VibraCell) bei 90 W und 1 min Gesamtpulszeit aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt, die lösliche Fraktion in PBSCT verdünnt und für den ELISA verwendet. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBST, wurde der zweite Antikörper PAK<Gluc-DH>K-IgG-Dig(XOSu) in PBSCT mit einer Konzentration von 0,6 µg/ml aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation wurde erneut mit PBST gewaschen. Für die Detektion wurde <Dig>POD in Konjugat-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim) zu 50 mU/ml gelöst und für 1 h inkubiert. Durch Zugabe von ABTS (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde die Detektionsreaktion gestartet. Die Absorptionswerte wurden nach 15 min bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm (Referenzwellenlänge $\lambda = 495$ nm, Tecan Sunrise ELISA Reader, Magellan 4.0 Software) gemessen. Alle Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt.

2.5.5 Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Gluc-DH-Enzymaktivität wurden 12 ml Kultur zentrifugiert, die Biomasse in 4 ml Aufschlusspuffer (2.2) resuspendiert und die Zellen bei 1,5 kbar aufgeschlossen (Cell Disruption Equipment, IUL Instruments). Für die Analyse wurde entweder das Gesamtzellextrakt, die lösliche Fraktion nach Zellaufschluss sowie de- oder renaturierte Proteinlösung verwendet. Zur Aktivierung des Enzyms wurde die Probe 1:20 in Rekonstitutionslösung (2.2) verdünnt und für 30 min bei RT inkubiert. 50 µl Probe wurden mit 1 ml Testpuffer (2.2) und 33 µl Glukoselösung (2.2) gemischt. Die Enzymkinetik wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 620$ nm (Beckman Coulter DU 7400) und einer Temperatur von 25 °C für 3 min photometrisch bestimmt. Die Enzymaktivität wurde unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnungsfaktoren aus der Absorptionsänderung/min in U/l kalkuliert. Als Referenz diente gereinigtes Wildtyp-Enzym.

Der Vergleich der Substratspezifitäten (1.5) wurde von Mitarbeitern der Roche Diagnostics GmbH durchgeführt. Hierfür wurde gereinigte Glukose-Dehydrogenase verwendet und unter

identischen Reaktionsbedingungen mit den äquimolaren Mengen alternativer Zucker untersucht.

2.5.6 2-D Gelelektrophorese

Die Aufnahme von Expressionsprofilen erfolgte auf Basis von 2-D Gelen. Hierfür wurden *E. coli* Schüttelkulturen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten analysiert (3.1.4). Die entsprechenden Proben wurden zentrifugiert und die Biomassen von je 30 OD₆₀₀ bei -20 °C gelagert. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Arbeiten auf Eis durchgeführt.

Probenvorbereitung

Die Biomassen wurden mit 2 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8 gewaschen und nach Zentrifugation in 1 ml Probenpuffer (2.2) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall bei 90 W und 1 min Gesamtpulszeit (Sonics VibraCell). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation von der löslichen Fraktion getrennt. Anschließend wurde die Konzentration des Gesamtproteins nach Bradford bestimmt (2.5.1).

Wurden analytische Gele für die Aufnahme von Expressionsprofilen hergestellt, sind insgesamt 150 µg Protein vor der Trennung zu jeweils gleichen Teilen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert worden. Hierfür wurden die Farbstoffe CyTM2, CyTM3 und CyTM5 (CyDye DIGE Fluor minimal dyes, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks/UK) verwendet und laut Herstellerangaben in DMF rekonstituiert. Für die Markierungsreaktion wurde jeweils 6 pmol Farbstoff pro µg Protein verwendet. Nach 30 min Inkubation wurde die Reaktion mit 10 mM Lysin gestoppt. Nach der Zugabe des äquivalenten Volumens Markierungspuffer (2.2) wurden die Proben für die isoelektrische Fokussierung (IEF) eingesetzt.

Proteintrennung

Um die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt zu trennen, wurden Immobiline DryStrips von 18 cm Länge mit einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) von 3 - 10 (nicht linear, NL) verwendet (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks/UK). Diese wurden für 16 h mit jeweils 350 µl Rehydrierungslösung (2.2) aktiviert. Anschließend wurden die IPG-Streifen mit 150 µg *E. coli* Zelllysate per anodischem Probenauftrag beladen und die Proteine mit insgesamt 34,2 kWh nach folgendem Protokoll getrennt (Tab. 6; Ettan IPGphor II IEF Unit, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks/UK).

Tab. 6: Protokoll für die isoelektrische Fokussierung (IEF).

Spannung [V]	Zeit [h]	Steigung
150	3	Stufe
300	3	Stufe
1000	6	Gradient
8000	2	Gradient
8000	2,5	Stufe

Nach der Fokussierung wurden die Proteine für 15 min bei RT in Equilibrierpuffer (2.2) mit 0,5 % (w/v) DTT reduziert. Die anschließende Alkylierung erfolgte mit 4,4 % (v/v) Iodacetamid. Um die Proteine in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht zu trennen, wurden 12,5 % (v/v) Acrylamidgele hergestellt. Hierfür wurden alle notwendigen Komponenten gemischt (2.2) und die Lösung in eine Gelkassette überführt (Ettan DALT Gel Caster, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks/UK). Die Gießapparatur wurde anschließend mit Verdrängungslösung (2.2) unterschichtet und die Oberfläche der Gele mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach 6 h Polymerisation bei RT wurden die Gele für die SDS-PAGE eingesetzt. Mittels 0,5 % (w/v) Agaroselösung wurden die IEF-Streifen in den Gelkassetten fixiert. Die Trennung der Proteine wurde bei 25 °C für 30 min und 8 W pro Gel und für weitere 5 h 30 min bei 15 W pro Gel durchgeführt (Ettan DALT*twelve* Elektrophorese-Einheit, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks/UK; TGS-Puffer, Bio-Rad, München).

Wurden die Proteine mittels DIGE-System analysiert, konnten die Gele direkt für die Messung im Fluoreszenz-Scanner eingesetzt werden. Im Rahmen der Methodenetablierung wurden die Proteine vor der Bildanalyse für 1 h in Fixierlösung (2.2) gelegt und anschließend mit Coomassie (Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen, Karlsruhe) über Nacht gefärbt.

Bildanalyse

Coomassie-Gele wurden mit dem Image Scanner und dem LabScan-Programm (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks/UK) analysiert. Die DIGE-Gelbilder wurden mit einem Fluoreszenz-Scanner (Typhoon Variable Mode Imager, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks/UK) aufgenommen und mit der DeCyder™ Differential Analysis Software (Version 6.5, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks/UK) ausgewertet.

2.5.7 Massenspektrometrische Analyse

Für die Identifizierung der Proteine wurden präparative 2-D Gele mit einer Proteinbeladung von insgesamt 600 µg hergestellt. 150 µg des Probenmaterials wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (2.5.6) und anschließend mit 450 µg nicht markiertem Protein gemischt. Nach der 2-D Gelelektrophorese (2.5.6) wurden die Fluoreszenzbilder aufgenommen, die Gele 1 h in Fixierlösung (2.2) inkubiert und die Proteine anschließend mit Coomassie (Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt.

Die MALDI-TOF Analyse wurde nach der Methode von Berndt *et al.* (1999) und Jiang *et al.* (2003) sowie mit Modifikationen nach Roeßler *et al.* (2005) durchgeführt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standard-PCR

Alle Standard-PCRs wurden unter Verwendung von jeweils 0,2 mM dNTPs (Roche Diagnostics, Mannheim), jeweils 1 mM Oligonukleotiden (Tab. 5), 10 bis 100 ng DNA-Matrize und einem der Polymerase entsprechenden Reaktionspuffer mit 1,5 mM MgCl₂ durchgeführt. Für Kontroll-PCRs mit Bakterienkolonien wurde die Taq-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt. Hierfür wurde eine Kolonie in 20 µl sterilem Wasser aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 5 µl für die PCR verwendet. Für alle anderen PCRs wurde das Expand High Fidelity Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet.

Die PCR wurde im GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA/USA) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

95 °C	-	5 min	} 25-35x
95 °C	-	30 sek	
T _a	-	30 sek	
72 °C	-	1 kb/min	
72 °C	-	7 min	

Die Annealingtemperatur (T_a) wurde mit der Clone Manager Software (Version 5.2, Scientific & Educational Software) berechnet.

Die PCR-Produkte wurden entweder mit Hilfe des PCR Product Purification Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) oder mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

Mutagenese-PCR

Traten in der Sequenz amplifizierter DNA unerwünschte Mutationen auf, wurden diese mit einer Mutagenese-PCR korrigiert. Hierfür wurde das QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Die PCR wurde unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide (Tab. 5) nach dem Herstellerprotokoll für Punktmutationen durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde im Anschluss direkt für die Transformation von *E. coli* XL1Blue-Zellen verwendet (2.6.8).

2.6.2 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt. Soll- und Ist-Sequenzen wurden mit Hilfe der Clone Manager Software (Version 5.2) verglichen.

2.6.3 DNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von DNA wurde in 0,8 bis 1,2 % (w/v) Agarosegelen mit TBE-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim) und dem PowerPac Basic[™] (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die DNA wurde entweder mit Ethidiumbromid oder mit SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt. Als Längenstandard wurde der „DNA molecular weight marker X“ (Roche Diagnostics, Mannheim) oder die „1 kb DNA Ladder“ (NEB, Schwalbach) verwendet. Für die Geldokumentation wurde das „UV Systeme“ (Intas, Göttingen) verwendet.

2.6.4 Isolierung von DNA

Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde durch die Verwendung des High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) oder des QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) laut Herstellerangaben isoliert.

Isolierung von Gesamt-DNA

Für die Isolierung von Gesamt-DNA aus *E. coli* wurde das QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Trennung der DNA (2.6.3) wurde diese mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers extrahiert. Die Effizienz der DNA-Isolierungen wurde stets durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.6.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

DNA-Konzentrationen wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm photometrisch gemessen (Beckman Coulter DU 7400). Unter der Vorgabe, dass 1 OD₂₆₀ einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht, wurden die entsprechenden Konzentrationen berechnet. Der Reinheitsgrad der isolierten DNA wurde aus dem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt und mit $\geq 1,8$ als rein bewertet.

2.6.6 Durchführung von DNA-Modifikationen

Hydrolyse von Nukleinsäuren

Für die Hydrolyse von DNA wurden Enzyme der Firmen Roche Diagnostics (Mannheim) und NEB (Schwalbach) verwendet. Pro µg DNA wurden 1 - 5 U Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Wahl des Restriktionspuffers und der Inkubationsbedingungen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung von Vektor-DNA wurde die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Roche Diagnostics, Mannheim) laut Herstellerangaben verwendet.

Ligation

Die Ligation von DNA wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.7 Herstellung von Kalibrations- und Expressionsvektoren

2.6.7.1 Konstruktion von pQE80L-Var-dxs

Das Kalibratorplasmid für die Bestimmung der Plasmidkopienzahl (2.6.9) wurde auf Basis des Expressionsvektors pQE80L-Var hergestellt. Hierfür wurde ein Abschnitt des 1-Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase-Gens aus genomischer DNA (2.6.4) mit den Primern dxs-fw und dxs-rev-pst (Tab. 5) amplifiziert (2.6.1) und über *Pst*I- und *Sma*I-Restriktionsschnittstellen in den Vektor ligiert (2.6.6). Anschließend wurde *E. coli* XL1Blue mit dem Ligationsprodukt transformiert (2.6.8). Um DNA-Material für die Kalibrationskurven zu erhalten, wurde eine Plasmid-Isolierung (2.6.4) durchgeführt und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (2.6.5). Die Sequenzanalyse (2.6.2) zeigte keine Mutationen in den zu amplifizierenden DNA-Abschnitten (Daten nicht gezeigt).

2.6.7.2 Konstruktion von pQE80L-pUC-Var

Für die Erhöhung der Plasmidkopienzahl (3.4.1.2) wurde der Expressionsvektor pQE80L-pUC-Var hergestellt. Hierfür wurde das pQE80L-Var Plasmid (Tab. 4) mit den Oligonukleotiden amp-fw-not und lacI-rev-spe (Tab. 5) mittels PCR amplifiziert (2.6.1). Die DNA-Sequenz des pUC-oris wurde aus dem Vektor pBSK(+) (Tab. 4) mit den Oligonukleotiden pUC-rev-not und pUC-fw-spe (Tab. 5) generiert. Die Ansätze wurden gereinigt (2.6.4) und mit den Restriktionsenzymen *Not*I und *Spe*I inkubiert (2.6.6). Der Vektor wurde mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und anschließend mit dem pUC-Replikationsursprung ligiert (2.6.6). Nach der Transformation von *E. coli* XL1Blue (2.6.8) wurde das Plasmid pQE80L-Var-pUC isoliert (2.6.4). Durch eine Kontroll-Restriktion mit *Hpa*I (2.6.6) wurde die richtige Größe des neuen Vektorkonstrukts nachgewiesen. Die anschließende DNA-Sequenzierung (2.6.2) zeigte die korrekte Basenzusammensetzung der Gluc-DH Enzymvariante (Daten nicht gezeigt).

2.6.7.3 Konstruktion von pQE80L-p15A-Var

Um die Plasmidkopienzahl zu reduzieren (3.4.2.1), wurde der *Co/E1*-ori im pQE80L-Vektor (Tab. 4) gegen einen p15A-Replikationsursprung ausgetauscht. Hierfür wurde das pQE80L-Var Plasmid (Tab. 4) in einer PCR (2.6.1) unter Verwendung der Oligonukleotide amp-fw-not und lacI-rev-spe (Tab. 5) amplifiziert. Die DNA-Sequenz des p15A-ori wurde in einer weiteren PCR (2.6.1) aus dem Vektorkonstrukt pBAD-p15A-oppA (Tab. 4) mittels p15A-rev-not und p15A-fw-spe (Tab. 5) gewonnen. Nach der Reinigung der PCR-Produkte (2.6.4) und deren Hydrolyse mit den Enzymen *NotI* und *SpeI*, wurde der Vektor dephosphoryliert (2.6.6). Im Anschluss wurden die beiden Konstrukte ligiert (2.6.6) und *E. coli* XL1Blue-Zellen transformiert (2.6.8). Das Plasmid pQE80L-Var-p15A wurde isoliert (2.6.4) und mittels *HpaI*-Restriktion (2.6.6) überprüft. Die Sequenzanalyse (2.6.2) zeigte eine Mutation im Gluc-DH Gen. Diese konnte durch eine Mutagenese-PCR (2.6.1) mit den Oligonukleotiden var-Mut-fw und var-Mut-rev (Tab. 5) erfolgreich eliminiert werden (Daten nicht gezeigt).

2.6.7.4 Konstruktion von pBAD-p15A-oppA

Für die Coexpression des periplasmatischen Substratbindepoteins OppA wurde das Plasmid pBAD-p15A-oppA hergestellt (Abb. 23). Hierfür wurde der Vektor pBAD202/D-TOPO (Tab. 4) als Grundlage verwendet, mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *SacI* inkubiert (2.6.6) und anschließend gereinigt (2.6.4). Die DNA-Sequenz von oppA wurde mit den Oligonukleotiden oppA-fw-nc0 und oppA-rev-sac (Tab. 5) aus genomischer DNA (2.6.4) mittels PCR amplifiziert (2.6.1). Das PCR-Produkt wurde gereinigt (2.6.4) und mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *SacI* inkubiert (2.6.6). Anschließend wurde dieses mit dem restringierten Vektor pBAD202/D-TOPO (Tab. 4) ligiert (2.6.6). Das Ligationsprodukt pBAD202/D-TOPO-oppA (Tab. 4) wurde im Anschluss für die Transformation von *E. coli* XL1Blue verwendet (2.6.8). Das Plasmid wurde isoliert (2.6.4) und durch Hydrolyse mit *EcoRV* (2.6.6) charakterisiert (Daten nicht gezeigt).

Der pUC-Replikationsursprung des pBAD202/D-TOPO-Vektors (Tab. 4) ist zum *Co/E1*-ori der pQE80L-Plasmide (Tab. 4) nicht kompatibel. Daher wurde der Replikationsursprung gegen einen p15A-ori ausgetauscht. Dieser wurde aus pACYC Duet-1 (Tab. 4) gewonnen, indem der Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *HpaI* und *NdeI* inkubiert wurde (2.6.6). Das Zwischenprodukt pBAD202/D-TOPO-oppA wurde mit den Enzymen *PmeI* und *NdeI* hydrolysiert (2.6.6). Nach Isolierung der Produkte (2.6.4), wurde das DNA-Fragment aus pACYC Duet-1 dephosphoryliert (2.6.6) und mit Hilfe des PCR Product Purification Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) gereinigt. Anschließend wurden beide DNA-Stücke ligiert (2.6.6) und zur Transformation von *E. coli* XL1Blue verwendet (2.6.8).

Das Plasmid pBAD-p15A-oppA (Tab. 4) wurde isoliert (2.6.4) und die Plasmidgröße mit den Restriktionsenzymen *Nru*I, *Pvu*I und *Xba*I kontrolliert (2.6.6). Die DNA-Sequenzierung (2.6.2) zeigte fünf Abweichungen von der Sollsequenz (Daten nicht gezeigt). Drei Mutationen lagen außerhalb der Strukturgene bzw. hatten auf die Replikation und das Zellwachstum keinen Einfluss. Zwei Mutationen lagen innerhalb des oppA-Gens. Während der Austausch von N271Y auch in den Datenbanken der Sollsequenzen nicht eindeutig beschrieben ist, wurde mit T190I eine kritische Punktmutation identifiziert. Diese wurde durch eine Mutagenese-PCR (2.6.1) mit den Oligonukleotiden oppA-Mut-fw und oppA-Mut-rev (Tab. 5) erfolgreich entfernt (Daten nicht gezeigt).

2.6.8 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von superkompetenten *E. coli* XL1Blue (Stratagene, Heidelberg) wurden 50 µl kompetente Zellen mit 0,85 µl β-Mercaptoethanol und 10 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 sek wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der Transformationsansatz in 450 µl SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 250 Upm kultiviert (Infors HT Inkubator).

50 bis 200 µl transformierte Zellen wurden auf LB-Agarplatten (LB-Agar Miller, Merck, Darmstadt) unter Verwendung des entsprechenden Selektionsantibiotikums über Nacht bei 37 °C inkubiert (Heraeus, Thermo Electron Corporation).

2.6.9 Plasmidkopienzahlbestimmung

Die Bestimmung der Plasmidkopienzahl erfolgte nach der Methode von Lee *et al.* (2006a). Hierzu wurde Gesamt-DNA aus *E. coli* isoliert (2.6.4) und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (2.6.5). Die Analyse der Proben erfolgte mittels quantitativer PCR (QPCR) im Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim). Hierfür wurde das Light Cycler Fast Start DNA Master Sybr Green I Kit verwendet (Roche Diagnostics, Mannheim). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Light Cycler Software Version 4.0 (Roche Diagnostics, Mannheim). Die Produktbildung wurde mit einer Schmelzkurvenanalyse kontrolliert. Die Genkopienzahl wurde mittels absoluter Quantifizierung bestimmt. Die hierfür notwendigen Kalibrationskurven wurden durch Amplifikation des Plasmids pQE80L-Var-dxs (Tab. 4; 2.6.7.1) aufgenommen. In allen Versuchen wurde neben einer Kalibrationskontrolle eine weitere

Positiv- (pQE80L-Var bzw. genomische *E. coli* DNA) und eine Negativkontrolle (A. dest.) mitgeführt. Alle Proben wurden in einer Doppelbestimmung vermessen.

Die Plasmidkopienzahl wurde durch das Verhältnis der Genkopienzahl von β -Lactamase (bla, plasmidkodiert) zu 1-Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase (dxs, chromosomal) berechnet (3.4.1.1).

3 Ergebnisse

3.1 Das Modellsystem

3.1.1 Prokaryontisches Wirt-/Vektor-Expressionssystem

In einer Reihe von Versuchen wurden verschiedene Wirt-/Vektor-Systeme für die Expression der rekombinanten Glukose-Dehydrogenase (Gluc-DH) getestet. Bei der Auswahl eines geeigneten Modellsystems kamen vor allem solche Systeme in Betracht, die sich durch eine stark variierende Expressionsleistung unterschieden. Hierbei zeigte das Wirt-/Vektor-System *E. coli* XL1Blue/pQE80L (2.3) für die Expression der Gluc-DH Enzymvariante im Vergleich zum Wildtyp-Enzym die größten Differenzen.

In der Aminosäuresequenz unterscheidet sich die Enzymvariante durch sechs Substitutionen und eine Insertionsmutation vom Gluc-DH Wildtyp-Enzym (1.5). Dies entspricht einem genetischen Unterschied von 1,5 %. Die Sequenzierung der Expressionsvektoren pQE80L-WT und pQE80L-Var (Tab. 4) zeigte neben den bekannten Unterschieden des Zielproteins keine weiteren Mutationen in den übrigen Strukturgenen (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Charakterisierung des Wachsverhaltens

Bei der Kultivierung der Expressionssysteme *E. coli* XL1Blue/pQE80L-Wildtypenzym (WT) bzw. *E. coli* XL1Blue/pQE80L-Enzymvariante (Var) wurden deutliche Unterschiede im Wachsverhalten beobachtet. In Abb. 8 sind die Wuchskurven des Expressionsmodells von unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. Die Kultivierung erfolgte in 400 ml Schüttelkultur (2.4). Das Wachsverhalten wurde über einen Zeitraum von 8 h nach der Induktion stündlich aufgezeichnet (Abb. 8).

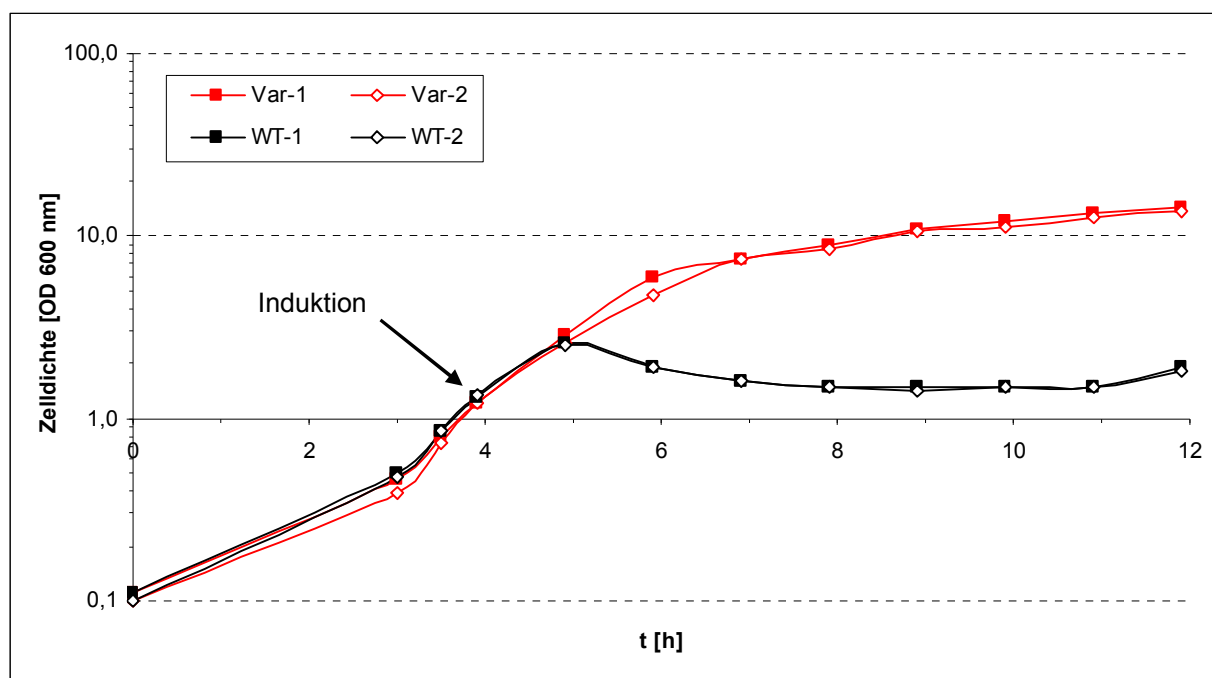


Abb. 8: Unterschiedliches Wuchsverhalten des Expressionsmodells.

Die Zelldichte-Messungen zeigen, dass die Expressionssysteme *E. coli* XL1Blue/pQE80L für das GlucDH Wildtyp-Enzym (WT) und für die Enzymvariante (Var) ein stark unterschiedliches Wuchsverhalten aufweisen. Zum Zeitpunkt t_0 wurde die Kultur beimpft. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von IPTG. Die Zahlen 1 und 2 kennzeichnen die voneinander unabhängig durchgeführten biologischen Replikate des gesamten Experiments.

Die Zelldichte-Messungen zeigten, dass die optische Dichte des Wirt-/Vektor-Systems zur Expression der Enzymvariante stetig zunahm. Im Vergleich hierzu ging das Wildtyp-System kurz nach der Induktion in die stationäre Wachstumsphase über (Abb. 8).

3.1.3 Untersuchung des Expressionsverhaltens

Neben dem unterschiedlichen Wuchsverhalten bestand innerhalb des Modellsystems ein großer Unterschied in der Produktionsleistung. Die Expression der rekombinanten, heterologen Proteine wurde mittels SDS-PAGE (2.5.2) und Western Blot (2.5.3) analysiert und auf die Expressionsleistung pro Zelle normiert. Abb. 9 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE Analyse über den gesamten Kultivierungszeitraum.

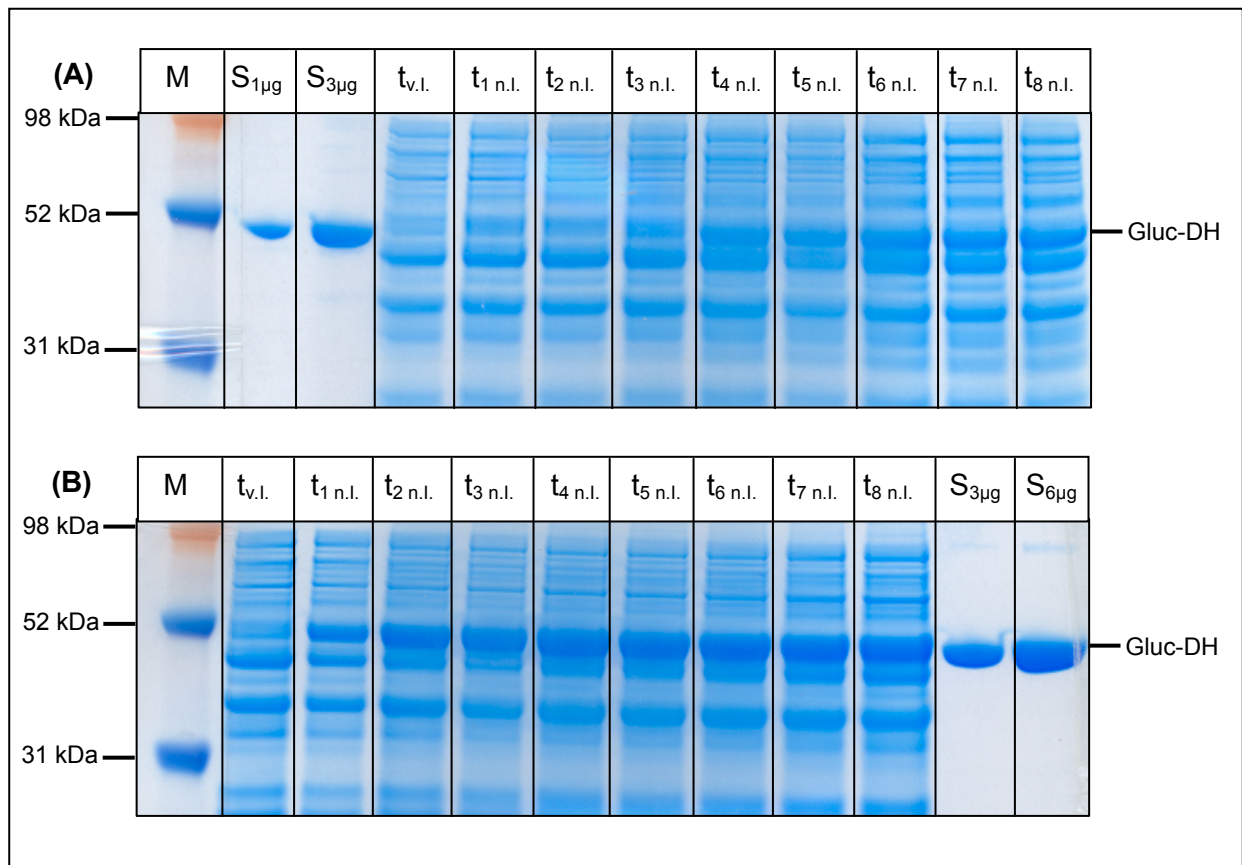


Abb. 9: SDS-PAGE Analyse zur Gluc-DH Expression.

Die unterschiedliche Produktionsleistung der Expressionssysteme *E. coli* XL1Blue/pQE80L-Enzymvariante (A) und *E. coli* XL1Blue/pQE80L-Wildtypenzym (B) wird exemplarisch anhand der SDS-PAGE Analyse aus Versuch Nr. 1 (Abb. 8) dokumentiert. Pro Spur wurde der Gesamt-Zellextrakt von 0,1 OD₆₀₀/ml aufgetragen. Die Expression der Gluc-DH (50 kDa) wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum (t_{v.l.}: vor Induktion, t_{i n.l.}: i Stunden nach Induktion) analysiert. Die Spur M kennzeichnet den verwendeten Größenmarker (Magic Mark, Invitrogen). Die Proben können mit einer Gluc-DH-Kontrolle (S) verglichen werden.

Die Expression des Wildtyp-Enzyms zeigte eine deutlich bessere Produktionsleistung als die Gluc-DH Enzymvariante. Das Expressionssystem mit vergleichbar niedriger Produktionsleistung wurde als Niedrigproduzent, das WT-Expressionssystem als Hochproduzent definiert (Abb. 9).

3.1.4 Probenauswahl für die Proteomanalyse

Die Expression des Gluc-DH-Wildtyps und der -Variante sollte im Rahmen dieser Arbeit durch die Aufnahme von Expressionsprofilen umfassend analysiert werden. Für die Analyse des Gesamt-Proteoms wurden die drei Kultivierungszeitpunkte ‚vor Induktion‘ (t_{v.l.}), 1 h nach Induktion (t_{1 n.l.}) und 2 h nach Induktion (t_{2 n.l.}) ausgewählt.

Abb. 10 verdeutlicht das signifikant unterschiedliche Wuchsverhalten zu diesen Kultivierungszeitpunkten. Die Ergebnisse der Zelldichtemessungen aus fünf voneinander unabhängig durchgeführten Schüttelkultur-Experimenten wurden auf die Induktionszeit normiert. Vor Induktion und 1 h nach Induktion wurde kein Unterschied im Wuchsverhalten der Vergleichssysteme detektiert. Während die Zelldichten des Var-Systems (Niedrigproduzent) weiter zunahmen, befand sich der Hochproduzent (WT) bereits 2 h nach Induktion in der stationären Wuchsphase (Abb. 10).

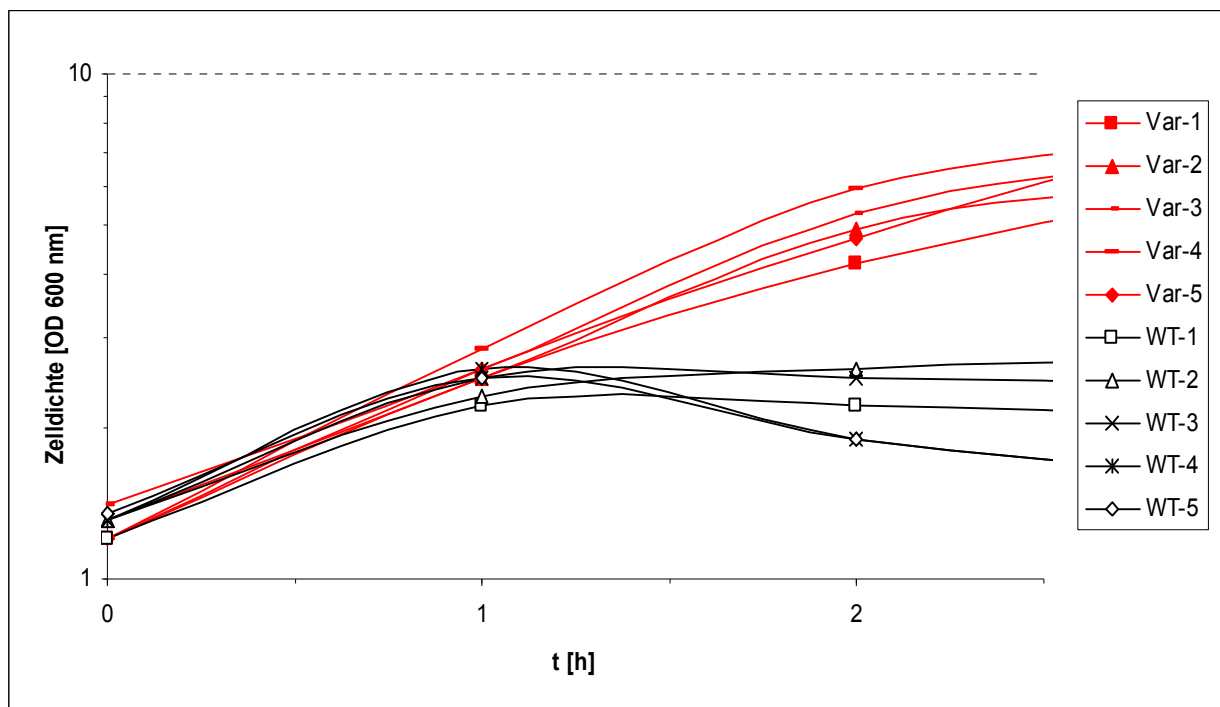


Abb. 10: Wuchsverhalten der Expressionssysteme ab dem Zeitpunkt der Induktion. Die Wuchskurven der Expressionssysteme *E. coli* XL1Blue/pQE80L-Wildtypenzym (WT) und *E. coli* XL1Blue/pQE80L-Enzymvariante (Var) wurden auf den Zeitpunkt der Induktion normiert (t_0). Die Zahlen 1 - 5 kennzeichnen die voneinander unabhängig durchgeführten Wiederholungen des Schüttelkultur-Experiments. Die Standardabweichungen lagen im Mittel bei 8 % (t_0 und t_1) bzw. 15 % (t_2).

Das Expressionsverhalten der Zellen ist in Abb. 11 zusammengefasst. Hierfür wurden zu den Analysezeitpunkten ‚vor Induktion‘ ($t_{v.l.}$), 1 h nach Induktion ($t_{1 n.l.}$) und 2 h nach Induktion ($t_{2 n.l.}$) die Proben der Schüttelkulturexperimenten mittels Western Blot (2.5.3) analysiert (Abb. 11).

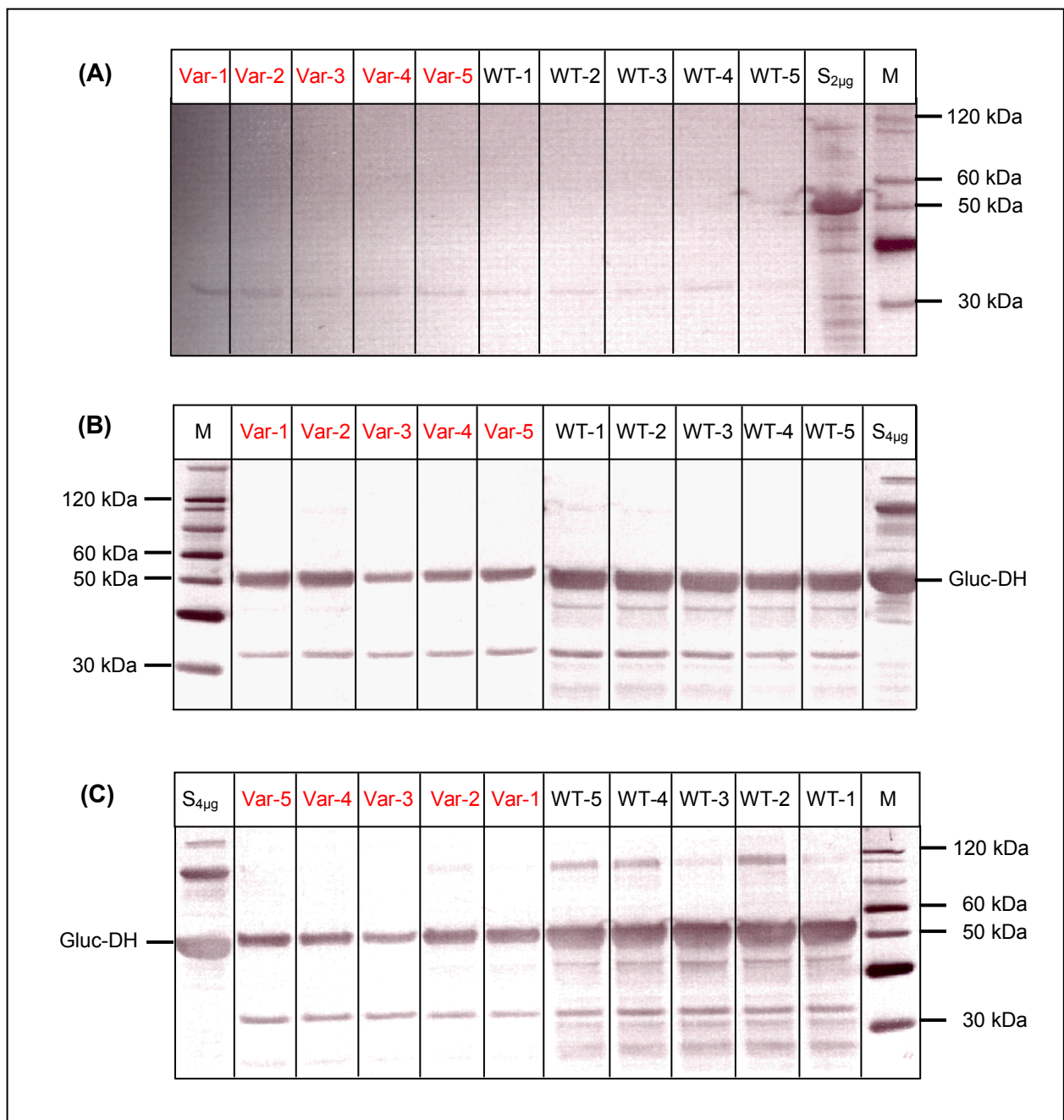


Abb. 11: Western Blot zur unterschiedlichen Expressionsleistung des Modellsystems. Die Produktionsleistung der Expressionssysteme *E. coli* XL1Blue/pQE80L-Wildtypenzym (WT) und *E. coli* XL1Blue/pQE80L-Enzymvariante (Var) wurde durch PAK<Gluc-DH>K-IgG und <K>IgG-POD zum Zeitpunkt $t_{v.l.}$ (A), $t_{1 n.l.}$ (B) und $t_{2 n.l.}$ (C) mittels Western Blot (2.5.3) analysiert. Die Zahlen 1 - 5 kennzeichnen die voneinander unabhängig generierten Versuchswiederholungen. Pro Spur wurden 0,1 OD₆₀₀/ml Gesamt-Zellextrakt aufgetragen. Als Größenstandard (M) wurde MagicMark (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die Positivkontrolle wurden 2 bzw. 4 µg Gluc-DH-Standard (S) eingesetzt.

Abb. 11 (A) zeigt, dass vor der Induktion ($t_{v.l.}$) noch keine Gluc-DH exprimiert wurde. Da zudem keine Unterschiede im Wuchsverhalten zu beobachten waren (Abb. 10), konnte $t_{v.l.}$ als Bezugspunkt für induktionsunabhängige Effekte verwendet werden. Der Zeitpunkt $t_{1 n.l.}$ (1 h

nach der Induktion) ergab Hinweise auf ein unterschiedliches Gluc-DH-Expressionsverhalten. Im Western Blot konnten zu diesem Zeitpunkt bereits stark variierende Produktmengen beobachtet werden (Abb. 11 (B)), während die Bestimmung der Zelldichte (OD_{600}) noch keinen Hinweis auf ein unterschiedliches Wuchsverhalten gab (Abb. 10). Zum Zeitpunkt $t_{2\text{ n.l.}}$ (2 h nach der Induktion) hatte sich für die Enzymvariante auch das Wuchsverhalten verändert (Abb. 10). Weiterhin weisen die Proteinbanden im Western Blot unterhalb von 50 kDa insbesondere bei der Gluc-DH Produktion im Hochproduzenten (WT) auf eine proteolytische Degradation hin (Abb. 11).

In dem *E. coli* XL1Blue/pQE80L-Expressionssystem erfolgt die Synthese von Wildtyp-Glukose-Dehydrogenase im Vergleich zur Enzymvariante mit bis zu 5-fach höheren Ausbeuten. Charakteristisch für das Wuchsverhalten des Stammes mit Wildtyp-Gluc-DH ist der Übergang in die stationäre Wachstumsphase, der bereits 2 h nach Induktion abgeschlossen ist. Dem gegenüber steht ein isogenes System für die Produktion einer Gluc-DH Enzymvariante mit deutlich niedriger Produktion des Enzyms, aber ungestörtem Wachstumsverhalten. Beide Wirt-/Vektor-Systeme unterscheiden sich genetisch nur in sieben Aminosäure-Austauschen im Zielprotein (1.5).

3.2 Expression Profiling

3.2.1 2-D Gelelektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode etabliert werden, welche die Aufnahme von Expressionsprofilen für prokaryontische Wirt-/Vektor-Systeme ermöglicht. Mit Hilfe von 2-D Gelen sollten komplexe *E. coli* Zellysate analysiert und deren Proteome miteinander verglichen werden. Die Methodenentwicklung umfasste die Etablierung eines geeigneten Protokolls für die Probenvorbereitung, die Proteinbeladung der 2-D Gele, eine geeignete Trenntechnik für die IEF und SDS-PAGE sowie die Art der Protein-Detektion.

Probenaufarbeitung

Zu Beginn der Methodenentwicklung wurde die Fraktionierung der Zellen in einen peri- und cytoplasmatischen Teil untersucht. Die Inkubationen der Proben mit Lysozym und DNase

erforderten neben physiologischen Pufferbedingungen, Temperaturen über 4 °C und hierdurch bedingt den Einsatz von Proteaseinhibitoren (Complete, Roche Diagnostics). Um die Proben mittels 2-D Gelen analysieren zu können, war zudem eine Umpufferung des Probenmaterials in denaturierenden Puffer notwendig. Die Versuche zeigten, dass die Zellfraktionierung und die enzymatische Behandlung des Probenmaterials nicht reproduzierbar umzusetzen waren. Alle Arbeitsschritte resultierten in qualitativen Proteinverlusten und damit in einer ungleich bleibenden Veränderung des Zelllysates (Daten nicht gezeigt).

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll für die Probenaufarbeitung erfüllt daher die Bedingungen eines möglichst einfachen, reproduzierbaren und das Analysenmaterial wenig verändernden Prozesses. Die Biomassen aus den Schüttelkultur-Experimenten (3.1.4) wurden zur Entfernung von Medienbestandteilen mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung (2.2) gewaschen und anschließend direkt in denaturierendem Probenpuffer (2.2) resuspendiert. Die Herstellung des Lysates wurde mittels Ultraschall vervollständigt. Im Anschluss wurden die Zelltrümmer entfernt und die lösliche Fraktion für die 2-D Gelelektrophorese verwendet (2.5.6).

Proteintrennung

Die erste Dimension der Proteintrennung (IEF) wurde nach dem Prinzip immobilisierter pH-Gradienten (IPG) durchgeführt. Für die Trennung des *E. coli* Lysates wurden IPG-Streifen verschiedener pH-Gradienten verwendet (2.5.6). Entscheidend für die Etablierung des Fokussierungsprotokolls war vor allem die Art des Probenauftrags. Die Proteine diffundierten entweder während der Rehydrierung des IPG-Streifens ein oder wurden mit geringen Strommengen in den Streifen eingezogen (*sample cup* Proben-Beladung). Hierbei war der Ort der Beladung, d. h. die Positionierung des *sample cup* auf dem IPG-Streifen, von entscheidendem Einfluss für die Proteinauflösung (Abb. 12).

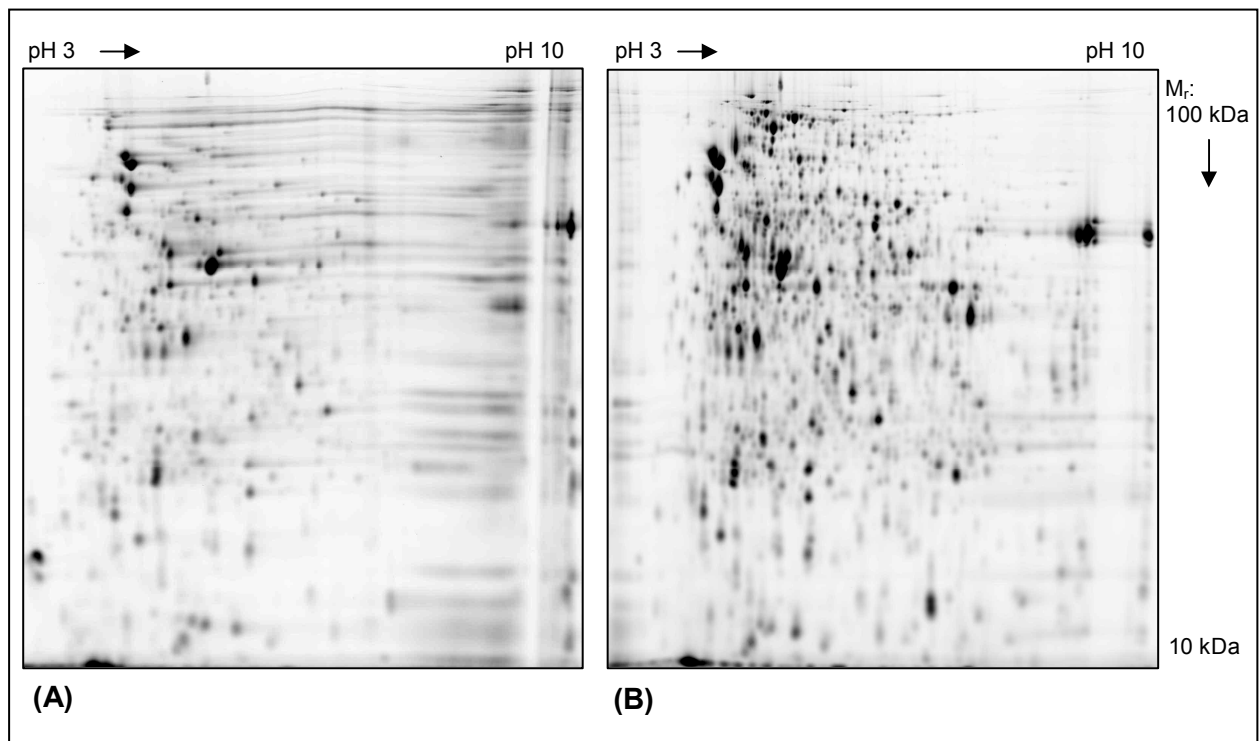


Abb. 12: Einfluss des Probenauftrags auf die Qualität der 2-D Gele. Dargestellt sind 2-D Gele, die mittels DIGE-Technologie hergestellt wurden. In diesem Fall wurden 18 cm lange IPG-Streifen mit einem pH Gradienten von 3 - 10 (nicht linear, NL) verwendet. Im linken oberen Bildrand befindet sich der hochmolekulare, saure Bereich. Der niedermolekulare, basische Bereich ist im rechten, unteren Bildrand repräsentiert. Die Auflösung der Proteinspots konnte durch die Optimierung des Fokussierungsprotokolls deutlich verbessert werden. Der Ort des Probenauftrags hat hierbei entscheidenden Einfluss auf die Gelqualität. Der einzige Unterschied in der Herstellung der gezeigten 2-D Gele ist die kathodische (A) im Vergleich zur anodischen Probenbeladung (B).

In der zweiten Dimension wurde die Proteinauflösung über die Geschwindigkeit der elektrophoretischen Trennung optimiert. Hierfür wurden Laufzeiten zwischen 6 und 20 h in der SDS-PAGE getestet.

Die Qualität der 2-D Gele hing weiterhin von der eingesetzten Proteinmenge ab. Insgesamt wurden Gelbeladungen zwischen 150 und 1500 μg Protein erprobt. Das optimierte Fokussierungsprotokoll für analytische 2-D Gele ermöglicht eine sehr gute Auflösung von 150 μg Gesamtprotein (2.5.6).

Die Identifikation der Proteine erforderte die Herstellung präparativer Gele. Um für die Massenspektrometrie genügend Probenmaterial zur Verfügung zu stellen, wurden die 2-D Gele mit 600, 750 und 900 μg Protein beladen und die Auflösung mit denen der analytischen Gele verglichen. Um eine gleich bleibende Gelqualität zu erhalten, musste eine maximale Auftragsmenge von 600 μg Protein eingehalten werden (Daten nicht gezeigt).

Protein-Detektion

Die Proteine wurde mit verschiedenen Methoden detektiert. Im Rahmen der Methodenoptimierung wurde die konventionelle 2-DE verwendet, so dass die Proteine erst nach der zweidimensionalen Trennung gefärbt wurden. In der Regel wurde hierfür Coomassie-Farbstoff verwendet. Bei Verwendung geringer Proteinmengen wurde auch der Einsatz von Fluoreszenz- (Sypro Ruby) und Silberfärbetechniken getestet und hinsichtlich einer optimalen Proteinauflösung untersucht (Daten nicht gezeigt).

Für die Vergleichsanalyse wurde die differenzielle 2-D Gelelektrophorese (DIGE) verwendet (1.3). Die Proteine werden hierbei vor der Trennung mit einem Fluoreszenzfarbstoff kovalent markiert. Diese Technik stellt hinsichtlich der Reproduzierbarkeit von 2-D Gelen eine wesentliche Verbesserung zu den konventionellen Methoden dar. Durch die Verwendung mehrerer Farbstoffe (CyTM2, CyTM3 und CyTM5), können bis zu drei Proben auf einem Gel untersucht werden. Nach der Proteintrennung werden die Farbstoffe entsprechend ihrer Anregungs- und Emissionswellenlänge in einem Fluoreszenzscanner ausgelesen. Auf diese Weise werden aus einem 2-D Gel bis zu drei Gel-Bilder generiert. Die Proben können anschließend mit einem Analysenprogramm (DeCyderTM, GE Healthcare) am Computer verglichen und ausgewertet werden. Die Methodenentwicklung der DIGE-Technologie umfasste vor allem die Optimierung der Kopplungsreaktion von Protein und Fluoreszenzfarbstoff. Dabei wurde ein optimales Verhältnis von 6 pmol Farbstoff zu einem µg Gesamtprotein ermittelt.

Aufgrund der durchgeführten Versuche konnte im Rahmen dieser Arbeit eine qualitativ hochwertige Methode für die Aufnahme von Expressionsprofilen etabliert werden. Die Art der Probenvorbereitung ermöglicht die schnelle und reproduzierbare Herstellung von *E. coli*-Ganzzelllysaten. Die Optimierung der Proteintrennung führte zu einer sehr guten Auflösung des Proteingemisches. Mit dem optimierten Protokoll können 2-D Gele mit einem immobilisierten pH-Gradienten von 3 - 10 (nicht linear, NL) oder 4 - 7 generiert werden. Für analytische 2-D Gele wurden 150 µg und für präparative 2-D Gele 600 µg Protein eingesetzt. Die Gelbeladung erfolgte durch einen anodischen Probenauftrag (2.5.6).

Abb. 13 zeigt exemplarisch den Einfluss der Optimierungsarbeiten auf die Qualität der 2-D Gele.

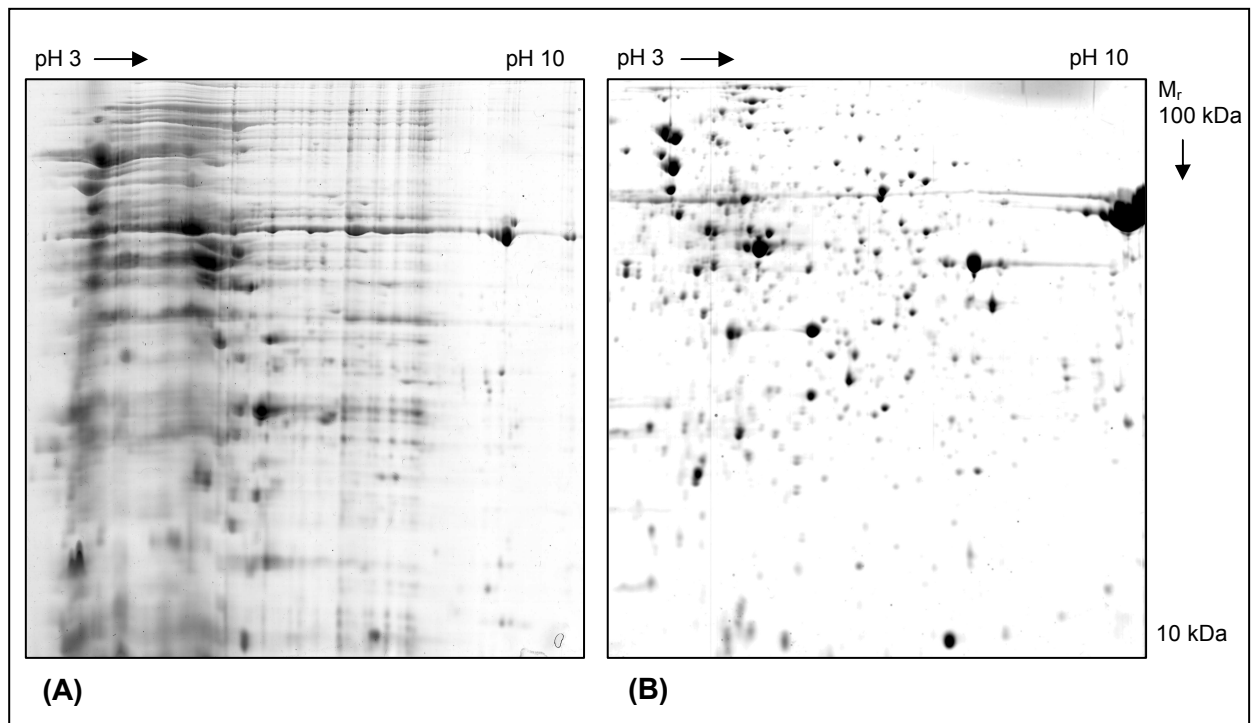


Abb. 13: Verlauf der Methodenoptimierung in der 2-D Gelelektrophorese. Dargestellt sind Coomassie gefärbte 2-D Gele, die mit 600 µg Protein aus einem *E. coli*-Ganzzelllysate hergestellt wurden. Für beide Systeme wurden 18 cm lange IPG-Streifen mit einem pH-Gradienten von 3 - 10 (nicht linear, NL) verwendet. Am linken oberen Bildrand befindet sich der saure, hochmolekulare Proteinbereich. Die Vertikale repräsentiert die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht, so dass sich am unteren, rechten Bildrand die basischen, niedermolekularen Proteine befinden. Zu Beginn der Methodenentwicklung konnten keine distinkten Proteinspots auf den 2-D Gelen generiert werden (A). Nach den Optimierungsarbeiten hinsichtlich Probenvorbereitung, Menge und Art der Proteinbeladung, sowie der Fokussierung konnten die Proteine in hoher Qualität separiert werden (B).

3.2.2 Statistische Aspekte

Die auf 2-D Gelen basierende Analyse von *E. coli*-Ganzzelllysaten wurde im Folgenden unter statistischen Aspekten untersucht. In Abhängigkeit von der technischen Variation innerhalb der Methode und der biologischen Variation der Zelle (1.4) sollte eine Reihe von statistischen Vorversuchen durchgeführt werden. Um den Informationsgehalt aus der Vergleichsanalyse zu maximieren, sollte die Größenordnung signifikant nachweisbarer Expressionsunterschiede bestimmt werden. Dabei sollte die Möglichkeit falsch-positiver (α -Fehler) und falsch-negativer (β -Fehler) Signale berücksichtigt werden. Zuletzt sollte aus diesen Ergebnissen ein geeignetes Versuchsdesign für den Vergleich von Expressionsprofilen erstellt werden.

3.2.2.1 Fehlerquellen bei der Datenauswertung

In Abhängigkeit von der technischen Variation einer Analysenmethode und der biologischen Variation eines lebenden Systems (1.4), müssen bei der Auswertung von 2-D Gelen bestimmte Fehlerquellen berücksichtigt werden. Zum einen können Expressionsunterschiede detektiert werden, die tatsächlich nicht existieren (α -Fehler), zum anderen können real bestehende Expressionsunterschiede nicht identifiziert werden (β -Fehler).

α -Fehler

Wenn Expressionsunterschiede detektiert werden, die real nicht existieren, werden falsch-positive Ergebnisse erzeugt. Aus mathematischer Sicht handelt es sich hierbei um α -Fehler. Experimentell wurde der α -Fehler untersucht, indem eine Probe mit jeweils drei Fluoreszenzfarbstoffen markiert und miteinander verglichen wurde. Alle Proteinunterschiede, die in diesem Fall detektiert wurden, stellten falsch-positive Signale dar. Unter Berücksichtigung der technischen und biologischen Variation (1.4) konnte somit ein falsch-positiver Expressionsunterschied quantifiziert werden, der als untere Ausschlussgrenze für den Nachweis signifikanter Expressionsunterschiede herangezogen werden konnte.

Für die praktische Bestimmung dieses Schwellenwertes mussten bestimmte Rahmenbedingungen gewählt werden. Grundlage hierfür war die Vorgabe, dass bei der Auswertung ein und derselben Probe 95 % aller Stoffwechselproteine als nicht unterschiedlich exprimiert galten. Daraus ergab sich eine Restwahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ für falsch-positive Detektionen oberhalb dieses minimal detektierbaren Expressionsunterschiedes (3.2.2.2).

β -Fehler

Werden in der 2-D Gelanalyse reale Expressionsunterschiede nicht erfasst, handelt es sich um falsch-negative Detektionen bzw. β -Fehler. Die Wahrscheinlichkeit für einen β -Fehler wurde anhand der Daten zur Bestimmung des minimal nachweisbaren Expressionsunterschiedes bestimmt. Somit wurde in Abhängigkeit des α -Fehlers die Möglichkeit abgeschätzt, falsch-negative Signale zu detektieren (3.2.2.2).

3.2.2.2 Statistische Versuchsreihe

Versuchsdurchführung

Um einschätzen zu können, welchen Einfluss die technischen und biologischen Variationen auf die Auswertung der 2-D Gele haben, wurde eine Reihe von Versuchen unter statistischen Aspekten durchgeführt.

Hierfür wurde eine Probe eines *E. coli*-Ganzzelllysates verwendet und mit der DIGE-Methode (2.5.6) in drei technischen Replikaten (1.4) analysiert. Aufgrund der Verwendung von drei Fluoreszenz-Farbstoffen wurden pro 2-D Gel drei Gelbilder erzeugt und miteinander verglichen. Dieser Versuch wurde mit jeweils zwei weiteren *E. coli*-Ganzzelllysaten wiederholt. Insgesamt wurden somit drei biologische Replikate verwendet und in jeweils drei 2-D Gelen analysiert (Tab. 7).

Tab. 7: Übersicht zur Durchführung der statistischen Versuchsreihe.

Es wurden drei biologische Proben (A, B, C) in jeweils drei technischen Replikaten (1 - 3) analysiert. Erfolgte die Auswertung für A, B und C getrennt, wurde der methodische Einfluss auf die Ergebnisse bestimmt. Wurden die biologischen und technischen Replikate zusammen ausgewertet, konnte der Einfluss des Zellstoffwechsels auf die Ergebnisse berücksichtigt werden.

Biologisches Replikat	A	B	C
	1	1	1
Technisches Replikat	2	2	2
	3	3	3

Wenn jede biologische Probe isoliert betrachtet wird (A1-3, B1-3, C1-3: 3 x 3 2-D Gele, d.h. 3 x 9 Gelbilder), kann eine Abschätzung der technischen Variation erfolgen. Erfolgt die Analyse der Gelbilder gemeinsam (ABC1-3: 9 2-D Gele, d.h. 27 Gelbilder), kann die technische durch die biologische Variation ergänzt werden.

Bei der Versuchsvorbereitung und -Durchführung wurde darauf geachtet, dass die biologischen Replikate unabhängig voneinander generiert wurden. Es wurden stets frische Vorkulturen verwendet, die Kulturmedien neu hergestellt und die Schüttelkultur-Experimente an verschiedenen Tagen durchgeführt. Die Probenaufarbeitung und Durchführung der 2-D Gelelektrophorese (DIGE) erfolgte unabhängig voneinander. Um dies zu gewährleisten wurden jeweils neue Puffer und Lösungen hergestellt sowie frisch produzierte 2-D Gele verwendet.

Datenauswertung

Für die Auswertung der 2-D Gele mussten bestimmte Rahmenbedingungen gewählt werden. Ein Protein, das für die Bildanalyse verwendet wurde, musste in allen Bildern eines 2-D Gel Datensatzes vorkommen. Bei einem Datensatz von drei 2-D Gelen wurden laut Versuchsdurchführung (Tab. 7) 3 x 3 Gelbilder erzeugt (3-Farbstoff-Versuchsdesign). Das Protein musste somit in allen neun 2-D Gelbildern detektiert werden, um bei der Auswertung berücksichtigt zu werden. Zusätzlich wurde der für jedes Protein kalkulierte p-Wert als Qualitätskontrolle für die Aussagekraft des detektierten Proteinunterschiedes herangezogen. Der p-Wert wurde mit dem statistischen Student t-Test berechnet (DeCyder™). Hierbei werden die Hypothesen (H_1) miteinander verglichen, dass zwischen zwei Vergleichsproben kein (H_0) bzw. ein signifikanter (H_1) Expressionsunterschied besteht. Falls der berechnete p-Wert $\leq 1\%$ war, wurde H_1 angenommen.

Minimal detektierbarer Expressionsunterschied

Auf den 2-D Gelen wurden zwischen 1754 und 1770 Proteinspots detektiert. Für die Analyse der technischen Variation wurden die Daten aus den 2-D Gelen in den Kombinationen A1/A2, A2/A3, A1/A3; B1/B2, B2/B3, B1/B3; C1/C2, C2/C3, C1/C3 (Tab. 7) verglichen und jede biologische Probe somit isoliert betrachtet. Dabei wurden durchschnittlich 76,5 % der Proteine auf allen Gelbildern in A, B bzw. C detektiert. Unter der Voraussetzung von $\alpha = 5\%$ (3.2.2.1), wurde anschließend ein minimal nachweisbarer Expressionsunterschied bestimmt. Hierfür musste der Datensatz 95 % aller gemessenen Expressionsunterschiede enthalten. Da alle Proteinunterschiede theoretisch nicht existieren dürften, waren sie allein auf die Analysenmethode zurückzuführen. Auf diese Weise wurde der kleinste messbare Expressionsunterschied mit dem Faktor 1,28 bestimmt.

Um die biologische Variation zu berücksichtigen, wurden die 2-D Gele nach folgendem Schema ausgewertet (Tab. 8).

Tab. 8: Übersicht zur kombinatorischen Auswertung der statistischen Versuchsreihe. Indem die 2-D Gele der biologischen Replikate kombiniert und die Datensätze 1 und 2 miteinander verglichen wurden, konnte der Einfluss der biologischen inklusive der technischen Variation für die Auswertung berücksichtigt werden. Für die Analyse wurden alle drei Gele der biologischen Replikate A, B bzw. C verwendet. Es wurden nur jene Proteinspots verwendet, die in allen Gelbildern detektiert wurden. Der minimal nachweisbare Expressionsunterschied wurde unter der Voraussetzung von $\alpha = 5\%$ bestimmt.

Auswertung	Datensatz 1	Datensatz 2	Σ detektierter Proteinspots	Anteil identischer Proteinspots in allen Gelen [%]	Expressionsunterschied
1	A	B	1762	44	1,40
2	B	C	1763	38	1,34
3	A	C	1771	46	1,49
4	AB	C	1766	34	1,35
5	BC	A	1766	34	1,37
6	AC	B	1766	34	1,27

Der Expressionsunterschied lag durchschnittlich bei einem Faktor von 1,37. Als minimal nachweisbarer Schwellenwert wurde daher ein Expressionsunterschied von 1,40 festgelegt. Aufgrund der strikt gewählten Rahmenbedingungen für die Datenauswertung ging die Anzahl der Proteinspots, die für die Analyse verwendet wurden, im Vergleich zur technischen Variation von 75 % auf 34 % zurück.

Wahrscheinlichkeit für falsch-negative Detektionen

Um die Wahrscheinlichkeit für falsch-negative Signale abschätzen zu können, wurden die Daten zur Bestimmung der technischen und biologischen Variation verwendet (Tab. 7). Die Proteine wurden entsprechend ihres Expressionsunterschiedes gruppiert und ihre Häufigkeit im Vergleich von Datensatz 1 und 2 (Tab. 8) gegenübergestellt (Abb. 14).

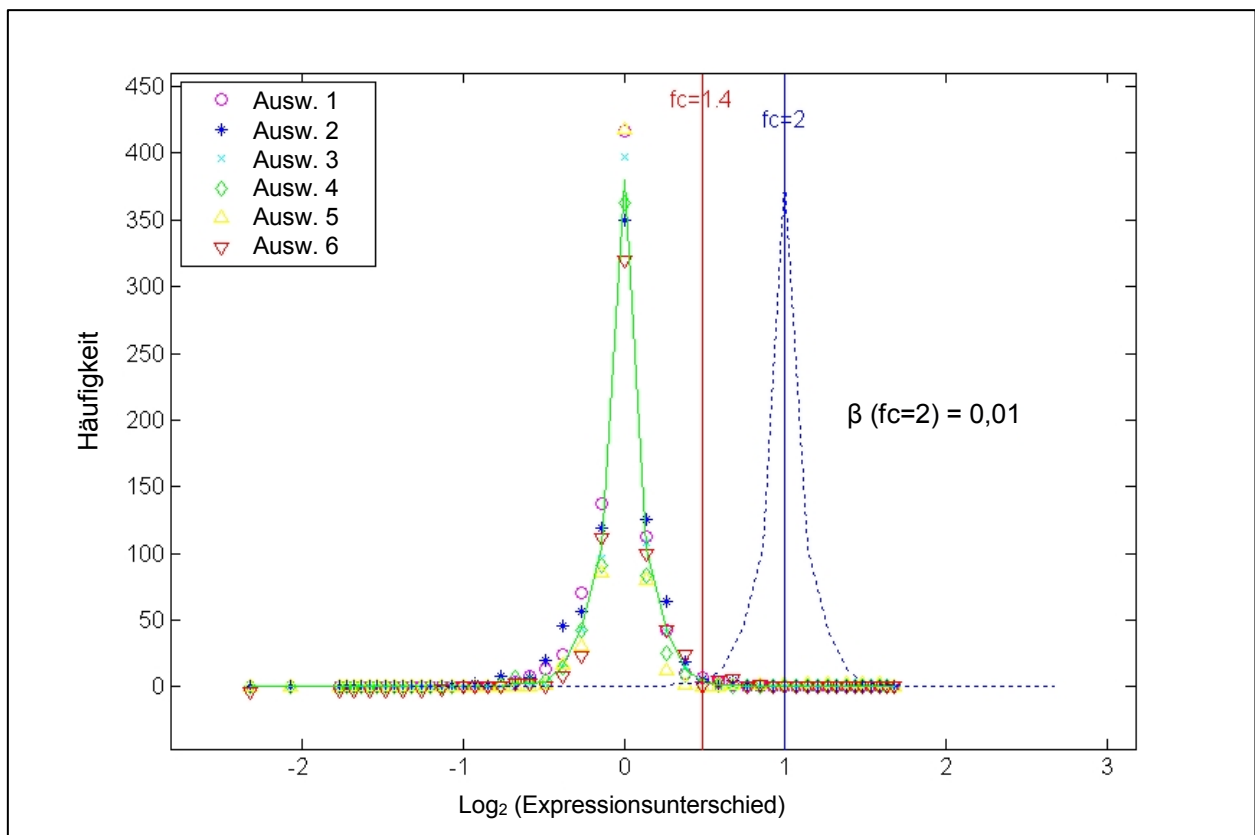


Abb. 14: Abschätzung des β -Fehlers anhand der statistischen Vorversuche.

Die Häufigkeitsverteilung (grün) wurde aus den Daten der statistischen Versuchsreihe (Tab. 8) erstellt, indem die Expressionsunterschiede (fc) der Auswertungen 1 - 6 (Ausw. 1 - 6) verwendet wurden. Indem die Kurve (grün) entlang der Abszisse verschoben wurde (blau), konnte die Wahrscheinlichkeit für einen β -Fehler bei einem Expressionsunterschied von Faktor 2 abgeschätzt werden. Diese lag bei 1 % (Erläuterungen siehe Text).

Die Abschätzung des β -Fehlers erfolgte unter der Annahme, dass die Häufigkeitsverteilung aller Proteine bei steigenden Expressionsunterschieden gleich bleibt. Die Kurve wurde unter Berücksichtigung des minimal nachweisbaren Expressionsunterschiedes von 1,4 auf der Abszisse verschoben. Bei einem Expressionsunterschied von 2 lag 1 % der Proteine innerhalb des minimal nachweisbaren Detektionsbereiches. Somit betrug die Wahrscheinlichkeit für eine falsch-negative Detektion bei einem zweifachen Expressionsunterschied $\leq 1\%$ (Abb. 14).

3.2.2.3 Präferenzreaktionen bei der Proteinmarkierung

Um einschätzen zu können, ob die Fluoreszenzfarbstoffe mit einzelnen Proteinen aus dem *E. coli*-Ganzzelllysate bevorzugt reagierten, wurde ein Versuch zu Präferenzreaktionen bei der Proteinmarkierung durchgeführt (Ettan DIGE User Manual).

Hierfür wurde eine Probe mit den Farbstoffen CyTM2, CyTM3 und CyTM5 markiert (2.5.6) und in drei technischen Replikaten (1.4) analysiert. Die Auswertung ein und derselben Probe sollte theoretisch keine Expressionsunterschiede zeigen. Alle Proteinunterschiede $\leq 1,4$ können auf die Methode der 2-D Gelelektrophorese zurückgeführt werden. Bei Proteinen, die einen höheren Expressionsunterschied zeigen, können die Ergebnisse entweder auf einen falsch-positiven Fehler ($\alpha < 5\%$) oder auf eine Präferenzreaktion mit den Fluoreszenzfarbstoffen zurückzuführen sein.

Die Analyse zeigte, dass 47 von 1332 Proteinspots sowohl in allen neun Gelbildern vorkamen als auch einen Expressionsunterschied $\geq 1,4$ aufwiesen. Darunter zeigten sieben Proteine einen p-Wert $> 0,01$ (Student t-Test, 3.2.2.2). Insgesamt unterschieden sich 90 % der Proteine um einen Faktor kleiner als zwei. 20 von 40 Proteinspots waren hierbei 1,40- bis 1,49-fach unterschiedlich exprimiert. Insgesamt waren drei Proteine um einen Faktor größer zwei unterschiedlich exprimiert (Proteinspots 1766, 1774 und 1916).

Um die Wahrscheinlichkeit der korrekten Analyse für ein identifiziertes Markerprotein zu erhöhen, wurden bei der Auswertung der Hauptstudie alle Proteinunterschiede nochmals auf Präferenzreaktionen mit den Fluoreszenzfarbstoffen untersucht.

3.2.2.4 Versuchsdesign

Durch die statistische Versuchsreihe war es möglich, in der Vergleichsanalyse von Hoch- und Niedrigproduzent auf die Herstellung technischer Replikate zu verzichten. Vielmehr wurde die Anzahl der biologischen Replikate erhöht, um den Informationsgehalt auf der Ebene von Variationen im Zellstoffwechsel zu maximieren. Insgesamt wurden fünf biologische Replikate für die Expressionsprofil-Analyse eines Kultivierungszeitpunktes eingesetzt.

Durch die Verwendung eines 3-Farbstoff-Versuchsdesigns konnten drei Proben auf einem 2-D Gel analysiert werden. Zwei Farbstoffe (CyTM3 und CyTM5) wurden für die Proben des Hoch- bzw. Niedrig-Expressionssystems eingesetzt, der dritte Farbstoff (CyTM2) wurde für den internen Standard verwendet. Dieser setzte sich zu gleichen Teilen aus allen Proben, die zu einem Kultivierungszeitpunkt analysiert wurden, zusammen. Durch die Verwendung eines internen Standards können Gel zu Gel-Variationen erkannt und von biologischen Variationen unterschieden werden (1.3). Alle Proben, die aus einem individuellen Schüttelkulturexperiment stammten (WT und Var), wurden auf das gleiche 2-D Gel aufgetragen. Hierbei handelt es sich um ein sog. „angepasstes Versuchsdesign“ (*matched design*). Auf diese Weise konnte gewährleistet werden, dass alle Parameter, die nicht Ursprung der biologischen Variation waren, keinen Einfluss auf die Versuchsergebnisse hatten. Um potenzielle Einflüsse der

Fluoreszenzfarbstoffe auf die Interpretation der Daten zu minimieren (3.2.2.3), wurden Hoch- und Niedrigproduzent alternierend mit den Farbstoffen CyTM3 und CyTM5 markiert (*reverse labelling*). Für die Aufnahme von Expressionsprofilen wurde folgender Versuchsplan aufgestellt (Tab. 9).

Tab. 9: Finales Versuchsdesign für die Aufnahme von Expressionsprofilen zum Kultivierungszeitpunkt t_i . Die Proben des Hoch- (H) und Niedrigproduzenten (N) wurden alternierend mit den Farbstoffen CyTM3 und CyTM5 markiert. Der Fluoreszenzfarbstoff CyTM2 wurde für den internen Standard verwendet. Die biologischen Replikate wurden mit den Zahlen 1 bis 5 gekennzeichnet. Für die Analyse eines Kultivierungszeitpunktes (t_i) wurden fünf 2-D Gele hergestellt, die bei der Datenauswertung jeweils drei 2-D Gelbilder lieferten.

2-D Gel	Farbstoff Cy TM 3	Farbstoff Cy TM 5	Farbstoff Cy TM 2
1	H1	N1	H1, N1, H2, N2, H3, N3, H4, N4, H5, N5
2	N2	H2	
3	H3	N3	
4	N4	H4	
5	H5	N5	

Mit der 2-D Gelelektrophorese wurde eine Methode etabliert, die sich für die proteomweite Analyse von Expressionsprofilen eignet. Unter Verwendung der DIGE-Technik konnte die Methode für die Analyse von *E. coli*-Ganzzelllysaten optimiert werden. Im Rahmen einer statistischen Versuchsreihe wurde die Technologie unter Berücksichtigung der technischen und biologischen Variationen bewertet. Letztlich konnte ein Versuchsdesign erstellt werden, mit dem die Expressionsprofile des ausgewählten Modellsystems (3.1) mit maximalem Informationsgewinn analysiert werden konnten.

3.3 Expressionsanalyse

3.3.1 Durchführung der Expressionsanalyse

Für die Herstellung der Expressionsprofile wurden die Biomassen aus fünf Schüttelkultur-Experimenten verwendet. Die biologischen Replikate wurden unabhängig voneinander generiert. Die Proben wurden individuell aufbereitet und das *E. coli*-Ganzzellextrakt mittels 2-D Gelelektrophorese analysiert (2.5.6). Die Expressionsprofile der Kultivierungszeitpunkte vor Induktion (t_0), 1 h nach Induktion (t_1) und 2 h nach Induktion (t_2 , Abb. 10) wurden anhand des beschriebenen Versuchsdesigns untersucht (Tab. 9). Die Analyse der drei

Kultivierungszeitpunkten (t_0 , t_1 , t_2) umfasste 15 2-D Gele. Unter Verwendung von drei Fluoreszenzfarbstoffen (CyTM2, CyTM3 und CyTM5) entstanden drei Bilder pro 2-D Gel. Somit wurden für die Bildanalyse (DeCyderTM) insgesamt 45 Gelbilder ausgewertet.

Die Analyse der Proteomdaten erfolgte unter der Voraussetzung von $\alpha = 5\%$. Demnach wurden alle Expressionsunterschiede $\geq 1,4$ als signifikant bewertet. Zudem musste ein Proteinspot in allen Gelbildern des zugehörigen Datensatzes (t_i) vorkommen und einen p-Wert $\leq 1\%$ aufweisen, um in der Vergleichsanalyse berücksichtigt zu werden (3.2.2.2).

Die Identifizierung der Proteinspots erfolgte mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS). Hierfür wurden präparative 2-D Gele hergestellt und mittels MALDI-TOF analysiert (2.5.7).

3.3.2 Auswertung der Expressionsanalyse

Die Auswertung der Vergleichsanalyse erfolgte auf mehreren Ebenen. Zum einen sollte untersucht werden, ob die Methode der DIGE-Technik für den Ansatz des *expression profiling* geeignet ist. Zum anderen sollte das Verständnis für das unterschiedliche Expressionsverhalten von Hoch- und Niedrigproduzent erhöht werden, indem signifikant unterschiedlich exprimierte Proteinspots detektiert, die entsprechenden Proteine identifiziert und deren physiologische Einflüsse im Zellstoffwechsel beurteilt werden.

3.3.2.1 Hauptkomponentenanalyse

Ziel der Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) ist es, die Komplexität mehrdimensionaler Datensätze zu reduzieren, um deren Auswertung und Visualisierung zu vereinfachen. Die PCA ist ein mathematisches Verfahren, das sich durch lineare Transformation auszeichnet. Hierbei werden die Daten in ein neues Koordinatensystem transformiert, indem deren größte Variation auf die erste Hauptkomponenten-Achse projiziert wird, die zweitgrößte Variation auf die zweite Hauptkomponenten-Achse usw. Die PCA berücksichtigt somit die Charakteristika, die am meisten zur Variation des Gesamtsystems beitragen. Diese werden in den niedrigen Hauptkomponenten ausgedrückt (De Keersmaecker *et al.*, 2006). Die Variationen eines Systems werden somit durch Punktabstände der Systemkomponenten im neuen Koordinatensystem beschrieben. Je größer der Abstand der Punkte voneinander ist, desto größer ist die Variation zwischen den Systemkomponenten.

Die Daten der vorliegenden Vergleichsanalyse wurden mittels PCA analysiert (DeCyderTM). Abb. 15 gibt einen Überblick über die Variationen des Hoch-/Niedrig-Expressionssystems zu den Kultivierungszeitpunkten t_0 , t_1 und t_2 .

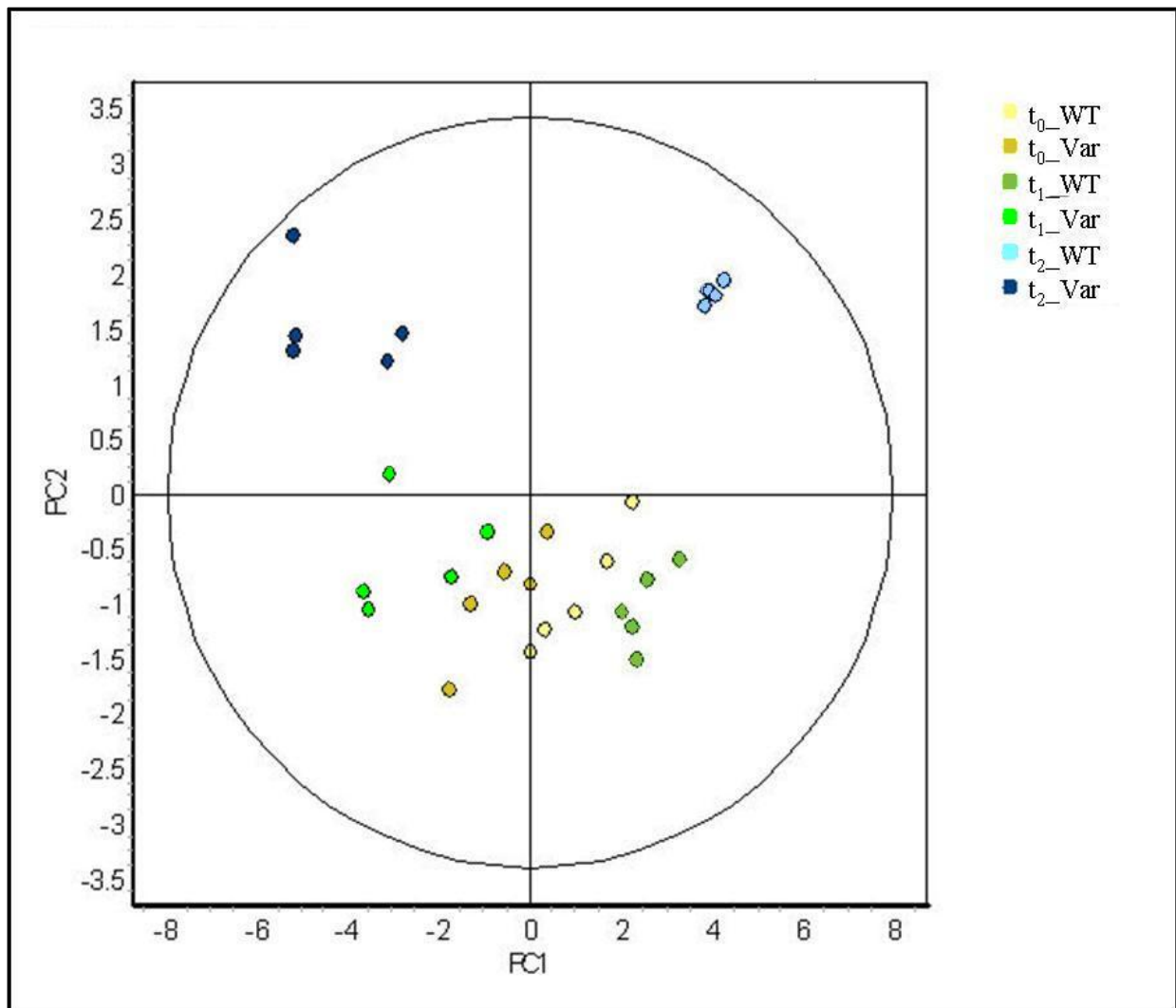


Abb. 15: Hauptkomponentenanalyse der Expressionsprofile von Hoch- und Niedrigproduzent. Die Variationen der Expressionssysteme wurden mittels PCA auf zwei Hauptkomponenten (*principal component*, PC1 und PC2) reduziert. Die Analyse spiegelt die Daten aus den Kultivierungszeitpunkten t_0 , t_1 und t_2 wider. Das Niedrig-Expressionssystem für die Gluc-DH Enzymvariante ist mit Var, das Hochexpressionssystem für das Wildtyp-Enzym mit WT gekennzeichnet. Die Bildanalyse eines Expressionssystems (WT bzw. Var) zum Kultivierungszeitpunkt t_i wird in der Grafik durch einen Punkt dargestellt. Je größer der Abstand zwischen den Punkten ist, desto größer ist die Variation zwischen den Vergleichssystemen.

Die Hauptkomponentenanalyse zeigt, dass die Datenpunkte zum Kultivierungszeitpunkt t_0 (vor Induktion) dicht beieinander liegen. Zu diesem Zeitpunkt sollten die Unterschiede zwischen den Vergleichssystemen erwartungsgemäß gering sein. Eine Stunde nach der Induktion (t_1) wird eine Zunahme der Variation beobachtet. Die Entfernung der Datenpunkte vergrößert sich sowohl innerhalb eines Expressionssystems (von t_0 nach t_1) als auch zwischen den Vergleichssystemen (Abstände zwischen t_1_WT und t_1_Var). Zum Kultivierungszeitpunkt t_2 steigt die Variation erneut an. Neben der Entfernung zwischen t_1 und t_2 innerhalb eines

Systems vergrößert sich auch der Punktabstand zwischen den Expressionssystemen (Abb. 15).

Die Unterschiede der Expressionssysteme, die bislang durch Zelldichte-Messung (Abb. 8, Abb. 10), SDS-PAGE (Abb. 9) und Western Blot Analyse (Abb. 11) charakterisiert wurden, konnten innerhalb der Hauptkomponenten-Analyse detektiert werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse (Abb. 15) konnte gezeigt werden, dass die DIGE-Technologie (1.3) dafür geeignet ist, zwei Systeme im Rahmen einer Expressionsprofil-Analyse miteinander zu vergleichen. Im Gegensatz zur herkömmlichen Analytik ist somit die Möglichkeit gegeben, die Ursache dieser Unterschiede durch eine detaillierte Stoffwechselanalyse zu identifizieren.

3.3.2.2 Bildanalyse

Durch die Bildanalyse der 2-D Gele wurden unter den definierten Rahmenbedingungen (3.3.1) 363 Proteinspots detektiert, die entweder zum Zeitpunkt t_0 , t_1 oder t_2 unterschiedlich exprimiert wurden.

Zum Zeitpunkt t_0 (vor der Induktion) wurden 25 Expressionsunterschiede detektiert. Hiervon wurden 22 Proteine im Hochproduzenten (WT) überexprimiert. Der Expressionsunterschied war bei 54 % der Spots $< 2,0$. Die im Niedrigproduzenten (Var) überexprimierten Proteine lagen mit Faktoren zwischen 1,40 und 1,55 nahe der unteren signifikanten Nachweisgrenze. Neun Proteine waren eine Stunde nach der Induktion (t_1) nicht mehr unterschiedlich exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt stieg die Anzahl der verschieden exprimierten Proteine auf 91 an. 63 % wurden dabei im WT-System überexprimiert. 15 Spots wurden bereits zum Zeitpunkt t_0 detektiert. Zum Zeitpunkt t_2 (2 h nach der Induktion) wurden weitere 262 Spots identifiziert, die weder vor der Induktion noch zum Zeitpunkt t_1 zu beobachten waren.

Für die Interpretation der Daten wurden die Proteine priorisiert. Die Proteine, die bereits vor der Induktion (t_0) unterschiedlich exprimiert wurden, konnten als Bezugspunkt der Analyse herangezogen werden. Obwohl auf Genomebene keine Unterschiede zwischen den Stämmen existieren sollten, können sie Hinweise auf unerwartete Expressionsunterschiede liefern. Proteinunterschiede, die eine Stunde nach der Induktion auftreten, können einen größeren Einfluss auf die heterologe Proteinexpression als solche haben, die erst zwei Stunden nach Induktion unterschiedlich exprimiert werden. Proteinspots, die sich vor dem Zeitpunkt t_2 nicht unterschieden, wurde die geringste Priorität zugewiesen. Unter diesen Voraussetzungen reduzierte sich die Anzahl der zu analysierenden Proteinspots auf 170.

3.3.2.3 Massenspektrometrische Analyse

Die Identifikation der Proteine erfolgte mittels Massenspektrometrie (2.5.7). Von den 170 untersuchten Proteinspots konnten 54 % identifiziert werden. Darunter wurden 10 Proteine identifiziert, deren Funktion im Stoffwechsel von *E. coli* noch unbekannt ist. Bei der MS-Analyse wurden teilweise mehrere Proteine innerhalb eines Spots detektiert, so dass in 81 Spots 110 verschiedene Proteine identifiziert wurden. Zum Analysenzeitpunkt t_0 konnten 18 Proteinspots identifiziert werden, wovon in sieben Spots mehr als ein Protein detektiert wurde. Eine Stunde nach der Induktion (t_1) wurden 51 Proteinspots analysiert. Bei 41 % wurden mehrere Proteine pro Spot gefunden. Insgesamt konnten 38 Proteinspots einem definierten Protein zugewiesen werden.

3.3.2.4 Stoffwechselanalyse

Um eine Übersicht des unterschiedlichen Stoffwechselverhaltens von Hoch- (WT) und Niedrigproduzenten (Var) zu erhalten, wurden die Expressionsprofile in einem ersten Schritt global ausgewertet. Hierfür wurden die Proteine entsprechend ihrer Stoffwechselfunktion gruppiert. Durch eine weiterführende, detaillierte Analyse sollten Hinweise für eine rational geführte Expressionsoptimierung des Niedrigproduzenten erarbeitet werden.

Globale Stoffwechselanalyse

Für die globale Analyse der Stoffwechseldaten erfolgte eine Einteilung in die Bereiche Katabolismus, Anabolismus und Adaption. Im Bereich „Katabolismus“ wurden alle identifizierten Proteine aus Stoffwechselwegen für den Zuckerabbau eingeordnet. In der Gruppe „Anabolismus“ wurden Proteine aufgeführt, die in der Nukleinsäure-, Aminosäure-, Lipid- und Zucker-Synthese von Bedeutung sind. Proteine, die mit der Anpassung von Zellen an sich ändernde Umweltbedingungen zusammenhängen, wurden dem Bereich „Adaption“ zugeordnet.

Tab. 10 gibt einen Überblick über die Anzahl der Proteine, die dem jeweiligen Bereich zugeordnet wurden. Da einzelne Proteine teilweise mehreren Untergruppen zugeordnet werden konnten, sind Mehrfachnennungen eines identifizierten Proteins möglich.

Tab. 10: Globale Stoffwechselanalyse der Expressionsprofil-Daten.

Die Proteine, deren Expression im Hoch- und Niedrigproduzenten verändert ist, wurden nach Stoffwechselfunktion gruppiert. Die Anzahl der Proteine innerhalb einer Gruppe wurde entsprechend ihres Vorkommens im jeweiligen Expressionssystem gegenübergestellt.

Bereich	Gruppe	Anzahl identifizierter Proteine	
		Hochproduzent (WT)	Niedrigproduzent (Var)
Katabolismus	Zucker-Abbau	5	8
Anabolismus	Aminosäure-Synthese	6	2
	Nukleinsäure-Synthese	6	14
	Zucker-Synthese	2	1
	Lipid-Synthese	3	1
Adaption	Transkription	1	1
	Translation & Modifikation	3	10
	Transport	3	3
	Äußere Membran	8	2
	Globale Regulatoren	2	1
	Detoxifikation	1	2
	Allgemeiner Stress	4	3
	Degradation	12	4
	Zellentwicklung	5	0
	Cofaktoren & Carrier	4	1

Bei der Analyse der Proteomdaten war besonders auffallend, dass innerhalb der Hauptgruppe „Anabolismus“ viele Proteine aus der Purin- und Pyrimidin-Synthese in der Expression betroffen waren. Im Rahmen der Zellreaktion auf sich ändernde Umweltbedingungen, konnten die meisten Gruppen im Bereich „Adaption“ definiert werden. So wurden z. B. der Gruppe „Allgemeiner Stress“ Hitzeschockproteine und der Sigma Faktor 38 oder der Gruppe „Degradation“ Proteine für den Abbau von RNA oder Eiweißen zugeordnet. Die Gruppe „Zellentwicklung“ umfasste beispielsweise Proteine für den Aufbau von Peptidoglykan oder Proteine, die bei der Zellteilung eine Rolle spielen.

Detaillierte Stoffwechselanalyse

Eine detaillierte Analyse der Expressionsdaten wurde mit Hilfe der zuvor definierten Stoffwechselgruppen durchgeführt. Die Proteine wurden anhand ihres Expressionsunterschiedes und des zugehörigen p-Wertes aus dem Student t-Test (3.2.2.2) zu

den Kultivierungszeitpunkten t_0 , t_1 und t_2 bewertet. Eine Übersicht der Daten ist im Anhang aufgeführt.

Im Bereich „**Katabolismus**“ wurden vor allem im Var-System viele Proteine detektiert, die im Bereich der Substratkettenphosphorylierung eine Rolle spielen. Aus der Glykolyse wurden die Enzyme Phosphoglycerat-Kinase (Pgk) und Phosphoglycerat-Mutase (GpmA) identifiziert. Pgk katalysiert unter Bildung von ATP die Umwandlung von 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat. Im Anschluss wird 3-Phosphoglycerat mittels GpmA in 2-Phosphoglycerat umgewandelt. Beide Proteine wurden im Niedrigproduzenten (Var) um den Faktor 1,4 (t_1) bzw. 2,3 bis 2,6 (t_2) überexprimiert. Neben Enzymen aus der Glykolyse wurde auch die 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Aldolase (KDPG-Aldolase, Eda) im Niedrigproduzenten detektiert. Die KDPG-Aldolase katalysiert im Entner-Doudoroff-Abbauweg die Umwandlung von KDPG zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Im Vergleich zum WT-System wurde sie um die bis zu 2,3-fache Menge (t_2) überexprimiert. Der weitere Abbau von Pyruvat zu Acetyl-CoA kann durch den Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex erfolgen. Im Niedrig-Expressionssystem wurde AceE um einen Faktor bis zu 2,2 (t_1) überexprimiert. AceE ist Bestandteil der Pyruvatdehydrogenase (E1) im Multienzymkomplex und am ersten Schritt der Umwandlung zu Hydroxyethyl-TPP beteiligt. Beim weiteren Abbau von Acetyl-CoA durch den Tricarbonsäure-Zyklus (TCA) wurde die Malat-DH (Mdh) detektiert, die bis zu einem Faktor von 3,0 (t_2) im Niedrigproduzenten überexprimiert wurde. Im Hochproduzenten hingegen fielen aus dem TCA die Enzyme Ketoglutarat-DH (SucB) und eine Untereinheit der Succinat-DH (SdhA) auf. Während SdhA bei der Regeneration des Oxalacetats beteiligt ist, katalysiert SucB unter Bildung von Reduktionsäquivalenten die irreversible oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat. Die Proteine wurden um Faktoren von -2,9 (SdhA, t_2) bzw. bis zu -4,4 (SucB, t_1) überexprimiert. Weiterhin wurden im Niedrigproduzenten die Transketolase (TktA) aus dem Pentosephosphat-Weg detektiert. Die Reduktion von Flavin, Riboflavin, FMN oder FAD wird durch die Flavin-Reduktase (UbiB) katalysiert, die im Hochproduzenten bis zu einem Faktor von -2,3 (t_1) überexprimiert wurde. Aus dem Bereich der Elektronentransport-Phosphorylierung wurden die α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase (AtpA, AtpD) identifiziert.

Im Bereich „**Anabolismus**“ wurden Proteine für die Aminosäure-, Nukleinsäure-, Zucker- und Lipid-Synthese unterschieden. In der Gruppe der Aminosäure-Synthese wurden vor allem Enzyme im WT-Expressionssystem überexprimiert. So fielen Enzyme für die Synthese von Cystein (CysK), Lysin (DapA) und Phenylalanin (PheA) auf. Ebenso wurden die Enzyme LeuA, LeuC und IlvB detektiert, die bei der Synthese von Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten

eine Rolle spielen. Im Vergleich dazu wurden im Niedrigproduzenten die D-3-Phosphoglycerat-Kinase (SerA) für die Herstellung von Serin und die Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA) für die Synthese von Glycin überexprimiert.

Die meisten anabolen Proteine konnten der Gruppe „Nukleinsäure-Synthese“ zugeordnet werden. Im Niedrigproduzenten (Var) wurden hierbei mehr als doppelt so viele Enzyme mit veränderter Expression detektiert als im WT-System. Grundsätzlich kann unterschieden werden, ob die Nukleinsäuren *de novo* synthetisiert oder aus bestehendem Zellmaterial regeneriert werden. Tab. 11 gibt einen Überblick über die identifizierten Enzyme, ihre Expressionsfaktoren und die von ihnen katalysierten Reaktionen.

Tab. 11: Übersicht der detektierten Proteine für die Nukleinsäure-Synthese im Bereich der Regeneration bestehenden Zellmaterials. Die Expressionsfaktoren (fc) kennzeichnen den Grad der Überexpression. Die Proteine mit negativem Vorzeichen wurden im Hochproduzenten (WT) überexprimiert.

Protein		Stoffwechselweg	Nukleinsäure	fc (t ₀)	fc (t ₁)	fc (t ₂)
Amn	AMP Nukleosidase	H ₂ O + AMP ↔ Adenin + D-Ribose-5-Phosphat	Adenin- und Hypoxanthin-Nukleoside	-1,83	-1,76	-2,45
Apt	Adenin-phosphoribosyl-Transferase	PRPP + Adenin ↔ AMP + PP _i	Adenin- und Hypoxanthin-Nukleoside	< 11,41	< 11,41	-2,16
Cmk	Cytidylat-Kinase	CMP + ATP ↔ CDP + ADP	Pyrimidin Ribonukleotide	< 11,41	1,58	2,47
CodA	Cytosin-Deaminase	H ₂ O + Cytosin ↔ Ammonium + Uracil	Pyrimidin Ribonukleotide	< 11,41	1,50	2,95
				< 11,41	< 11,41	-2,16
DeoC	2-Deoxyribose-5-phosphat-Aldolase	Deoxyribose-5-P ↔ Acetaldehyd + D-Glycerinaldehyd-3-P	Abbau von Purin- und Pyrimidin Deoxyribonukleosiden	< 11,41	< 11,41	-2,33
GlyA	Serin-hydroxymethyl-Transferase	L-Serin + THF ↔ 5,10-methylen-THF + Glycin + H ₂ O	Purin Biosynthese aus 5,10-mTHF	< 11,41	< 11,41	2,21
				< 11,41	1,62	3,14
Gpt	Xanthin-Guanin-Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase	Xanthosin-5-P + PP _i ↔ Xanthin + PRPP; Guanin + PRPP ↔ GMP + PP _i Hypoxanthin + PRPP ↔ IMP + PP _i	Adenin- und Hypoxanthin-Nukleoside	< 11,41	< 11,41	2,20
RfbB	dTPD-Glukose-4,6-Dehydratase	dTPD-L-Rhamnose Biosynthese	Nukleoside	< 11,41	< 11,41	2,30
Udp	Uridin-Phosphorylase	P _i + Uridin ↔ Ribose-1-P + Uracil	Pyrimidin Ribonukleotide	< 11,41	1,56	2,07
				< 11,41	< 11,41	2,70

Die Neusynthese von Purinnukleotiden erfolgt über die aktivierte Pentose 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP). Diese wird aus Ribose-5-P und ATP mit Hilfe der Phosphoribosyl-pyrophosphat-Synthetase (PrsA) synthetisiert, die auch in dieser Expressionsprofil-Analyse detektiert wurde. Das bei der Reaktion freigesetzte AMP wird mittels Adenylat-Kinase (Adk) und ATP zu ADP umgewandelt. Adk wurde im Niedrig-Expressionssystem um die Faktoren 1,6 (t_1) bzw. 2,5 (t_2) überexprimiert. In der weiteren Purinsynthese wird mit Hilfe von PRPP in mehreren Reaktionsschritten Inosin-5-monophosphat (IMP) hergestellt, das als Vorstufe für die Herstellung von Adenosin-5-monophosphat (AMP) bzw. Guanosin-5-monophosphat (GMP) dient. 4 der 11 Pur-Enzyme, die bei der Herstellung von IMP beteiligt sind, wurden in der vorliegenden Analyse im Niedrigproduzenten überexprimiert: PurC, PurH, PurK und PurN.

Im Bereich der Pyrimidin-Synthese wurden die Proteine CarA, PyrB und PyrD detektiert. Die Herstellung von Uridin-5-monophosphat (UMP) bzw. Cytosin-5-monophosphat (CMP) erfolgt über das Zwischenprodukt Orotat, welches entweder in die Zelle transportiert oder neu synthetisiert werden kann. Die Herstellung von Orotat erfolgt aus den Bausteinen Aspartat und Carbamoylphosphat, die von der Aspartat-carbamoyl-Transferase (PyrB) katalysiert wird. Carbamoylphosphat wird mit Hilfe der Carbamoylphosphat-Synthetase (CarA) aus L-Glutamin und Hydrogencarbonat unter ATP-Verbrauch hergestellt. Beide Enzyme wurden im Niedrig-Expressionssystem detektiert. Während CarA um die 2,1-fache (t_1) bzw. 2,7-fache (t_2) Menge überexprimiert wurde, unterschied sich PyrB um die Faktoren 2,9 (t_1) bzw. 3,1 und 4,8 (t_2). Im weiteren Verlauf der Reaktion tritt Dihydroorotat auf, das mit Hilfe der Dihydroorotat-Oxidase (PyrD) unter Abspaltung von Wasserstoffperoxid zu Orotat umgewandelt wird. Die Überexpression von PyrD im Hochproduzenten war mit Faktoren von -11,5 (t_1) bzw. -5,6 (t_2) außergewöhnlich hoch.

Im Bereich „Zucker-Synthese“ konnten die Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PckA) aus der Gluconeogenese und die Glutamat-Synthase (GltD) identifiziert werden. Beide Enzyme wurden im Hochproduzenten überexprimiert. Im Niedrigproduzenten wurde die Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferase (GlmS), ein Enzym für die Herstellung von Aminoszuckern, detektiert.

In der Gruppe der „Lipid-Synthese“ fiel die Überexpression der Fab-Proteine auf. Die Herstellung von Lipiden beginnt mit der Carboxylierung von Acetyl-CoA, das in einer biotinabhängigen Reaktion durch die Acetyl-CoA-Carboxylase aktiviert wird. Der Enzymkomplex besteht aus zwei katalytischen Einheiten, welche die Synthese von Malonyl-CoA durchführen. Die Biotin-Carboxylase (AccC) stellt eine dieser Einheiten dar und wird im Hochproduzenten um die Faktoren -2,3 bzw. -3,4 (t_2) überexprimiert. Im weiteren

Reaktionsverlauf wird Malonyl-CoA mit dem Acetyl-Acyl-Carrier-Protein (Acetyl-ACP) zu Acetoacetyl-ACP umgesetzt. Die Reaktion wird durch die β -Ketoacyl-ACP-Synthase (KAS) katalysiert. In *E. coli* existieren drei verschiedene KAS. In der vorliegenden Analyse wurden KasII (FabF) und KasIII (FabH) im Hochproduzenten überexprimiert. KasII spielt bei der temperaturabhängigen Regulation für die Fettsäurezusammensetzung eine wichtige Rolle und wird für die Kettenverlängerung von Palmitoleat benötigt (fc -4,0 (t_2)). Die Produkte, die mit Hilfe von KasIII (FabH) hergestellt werden, sind kürzer als bei KasI oder KasII. Im Gegensatz zu diesen Enzymen verwendet KasIII für die Reaktion Acetyl-CoA anstatt Acetyl-ACP (fc -1,4 (t_0), -2,7 (t_1), -6,9 (t_2)). Während im Hochproduzenten die überexprimierten KAS-Enzyme eine wichtige Rolle spielten, wurde im Niedrigproduzenten die β -Ketoacyl-ACP-Reduktase (FabG) um die Faktoren 1,9 (t_1) bzw. 4,8 (t_2) überexprimiert. FabG ist für die Elongation der Fettsäuren von Bedeutung.

Der Bereich „**Adaption**“ wurde in die Gruppen Transkription, Translation & Modifikation, Transport, Cofaktoren & Carrier, globale Regulatoren, allgemeiner Stress, Detoxifikation, Degradation, Zellentwicklung und äußere Membran unterteilt.

Proteine, die bei der Transkription der mRNA eine Rolle spielen und im Rahmen dieser Expressionsanalyse detektiert wurden, waren der Terminationsfaktor Rho (ρ), der im WT überexprimiert und die α -Untereinheit der RNA-Polymerase (RpoA), die im Niedrigproduzenten detektiert wurde. Im Bereich der Proteinbiosynthese wurden vor allem die Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen AsnS, GlyS, PheS, LysS, LysU im Var-System überexprimiert. Weiterhin wurden im Niedrigproduzenten die t-RNA-Guanin-Transglykosylase (Tgt), das L9-Protein der ribosomalen 50S-Untereinheit (RplI), der Elongationsfaktor FusA, der Terminationsfaktor Rf2 und die Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase B (PpiB) identifiziert. Im Gegensatz dazu wurden im Hochproduzenten der Transkriptions-Initiationsfaktor IF-2 (InfB), der Elongationsfaktor TufA und die Methionin-Aminopeptidase (Map) überexprimiert.

In der Gruppe „Transport“ wurden zwei Proteine des Phosphotransferase-Systems (PTS) detektiert. Im WT-Expressionssystem wurde ManX als Teil des Mannose-spezifischen und im Var-Expressionssystem Crr als Teil des Glukose-spezifischen Aufnahmesystems identifiziert. Als Bestandteile von ABC-Transportern für Thiosulfat und Ribose wurden die periplasmatischen Substratbindeproteine CysP und RbsB im Niedrigproduzenten detektiert. Im Gegensatz dazu wurden im Hochproduzenten die Proteine FhuC und OppA überexprimiert. FhuC ist als ATP-hydrolysierende Komponente Teil des Eisen(III)-Hydroxamat-ABC-Transporters. OppA fungiert als periplasmatisches Substratbindeprotein im Oligopeptid-

Transport und fiel in der Proteomanalyse durch besonders hohe Expressionsfaktoren von $-5,2$ (t_1) und $-10,6$ (t_2) auf (Abb. 16).

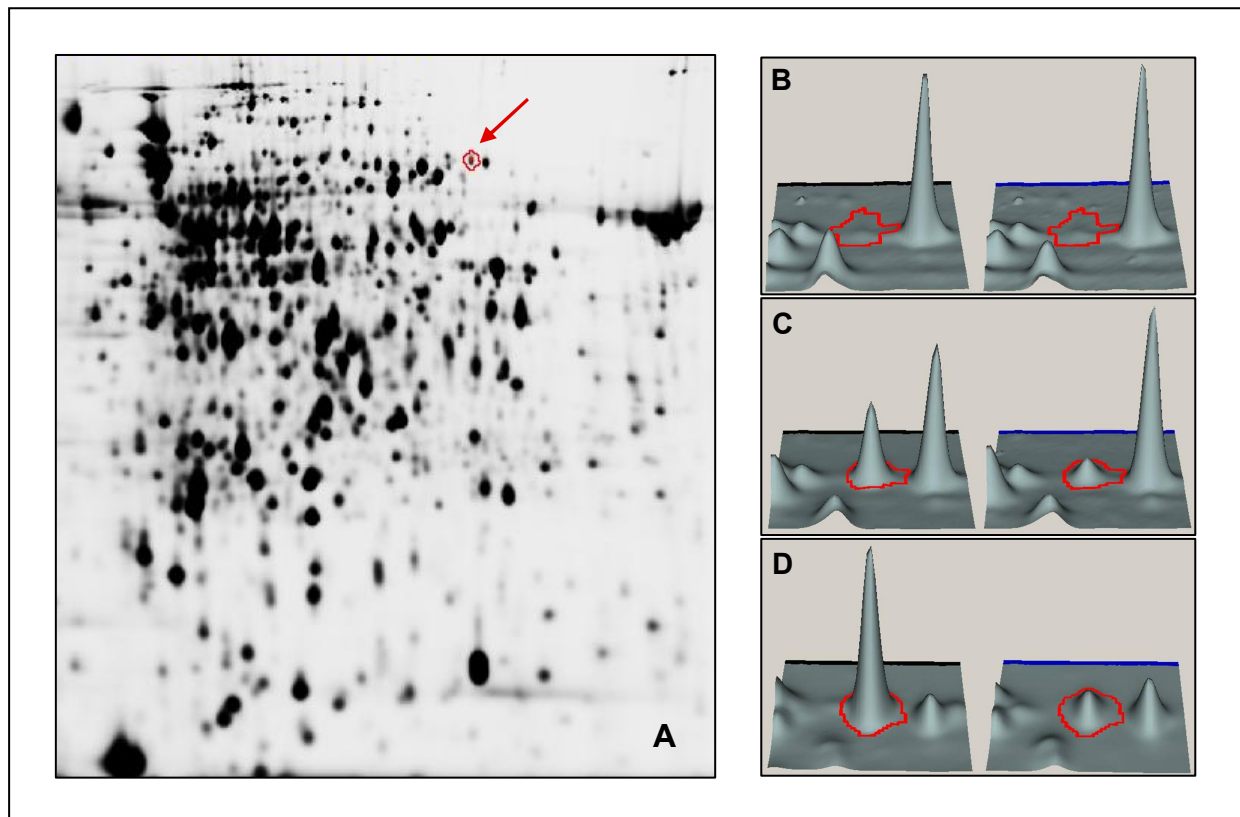


Abb. 16: Expressionsprofil von OppA zu den Kultivierungszeitpunkten t_i . Das periplasmatische Substratbindeprotein OppA fiel in der Proteomanalyse durch besonders hohe Expressionsunterschiede auf. Mit Hilfe des Auswerteprogramms DeCyder™ wurde OppA im 2-D Gel lokalisiert (B). In den Abb. C - D sind die Proteinspots über den Kultivierungsverlauf im Vergleich von Hoch- (schwarzer Bildrand) und Niedrig-Produzent (blauer Bildrand) gegenübergestellt. Vor der Induktion (t_0) konnte kein Unterschied in der Expression von OppA detektiert werden (B). Eine Stunde nach der Induktion unterschieden sich die Expressionswerte bereits um den Faktor $-5,2$ (C). Zwei Stunden nach der Induktion wurde OppA im WT-System außerordentlich stark überexprimiert und der Unterschied auf einen Faktor von $-10,6$ quantifiziert (D). Die statistischen p-Werte lagen mit $0,00014$ (t_1) und $0,000043$ (t_2) deutlich unter der geforderten Grenze von 1% (3.2.2.2).

Weitere Proteine wurden in der Gruppe „äußere Membran“ zusammengefasst. Neben den Proteinen FhuA und RfaD wurden viele Proteine der Omp-Familie detektiert. Hierzu zählen das Protein 3b der äußeren Membran (OmpT) und OmpP, die als Proteasen fungieren. Weiterhin wurde der globale Regulator OmpR identifiziert, der u.a. die Transkription von OmpC reguliert, das dem unspezifischen Stofftransport kleiner hydrophiler und ionischer Solute dient. Neben OmpC konnten weiterhin die Porine OmpA und TolC identifiziert werden. Ein essentieller Bestandteil der äußeren Membran wurde mit dem Imp-Protein detektiert. Imp wurde um die Faktoren $-1,5$ (t_1) und $-2,2$ (t_2) überexprimiert und spielt beim Aufbau des

Lipopolysaccharids (LPS) und der Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln eine wichtige Rolle. Der Großteil der Proteine in der Gruppe „äußere Membran“ wurde im Hochproduzenten überexprimiert.

Neben dem bereits erwähnten Regulator OmpR wurden weiterhin PhoR und Dps in der Gruppe der „globalen Regulatoren“ identifiziert. PhoR ist als Sensorkinase Bestandteil des PhoR/PhoB Zweikomponenten-Systems, das bei Phosphatmangel aktiviert wird. Während OmpR und PhoR im Hochproduzenten überexprimiert wurden, wurde im Var-Expressionssystem Dps detektiert. Dps wurde mit einem Faktor von 2,0 zum Zeitpunkt t_2 überexprimiert und kann als Hinweis für allgemeine Mangelerscheinungen verstanden werden. Es wird im Zusammenhang mit oxidativen Stresssituationen genannt und gilt als Protektorprotein für DNA.

Einen weiteren Hinweis auf oxidativen Stress lieferten die Proteine SodA und SodB, die um die Faktoren 1,5 (t_1) bzw. 1,8 und 2,7 (t_2) im Niedrigproduzenten überexprimiert wurden. In beiden Fällen handelt es sich um Superoxid-Dismutasen, die Superoxid-Radikalanionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umwandeln. Während SodB Eisen(III) als Cofaktor verwendet, ist bei SodA die Anwesenheit von Mangan erforderlich. Im Hochproduzenten wurde im Gegensatz dazu die Katalase (KatG) identifiziert. KatG wandelt Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff um und wurde um die Faktoren -1,5 (t_1) bzw. -2,8 (t_2) überexprimiert. Die Gruppe Detoxifikation umfasste somit ausschließlich Proteine zur Entgiftung schädlicher Sauerstoffspezies.

Hinweise auf einen allgemeinen Zellstress gaben im WT-Expressionssystem die Hitzeschockproteine Hsp 70 (DnaK) und Hsp 90 (HptG) sowie der Trigger-Faktor (Tig) und die periplasmatische Serinprotease HtrA (DegP). DegP gilt, wie auch die Lysyl-t-RNA-Synthetase LysU, als Hitzeschockprotein. Im Gegensatz zum konstitutiv exprimierten LysS wird LysU bei hohen Temperaturen, alkalischem pH-Wert und anaeroben Wuchsbedingungen induziert. Weiterhin wurde im Niedrigproduzenten der Sigma-Faktor 38 (RpoS) detektiert, der u. a. auf einen Carbon- bzw. Aminosäuremangel hinweist.

Die größte Gruppierung im Bereich „Adaption“ umfasst Proteine aus degradativen Prozessen. Während die Proteine GatY, Glf, Kdul, Pta und KdgK mit dem Abbau kleinerer Kohlenstoffverbindungen im Zusammenhang stehen, wurden einige proteolytische Enzyme identifiziert. Die meisten Proteasen wurden im Hochproduzenten (WT) überexprimiert. Besonders auffallend war der außerordentlich hohe Expressionsunterschied der cytoplasmatischen Prolin-Dipeptidase PepQ (Tab. 12).

Tab. 12: Übersicht der in der Expressionsanalyse identifizierten Proteasen.

Die Tabelle stellt die proteolytische Enzyme und ihre Expressionsunterschiede (fc) anhand der Kultivierungszeitpunkte t_0 , t_1 und t_2 gegenüber. Proteasen, die im Hochproduzenten (WT) überexprimiert wurden, sind mit einem negativen Vorzeichen gekennzeichnet.

Protease		Zellokalisation	fc (t_0)	fc (t_1)	fc (t_2)
HtrA (DegP)	Serinprotease	Periplasma	< 11,4l	< 11,4l	-1,8
OmpP	Protein X	Äußere Membran	< 11,4l	-1,5	-2,4
OmpT	Protein 3a	Äußere Membran	< 11,4l	< 11,4l	-2,3
PepD	Aminoacyl-Histidin-Dipeptidase	Cytoplasma	< 11,4l	< 11,4l	-2,2
			< 11,4l	1,5	1,7
PepQ	Prolin-Dipeptidase	Cytoplasma	< 11,4l	-2,4	-7,2
PepN	Aminopeptidase N	Cytoplasma	< 11,4l	1,6	2,1

Weiterhin wurden neben TnaA, das beim Abbau von L-Tryptophan und L-Cystein beteiligt ist, RNaseIII (Rnc) im Hochproduzenten überexprimiert. Mit Faktoren von -3,0 (t_1) bzw. -3,3 und -2,4 (t_2) wies Rnc damit auf einen massiven Abbau ribosomaler RNA hin.

Proteine, die der Gruppe „Zellentwicklung“ zugeordnet wurden, standen entweder mit Zellwand-Prozessen in Verbindung (DacA, DacC, MurE) oder spielten bei Vorgängen der Zellteilung eine Rolle (MukF, FtsA). Während MukF (fc -2,5 (t_2)) bei der Aufteilung des Bakterienchromosoms involviert ist und im Zusammenhang von MukB mit dem Zelltötungssignal KicB steht, kann die übermäßige Expression von FtsA (fc -1,4 (t_0 , t_2)) zur Inhibierung der Zellteilung führen. Alle Proteine der Gruppe „Zellentwicklung“ wurden im Hochproduzenten überexprimiert.

Der Gruppierung „Cofaktoren & Carrier“ wurden Proteine für die Synthese der Coenzym Tetrahydrofolat (FolD), Pyridoxal (PdxB) und Coenzym A (PanC) zugeordnet. Weiterhin wurden mit Glutathion (GrxB) und GshA Proteine detektiert, die im Zusammenhang mit antioxidativen Prozessen stehen. Dies wurde im Hochproduzenten besonders durch die signifikante Überexpression von GrxB um die Faktoren -5,2 (t_1) und -4,3 (t_2) deutlich.

Eines der auffälligsten Proteine in der Expressionsprofil-Analyse war der Transkriptionsrepressor LacI. Dieser wurde im Hochproduzenten (WT) überexprimiert und in mehreren Proteinspots identifiziert. Bereits vor der Induktion wurden Expressionsunterschiede um Faktoren zwischen -1,4 und -3,7 detektiert. Im Laufe der Kultivierung stieg der Unterschied auf die bis zu 8-fachen Mengen an (Abb. 17).

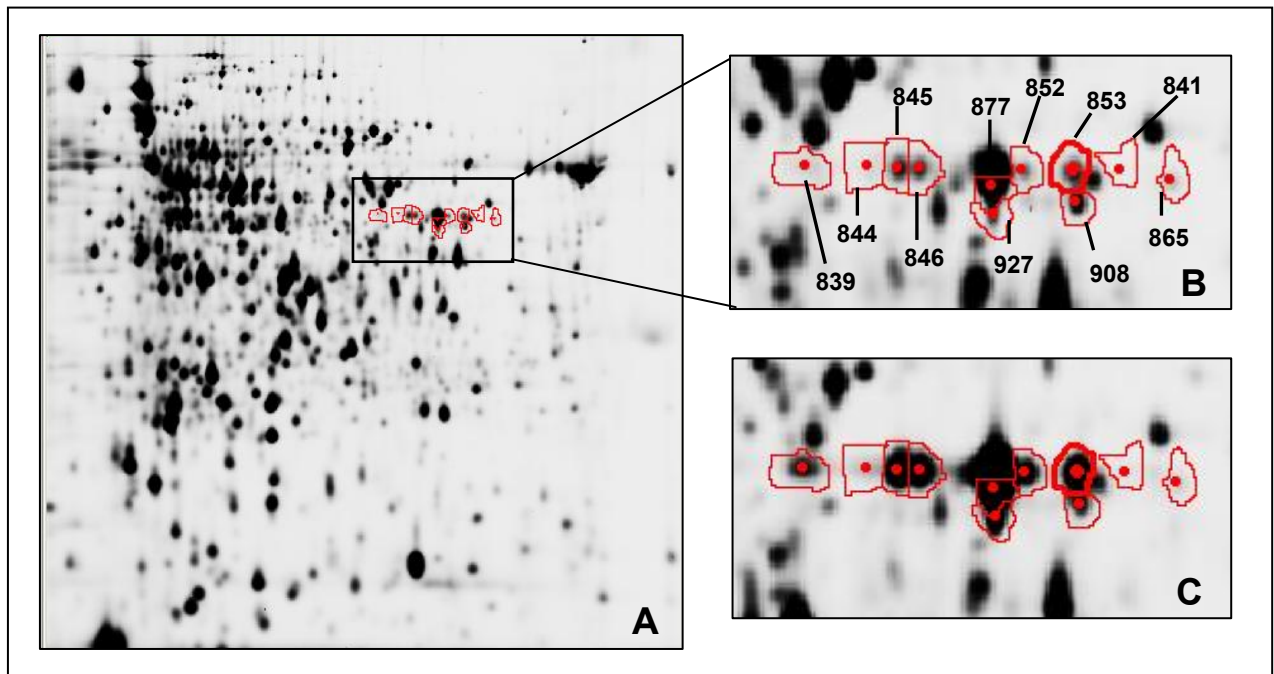


Abb. 17: 2-D Gele mit den Proteinspots des LacI Repressors.

Der Transkriptionsrepressor LacI wurde in mehreren Proteinspots (rot) gefunden und bei der Auswertung entsprechend nummeriert (B). Bildabschnitt A dokumentiert die Lage der Proteinspots im gesamten 2-D Gel. Die weiteren Bildausschnitte stellen die Proteinspots von Niedrig- (B) und Hochproduzent (C) gegenüber. LacI wurde bis zu einem Faktor von 7,6 im WT-System überexprimiert.

Neben den Proteinen, deren metabolische Funktion noch nicht geklärt ist, wurde auch das rekombinante Produkt Gluc-DH in den 2-D Gelen detektiert.

Im Rahmen der vorliegenden Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass sich die DIGE-Technologie für den Vergleich von Wirt-/Vektor-Expressionssystemen auf Proteombasis eignet. Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden, die zur Charakterisierung des Zellverhaltens während der Kultivierung verwendet werden, gestattet die Analyse der Expressionsprofile detailliertere Einblicke in den Zellmetabolismus. Die Auswertung der Proteomdaten ermöglicht es, Hinweise für die unterschiedlichen Expressionsleistungen des rekombinanten Produkts zu finden und das Stoffwechselverhalten des Modellsystems besser zu verstehen.

3.4 Expressionsoptimierung

Die Erkenntnisse der *expression profiling*-Analyse sollten dazu verwendet werden, die Produktionsleistung des Niedrig-Expressionssystems (Var) zu verbessern. Hierfür sollte ein rationaler Optimierungsansatz erarbeitet und untersucht werden, ob durch dessen praktische Umsetzung die Expressionsleistung erhöht werden kann.

3.4.1 Einfluss der Plasmidkopienzahl

Die Überexpression des Transkriptionsrepressors LacI im Hochproduzenten (WT) wies auf eine unterschiedliche Plasmidkopienzahl zwischen den Vergleichssystemen hin (Abb. 17). Da LacI nur auf dem Expressionsvektor kodiert ist, sollte der Niedrigproduzent laut Proteomanalyse eine geringere Kopienzahl aufweisen. Die Sequenzierung (2.6.2) der Expressionsvektoren pQE80L-WT und pQE80L-Var (Tab. 4) zeigte außer den bekannten Unterschieden im Zielgen keine weiteren Mutationen in den übrigen Strukturgenen (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis unterschiedlicher Plasmidkopienzahlen sollte daher mit einer zweiten Methode erfolgen.

3.4.1.1 Nachweis unterschiedlicher Plasmidkopienzahlen

Um unterschiedliche Plasmidkopienzahlen direkt nachzuweisen, wurde die Methode von Lee *et al.* (2006a) verwendet. Die Plasmidkopienzahl wurde mittels quantitativer PCR (QPCR) bestimmt, indem die amplifizierte Menge eines plasmidkodierten Gens (β -Lactamase, bla) der eines genomischen Gens (1-Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase, dxs) gegenübergestellt wurde (2.6.9). Für die Quantifizierung der amplifizierten DNA-Mengen war die Herstellung des Kalibratorplasmids pQE80L-Var-dxs notwendig. Hierfür wurde ein Abschnitt des 1-Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase-Gens (dxs) amplifiziert und in den Vektor pQE80L-Var ligiert (2.6.7.1).

Plasmidkopienzahlbestimmung

Die Amplifikation der Gene bla und dxs (2.6.9) erfolgte zwischen Konzentration von 10^5 bis 10^9 Kopien/ μ l. Die Kalibrationskurven wurden in Doppelmessungen bestimmt. Tab. 13 dokumentiert die Berechnung der Plasmidkopienzahl anhand des CP-Wertes.

Tab. 13: Plasmidkopienzahlbestimmung mit dem Kalibratorplasmid.

Die Kalibrationskurven wurden mit dem Plasmid pQE80L-Var-dxs zwischen Konzentrationen von 10^5 bis 10^9 Kopien/ μ l aufgenommen. Anhand des CP-Wertes wurden die Kopien/ μ l in einer Probe berechnet. Das Verhältnis der Kopien von bla zu dxs stellt die Plasmidkopienzahl dar.

Kopien/ μ l (Soll)	bla (Ist)		dxs (Ist)		Plasmidkopienzahl
	CP	Kopien/ μ l*	CP	Kopien/ μ l**	
10^5	20,31	$9,44 \cdot 10^4$	19,72	$1,05 \cdot 10^5$	1,11
10^6	16,92	$1,05 \cdot 10^6$	16,61	$1,07 \cdot 10^6$	1,03
10^7	13,80	$9,60 \cdot 10^6$	13,87	$8,34 \cdot 10^6$	0,87
10^8	10,24	$1,20 \cdot 10^8$	10,59	$9,72 \cdot 10^7$	0,81
10^9	7,43	$8,83 \cdot 10^8$	7,35	$1,10 \cdot 10^9$	1,25
					1,01

* CP (bla) = $-1,3352 \cdot \ln(\text{Kopien}/\mu\text{l}) + 35,148$

** CP (dxs) = $-1,4086 \cdot \ln(\text{Kopien}/\mu\text{l}) + 36,441$

Im Falle von pQE80L-Var-dxs liegen die Gene bla und dxs im Verhältnis 1:1 vor, so dass sich eine theoretische Plasmidkopienzahl von 1 ergibt. Mit der vorliegenden Methode wurde diese im Mittel mit 1,01 bestimmt. Die Analyse des Kalibratorplasmids zeigte somit, dass die Plasmidkopienzahl mit der vorliegenden Methode erfolgreich bestimmt werden kann.

Vergleich der Plasmidkopienzahlen von Hoch- und Niedrigproduzent

Zur Bestimmung der Plasmidkopienzahlen wurden die Expressionssysteme in einem Volumen von 20 ml SB-Medium mit entsprechenden Additiven kultiviert (2.4). Die Probennahme erfolgte vor der Induktion (t_0) bzw. 1 h (t_1) und 2 h (t_2) nach Induktion. Nach der Isolierung der GesamtdNA (2.6.4) wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (2.6.5). Im Anschluss wurden die Proben mittels quantitativer PCR (2.6.9) analysiert und die Plasmidkopienzahl anhand der Kalibrationskurven (Tab. 13) berechnet.

Die Analyse bestätigte die Hinweise aus der Expressionsprofil-Analyse und zeigte, dass sich die Plasmidkopienzahlen der Vergleichssysteme deutlich unterscheiden. Abhängig vom Kultivierungszeitpunkt ist die Plasmidkopienzahl im Gluc-DH Hoch-Expressionssystem (WT) um Faktoren zwischen 2,0 und 2,8 höher als im Niedrig-Expressionssystem der Enzymvariante (Abb. 18).

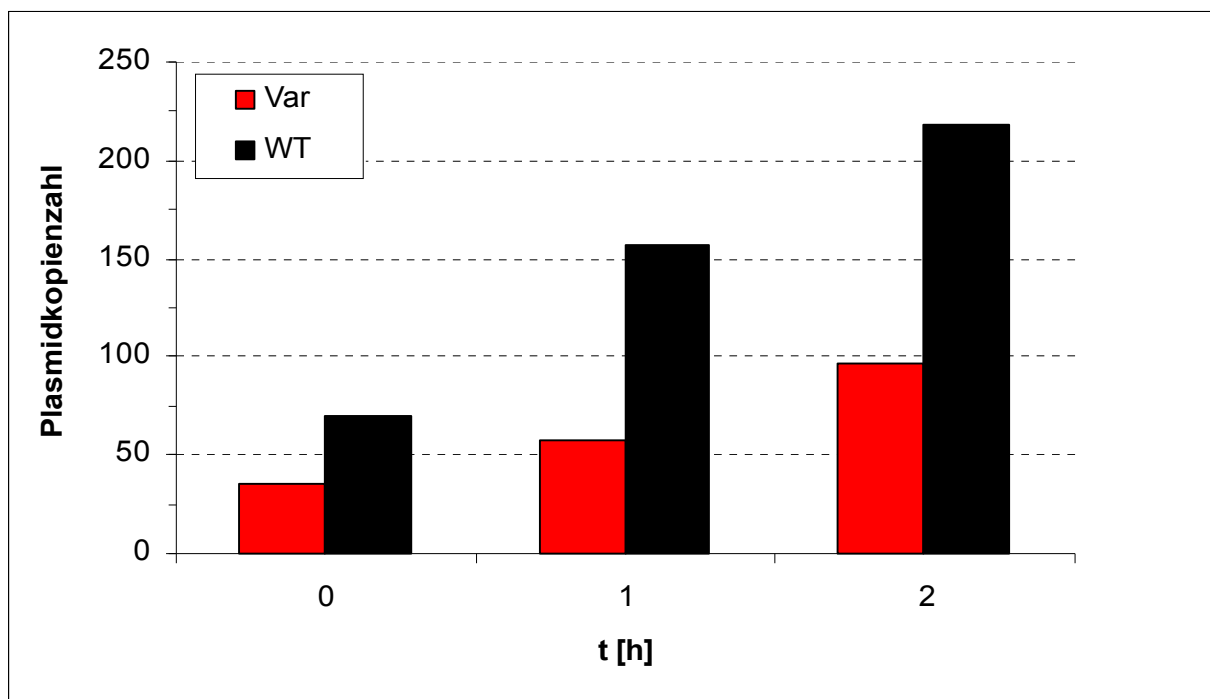


Abb. 18: Bestimmung der Plasmidkopienzahlen im Expressionsmodell.

Der Vergleich des Hoch- (WT) und Niedrig-Expressionssystems (Var) zeigte, dass sich die Plasmidkopienzahlen zu den Kultivierungszeitpunkten t_0 , t_1 und t_2 deutlich unterscheiden. Das WT-System verfügt trotz gleichem Expressionsvektor über eine höhere Plasmidkopienzahl als das Var-System. Die Daten wurden aus Doppelbestimmungen von jeweils zwei unabhängigen biologischen Replikaten aufgenommen. Die technischen und biologischen Variationen der Bestimmung lagen durchschnittlich bei 11 %.

3.4.1.2 Erhöhung der Plasmidkopienzahl

Um die Produktionsleistung des Niedrig-Expressionssystems zu verbessern, sollte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse (Abb. 18) die Plasmidkopienzahl des verwendeten Vektorsystems erhöht werden. Die pQE80L-Plasmide verfügen über einen *Co/E1*-Replikationsursprung (*origin of replication*, *ori*). Demnach sollte durch den Austausch gegen einen pUC-Replikationsursprung eine signifikante Erhöhung der Plasmidanzahl möglich sein. Für die Herstellung des neuen Vektorkonstrukts wurde das pQE80L-Var Plasmid (Tab. 4) ohne die DNA-Sequenz des *Co/E1* *ori* amplifiziert. Der pUC-*ori* wurde aus dem Vektor pBSK(+) (Tab. 4) gewonnen. Durch Ligation der beiden PCR-Produkte wurde das Expressionsplasmid pQE80L-pUC-Var hergestellt (2.6.7.2).

Nachweis erhöhter Plasmidkopienzahlen im Niedrig-Expressionssystem

Um zu überprüfen, ob der Austausch des Replikationsursprungs zu höheren Plasmidkopienzahlen führte, wurde das herkömmliche Niedrig-Expressionssystem (*E. coli* XL1Blue/pQE80L-Var, Var) mit dem optimierten Wirt-/Vektorsystem für die Enzymvariante (*E. coli* XL1Blue/pQE80L-pUC-Var, Var-pUC) verglichen. Hierfür wurden die Zellen im Maßstab der Expressionsprofil-Versuche kultiviert (2.4) und die Plasmidkopienzahlen der Kultivierungszeitpunkte t_0 , t_1 und t_2 mittels quantitativer PCR bestimmt (2.6.9).

Die Analyse zeigte eine signifikante Erhöhung der Plasmidkopienzahl im Expressionssystem Var-pUC. Im Vergleich zum Var-System war die Plasmidkopienzahl vor der Induktion um den Faktor 10,5 höher, zum Zeitpunkt t_1 lagen um den Faktor 7,7 und zwei Stunden nach der Induktion um den Faktor 9,1 mehr Plasmide im Var-pUC-System vor. Die Plasmidkopienzahlen wurden in Doppelbestimmungen anhand von jeweils zwei voneinander unabhängigen biologischen Replikaten gemessen (Daten nicht gezeigt).

Effekte der Plasmidkopienzahl-Erhöhung auf das Wuchs- und Expressionsverhalten

Der Einfluss der erhöhten Plasmidkopienzahl auf das Wuchs- und Expressionsverhalten der Zellen wurde unter den identischen Kultivierungsbedingungen wie bei der Expressionsprofil-Analyse untersucht (3.1.2). Die Analyse zeigte, dass das Var-pUC-Expressionssystem langsamere Wachstumsraten aufwies als das ursprüngliche Niedrig-Expressionssystem der Enzymvariante (Var). Var-pUC ging allerdings im Gegensatz zum WT-Hochexpressionssystem nach der Induktion nicht direkt in die stationäre Wachstumsphase über (Abb. 19).

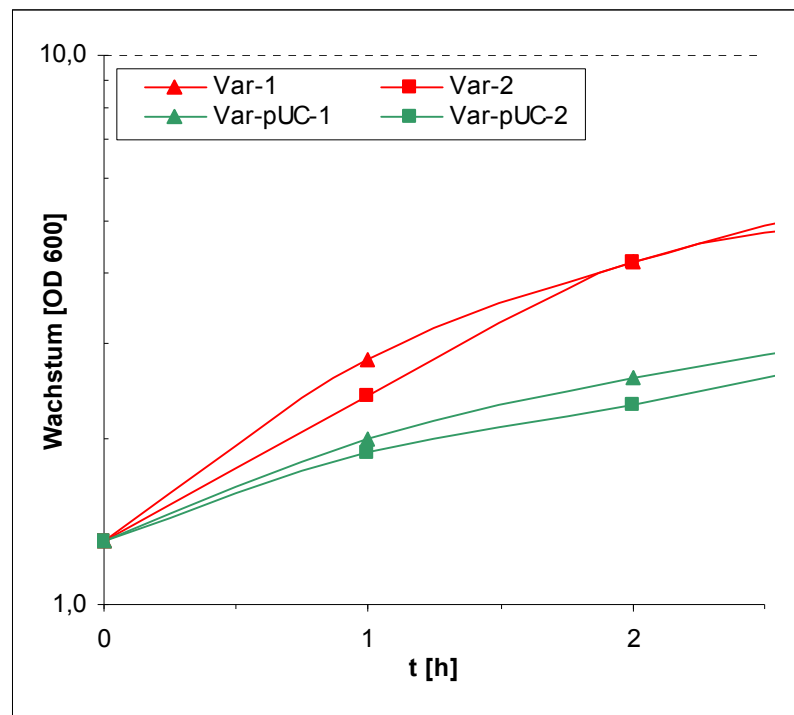


Abb. 19: Effekte der Plasmidkopienzahl-Erhöhung auf das Wuchsverhalten. Das Wirt-/Vektor-System für die Gluc-DH Enzymvariante mit erhöhter Plasmidkopienzahl (Var-pUC) wies im Vergleich zum Niedrig-Expressionssystem (Var) geringere Wachstumsraten auf. Die Grafik zeigt Daten von jeweils zwei unabhängigen biologischen Replikaten der Vergleichssysteme, die mit 1 und 2 gekennzeichnet wurden.

Die Untersuchungen zur Produktionsleistung wurden anhand des exprimierten, rekombinanten Proteins sowie über die Enzymaktivität bewertet.

Für die Bestimmung der absoluten Produktionsleistung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Gluc-DH-spezifischer ELISA etabliert (Abb. 7). Hierfür wurden polyklonale Gluc-DH (WT)-Antikörper aus Kaninchen-Rohserum gereinigt. Anschließend wurden Teile des IgGs biotinyliert bzw. digoxygenyliert (2.5.4). Für den ELISA wurden Streptavidin markierte Mikrotiterplatten verwendet und mit dem biotinylierten Fangantikörper PAK<Gluc-DH>K-IgG-Bi(DDS) inkubiert. Nach dem Probenauftrag (Gluc-DH) erfolgte ein Inkubationsschritt mit dem digoxygenylierten Antikörper gegen die Gluc-DH (PAK<Gluc-DH>K-IgG-Dig(XOSu)). Die Detektion wurde mit Hilfe eines Antidigoxigenin-POD-Konjugates unter Verwendung von Wasserstoffperoxid und chromogenem ABTS durchgeführt (2.5.4).

Die Aktivität der Gluc-DH wurde photometrisch bestimmt. Nach Inkubation des Zelllysates mit PQQ wurde die Enzymkinetik mit Hilfe eines Mediators durch die Umsetzung von Glukose zu Gluconolacton gemessen (Abb. 6; 2.5.5).

Die Produktionsleistung zu den Kultivierungszeitpunkten t_1 und t_2 wurde auf die Expression pro Zelle bezogen. Die Analyse mittels ELISA zeigte, dass die Expression der Gluc-DH Enzymvariante durch den Austausch des Replikationsursprungs im Vektorsystem signifikant verbessert werden konnte. Das Var-pUC System zeigt eine 6,6- (t_1) bzw. 9,2-fach (t_2) höhere Expressionsleistung als das herkömmliche Niedrig-Expressionssystem (Var). Auch die Enzymaktivitäten konnten deutlich erhöht werden. Das optimierte Wirt-/Vektor-System (Var-pUC) produziert um den Faktor 2,5 mehr aktives Enzym als das Referenzsystem (Var; Abb. 20).

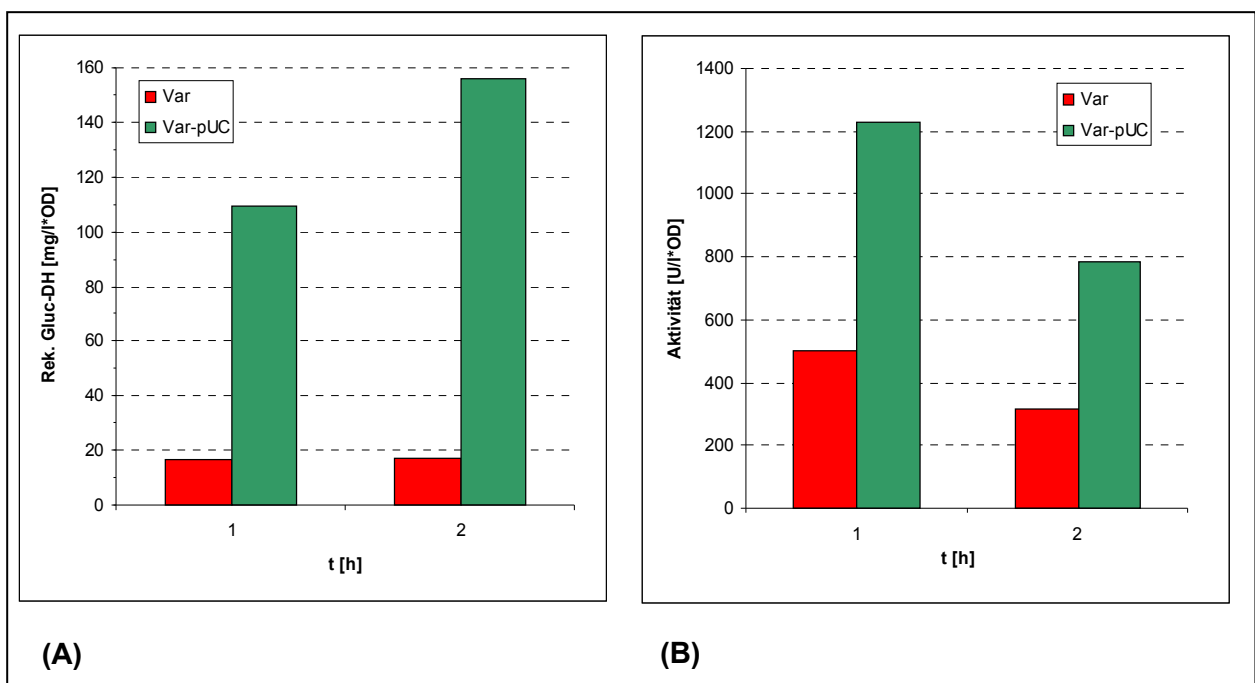


Abb. 20: Analyse zur Expressionsoptimierung der Gluc-DH Enzymvariante. Durch die Plasmidkopienzahl-Erhöhung wurde eine signifikante Verbesserung der Expression der Enzymvariante erreicht. Das optimierte Expressionssystem (Var-pUC) zeigt eine 6,6- bis 9,2-fach höhere Produktionsleistung für die heterologe Gluc-DH Expression als das herkömmliche Niedrig-Expressionssystem Var (A). Die Ausbeuten aktiven Enzyms konnten durch die Optimierung um den Faktor 2,5 verbessert werden (B).

Die Produktionsleistung des ursprünglichen Hochexpressionssystems (WT) liegt mit 62 (t_1) und 65 (t_2) mg/l*OD deutlich unter denen des optimierten Systems (Var-pUC). Die Enzymaktivität hingegen ist im Var-pUC System 3,1- (t_1) bis 3,5-fach (t_2) niedriger als im WT-Expressionssystem (Daten nicht gezeigt).

3.4.2 Löslichkeitsverbesserung

Die spezifische Enzymaktivität weist auf Probleme hinsichtlich der Löslichkeitsvermittlung während der rekombinanten Proteinproduktion hin. Der Vergleich des optimierten Expressionssystems (Var-pUC) mit dem Niedrig-Expressionssystem (Var) zeigt, dass höhere Mengen rekombinantes Produkt im Verhältnis zu einer geringeren spezifischen Enzymaktivität stehen (Abb. 20). Weiterhin werden im Vergleich zur WT-Expression zwar höhere Mengen rekombinanter Gluc-DH im Var-pUC-System gebildet, die Ausbeuten aktiven Enzyms sind jedoch geringer (3.4.1.2). In der *expression profiling*-Analyse wurden zudem Proteine identifiziert, die als Faltungshelfer fungieren und im Hoch-Expressionssystem überexprimiert werden (3.3.2.4). Aufgrund dieser Ergebnisse zielte die weitere Expressionsoptimierung auf eine Löslichkeitsverbesserung des rekombinanten Proteins ab.

3.4.2.1 Reduktion der Plasmidkopienzahl

Um die Ausbeuten an löslichem, aktivem Enzym zu erhöhen, sollte der metabolische Stress der rekombinanten Proteinexpression auf die Zelle reduziert werden. Dies wurde durch die Reduktion der Plasmidkopienzahl im Niedrig-Expressionssystem (Var) getestet. Hierfür wurde der *ColE1*-ori im pQE80L-Vektor (Tab. 4) gegen einen p15A-Replikationsursprung ausgetauscht (2.6.7.3).

Nachweis zur Reduktion der Plasmidkopienzahl

Der Nachweis reduzierter Plasmidkopienzahlen in *E. coli* XL1Blue/pQE80L-p15A-Var (Var-p15A) wurde mittels quantitativer PCR durchgeführt (2.6.9) und mit den Kopienzahlen des Niedrig-Expressionssystems (*E. coli* XL1Blue/pQE80L-Var, Var) verglichen. Hierfür wurden die Expressionssysteme im 400 ml-Maßstab kultiviert (2.4). Die Analyse der Proben wies eine Reduktion der Plasmidkopienzahl um die Faktoren 2,3 (t_0), 1,7 (t_1) und 2,4 (t_2) nach (Abb. 21). Die Daten wurden in Doppelbestimmungen aus jeweils zwei unabhängigen biologischen Replikaten generiert.

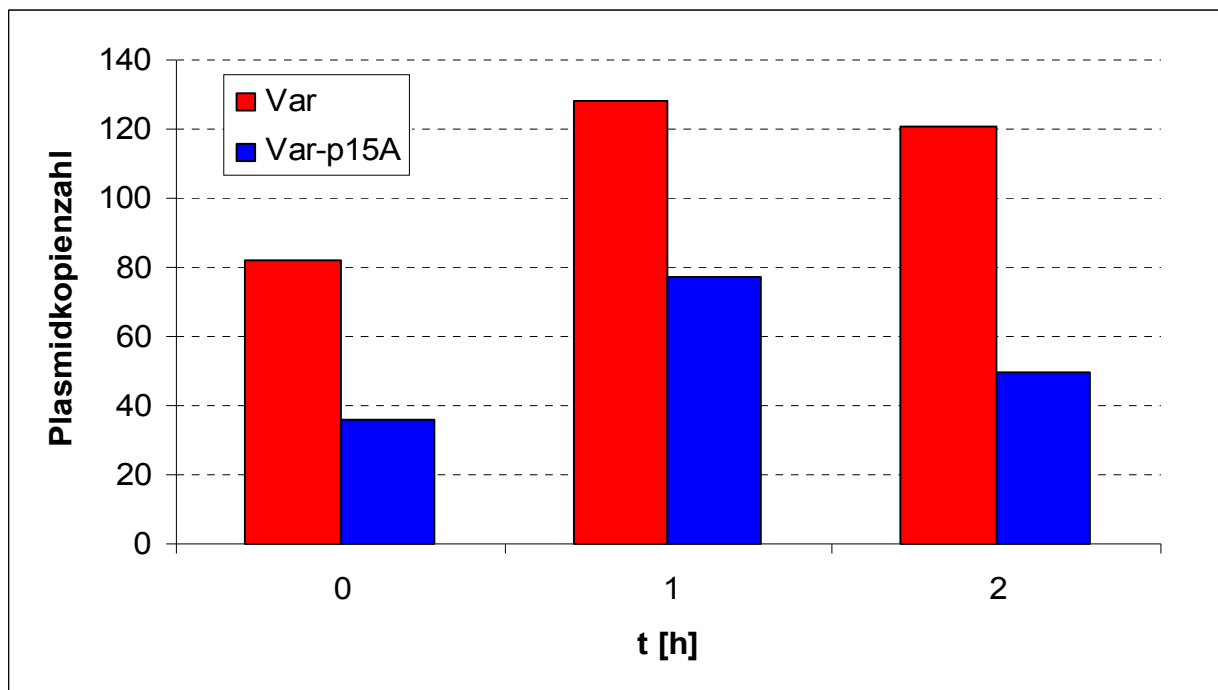


Abb. 21: Nachweis der Plasmidkopienzahl-Erniedrigung im Var-p15A Expressionssystem. Durch den Austausch des *Co/E1*-Replikationsursprungs gegen einen p15A-ori konnte die Plasmidkopienzahl im Var-p15A Wirt-/Vektor-System im Vergleich zum herkömmlichen Niedrig-Expressionssystem (Var) gesenkt werden. In Abhängigkeit der analysierten Kultivierungszeitpunkte (t_0 , t_1 und t_2) wurde die Kopienzahl um Faktoren zwischen 1,7 und 2,4 gesenkt. Der Variationskoeffizient lag bei durchschnittlich 19 %.

Effekte der Plasmidkopienzahl-Erniedrigung auf das Wuchs- und Expressionsverhalten

Der Einfluss des reduzierten metabolischen Stresses auf das Wuchs- und Expressionsverhalten der Zellen wurde anhand mehrerer Schüttelkulturexperimente im 400 ml Maßstab untersucht (2.4). Die Expressionssysteme Var und Var-p15A wiesen identisches Wuchsverhalten auf (Daten nicht gezeigt). Die Expressionsleistung wurde mittels ELISA (2.5.4) und Aktivitätstest (2.5.5) untersucht. Trotz einer geringeren Plasmidkopienzahl zeigt das Var-p15A System im ELISA eine höhere Gluc-DH Expressionsleistung als das herkömmliche Niedrig-Expressionssystem (Var). Eine Stunde nach Induktion konnte mit Var-p15A eine Expression erzielt werden, die um den Faktor 2,1 und zum Kultivierungszeitpunkt t_2 um den Faktor 3,3 größer war als im Var-Expressionssystem. Die Analyse der Enzymaktivität zeigt allerdings, dass im Vergleich zum Var-Expressionssystem keine höheren Ausbeuten an aktivem Enzym erreicht werden (Abb. 22).

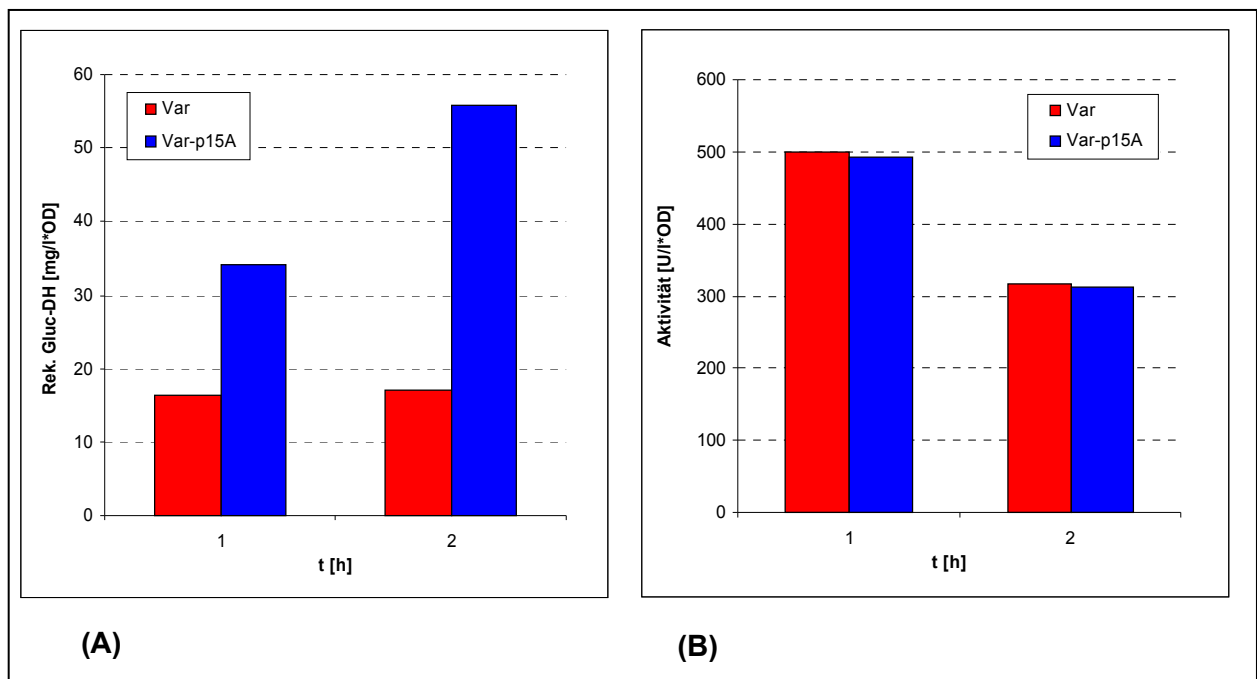


Abb. 22: Effekte der Plasmidkopienzahl-Erniedrigung auf die Proteinexpression. Der Austausch des *ColE*-oris gegen einen p15A-Replikationsursprung bewirkte im neuen Wirt/Vektor-Expressionssystem Var-p15A eine höhere Expressionsleistung pro Zelle als im herkömmlichen Niedrig-Expressionssystem Var (A). Die Ausbeuten an aktivem Enzym konnten durch die Plasmidkopienzahl-Erniedrigung allerdings nicht erhöht werden (B). Die Expressionsleistungen wurden 1 und 2 h nach Induktion (t_1 bzw. t_2) mittels ELISA (A) und Aktivitätstest (B) bestimmt. Für die Analyse wurden zwei voneinander unabhängige biologische Replikate in Form von Doppelbestimmungen untersucht. Die Variationskoeffizienten lagen bei 9 % (A) bzw. 7 (B) %.

3.4.2.2 Coexpression eines Löslichkeitsvermittlers

Um den Anteil an aktivem Enzym im Verhältnis zum exprimierten Gluc-DH-Protein zu erhöhen, sollte die Löslichkeitsvermittlung während der rekombinanten Proteinherstellung verbessert werden. Die Analyse der Expressionsprofile (3.3.2.4) zeigte, dass im Hochproduzenten einige Chaperone überexprimiert wurden. Das periplasmatische Substratbindeprotein OppA wies hierbei die höchsten Expressionsunterschiede auf (Abb. 16). Neben den Eigenschaften als Substratbindeprotein wurden auch löslichkeitsvermittelnde Fähigkeiten von OppA beschrieben (Richarme & Caldas, 1997). Durch die Coexpression von OppA sollte die Faltung des rekombinanten Proteins unterstützt und die Ausbeute aktiver Gluc-DH erhöht werden.

Herstellung des Coexpressions-Plasmids

Um die Proteinexpression von OppA und Gluc-DH unabhängig voneinander regulieren zu können, war die Herstellung eines weiteren Plasmids erforderlich. Im Vergleich zu den

pQE80L-Vektoren (Tab. 4) sollte das Coexpressions-Plasmid unabhängig von IPTG induziert und plasmidtragende Klone durch ein zweites Antibiotikum selektiert werden können. Um zwei Vektoren in einem Wirt etablieren zu können, musste ferner ein zu *Co/E1* kompatibler Replikationsursprung verwendet werden.

Als Grundlage für die Herstellung des Coexpressionsplasmids pBAD-p15A-oppA (Tab. 4) wurde der Arabinose-induzierbare Vektor pBAD202/D-TOPO (Tab. 4) benutzt. Die DNA-Sequenz von *oppA* wurde aus genomischer DNA amplifiziert und mit dem hydrolysierten Vektor ligiert. Der Replikationsursprung des pBAD202/D-TOPO-Vektors (Tab. 4) ist zum *Co/E1*-ori der pQE80L-Plasmide (Tab. 4) nicht kompatibel. Für eine stabile Etablierung beider Plasmide wurde daher der p15A-Replikationsursprung aus pACYC Duet-1 (Tab. 4) verwendet und gegen den pUC-ori ausgetauscht (2.6.7.4). Abb. 23 zeigt das Plasmid pBAD-p15A-oppA, das sich für die Coexpression von OppA in pQE80L-basierten Wirt-/Vektor-Expressionssystemen eignet.

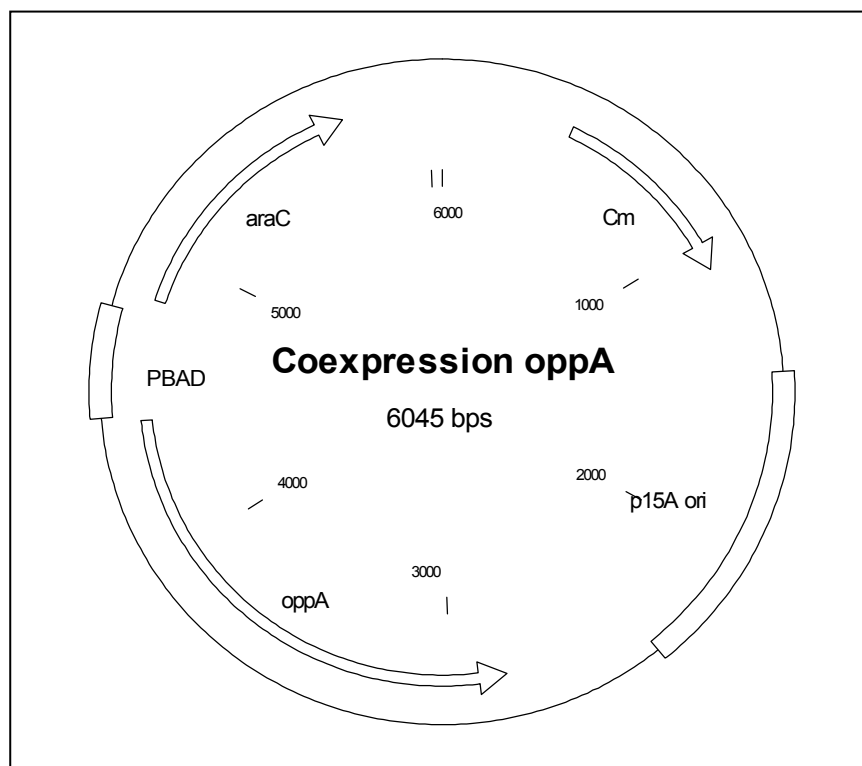


Abb. 23: Vektorsystem für die Coexpression von OppA.

Das Plasmid pBAD-p15A-oppA wurde für die Coexpression von Faltungshelfern in pQE80L-basierten Wirt-/Vektor-Expressionssystemen generiert. Der p15A-Replikationsursprung ermöglicht die stabile Etablierung des Plasmids neben einem Vektor mit *Co/E1*-ori. Neben der Ampicillin-Resistenz der pQE80L-Konstrukte wurde Chloramphenicol (Cm) als zweites Antibiotikum zur Selektion verwendet. OppA wurde unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors (PBAD, Guzman *et al.*, 1995) exprimiert, welcher durch das Produkt von *araC* in Abwesenheit des Induktors reprimiert wird.

Expressionsversuche

Zur Überprüfung der OppA-Expression wurde *E. coli* XL1Blue mit pBAD-p15A-oppA transformiert (2.6.8). Eine Übernachtskultur (ÜK) wurde in SB-Medium, M9-Salzen, 0,4 % (w/v) Glukose und Chloramphenicol (2.2) aufgenommen und bei 37 °C und 250 Upm kultiviert. Die Induktion erfolgte bei einer Zelldichte von 0,8 OD₆₀₀ mit Konzentrationen zwischen 0,2 und 4 % (w/v) Arabinose. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass 0,5 % (w/v) Arabinose für die Induktion ausreichend waren (Daten nicht gezeigt). Mittels SDS-PAGE Analytik (2.5.2) konnten 3 h nach der OppA-Induktion multiple Effekte auf die Zellphysiologie im Proteinmuster nachgewiesen werden (Abb. 24).

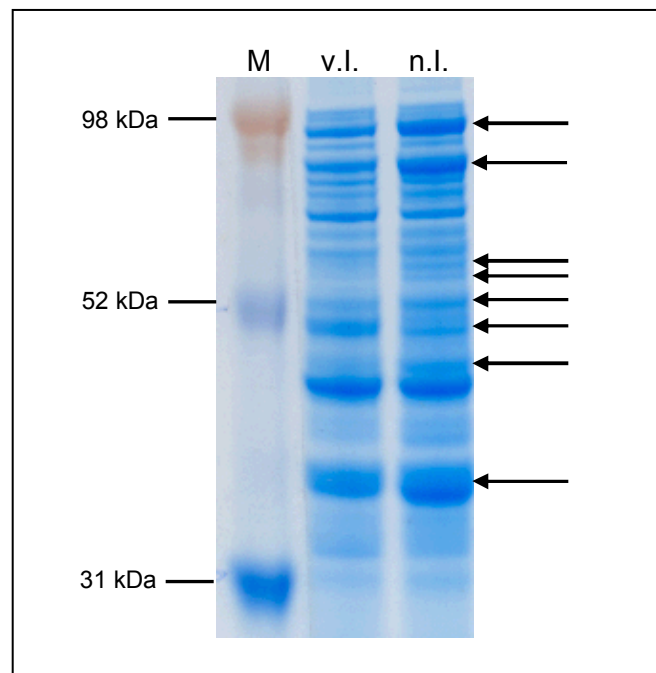


Abb. 24: SDS-PAGE Analyse zur OppA-Expression.

Die Analytik zeigte, dass durch die Induktion von OppA die Expression mehrerer Proteine im Bereich zwischen 31 und 97 kDa beeinflusst wurde. Die OppA-Induktion erfolgte mit 0,5 % (w/v) Arabinose.

Zur Überprüfung der Coexpression wurde *E. coli* XL1Blue mit pBAD-p15A-oppA und pQE80L-Var transformiert (2.6.8) und unter analogen Bedingungen mit Zusatz von Ampicillin kultiviert. OppA wurde 70 bis 80 min vor der rekombinanten Gluc-DH mit 0,5 % (w/v) Arabinose induziert. Der Einfluss der OppA-Coexpression auf die rekombinante Proteinproduktion wurde durch den Gluc-DH-Aktivitätstest (2.5.5) untersucht. Der Vergleich der aktiven Mengen Gluc-DH, die mit und ohne OppA Coexpression gewonnen wurden, zeigte, dass der Anteil aktiven Enzyms unter den beschriebenen Bedingungen nicht erhöht werden konnte (Daten nicht gezeigt).

3.4.2.3 Renaturierung

Aufgrund der Versuche zur Plasmidkopienzahl-Erhöhung konnte gezeigt werden, dass im Verhältnis zur Ausbeute an aktivem Enzym wesentlich mehr Protein exprimiert wird (Abb. 20). Auch die Analytik von Fermentationen aus dem Produktionsbetrieb zeigte, dass mehr inaktive Gluc-DH als aktives Enzym hergestellt wird. Mittels ELISA (2.5.4) wurden ca. 5 g/l rekombinantes Protein quantifiziert. Aus dem Vergleich der Aktivitätsmessungen (2.5.5) mit der spezifischen Enzymaktivität der gereinigten Gluc-DH ermittelt sich ein löslicher Anteil exprimierten Proteins von nur ca. 20 % (Daten nicht gezeigt). Demzufolge geht ein Großteil des Produktes mit dem Verwerfen der Biomasse nach Zellaufschluss verloren. Eine weitere Möglichkeit, die Ausbeuten an aktivem Enzym zu erhöhen, lag somit in der Renaturierung des exprimierten, inaktiven Produkts.

Um die Renaturierung durchzuführen, wurde die Biomasse in Aufschlusspuffer (2.2) resuspendiert und die Zellen bei 1,5 kbar aufgeschlossen (Cell Disruption Equipment, IUL Instruments GmbH). Anschließend wurde der Gesamtzellextrakt durch Zentrifugation in einen löslichen und unlöslichen Teil fraktioniert und die Proteine separat denaturiert. Hierfür wurden die Zelltrümmer in einem möglichst geringen Volumen Denaturierungspuffer (2.2) resuspendiert. Die Reaktivierung wurde unter starkem Rühren bei 4 °C durch pulsweise Zugabe von denaturierter Proteinlösung in Renaturierungspuffer (2.2) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proben mit PQQ inkubiert und die Enzymaktivität bestimmt (2.5.5).

Die Renaturierung der Gluc-DH wurde anhand der Enzymvariante getestet. Hierfür wurden Biomassen des Niedrig-Expressionssystems Var (3.1) und des optimierten Expressionssystems Var-pUC (3.4.1.2) verwendet. Die Analyse zeigte, dass aus den Biomassen beider Expressionssysteme exprimierte, aber inaktive Gluc-DH in die aktive Form überführt werden konnte. Die Ausbeuten renaturierbaren Enzyms waren allerdings im optimierten Var-pUC System um den Faktor 2,5 größer (Abb. 25).

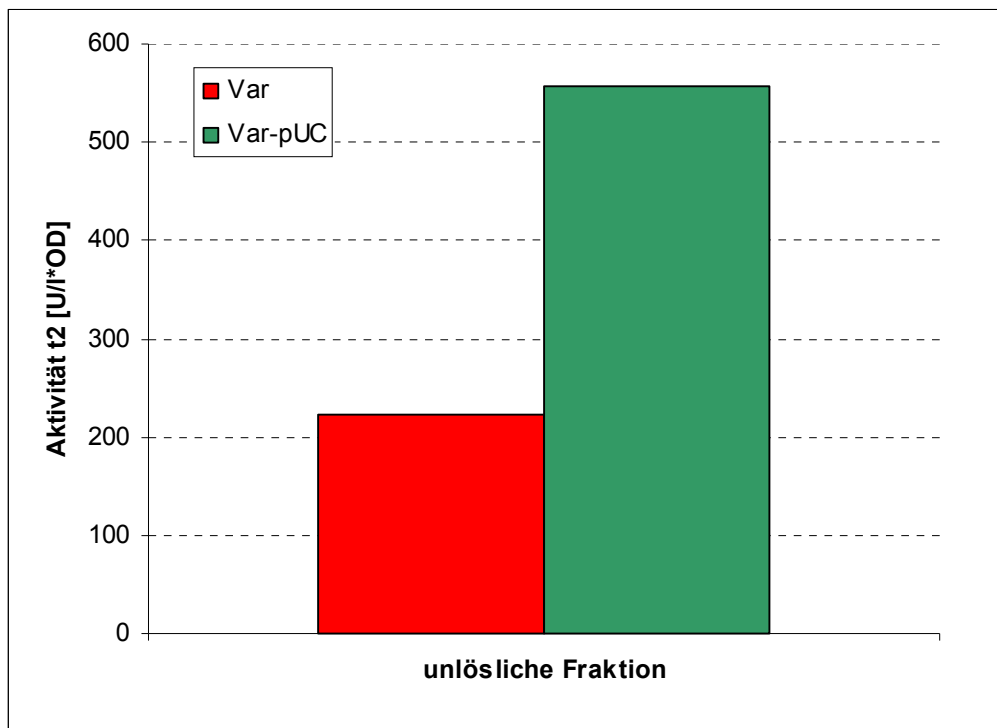


Abb. 25: Renaturierung der Gluc-DH aus der unlöslichen Zellfraktion.

Die Analyse von Proben des Var und Var-pUC Expressionssystems zeigte, dass bereits 2 h nach der Induktion große Mengen Protein renaturiert werden konnten. Im optimierten Var-pUC Expressionssystem wurden unter gleichen Bedingungen 2,5-fach höhere Ausbeuten erzielt.

In weiteren Analysen wurden die Proben der löslichen Fraktion untersucht. Während die De- und Renaturierung des herkömmlichen Niedrig-Expressionssystems (Var) vergleichbare Aktivitäten zeigten, befand sich auch noch in der löslichen Fraktion des optimierten Var-pUC Expressionssystems inaktives, d. h. lösliches, aber nicht korrekt gefaltetes Protein, das reaktiviert werden konnte. Die Versuche zeigten, dass durch eine Denaturierung und anschließende Gluc-DH-Reaktivierung mit PQQ die Ausbeuten an aktiver Gluc-DH verdoppelt werden konnten (Abb. 26).

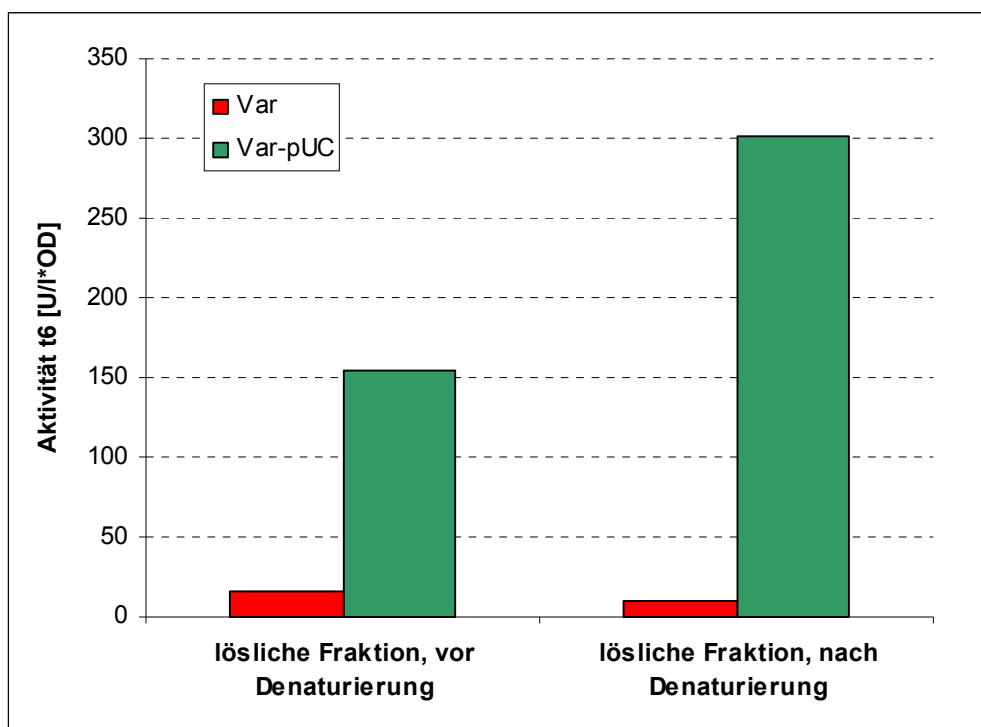


Abb. 26: Analyse der löslichen Fraktion vor und nach Denaturierung.

Die Analyse der löslichen Fraktion 6 h nach Induktion zeigt, dass sich im optimierten Var-pUC Expressionssystem noch lösliche, aber inaktive Gluc-DH befindet. Durch die Denaturierung und anschließende Reaktivierung mit PQQ konnten die Ausbeuten an aktivem Enzym verdoppelt werden. Das herkömmliche Niedrig-Expressionssystem (Var) wies erwartungsgemäß keine Aktivitätszunahme auf.

Im Rahmen dieser Analysen wurden zudem die Renaturierungsbedingungen und der Einfluss von PQQ auf die Reaktivierung untersucht. Hierfür wurde eine Probe aus der unlöslichen Fraktion des optimierten Expressionssystems Var-pUC untersucht. Nach der Denaturierung wurde die Probe entweder pulsweise in Renaturierungspuffer (2.2) gegeben, in Renaturierungspuffer mit 1/10 PQQ-haltiger Rekonstitutions-Lösung renaturiert oder nach der Denaturierung direkt 1:20 in PQQ aufgenommen und somit ohne eine klassische Renaturierung reaktiviert. Die Ergebnisse zeigen, dass bei geringen Gluc-DH Konzentrationen PQQ für die Renaturierung inaktiven Enzyms ausreichend ist (Abb. 27).

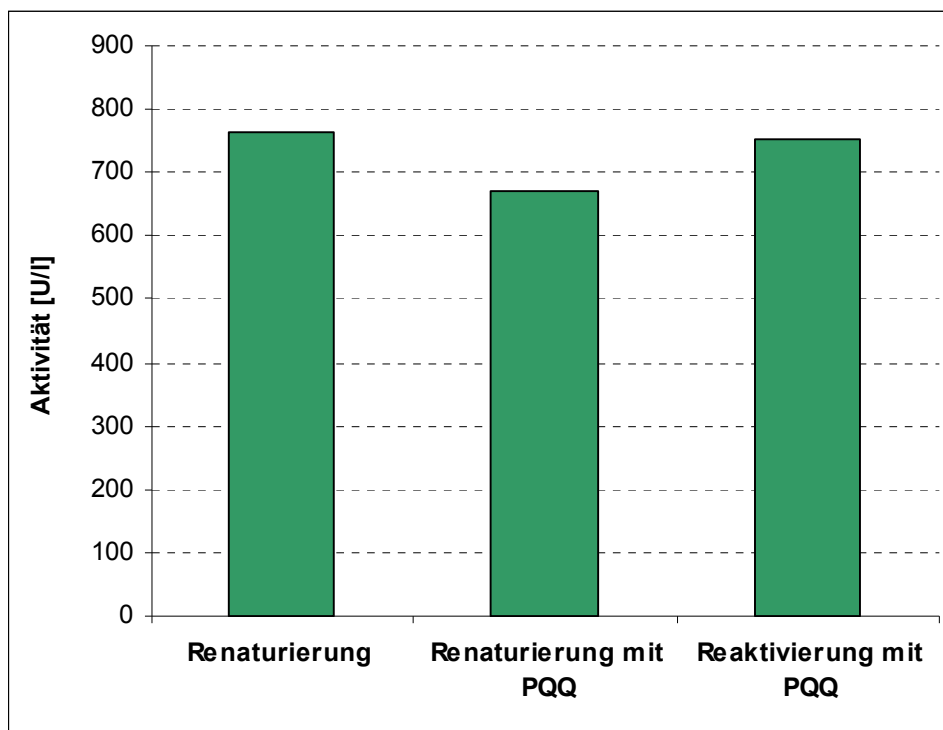


Abb. 27: Einfluss von PQQ auf die Renaturierung der Gluc-DH.

Die Renaturierung der Gluc-DH wurde unter verschiedenen Bedingungen getestet. Proben aus der unlöslichen Fraktion des Var-pUC Expressionssystems wurden entweder klassisch durch pulsweise Renaturierung in Renaturierungspuffer (Renaturierung), in Renaturierungspuffer mit PQQ (Renaturierung mit PQQ) oder einzig durch die Inkubation mit PQQ bei RT (Reaktivierung mit PQQ) reaktiviert. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen zeigen, dass bei Gluc-DH Konzentrationen bis 800 U/l allein die Anwesenheit von PQQ für die Renaturierung ausreichend sind.

Wurden hingegen Fermentationen untersucht, in denen die Konzentration der Gluc-DH aus den Schüttelkultur-Experimenten übertroffen wurde, zeigte sich, dass eine mit PQQ reaktivierbare Schwellenkonzentration von 75 kU/l existiert. Die Reaktivierung größerer Enzymmengen erfordert demgegenüber die Durchführung einer klassischen Renaturierung. Die Analyse zeigte, dass die Renaturierung der Gluc-DH sehr schnell erfolgt. Die Messungen von Enzymaktivitäten nach 50 min Renaturierung wies keine signifikante Veränderungen im Vergleich zur Analyse nach 10 min auf (Tab. 14).

Tab. 14: Einfluss von PQQ, Zeit und Enzymkonzentration auf die Renaturierung der Gluc-DH. Analyse einer Fermentationsprobe des Expressionssystems *E. coli* KS474/pQE80L-VarX (2.3) auf Renaturierbarkeit der Gluc-DH. Die gemessenen Aktivitäten verdeutlichen, dass bis zu 75 kU/l Gluc-DH einzig durch PQQ reaktiviert werden konnten. Größere Mengen rekombinanten Produkts erforderten eine klassische Renaturierung. Die Probenanalyse nach 10 bzw. 50 min zeigen, dass die Zeit einen geringen Einfluss auf die Renaturierung hat. Die Mengen renaturierbaren Enzyms, die in der unlöslichen Fraktion verloren gehen, waren signifikant.

Gluc-DH [kU/l]	Lösliche Fraktion	Unlösliche Fraktion
Nach der Denaturierung	75	76
10 min nach Renaturierung	160	237
50 min nach Renaturierung	147	261

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Expressionsoptimierung des Niedrigproduzenten (Var) basierte auf rational abgeleiteten Hinweisen der proteomweiten Expressionsprofil-Analyse (3.3). Auf Basis des unterschiedlich exprimierten Transkriptionsrepressors LacI wurde die Plasmidkopienzahl als eine Ursache variierender Expressionsleistungen identifiziert. Durch die Erhöhung der Plasmidkopienzahl konnte die Produktionsleistung des Niedrigproduzenten signifikant verbessert werden. Die Identifikation einiger Chaperone zeigte, dass die Ausbeuten der rekombinanten Gluc-DH durch die Verbesserung der Löslichkeitsvermittlung erhöht werden können. In diesem Zusammenhang konnten erhebliche Mengen exprimierten, inaktiven Produkts renaturiert und in aktives Enzym überführt werden.

4 Diskussion

Im Rahmen der Optimierungsarbeiten von diagnostisch interessanten Enzymen werden Proteinvarianten erzeugt, die im Vergleich zum Wildtyp-Enzym für die Anwendung optimierte Eigenschaften aufweisen. Die Enzymvarianten werden mit einem zielgerichteten Mutagenese-Ansatz (*directed evolution*) durch den Austausch von einzelnen oder wenigen Aminosäuren generiert. Der Vergleich mit dem Wildtyp-Enzym zeigt, ob das Protein erfolgreich optimiert werden konnte. Werden die Enzyme anschließend in geeigneten Wirt-/Vektor-Systemen exprimiert, lassen sich in vielen Fällen Unterschiede in der Expressionsleistung detektieren. Im Regelfall wird das optimierte Enzym in geringeren Mengen produziert als das Wildtyp-Enzym. Diese Beobachtung ist bei der Expression in sonst isogenen Wirt-/Vektor-Systemen bemerkenswert, da sich die rekombinanten Proteine nur durch wenige Aminosäure-Austausche voneinander unterscheiden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte am Beispiel eines solchen Expressionsmodells untersucht werden, ob Gründe für die unterschiedlichen Produktionsleistungen identifizierbar sind. Hierfür sollten Expressionsprofile aufgenommen und die Wirt-/Vektor-Systeme miteinander verglichen werden. Die Analyse sollte dabei helfen, das unterschiedliche Expressionsverhalten auf metabolischer Ebene besser zu verstehen. Darüber hinaus sollten die generierten Informationen dazu genutzt werden, die Produktionsleistung des Niedrig-Expressionssystems auf Basis einer rationalen Optimierung zu verbessern.

Das prokaryontische Modellsystem

Das in dieser Arbeit verwendete Expressionsmodell wird für die Herstellung einer Glukose-Dehydrogenase (Gluc-DH) verwendet. Das Gluc-DH Wildtyp-Enzym wurde durch einen Mutagenese-Ansatz hinsichtlich der Substratspezifität optimiert. Durch Veränderungen in 1,5 % der Aminosäure-Zusammensetzung konnte eine Enzymvariante mit geringerer Affinität für Maltose hergestellt werden (1.5).

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass die Expression der beiden Enzyme im sonst isogenen Wirt-/Vektor-System *E. coli* XL1Blue/pQE80L zu unterschiedlichen Zellreaktionen führt (3.1). Das Expressionssystem für die Enzymvariante (Var) unterscheidet sich sowohl in der Produktionsleistung als auch im Wuchsverhalten deutlich vom Wildtyp-System (WT). Der Vergleich der beiden Expressionssysteme wurde im Schüttelkultur-Maßstab durchgeführt. Durch die Kultivierung im 400 ml Maßstab sollte vermieden werden, dass die Probennahme entscheidenden Einfluss auf die Umweltbedingungen der Zelle nimmt, wie z. B. die Veränderung des Sauerstoffeintrags durch ein sinkendes Kolbenfüllvolumen. Die

Wuchsmessungen zeigten, dass die Zelldichten im Var-System während der rekombinanten Proteinexpression stetig zunehmen. Im Vergleich dazu befindet sich das Expressionssystem für die WT-Gluc-DH (WT) bereits zwei Stunden nach der Induktion in der stationären Wuchsphase (Abb. 8). Die Analyse der Produktbildung wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt. Sie verdeutlicht, dass geringere Mengen der Enzymvariante im Vergleich zur Wildtyp Gluc-DH hergestellt werden (Abb. 9 und 11). Mit dem Var-System wurde somit ein Niedrigproduzent charakterisiert, der sich sowohl im Wuchs- als auch im Expressionsverhalten vom WT-System unterscheidet. Die Sequenzierung des gesamten Plasmids stellte sicher, dass außer den bekannten Unterschieden im Zielprotein keine weiteren Mutationen in den übrigen Strukturgenen vorliegen, die für die unterschiedliche Expressionsleistung verantwortlich sein könnten. Die mehrfachen, unabhängigen Wiederholungen der Experimente (biologische Replikate) und der Vergleich des Wuchsverhaltens im induzierten und nicht-induzierten Kultivierungszustand (Daten nicht gezeigt) wiesen darauf hin, dass die Unterschiede der beiden Expressionssysteme auf die heterologe Gluc-DH Expression zurückzuführen waren. Das Expressionsmodell zeigt damit, dass bereits geringfügige Änderungen in der Aminosäurezusammensetzung rekombinanter Proteine Einfluss auf die heterologe Proteinexpression haben können.

Bei der Auswahl des Modellsystems wurde auf große Unterschiede im Stoffwechselverhalten der Expressionssysteme zurückgegriffen. Dies sollte zum einen die Wahrscheinlichkeit erhöhen, über den Ansatz des *expression profiling* aussagekräftige Hinweise auf die unterschiedlichen Zelladaptationen während der rekombinanten Proteinexpression zu erhalten. Zum anderen sollte sich ein breiteres Spektrum für die Entwicklung und Durchführung einer rationalen Expressionsoptimierung eröffnen. Hierdurch sollten die Informationen des Hochproduzenten (WT) für eine verbesserte Expression des diagnostisch interessanteren Produktes (Gluc-DH Enzymvariante) verwendet werden.

2-D Gelelektrophorese

Escherichia coli ist einer der meist verwendeten und best untersuchten Organismen (Lee & Lee, 2003). In dieser Arbeit wurden die Expressionsprofile des Modellsystems auf Proteombasis mit Hilfe von 2-D Gelen erstellt. Parameter, die bei der Methodenentwicklung zu berücksichtigen waren, umfassten die Probenvorbereitung, den Probeneintritt sowie die Fokussierung während der IEF, die Trenngeschwindigkeit in der 2. Dimension (SDS-PAGE) und die Protein-Detektion.

Bei der Probenaufarbeitung müssen vor allem die Pufferzusammensetzung und die Handhabung der biologischen Proben berücksichtigt werden (Hochstrasser *et al.*, 1988;

VanBogelen & Neidhardt, 1999; Shaw & Riederer, 2003; Görg *et al.*, 2004). Zunächst sollten die Zellen in einen peri- und cytoplasmatischen Teil fraktioniert werden. Dadurch hätte das Periplasma, in das die rekombinante Gluc-DH sekretiert wird, separat analysiert werden können. Hierfür wurden die Zellen bei RT mit Lysozym inkubiert. Um proteolytische Effekte zu reduzieren, wurden der Zellsuspension Proteaseinhibitoren (Complete, Roche Diagnostics) zugesetzt. Die Enzymbehandlung erforderte physiologische Pufferbedingungen, so dass nach der Inkubation eine Umpufferung des Lysates in 2-DE-kompatiblen Harnstoffpuffer erforderlich war. Ein Großteil der Gluc-DH verblieb nach der Lysozymbehandlung in der Membran. Ein Teil davon löste sich nach dem Ultraschallaufschluss in der cytoplasmatischen Fraktion, während der Rest in den Zelltrümmern detektierbar war. Dies kann auf nicht vollständig sekretierte Gluc-DH oder auf hydrophobe Interaktionen des Enzyms mit Bestandteilen der Zellhülle zurückzuführen sein. Eine reproduzierbare Fraktionierung der Zellen war mit dieser Methode nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Letztlich wurden die Zellen mehrfach mit physiologischer Kochsalz-Lösung gewaschen, um störende Salze und Medienbestandteile zu entfernen und anschließend in denaturierendem Probenpuffer resuspendiert. Durch eine Ultraschall-Behandlung wurde der Aufschluss komplettiert, die Zelltrümmer entfernt und der Überstand für die 2-D Gelelektrophorese verwendet (2.5.6). Die Gelqualität wurde vor allem mit einem verbesserten Probenpuffer (Olsson *et al.*, 2002) und durch die Optimierung der Fokussierungstechnik (Görg *et al.*, 2004) verbessert. Um die Reproduzierbarkeit der Analysen zu erhöhen, sollte die Probenaufarbeitung generell so einfach wie möglich gehalten werden. Jeder zusätzliche Arbeitsschritt stellt eine Quelle für Variationen dar, die Ursache der Probenvorbereitung und nicht auf eine unterschiedliche Biologie zurückzuführen sind.

Die Proteintrennung in der ersten Dimension erfolgt mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IEF nach dem Prinzip immobilisierter pH-Gradienten (IPG; Görg *et al.*, 1988) durchgeführt. Diese Methode zeichnet sich durch die Fixierung der Trägerampholyte (*carrier ampholytes*, CA) aus, die den Aufbau eines stabilen pH-Gradienten gewährleistet, den experimentellen Versuchsaufwand reduziert und zu höheren Reproduzierbarkeiten beiträgt (Görg *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurden IPG-Streifen mit einem pH-Gradienten von 3 - 10 NL (nicht linear) verwendet. Der Großteil der *E. coli*-Proteine weist zwar einen isoelektrischen Punkt (pI) zwischen pH 4 - 7 auf, die Wahl eines breiteren pH-Gradienten ermöglichte aber zusätzlich den Nachweis der rekombinanten Gluc-DH (pI 8,9). Vor ihrem Gebrauch müssen die IPG-Streifen rehydriert werden. Die Rehydrierung erfolgt über einen Zeitraum von 12 - 16 Stunden und kann entweder mit oder ohne Proteinprobe erfolgen (Görg *et al.*, 2000). Die Rehydrierung mit der Probe birgt besonders bei großen und hydrophoben Proteinen sowie bei Proteinen mit einem basischen isoelektrischen Punkt

Schwierigkeiten. Bei der Durchführung von quantitativen Analysen sollte die Probencup-Beladung dieser Methode vorgezogen werden. Hierbei diffundieren die Proteine mit geringem Stromfluss in die IPG-Streifen ein. Im Vergleich zur Rehydrierung mit der Probe ist die Probencup-Beladung reproduzierbarer und birgt weniger die Gefahr von Kreuzkontaminationen bei der Analyse mehrerer Zellysate (Görg *et al.*, 2004). Die Qualität der 2-D Gele hängt unter anderem davon ab, an welcher Stelle der Probencup auf dem Streifen positioniert ist (Abb. 12). Wie auch in dieser Arbeit ist zumeist der anodische dem kathodischen Probeneintritt überlegen. Die Resultate hängen von der Art des Analyten, der Pufferzusammensetzung und der Proteinkonzentration ab. Die Beladung der Streifen muss in Abhängigkeit von Probenzusammensetzung und -vorbereitung jedoch stets empirisch ermittelt werden (Görg *et al.*, 2004).

Für die Fokussierung der Proteine muss der Leistungseintrag (Vh) umso größer sein, je länger der IPG-Streifen und je enger der pH-Gradient ist. Ist die Fokussierungszeit zu kurz gewählt, sind zumeist horizontale Schmiereffekte zu beobachten. Im Falle der Über-Fokussierung tritt ein reverser elektroosmotischer Effekt auf, der auf den aktiven Transport von Wassermolekülen zurückzuführen ist. In diesem Fall sind verzerrte Proteinspots und horizontaler Schmier im basischen Bereich des 2-D Gels die Folge (Görg *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Fokussierungsprotokoll erarbeitet, das die Auflösung von 150 bis 600 µg *E. coli*-Ganzzellysat gewährleistet. Mittels anodischer Probencup-Beladung konnten die Proteine bei einer Maximalspannung von 8000 V über einen Zeitraum von 16,5 h fokussiert werden (2.5.6).

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Proteine für den Transfer in die 2. Dimension equilibriert. Hierfür wurden die IPG-Streifen in SDS-Lösung (Equilibrierpuffer, 2.2) inkubiert. Die anschließende Reduktion mit Iodacetamid alkyliert freies DTT aus dem Probenpuffer sowie freie Sulfhydryl-Gruppen der Proteine (Görg *et al.*, 2004).

Die Trennung der Proteine in der 2. Dimension wurde in einem vertikalen SDS-PAGE System durchgeführt. Hierdurch können mehrere 2-D Gele parallel bearbeitet werden. Die entscheidenden Aspekte in der 2. Dimension sind der Transfer der Proteine von den IPG-Streifen in das Polyacrylamidgel sowie der Leistungseintrag während der Proteintrennung (Görg *et al.*, 2004). Generell ist eine zu hohe Laufgeschwindigkeit zu vermeiden, um Schmier-Effekte zu minimieren.

Um ein geeignetes Protokoll für die 2-D Gelelektrophorese zu entwickeln, sind demnach viele Parameter zu berücksichtigen. Insgesamt wurden über 120 Gele im Rahmen der Methodenoptimierung erstellt. Letztlich konnte ein Verfahren entwickelt werden, das unter

Berücksichtigung einer reproduzierbaren Probenvorbereitung die qualitativ hochwertige Auflösung eines *E. coli*-Ganzzelllysates ermöglicht.

Die Vergleichsanalyse von Hoch- und Niedrigproduzent wurde mit der DIGE-Technik durchgeführt (1.3). Im Gegensatz zur konventionellen 2-DE, die für die Methodenentwicklung verwendet wurde, können technische von biologischen Variationen durch die Verwendung eines internen Standards unterschieden werden. Indem die Signalstärken der Vergleichsproben mit der des Standards verglichen werden, wird der Expressionsunterschied in jedem 2-D Gel als Verhältnis von Probe zu internem Standard berechnet. Hierdurch werden Proteinunterschiede, die auf die Analysenmethode zurückzuführen sind, erkannt und können von biologischen Variationen unterschieden werden (Abb. 4). Im Vergleich zur konventionellen Methode stellt die DIGE-Technologie eine signifikante Verbesserung der 2-D Gelelektrophorese und der Interpretation von Proteomdaten dar (Marouga *et al.*, 2005).

Statistische Aspekte in der 2-D Gelelektrophorese

Bevor Expressionsprofile miteinander verglichen werden, sollte eine statistische Bewertung der Analysenmethode erfolgen (1.4). Im Rahmen der DIGE-Technologie sollte der signifikant nachweisbare Expressionsunterschied eines Proteins ermittelt (Tonge *et al.*, 2001) und der Umfang eines geeigneten Versuchsdesigns bestimmt werden (Hunt *et al.*, 2005).

Die 2-D Gelelektrophorese ist technischen Variationen unterworfen, die von der Probenvorbereitung, der Proteintrennung und der Färbemethode abhängig sind. Weiterhin müssen bei der Analyse biologische Variationen berücksichtigt werden, die auf den Stoffwechsel der Zellen und deren Umgebungsbedingungen zurückzuführen sind (Hunt *et al.*, 2005). Die statistische Bewertung dient dazu, reale Expressionsunterschiede von technischen bzw. biologischen Artefakten zu unterscheiden. Weiterhin musste eine statistisch abgesicherte Grundlage für die Expressionsoptimierung gelegt werden, die auf den Ergebnissen der Proteomanalyse basieren sollte.

Bei der Detektion von Expressionsunterschieden können entweder falsch-positive (α -Fehler) oder falsch-negative Signale (β -Fehler) zu Fehlinterpretationen führen (3.2.2.1; Karp & Lilley, 2005). Die Wahrscheinlichkeit für α -Fehler wird in der Regel vor der Analyse mit 5 - 10 % definiert (Dell *et al.*, 2002). Im Rahmen der 2-DE-Technologie bedeutet dies, dass oberhalb eines kritischen Expressionsunterschiedes eine Restwahrscheinlichkeit von 5 - 10 % besteht, dass der Proteinunterschied real doch nicht existiert. Der kritische Expressionsunterschied (*fold change*, fc) berücksichtigt das Signalrauschen innerhalb der Methode (technische Variation) bzw. innerhalb der Zelle (biologische Variation). Er kann als unterer Schwellenwert für signifikant nachweisbare Proteinunterschiede angesehen werden (Karp *et al.*, 2004). Zur

Bestimmung des f_c wurde eine Probe mehrfach analysiert, indem sie mit den CyTM-Farbstoffen markiert und mittels 2-DE analysiert wurde (3.2.2.2). Da ein und dieselbe Probe miteinander verglichen wurde, waren alle detektierten Expressionsunterschiede falsch positive Signale. Mit $\alpha = 5\%$ umfasste der f_c 95% aller gemessenen Proteinunterschiede. Um Differenzen in den Expressionprofilen zu detektieren, musste ein Proteinspot in allen Gelbildern eines Datensatzes nachgewiesen werden. Weiterhin wurde der p-Wert des Student t-Tests als Qualitätskontrolle für die Aussagekraft eines Proteinunterschiedes verwendet (Fodor *et al.*, 2005).

In der statistischen Versuchsreihe wurden von einer Probe drei technische Replikate erstellt. Für die Auswertung wurden drei biologische Proben verwendet (Tab. 7). Wird jede Probe isoliert betrachtet, kann der kritische Expressionsunterschied unter Berücksichtigung der technischen Variation bestimmt werden. Werden die 2-D Gele aller Proben ausgewertet, wird zusätzlich die biologische Variation der Zellen bewertet (Karp *et al.*, 2005). Unter diesen Voraussetzungen wurde ein minimal nachweisbarer Expressionsunterschied von 1,4 bestimmt, der sowohl die technischen als auch die biologischen Variationen berücksichtigte (Tab. 8). Der Expressionsunterschied für die technische Variation lag mit einem f_c von 1,28 nur minimal darunter. Um den Einfluss der Biologie umfassend zu bewerten, muss hierbei die Anzahl der detektierten Proteinspots berücksichtigt werden, die von 76,5% auf 34% zurückging. Die Ausschlussgrößen für Expressionsunterschiede wurden unter diesen Bedingungen sehr restriktiv gewählt, um die Qualität der Daten deutlich zu erhöhen.

Weiterhin können bei der Expressionsanalyse real existierende Proteinunterschiede übersehen werden (β -Fehler). Die direkte, experimentelle Überprüfung von falsch-negativen Signalen ist äußerst komplex (Alban *et al.*, 2003). Hierfür müssen Proteingemische bekannter Konzentrationen verwendet und miteinander verglichen werden. Unter Berücksichtigung der methodisch detektierbaren oberen und unteren Nachweisgrenzen, sind variierende Konzentrationen einzelner Markerproteine innerhalb und zwischen den Vergleichsproben erforderlich. Da das Bildanalysen-Programm (DeCyderTM) für eine qualitativ hochwertige Auswertung mindestens 400 Proteine pro Gel benötigt (DeCyderTM User Manual), müssen die Experimente mit einem komplexen Proteingemisch durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Abschätzung von β mit den Daten aus der statistischen Versuchsreihe durchgeführt (3.2.2.2). Durch eine Häufigkeitsanalyse der gemessenen Proteinunterschiede konnte die Wahrscheinlichkeit, einen Expressionsunterschied um den Faktor 2 nicht zu detektieren, auf 1% geschätzt werden (Abb. 14). Hierbei wurde vorausgesetzt, dass sich die Häufigkeitsverteilung der Proteine mit zunehmenden Expressionsunterschieden nicht verändert.

Um den Informationsgehalt der detektierten Expressionsunterschiede zu erhöhen, wurde eine Überprüfung des *E. coli*-Ganzzelllysates auf Präferenzreaktionen mit den Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Da die Farbstoffe in der Kopplungsreaktion als limitierende Faktoren eingesetzt werden (*minimal labelling*), sollte statistisch gewährleistet sein, dass ein Cyaninderivat an ein Protein bindet. Die Kopplung erfolgt durch die Bildung eines NHS-Esters an die ϵ -Aminogruppe der proteinogenen L-Lysine (Abb. 3). Hat einer der Farbstoffe zu einem Protein mit beispielsweise vielen Lysin-Gruppen eine höhere Bindungsaffinität, ist das Fluoreszenzsignal intensiver als in den Vergleichsproben. Bei der Analyse wird somit ein Expressionsunterschied detektiert, der auf die Kopplungschemie zurückzuführen ist. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Proteine bei der Überprüfung von Präferenzreaktionen detektiert, die sich durch einen f_c größer als Faktor 2,0 unterschieden (3.2.2.3). Keines dieser Proteine wurde im Vergleich der Expressionsprofile des Modellsystems detektiert. Zum einen kann dies auf die 5 %-ige Restwahrscheinlichkeit für falsch-positive Detektionen in der statistischen Versuchsreihe zurückgeführt werden. Zum anderen wurde bei der Vergleichsanalyse ein auf diese Ergebnisse angepasstes Versuchsdesign verwendet (Tab. 9). Um den Effekt von Präferenzreaktionen zu minimieren, wurden die Proben daher alternierend mit den Farbstoffen CyTM3 und CyTM5 markiert (*reverse labelling*). Aufgrund der statistischen Versuchsreihe konnte in der Vergleichsanalyse darauf verzichtet werden, von einem 2-D Gel mehrere technische Replikate herzustellen. Stattdessen wurde die Anzahl der biologischen Proben erhöht. Um systematische Fehler bei der Herstellung der Vergleichsproben zu vermeiden, wurden alle biologischen Replikate unabhängig voneinander hergestellt. Die Versuche wurden an verschiedenen Tagen, unter Verwendung frisch hergestellter Puffer, Kulturmedien und Vorkulturen durchgeführt. Um die Variationen, die während der Kultivierung entstanden waren, nicht ursächlich auf biologische Variationen zurückzuführen, wurden die Proben aus einem Schüttelkulturexperiment (WT und Var) auf einem 2-D Gel analysiert (*matched design*). Der dritte Fluoreszenzfarbstoff wurde für einen internen Standard verwendet (Alban *et al.*, 2003). Durch die Berechnung der Expressionsunterschiede von Probe 1 zu internem Standard im Verhältnis von Probe 2 zu internem Standard, können mit der DIGE-Technologie Gel-zu-Gel-Variationen von den Unterschieden auf Zellebene differenziert werden (Abb. 4 und 5).

Demzufolge ist die Durchführung einer statistischen Versuchsreihe für die Einschätzung des Informationsgehaltes von Proteomanalysen sehr bedeutend. Insgesamt wird hierdurch der experimentelle Aufwand für den Vergleich der Expressionsprofile reduziert und die Kosten für die DIGE-Analyse gesenkt. Indem eine höhere Anzahl biologischer Replikate verwendet wird, kann der Informationsgewinn für die Stoffwechselanalyse erhöht werden.

Auswertung der Expressionsprofile

Um die 2-D Gele des Hoch- und Niedrigproduzenten auszuwerten, wurden die detektierten Expressionsunterschiede gefiltert. Für die Auswertung wurden nur die Proteinspots berücksichtigt, die in allen 2-D Gelbildern eines Datensatzes t_i detektiert wurden, sich um einen Faktor $\geq 1,40$ unterschieden und einen p-Wert $\leq 1\%$ (Student t-Test) aufwiesen (3.3.1). Zusätzliche Filterparameter wie Spotvolumen oder Peaksteigung wurden bei der Auswertung nicht verwendet, da die gewählten Ausschlussgrößen eine gute Spotqualität gewährleisteten. In einem ersten Schritt wurden die Proteomdaten mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) untersucht (3.3.2.1). Hierfür werden die Variationen innerhalb eines Datensatzes (t_i) und zwischen den Expressionssystemen miteinander verglichen. Die PCA verdeutlicht, dass sich die Unterschiede des Modellsystems im Wuchs- und Expressionsverhalten (3.1) in den Expressionsprofilen wieder finden (Abb. 15). Die Variationen innerhalb eines Datensatzes (WT bzw. Var) zu einem Kultivierungszeitpunkt (t_0 , t_1 bzw. t_2) waren gering. Insbesondere die Abweichungen der biologischen Replikate des Hochproduzenten zum Zeitpunkt t_2 fielen minimal aus. Mit Einsetzen der rekombinanten Proteinexpression ab t_1 stiegen die Variationen sowohl innerhalb eines Systems von t_0 nach t_1 bzw. von t_1 nach t_2 als auch zwischen dem WT- und dem Var-System an. Damit konnte gezeigt werden, dass die DIGE-Technologie für die Detektion von Unterschieden zwischen zwei Vergleichssystemen geeignet ist. Im Gegensatz zu den bisherigen Messmethoden, mit denen nur die Resultate der unterschiedlichen Stoffwechselforgänge beobachtet werden können, ermöglicht der Ansatz des *expression profiling*, nach den Gründen für diese Unterschiede zu suchen.

Mittels Bildanalyse konnten 363 Proteinspots detektiert werden, die zu den Zeitpunkten t_0 , t_1 bzw. t_2 unterschiedlich exprimiert wurden (3.3.2.2). Um die Proteomdaten auszuwerten, wurden die Proteine priorisiert. Die Analyse zum Zeitpunkt t_0 wurde dazu verwendet, Regulationsmechanismen vor der rekombinanten Proteinexpression zu detektieren. Erwartungsgemäß wurden zu diesem Zeitpunkt wenige Proteinunterschiede detektiert. Eine Stunde nach der Induktion (t_1) traten Proteine auf, die einen größeren Effekt auf die Expression der Gluc-DH hatten als solche, die zwei Stunden nach Induktion (t_2) identifiziert wurden. Letztere konnten entweder der unterschiedlichen Proteinexpression oder dem unterschiedlichen Wuchsverhalten zugeordnet werden. Proteine, die vor t_2 unterschiedlich reguliert wurden, wurde demnach die höchste Priorität zugeordnet. Die Anzahl der interessantesten Proteinspots reduzierte sich dadurch auf 170.

Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels Massenspektrometrie (3.3.2.3). Um genügend Probenmaterial zur Verfügung zu stellen, mussten präparative 2-D Gele hergestellt und auf maximale Proteinbeladung getestet werden. Die Experimente zeigten, dass mit der

beschriebenen Methode (2.5.6) maximal 600 µg Gesamtprotein ohne Qualitätsverluste aufzulösen sind. Für die massenspektrometrische Analyse wurden vier präparative 2-D Gele verwendet und die Proteine mittels MALDI-TOF identifiziert. Anschließend wurde eine Referenzgelkarte erstellt, die mit den Proteinspots aus der Expressionsprofil-Analyse verglichen wurde. Insgesamt konnten 54 % der Proteine identifiziert werden. Einerseits wurden bei den präparativen Gelen Proteinspots aufgrund der unterschiedlichen Nachweisgrenzen von Fluoreszenz- und Coomassie-Färbung nicht detektiert, andererseits war die Spektrenqualität einiger Proteinspots für deren Identifizierung nicht ausreichend.

Interpretation der Stoffwechseldaten

Um einen Überblick der unterschiedlich exprimierten Proteine zu erhalten, wurden diese anhand ihrer Stoffwechselfunktion gruppiert. Die Bereiche Katabolismus und Anabolismus umfassten 1/3 der identifizierten Proteine (Tab. 10). Dem Bereich Adaption wurden alle Proteine zugeordnet, die mit den Umweltbedingungen der Zellen im Zusammenhang standen. Hierfür wurden die Gruppen Transkription, Translation & Modifikation, Transport, äußere Membran, globale Regulatoren, Detoxifikation, allgemeiner Stress, Degradation, Zellentwicklung sowie Cofaktoren & Carrier definiert. Die Gruppierungen sollten dabei helfen, die Analysedaten im globalen Zusammenhang der Zellbiologie zu betrachten und Netzwerke oder Verbindungen zwischen ihnen zu erkennen. Die Interpretation der Daten diente dazu, das unterschiedliche Stoffwechselverhalten von Hoch- und Niedrigproduzent zu verstehen und Gründe für die unterschiedlichen Expressionsleistungen zu identifizieren.

Das Stoffwechselverhalten des Var-Expressionssystems zeichnete sich vor der 2-D Gel Analyse durch eine besonders niedrige Expressionsleistung aus (Abb. 11). Die Zelldichten nahmen während der Kultivierung stetig zu und der Übergang in die stationäre Wachstumsphase trat 5 - 6 h nach Induktion ein (Abb. 8).

Werden die Daten des Niedrigproduzenten im Hinblick auf den Energiestoffwechsel untersucht, so fällt grundsätzlich auf, dass deutlich mehr Proteine als im Hochproduzenten identifiziert wurden. Im Var-Expressionssystem wurden Enzyme aus der Glykolyse, der Pyruvat-Decarboxylierung und dem Citratzyklus detektiert. Wie bei Wang *et al.* (2005) wurde auch in dieser Arbeit die Überexpression der Malat-Dehydrogenase (Mdh) bei Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet. Zusätzlich zeichnete sich der Niedrigproduzent durch die Verwendung des Pentosephosphat-Weges und der KDPG-Aldolase (EdA) aus. Die Nutzung des KDPG-Weges während der rekombinanten Proteinexpression wurde auch in der Studie von Han *et al.* (2001) beschrieben. Der Entner-Doudoroff-Weg wird unter anderem

durch Carbon- und Phosphat-Mangel induziert. Die Identifizierung des allgemeinen Hungersignals Dps, das auch bei Han *et al.* (2001) und Jürgen *et al.* (2000) identifiziert wurde, sowie des allgemeinen Stressfaktors RpoS (σ^{38}) zwei Stunden nach der Induktion bestätigen diesen Befund. Der alternative Sigma-Faktor σ^{38} hat als generelle Stressantwort auf mehr als 70 Gene regulierenden Einfluss (Klauck *et al.*, 2007). Wahrscheinlich gehen die Zellen des Niedrigexpressionssystems aufgrund der *batch*-Kultivierung nach weiteren 3 - 4 h Kultivierung in die stationäre Wachstumsphase über.

Im Synthesestoffwechsel fiel insbesondere die Vielzahl der Proteine auf, die im Zusammenhang mit der Nucleinsäure-Synthese stehen. Im Vergleich zum WT-Expressionssystem werden im Var-System mehr als doppelt so viele Enzyme überexprimiert (3.3.2.4). Grundsätzlich können die Proteine entweder der Neusynthese von Purinen bzw. Pyrimidinen oder der Regeneration von Nucleosiden bzw. Nucleotiden aus bestehendem Zellmaterial zugeordnet werden. Im Niedrig-Expressionssystem wurde die Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA) detektiert, die an der Herstellung von 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat (5,10-mTHF) beteiligt ist. 5,10-mTHF ist die Hauptquelle für C1-Verbindungen in der Zelle. GlyA ist somit ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von Purinen, Thymin, Methionin, Cholin und Lipiden (Schirch & Szebenyi, 2005). Aldor *et al.* (2005) beschreiben im Gegensatz dazu eine geringere Expression von Bausteinen für die Nucleinsäure-Synthese, die bei der Herstellung von Antikörperfragmenten in *E. coli* beobachtet wurde. Mit der Identifikation von Adk, PrsA, PurC, PurH, PyrB und Udp liegt allerdings ein hoher Grad an Homologie zu Proteinen vor, die auch im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurden. Hier ist es möglich, dass die Proteine für die Nucleinsäure-Synthese im Hochproduzenten zwar geringer exprimiert werden, die Expressionslevel im Niedrigproduzenten aber absolut gesehen gleich bleiben. Die entsprechenden Proteinspots würden somit im Niedrigproduzenten als überexprimiert gelten. Um diesen Aspekt zu klären, müssten die Proben der Kultivierungszeitpunkte t_1 bzw. t_2 des Var- bzw. des WT-Systems auf einem 2-D Gel analysiert werden. Der Nucleinsäure-Bedarf kann jedoch in jedem Fall als Charakteristikum für wachsende Zellen und dem Bedarf nach Synthese-Bausteinen interpretiert werden.

Einen weiteren Hinweis auf hohe Stoffwechsel-Aktivitäten zum Aufbau von Zellmaterial liefern die Proteine, die dem Bereich „Translation & Modifikation“ zugeordnet werden konnten. Im Vergleich zum WT-Expressionssystem sind im Niedrigproduzenten besonders viele Faktoren der Proteinbiosynthese überexprimiert. Neben Elongations- und Terminationsfaktoren wurden sehr viele Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen und das Protein L9 (RplI) der ribosomalen 50S-Untereinheit identifiziert. Insbesondere überexprimiertes RplI ist in der Literatur als Charakteristikum für wachsende Zellen beschrieben (Pedersen *et al.*, 1978). Aus umgekehrter

Sicht kann dessen verminderte Expression wie bei Vind *et al.* (1993), Rinas (1996) und Jürgen *et al.* (2000) als negativer Effekt für den Aufbau der Translationsmaschinerie stärker exprimierender Zellen verstanden werden.

Die Stoffwechselfvorgänge des Hochproduzenten stehen im deutlichen Gegensatz zu denen des Niedrigproduzenten. Zum einen wurden im WT-System deutlich höhere Expressionsleistungen für die rekombinante Gluc-DH gemessen (Abb. 11). Zum anderen ging das System bereits zwei Stunden nach der Induktion in die stationäre Wachstumsphase über (Abb. 8).

Im Hochproduzenten wurden im Energiestoffwechsel sowohl weniger Proteine als auch eine geringere katabolische Stoffwechsel-Variation detektiert. So konnten nur Proteine aus dem Citratzyklus identifiziert werden (3.3.2.4). Hierbei werden die Ketoglutarat-DH (SucB) und die Succinat-DH (SdhA) durch das *cAMP receptor protein* (CRP) reguliert. CRP wird durch cAMP unter Energie-defizienten Bedingungen aktiviert, so dass diese Proteine als Hinweis auf eine reduzierte Versorgung der Zelle mit Glukose verstanden werden können.

Im Anabolismus fallen im Vergleich zum Niedrig-Expressionssystem vor allem viele Proteine aus dem Bereich der Aminosäure-Synthese auf. Neben dem Bedarf für Cystein, Phenylalanin und Lysin wurden mit LeuA, LeuC und IlvB Enzyme für die Synthese aliphatischer Aminosäuren detektiert. Auch die Detektion proteolytischer Enzyme (Tab. 12) kann als Bausteinbedarf der Zelle für die Proteinbiosynthese interpretiert werden. Zum einen hängt dieser mit der zusätzlichen metabolischen Last für das rekombinante Produkt zusammen. Zum anderen kann die übermäßige Produktbildung negative Effekte auf das Stoffwechsel-Gleichgewicht haben, so dass die Proteolyse des Produktes bzw. von Produkt-Aggregaten ausgelöst wird. Dies wurde bereits bei Kosinski & Bailey (1991) und Kosinski *et al.* (1992) beobachtet.

Im Rahmen der Nukleinsäure-Synthese wurden zwar weitaus weniger Proteine überexprimiert als im Var-System, die Dihydroorotat-Oxidase (PyrD) wies allerdings einen besonders hohen Expressionsunterschied auf (fc -11,5 (t_1); -5,6 (t_2)). PyrD katalysiert die Herstellung von Orotat, das ein zentrales Molekül in der UMP- und CMP-Synthese ist (Larsen & Jensen, 1985). Bei dieser Reaktion kommt es zur Freisetzung von Wasserstoffperoxid. Als reaktives Sauerstoffmolekül steht dieses in direktem Zusammenhang zu oxidativem Stress und der Überexpression der Katalase (KatG). KatG wandelt H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff um und trägt demnach entscheidend zur Detoxifikation des Hochproduzenten bei.

Eine häufig beobachtete Reaktion der Zelle auf die rekombinante Produktbildung ist die Überexpression von Proteinen aus dem Bereich des Hitzeschocks (*heat shock response*), wie

bereits Parsell & Sauer (1989) beobachteten. Eines der hierbei meist detektierten Proteine ist das Chaperon DnaK. Weiterhin wurden der Trigger-Faktor (Tig) und/oder HtpG in der vorliegenden Arbeit wie auch bei Rinas (1996), Jürgen *et al.* (2000), Han *et al.* (2001) und Han *et al.* (2003) beobachtet. Hoffmann & Rinas (2001) zeigten den Zusammenhang dieser Reaktion mit aggregiertem Produkt in der Zelle. Durch den Vergleich von exprimiertem Protein und aktiver Gluc-DH (Abb. 20) und durch die Ergebnisse der Renaturierungsversuche (Abb. 25) konnten auch für die Expression der rekombinanten Gluc-DH Engpässe in der Löslichkeitsvermittlung nachgewiesen werden.

In der weiteren Stoffwechselanalyse des Hochproduzenten wurden einige Proteine aus den Gruppen äußere Membran, Lipid-Synthese und Zellentwicklung in den Zusammenhang des sog. *envelope stress* gebracht (Tab. 15).

Tab. 15: Detektierte Proteine aus dem Bereich des *envelope stress*.

Die folgenden Proteine wurden im Zusammenhang mit dem *envelope stress* im Hochproduzenten überexprimiert. Neben den Angaben zur Gruppierung und Stoffwechselfunktion der Proteine werden die maximalen Expressionsunterschiede (fc) genannt, die bei allen Proteinen zwei Stunden nach der Induktion (t_2) am größten waren.

Gruppe	Proteine	Max. fc (t_2)	Stoffwechselfunktion
Äußere Membran	DegP	-1,8	HtrA, periplasmatische Serin-Protease
	Imp	-2,2	<i>Increased membrane permeability</i> -Protein, essentielles Protein der äußeren Membran
	OmpA	-13,6	Unspezifischer Diffusionskanal, Teil der OmpA-OmpF Porin Familie
	OmpC	-17,9	Diffusionskanal für Ionen und hydrophile Solute (Osmoporin)
	OmpP	-2,4	Outer membrane protein X, Protease
	OmpR	-10,2	Osmoregulation, Antwortregulator des Zweikomponentensystems OmpR/EnvZ
	OmpT	-2,4	Protease X, Präferenz für denaturierte Substrate
	ToIC	-2,2	Porin für den Efflux hydrophober oder amphipathischer Moleküle
	YaeT	-3,9	Im Komplex mit YfgL, YfiO und NlpB bei der Biogenese der omp-Proteine beteiligt, unbekannter Mechanismus
Lipid-Synthese	AccC	-3,9	Acetyl-CoA-Carboxylase, beteiligt an der Initialreaktion der Fettsäure-Synthese: Herstellung von Malonyl-CoA
	FabF	-4,0	β -Ketoacyl-ACP-Synthase II (KAS II), Herstellung von Acetoacetyl-ACP, Verwendung von Acetyl-ACP
	FabH	-6,9	β -Ketoacyl-ACP-Synthase III (KAS III), Herstellung von Acetoacetyl-ACP, Verwendung von Acetyl-CoA
Zellentwicklung	DacA	-6,0	Beteiligung an der Peptidoglykan-Synthese
	DacC	-1,5	
	MurE	-4,3	

Der *envelope stress* kann ausgelöst werden, wenn die Biogenese der inneren oder äußeren Membran beeinträchtigt wird oder Komponenten der Zellhülle zerstört werden (Ruiz & Silhavy, 2005). Die vorliegende Analyse führte zur Identifikation einer Vielzahl von Proteinen, die im Zusammenhang mit der Biogenese der Zellhülle stehen. Neben Enzymen für die Herstellung des Peptidoglykans, wurden Proteine der Fettsäure-Synthese detektiert, die vor allem für den Aufbau der inneren Membran verwendet werden. In der Literatur sind neben den Proteinen der Omp-Familie, Imp und YaeT als wichtigste Faktoren für die Koordination und den korrekten Aufbau der äußeren Membran beschrieben (Wu *et al.*, 2005). Diese wurden innerhalb dieser Studie identifiziert und weisen darauf hin, dass der Aufbau der äußeren Membran im Hochproduzenten gestört ist (Tab. 15).

Escherichia coli ist in der Lage, mit mehreren Signalwegen auf den *envelope stress* zu reagieren. Dies können die Bae- (Nishino *et al.*, 2005), Cpx- (Raivio *et al.*, 1999) oder σ^E - (Ades, 2004) Signalantworten sein. Während es sich bei den Bae- und Cpx-Wegen um Zweikomponentensysteme handelt (Button *et al.*, 2007) wird die σ^E -Antwort durch den alternativen Sigma-Faktor RpoE (σ^{24}) reguliert (Alba & Gross, 2004). Sowohl die Cpx- als auch die RpoE-Signale führen zu einer Überexpression der periplasmatischen Serin-Protease DegP (Danese *et al.*, 1995; De Las Penas *et al.*, 1997; Spiess *et al.*, 1999). Zudem wurde in *E. coli* eine um den Faktor 1,4 bis 8,0 erhöhte σ^E -Aktivität beobachtet, wenn die Proteine OmpC, OmpF, OmpP und OmpT überexprimiert wurden (Mecsas *et al.*, 1993). Somit lässt die Detektion der überexprimierten Proteine DegP, OmpC, OmpP und OmpT in dieser Studie die Schlussfolgerung zu, dass die Zelle mit einer σ^E -Signalkaskade auf den *envelope stress* reagiert.

Faktoren, die den *envelope stress* auslösen, können neben hohen Temperaturen, hohen pH-Werten, Ethanol oder Toxinen auch ungefaltene Proteine in der Zellhülle sein (Button *et al.*, 2007). Im analysierten WT-Expressionssystem wird die rekombinante Gluc-DH in großen Mengen in das Periplasma sekretiert. Durch die hohen Konzentrationen ist es theoretisch möglich, dass Engpässe bei der Faltung der Gluc-DH wie auch der Hüllproteine auftreten und der korrekte Aufbau der inneren und äußeren Membran gestört wird. Um dies zu kompensieren, kann die Expression der essentiellen Omp-Proteine weiter nach oben reguliert werden. Ist dies der Fall, erhöht sich die σ^E -Aktivität in der Zelle (Mecsas *et al.*, 1993). Letztlich können sowohl aggregierte Gluc-DH als auch inkorrekt gefaltene Hüllproteine dazu beitragen, dass in der Zelle eine σ^E -Signalantwort ausgelöst wird.

Der gesamte physiologische Stress, dem das WT-System ausgesetzt ist, scheint bereits zwei Stunden nach der Induktion so groß zu sein, dass die Zellen in die stationäre Wachstumsphase übergehen. Der Vergleich des Wachstumsverhaltens von induziertem und nicht induziertem WT-

Expressionssystem (Daten nicht gezeigt) belegt, dass die reduzierte Zellteilung durch die rekombinante Proteinexpression ausgelöst wird. Ebenso wie bei Dong *et al.* (1995) und Cserjan-Puschmann *et al.* (1999) überschreitet die rekombinante Proteinexpression das metabolische Leistungsvermögen der Zelle und resultiert in einer Wachstumshemmung. In der vorliegenden Untersuchung ist der metabolische Stress im WT-System durch die großen Mengen des rekombinanten Produkts im Vergleich zum Var-Expressionssystem wesentlich höher, so dass die „Adaptions-Kapazität“ (Hoffmann & Rinas, 2004b) der Zellen bezüglich der rekombinanten Proteinexpression überschritten wird. Dieser Stress resultiert in Antwortsignalen, die eine weitere Zellteilung inhibieren. In der vorliegenden Studie wurden in diesem Zusammenhang die Proteine FtsA und MukF identifiziert. FtsA ist ein essentielles Protein für die Zellteilung und an der cytoplasmatischen Seite der inneren Membran lokalisiert (Pla *et al.*, 1990). Wird FtsA überexprimiert, kann dies zur Inhibierung der Zellteilung führen (Wang & Gayda, 1990). MukF (KicB) ist bei der Aufteilung des Bakterienchromosoms involviert und ein Element des programmierten Zelltodes. Im Zusammenhang mit MukE (KicA) stellt MukF ein Zelltötungssignal dar. Der Mechanismus wird nach dem Toxin-Antitoxin-Prinzip reguliert. MukF stellt hierbei das stabile Toxin dar, das den Zelltod auslösen kann, wenn die Interaktion mit dem instabilen Antitoxin MukE gestört ist (Feng *et al.*, 1994). Wird dieses Zusammenspiel aus dem Gleichgewicht gebracht, indem MukF überexprimiert wird, kann dies zu einem Defekt in der Zellteilung führen (Yamanaka *et al.*, 1996). Die Hinweise, dass ein programmierter Zelltod ausgelöst wird, bestärken sich durch die Überexpression von Rnc (RNase III). RNase III ist hauptsächlich an der Prozessierung ribosomaler RNA beteiligt und nimmt damit Einfluss auf die Degradation des Proteinsyntheseapparates und den Zusammenbruch der gesamten Proteinexpression (Robertson & Dunn, 1975).

Ein bemerkenswertes Ergebnis der Expressionsprofil-Analyse ist die Identifikation des Transkriptionsrepressors LacI, der ebenfalls im WT-Expressionssystem überexprimiert wird. LacI wurde in mehreren Proteinspots und zu allen analysierten Kultivierungszeitpunkten detektiert (Abb. 17). Die Expressionsunterschiede stiegen zwei Stunden nach der Induktion bis auf einen Faktor von -7,6 an. Diese Beobachtung ist auffällig, da LacI ausschließlich plasmidkodiert ist. Die Sequenzierung des gesamten Vektors zeigte außer den bekannten Veränderungen des Zielproteins (Gluc-DH Wildtyp-Enzym und Enzymvariante) keinerlei Mutationen in den weiteren Strukturgenen. Unter diesen Umständen wurden keine unterschiedlichen Repressormengen erwartet. Sind die Konzentrationen von LacI im Niedrigproduzenten zu gering, werden weniger Operatorbindestellen besetzt. Bei einer zu geringen Gesamtkonzentration in der Zelle würde dies zu einer latenten Expression der Gluc-

DH vor der Induktion führen. Dieser Effekt war jedoch nicht zu beobachten (Abb. 11). Somit weist das Ergebnis der Expressionsprofil-Analyse auf eine höhere Plasmidkopienzahl des WT-Expressionssystems im Vergleich zum Var-System hin.

Die unterschiedlichen Plasmidkopienzahlen sollten mit einer zweiten, unabhängigen Technik quantifiziert werden. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Plasmidkopienzahlen basieren auf CsCl-Ethidiumbromid-Zentrifugationen (Hashimoto-Gotoh & Sekiguchi, 1977), Gelelektrophorese-Techniken (Projan *et al.*, 1983; Pushnova *et al.*, 2000), HPLC (Coppella *et al.*, 1987), Kapillarelektrophorese (Breuer *et al.*, 1998) oder DNA-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Proben (Korpela *et al.*, 1987; Fujimura *et al.*, 1996). Die Nutzung der quantitativen PCR (QPCR) ist erst in wenigen Veröffentlichungen beschrieben (Lee *et al.*, 2006a; Lee *et al.*, 2006b; Carapuça *et al.*, 2007). Aufgrund der einfachen und schnellen Durchführbarkeit im Labor sowie der hohen Präzision und Sensitivität ist die QPCR für die Bestimmung von Plasmidkopienzahlen im Vergleich zu den erwähnten Methoden besser geeignet (Carapuça *et al.*, 2007). Da sich die Methode von Lee *et al.* (2006a) generell für die Prozesskontrolle Ampicillin-selektierter *E. coli*-Stämme eignet, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet und durch den Einsatz des Kalibratorplasmids pQE80L-Var-dxs modifiziert (Tab. 4). Die Bestimmung der Plasmidkopienzahl beruht auf dem Vergleich des plasmidkodierten Gens der β -Lactamase (*bla*) mit einem genomischen Gen. Hierfür wurde ein Abschnitt der 1-Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase (*dxs*) verwendet. *Dxs* ist im Rahmen der Isoprenoid-Synthese bei der Umsetzung von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat zu CO₂ und 1-Deoxyxylulose-5-phosphat beteiligt (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998; Hahn *et al.*, 2001). Um eine Kalibrationskurve zu erstellen und die Effizienz der Amplifikationen während der PCR zu vergleichen, wurde das Kalibratorplasmid pQE80L-Var-dxs hergestellt (2.6.7.1). Die Genkopienzahlen wurden anhand der jeweiligen Standardkurve mit Hilfe der CP-Werte aus der QPCR berechnet. Indem die Genkopienzahlen von *bla* und *dxs* zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, kann die Plasmidkopienzahl bestimmt werden. Die Funktionalität der Methode konnte anhand des Kalibratorplasmids gezeigt werden, da das Verhältnis der Genkopien von *bla*:*dxs* erfolgreich mit 1:1 bestimmt wurde (Tab. 13). Die Plasmidkopienzahlen des Modellsystems wurden zu den Kultivierungszeitpunkten t_0 , t_1 und t_2 untersucht (Abb. 18). Die Analyse zeigte, dass die Plasmidkopienzahlen in beiden Expressionssystemen im Laufe der Kultivierung ansteigen. Diese Beobachtungen sind für Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase beschrieben (Carapuça *et al.*, 2007). Auch Teich *et al.* (1998) beobachteten die Amplifikation *Co/E1*-abhängiger Plasmide nach Induktion der rekombinanten Proteinexpression und beschrieben dabei die Inhibierung der Zellteilung. In dieser Studie liegt der Unterschied zwischen WT- und Var-Expressionssystem je nach

Kultivierungszeitpunkt zwischen Faktor 2,0 und 2,8. Mit dem Nachweis unterschiedlicher Plasmidkopienzahlen zwischen den beiden Expressionssystemen konnte eine der Hauptursachen für die signifikant niedrigere Expressionsleistung des Var-Expressionssystems identifiziert werden.

Die Plasmidkopienzahl hängt von der Replikation des Vektors sowie dessen Segregation in die Tochterzellen ab (Nordström & Austin, 1989). Die Replikation wird durch den *origin of replication* (ori), d. h. bei pQE80L-basierenden Vektoren durch den *Co/E1* ori reguliert (Del Solar & Espinosa, 2000). Die Kontrolle von *Co/E1* unterliegt einem *antisense RNA*-Mechanismus (Cesareni *et al.*, 1991). Hierbei hybridisiert ein RNA-Primer (RNA II) am Replikationsursprung. Nach der Spaltung mit RNase H bindet die DNA Polymerase I an die DNA, so dass die Replikation initiiert wird. Die Bindung von RNA II an den ori kann durch den komplementären Inhibitor RNA I unterbunden werden. Dieser bildet mit RNA II den sog. *kissing complex*, der durch das Rop-Protein stabilisiert wird (Grabherr & Bayer, 2002). Die Replikation von *Co/E1* kann zudem durch das Alarmon ppGpp kontrolliert werden (Hecker *et al.*, 1985; Riethdorf *et al.*, 1989), das im Zusammenhang mit der stringenten Kontrolle durch Aminosäure-Mangel steht (Cashel *et al.*, 1996). Diese Zellantwort ist in *relA*-defizienten Mutanten wie *E. coli* XL1Blue (Tab. 3) nicht möglich (Riethdorf *et al.*, 1989). Weiterhin können freie tRNAs, die bei Aminosäure-Mangel oder dem Zusammenbruch des Proteinbiosynthese-Apparates auftreten, durch hohe Sequenzhomologien zu RNA I bzw. RNA II die Replikation von *Co/E1* auslösen (Herman *et al.*, 1994). Diese Effekte lagen jedoch zum Kultivierungszeitpunkt t_0 nicht vor (Abb. 11). Auch rekombinante mRNAs können als Primer für die Plasmidreplikation dienen (Chew & Tacon, 1990). Dass die WT-mRNA im Gegensatz zur mRNA der Gluc-DH Enzymvariante hierfür besser geeignet sein könnte, ist aufgrund der wenigen Basenaustausche eher unwahrscheinlich. Zudem wird die rekombinante Gluc-DH vor der IPTG-Induktion noch nicht transkribiert. Die Analyse der mRNA-Faltungsmuster, die in Kooperation mit der Universität Stuttgart (Institut für Technische Biochemie, Arbeitsgruppe Prof. Pleiss) durchgeführt wurde, zeigte weiterhin keine Hinweise auf unterschiedliche mRNA Sekundärstrukturen, die eine ungleiche Translationseffizienz erklären könnten (Daten nicht gezeigt). Mutationen im *Co/E1*-ori wurden bei der DNA-Sequenzierung von pQE80L-WT bzw. pQE80L-Var nicht detektiert. Da isogene Zellen für die Transformation verwendet wurden, können ferner genomische Mutationen als Quelle unterschiedlicher Regulationsmechanismen (z. B. Ederth *et al.*, 2002) oder eine intrinsische Ampicillin-Resistenz, die den Selektionsdruck auf plasmidtragende Zellen reduziert, ausgeschlossen werden. Die Segregation der Plasmide bei der Zellteilung erfolgt nicht zielgerichtet (Summers & Sherratt, 1984). Eine ungleichmäßige Verteilung auf die Tochterzellen kann auf Plasmid-Oligomere oder Plasmid-Cluster, die nicht

kovalent verbunden sind, zurückzuführen sein (Nordström & Austin, 1989). Um zu untersuchen, ob diese Effekte für die unterschiedlichen Plasmidkopienzahlen zwischen dem Var- und dem WT-System verantwortlich sind, müssen einzelne Klone dieser Systeme während der Zellteilung betrachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Informationen der Proteomanalyse jedoch für die zielgerichtete Optimierung des Niedrigproduzenten genutzt.

Die Proteom-Analyse ermöglichte aufschlussreiche Erkenntnisse über die metabolischen Abläufe innerhalb der Expressionssysteme während der rekombinanten Proteinexpression. Die Interpretation der Daten half dabei, das unterschiedliche Wuchs- und Expressionsverhalten des Modellsystems zu verstehen und das Verständnis von Stoffwechselabläufen während der Gluc-DH-Expression zu erweitern. Die Analyse eröffnete viele interessante Aspekte, um eine rationale Strategie für die Expressionsoptimierung zu entwickeln. Diese werden im folgenden Abschnitt besprochen.

Rationale Optimierung der rekombinanten Proteinexpression

Die Informationen aus der Proteomanalyse sollten dazu genutzt werden, die Expressionsleistung des Modellsystems zu verbessern. Hierfür sollten anhand der Proteomprofile Optimierungsansätze erarbeitet werden.

Unter dem Aspekt der Nährstoffversorgung könnten die Zelldichten des Niedrig-Expressionssystems möglicherweise durch die gezielte Zugabe von Nukleinsäuren im Rahmen einer *fed-batch* Kultivierung erhöht werden. Durch die Zufütterung während der Kultivierung wird allerdings nicht die zelleigene Expressionsleistung verbessert, sondern die Produktausbeute durch höhere Zelldichten vergrößert.

Für die Verbesserung der spezifischen Produktionsleistung sind Veränderungen auf genetischer Basis notwendig. Die Identifizierung des Transkriptionsrepressors LacI (Abb. 17) und der Unterschied zwischen den Plasmidkopienzahlen (Abb. 18) lieferten hierfür einen geeigneten Ansatzpunkt. Durch den Austausch des Replikationsursprungs im Vektorkonstrukt pQE80L wurde untersucht, ob die Genkopienzahl der Gluc-DH Enzymvariante erhöht und die zelleigene Expressionsleistung des Niedrigproduzenten gesteigert werden kann. Hierfür wurde der *ColE1* Replikationsursprung durch einen pUC ori ersetzt (2.6.7.2). Die Kopienzahlen von Vektoren mit *ColE1*-ori liegen durchschnittlich bei 40 Plasmiden (Lee *et al.*, 2006b). Im Gegensatz dazu sind Vektoren mit einem pUC-Replikationsursprung sog. *high copy* Plasmide und weisen Kopienzahlen von über 400 auf (Lee *et al.*, 2006b). Die Bestimmung der Plasmidkopienzahlen mittels QPCR zeigte, dass diese durch den Austausch des Replikationsursprungs erfolgreich erhöht werden konnten. Je nach Kultivierungszeitpunkt

lagen die Unterschiede zwischen Faktoren von 7,7 und 10,5. Damit ist die Plasmidkopienzahl von pQE80L-pUC-Var größer als die des WT-Systems. Die Expressionsanalyse mittels ELISA zeigte, dass die Produktionsleistung des Niedrigproduzenten durch die Erhöhung der Plasmidkopienzahl gesteigert werden konnte. Zwei Stunden nach der Induktion produzierte das optimierte Expressionssystem die 9,2-fachen Mengen der Gluc-DH Enzymvariante (Abb. 20). Damit liegt die Produktivität um das 2,5-fache über der des ursprünglichen Hochproduzenten (Daten nicht gezeigt). Die Auswirkungen der Plasmidkopienzahl-Erhöhung auf das Zellwachstum konnten in den langsameren Generationszeiten des Var-pUC Systems beobachtet werden. Die Zelldichten des optimierten Expressionssystems nahmen langsamer zu als im Var-System (Abb. 19). Beim diesem Vergleich fällt auf, dass die Einschränkungen im Zellwachstum nicht direkt an die Erhöhung der Plasmidkopienzahl gekoppelt werden können. Denn obwohl der ursprüngliche Hochproduzent (WT) eine geringere Plasmidkopienzahl aufweist und auch geringere Mengen rekombinanter Gluc-DH produziert, liegen die Wachstumsraten unter denen des Var-pUC-Systems. Die forcierte Expression der Enzymvariante führt demnach nicht zu einem Überschreiten der „Adaptions-Kapazität“ (Hoffmann & Rinas, 2004b) wie im WT-System. Hierfür müssen die Ergebnisse der enzymatischen Aktivitätsmessung berücksichtigt werden. Durch die Plasmidkopienzahl-Erhöhung konnten die Ausbeuten um einen Faktor von 2,5 erhöht werden, die Menge aktiver Gluc-DH lag jedoch nicht über der des WT-Systems (Daten nicht gezeigt). Es ist daher möglich, dass neben den Folgen ungefaltener Proteine in der Zellhülle und des *envelope stress* auch die aktive Gluc-DH dazu beiträgt, den programmierten Zelltod des Wirtsystems auszulösen. Die Nährstoffversorgung kann gestört sein, indem Glukose vor dem Phospho-Transferase-Systems (PTS) von aktiver, periplasmatischer Gluc-DH abgefangen und zu Glukonolaktone umgewandelt wird. Das für aktive Gluc-DH notwendige PQQ kann *E. coli* zwar nicht selbständig synthetisieren (Matsushita *et al.*, 1997), es jedoch diffusiv über den komplexen Hefeextrakt aus dem Nährmedium in das Periplasma aufnehmen (Ohsugi *et al.*, 1989).

In der Expressionsprofil-Analyse wurden einige Proteasen identifiziert, die größtenteils im Hochproduzenten überexprimiert wurden (Tab. 12). Möglicherweise ist diese Zellreaktion auf aggregierte Gluc-DH zurückzuführen. Anhand der Abbaubanden im Western Blot wurde gezeigt, dass die rekombinante Gluc-DH einer proteolytischen Degradation ausgesetzt ist (Abb. 11). Bislang konnte nicht geklärt werden, ob der Abbau eher auf cyto- oder eher auf periplasmatische Proteasen zurückzuführen ist. Die Identifikation der periplasmatischen Serin-Protease DegP steht mit dem extracytoplasmatischen Stress in direktem Zusammenhang

(Danese *et al.*, 1995; De Las Penas *et al.*, 1997; Spiess *et al.*, 1999). Durch die Verwendung eines DegP-Deletionsstammes (*E. coli* KS474, Tab. 3; Kolmar *et al.*, 1996) konnte bereits eine Reduktion der Gluc-DH-Degradation erzielt werden (H. Düfel, pers. Mitteilung). Bei der cytoplasmatischen Prolin-Dipeptidase PepQ (Park *et al.*, 2004) wurden allerdings die größten Expressionsunterschiede detektiert. Im Vergleich zu DegP, die erst zwei Stunden nach der Induktion um den Faktor -1,8 überexprimiert wurde, lagen die Expressionsfaktoren von PepQ eine Stunde nach der Induktion (t_1) bei -2,4 und zwei Stunden nach Induktion (t_2) bei -7,2. Da die Gluc-DH einschließlich der Signalsequenz für die Sekretion über 32 mögliche Prolin-Schnittstellen (Xaa-Pro) verfügt, wurde eine PepQ-Deletionsmutante hergestellt. Hierfür wurde *pepQ* mittels Transposoninsertion in *E. coli* XL1Blue inaktiviert (TargeTron™, Sigma Aldrich; Zhong *et al.*, 2003). Nach der Transformation mit pQE80L-WT zeigten jedoch weder die Western Blot-Analysen noch die Aktivitätsmessungen eine Reduktion der Gluc-DH Degradation bzw. eine Zunahme aktiven Enzyms (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Konsequenz des extracytoplasmatischen Stresses ist mit der Herstellung von Vesikeln aus der äußeren Membran beschrieben (McBroom *et al.*, 2006). Die Genzerstörung von DegP führt hierbei zu einer extrem hohen Vesikelproduktion (McBroom & Kuehn, 2007). Da im aktuellen Produktionsverfahren das Expressionssystem *E. coli* KS474($\Delta degP$)/pQE80L verwendet wird, wurde geprüft, ob während der Fermentation Gluc-DH freigesetzt wird und nach der Zellseparation verloren geht. Für die Analyse wurden die Überstände von Fermentationsproben mittels ELISA untersucht. Der Vergleich mit den Ausbeuten nach Zellaufschluss zeigte, dass der Anteil freigesetzter Gluc-DH kleiner 3 % und somit nicht signifikant war (Daten nicht gezeigt). Ob die Freisetzung ausschließlich auf eine Vesikelbildung zurückzuführen ist oder in Verbindung mit lysierenden Zellen steht, konnte nicht vollständig geklärt werden.

Die Analyse der Expressionsprofile und die Ergebnisse der Plasmidkopienzahl-Erhöhung zeigten, dass größere Mengen ungefaltener, inaktiver Gluc-DH in der Zelle vorliegen. Um die Ausbeuten an aktivem Enzym zu erhöhen, sollte die Löslichkeitsvermittlung verbessert werden. Hierfür wurden drei Ansatzpunkte gewählt. Zum einen wurde untersucht, ob durch die Reduktion des metabolischen Drucks der Anteil aktiven Enzyms erhöht werden kann. Zum anderen wurden die Ergebnisse der Proteomanalyse hinsichtlich überexprimierter Faltungshelfer analysiert. Durch die Coexpression von Chaperonen kann es möglich sein, einen größeren Teil der Gluc-DH in die aktive Form zu überführen. Weiterhin wurde untersucht, ob inaktives Produkt im Rahmen des *down-streaming* Prozesses renaturiert und die Produktausbeuten damit erhöht werden können.

Um den metabolischen Druck während der rekombinanten Proteinexpression zu senken, wurde die Plasmidkopienzahl erniedrigt. Hierfür wurde der *Co/E1* Replikationsursprung gegen einen *p15A ori* ausgetauscht (2.6.7.3). Mittels Plasmidkopienzahl-Bestimmung konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl der Plasmide je nach Kultivierungszeitpunkt um einen Faktor zwischen 1,7 und 2,4 gesenkt wurden (Abb. 21). Der Vergleich der Abb. 18 und 21 zeigt, dass sich die Plasmidkopienzahlen des Var-Systems voneinander unterscheiden. Diese waren in den Versuchen zur Plasmidkopienzahl-Erniedrigung höher als im Vergleich mit dem WT-System. Dieser Effekt kann auf die unterschiedlichen Kultivierungs-Maßstäbe zur Bestimmung der Plasmidkopienzahlen zurückgeführt werden. Wurden die Zellen im 20 ml EK-Maßstab kultiviert, lagen die absoluten Plasmidkopienzahlen unter denen, die während der Kultivierung von 400 ml in einem Erlenmeyer-Kolben (EK) mit Schikane gemessen wurden. Dies kann möglicherweise mit dem unterschiedlichen Sauerstoffeintrag in den EK zusammen hängen. Ein Vergleich mit anderen Studien, in denen die Plasmidkopienzahlen eines Expressionssystems in verschiedenen Kultivierungs-Maßstäben mittels QPCR verglichen wurden, ist nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass ein reproduzierbarer Unterschied im Verhältnis der Plasmidkopienzahlen zwischen den Var-, WT-, Var-pUC- und Var-p15A-Expressionssystemen unabhängig vom Kultivierungsmaßstab besteht. Die Zelldichte-Messungen des Niedrigproduzenten (Var) und des Var-p15A-Systems zeigen, dass beide Expressionsstämme identische Wachstumsraten aufweisen (3.4.2.1). Die Expressionsleistungen im Var-p15A System waren um das 2,1- bis 3,3-fache größer als im Niedrigproduzenten. Die höheren Ausbeuten im Var-p15A System können auf eine verlangsamte Proteinexpression zurückzuführen sein, die sich positiv auf die Produktbildungsraten auswirken. Die Reduktion der Plasmidkopienzahl hatte jedoch keinen positiven Effekt auf die Ausbeuten an aktivem Enzym (Abb. 22).

Die Veränderungen der Plasmidkopienzahlen durch die Verwendung eines *Co/E1*, pUC oder p15A oris zeigte, dass sowohl durch die Erhöhung als auch durch die Erniedrigung der Kopienzahlen, die absolute Expressionsleistung der Zelle verbessert werden konnte. Die Ausbeuten *aktiver* Gluc-DH konnten nur unter Verwendung des pQE80L-pUC Vektors erhöht werden. Im Rahmen des Var-pUC Systems scheint das Maximum der „Adaptions-Kapazität“ (Hoffmann & Rinas, 2004b) wie im WT-System noch nicht erreicht zu sein.

Für die Coexpression von Faltungshelfern wurden die Proteomdaten hinsichtlich löslichkeitsvermittelnder Proteine untersucht. Auf cytoplasmatischer Ebene wurden der Trigger-Faktor (Tig), sowie Proteine aus den Hitzeschock-Systemen Hsp70 (DnaK), Hsp90 (HtpG) und Hsp100 (ClpB) detektiert. Der Trigger-Faktor ist bei der Faltung naszierender Polypeptidketten beteiligt und interagiert mit sehr kurzen Polypeptiden direkt am Ribosom

(Valent *et al.*, 1995). DnaK, HtpG und ClpB unterstützen die Faltung längerer Aminosäureketten und sind insbesondere an der Rückfaltung aggregierter Proteine beteiligt (Thomas & Baneyx, 2000; Zolkiewski, 1999; Goloubinoff *et al.*, 1999). Außerhalb des Cytosols wurde das periplasmatische Substratbindeprotein OppA identifiziert. Es wurde dem Bereich „Transport“ zugewiesen, da es im Rahmen eines ABC-Transporters der Übertragung von Oligopeptiden dient. Richarme & Caldas (1997) beschreiben jedoch auch löslichkeitsvermittelnde Eigenschaften von OppA. Da die Expressionsunterschiede mit einem Faktor bis zu $-10,6$ (t_2) besonders groß waren, kann OppA für die Rückfaltung aggregierter Periplasma-Proteine im WT-System von Bedeutung sein. Aufgrund der hohen Gluc-DH Expressionsraten sollte der Bedarf periplasmatischer Faltungshelfer größer sein als der cytosolischer Chaperone. Um dies hinsichtlich der rekombinanten Gluc-DH zu überprüfen, wurde OppA coexprimiert. Für die Coexpression wurde ein Plasmid konstruiert, das stabil neben dem Expressionsvektor pQE80L bzw. pQE80L-pUC etabliert werden konnte (2.6.7.4). pBAD-p15A-oppA zeichnet sich durch die Verwendung eines p15A-Replikationsursprungs aus, der zu *Co/E1* oder pUC oris kompatibel ist (Abb. 23). Als Selektionsmarker wurde die Chloramphenicol-Acetyltransferase vermittelte Antibiotikaresistenz verwendet. Hierdurch konnten die Bakterien, die mit den Expressions- und Coexpressions-Vektoren transformiert wurden, auf Ampicillin und Chloramphenicol selektiert werden. Die Expression von OppA wurde unter die Kontrolle des Arabinose-induzierbaren Promotors P_{BAD} gestellt. Dieser wird durch das *araC*-Genprodukt reprimiert, so dass die Proteinexpression durch Zugabe von Arabinose in das Kulturmedium induziert werden kann. Die ersten Expressionsversuche zeigten, dass die Induktion von OppA mehrere Effekte hat. Im SDS-Gel wurden mehrere Proteine detektiert, die nach der Induktion mit Arabinose deutlich stärker exprimiert wurden (Abb. 24). Im Rahmen einer Sequenz-Analyse sollten diese genauer charakterisiert werden. Aufgrund der Überlagerung mehrerer Proteine innerhalb einer Bande konnten die Aminosäure-Sequenzen jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden. Die weiteren Expressionsversuche zeigten, dass die Coexpression von OppA nicht zu einer Steigerung der Ausbeuten an aktiver Gluc-DH führt. Zum einen kann dieser Effekt darauf zurückzuführen sein, dass die Löslichkeitsvermittlung im WT-System nicht auf die Überexpression von OppA zurückzuführen ist, sondern im Zusammenhang mit Prozessen für den Aufbau der Zellhülle steht (Hiles *et al.*, 1987). Zum anderen könnte bei den Experimenten der Zeitpunkt der Arabinose-Induktion sowie die daraus resultierende Konzentration von OppA suboptimal gewesen sein, so dass bei der IPTG-Induktion nicht ausreichend OppA für die Löslichkeitsvermittlung der rekombinanten Gluc-DH vorlag. Weiterhin muss bei der Coexpression berücksichtigt werden, dass die Zelle zusätzliche Energie für die metabolischen Vorgänge aufwenden muss, die mit dem zweiten

Plasmid zusammen hängen. Die zusätzliche metabolische Last kann der Produktionsleistung des Organismus abträglich sein (Hoffmann & Rinas, 2004b).

Neben dem Versuch, Einfluss auf die Löslichkeitsvermittlung während der Proteinexpression zu nehmen, wurde untersucht, ob inaktives Produkt reaktivierbar ist. Hierfür wurde rekombinante Gluc-DH aus den Biomasse-Fractionen nach Zellaufschluss extrahiert und in die aktive Enzymform überführt. Die Analysen wurden anhand der Enzymvariante durchgeführt und die Expressionssysteme Var und Var-pUC miteinander verglichen. Die Denaturierung wurde mittels Guanidin-HCl sowie DTT durchgeführt, um die Bildung von Heteropolymeren zu unterdrücken. Da die aktive Gluc-DH Ca^{2+} -Ionen als Cofaktor verwendet (1.5), wurde dem Puffer EDTA zugesetzt (3.4.2.3). Um die Ausbildung der Disulfidbrücken bei der Renaturierung zu gewährleisten, wurde Glutathion (GSH) im Redoxgleichgewicht mit GSSG verwendet (*oxido-shuffling*). Da L-Arginin die Proteinrückfaltung positiv beeinflusst, wurden bei der Renaturierung zusätzlich 0,5 mol/l der Aminosäure eingesetzt (Tsumoto *et al.*, 2004). Die Renaturierungsversuche zeigten, dass inaktive, rekombinante Gluc-DH renaturiert werden kann. Die Produktausbeuten waren im optimierten Expressionssystem Var-pUC mit einem Faktor von 2,5 höher als im Niedrigproduzenten Var (Abb. 25). Mit der Aufarbeitung der Biomassen konnten die Produktausbeuten gesteigert werden. Überraschender Weise konnten sogar aus der löslichen Fraktion des optimierten Expressionssystems die Ausbeuten aktiver Gluc-DH durch eine De- und anschließende Renaturierung erhöht werden (Abb. 26). Dies zeigt, dass ein Teil der rekombinanten Gluc-DH in der löslichen Fraktion des Var-pUC Systems nicht in der optimalen Struktur vorlag. Dieser Effekt kann auf Interaktionen zwischen Gluc-DH-Vollängen- und proteolytisch degradiertem Produkt zurückzuführen sein, wodurch die enzymatische Aktivität inhibiert ist. Die De- und Renaturierung kann zur Auflösung dieser heterogenen Komplexe beitragen und damit die Ausbeuten an aktiver Gluc-DH erhöhen.

Die weiteren Renaturierungsexperimente weisen darauf hin, dass unter den beschriebenen Testbedingungen hauptsächlich die Anwesenheit des Cofaktors PQQ für die Reaktivierung der Gluc-DH erforderlich ist (Abb. 27). Durch die Analyse von Fermentationsproben konnte ein kritischer Schwellenwert von 75 kU/l bestimmt werden (Tab. 14). Für höhere Konzentrationen ist die Durchführung einer klassischen Renaturierung notwendig. Die Analysen zeigen, dass die Renaturierung sehr schnell erfolgt und somit unter einfachen Bedingungen durchführbar ist.

Ausblick

Die Proteomanalyse lieferte für die Optimierung der Expressionleistung eine Vielzahl interessanter Ansatzpunkte. In der Analyse wurden viele überexprimierte Proteine der Omp-Familie detektiert. Diese benutzen für den Transfer durch die innere Membran - ebenso wie

die rekombinante Gluc-DH - das Sec-Translokationssystem (Mori & Ito, 2001). Der Transport mit dem SecYEG-Komplex ist SecB-vermittelt. DnaK kann in der Zelle als *backup*-System für SecB verwendet werden (Hoffmann & Rinas, 2004a). Aufgrund der großen Proteinmengen, die diesen Sekretionsmechanismus durchlaufen, kann bei der Expression bereits der Transfer in das Periplasma limitierend wirken. Zudem wurden große Mengen Gluc-DH aus den Zelltrümmern der aufgeschlossenen Biomassen renaturiert (3.4.2.3). Es ist somit wahrscheinlich, dass ein Großteil der inaktiven, rekombinanten Gluc-DH noch mit der inneren Membran assoziiert ist. Demzufolge ist eine Überexpression des gesamten Translokase-Apparates SecYEG und der daran beteiligten Proteine SecA und SecB bzw. DnaK interessant. Einer der wichtigsten Parameter für die rekombinante Gluc-DH Expression wurde mit den Folgen des *envelope stress* und der Vermittlung der Proteinlöslichkeit identifiziert. Um den Anteil aktiven Enzyms während der Proteinexpression zu erhöhen, muss die Coexpression von Chaperonen näher untersucht werden. Um die Löslichkeitsvermittlung der naszierenden, cytosolischen Gluc-DH zu fördern, erscheint die Coexpression des Trigger-Faktors und der Hitzeschockproteine DnaK, HtpG und ClpB sinnvoll. Dabei sollte der Induktionszeitpunkt und die Konzentration der coexprimierten Proteine, sowie der zusätzliche metabolische Druck auf die Zellen berücksichtigt werden.

Weiterhin wurden die Proteine PdxB, GshA und GrxB detektiert, die bei der Synthese von Cofaktoren wie Pyridoxin, Thioredoxin, Glutathion oder Glutaredoxin beteiligt sind. Diese sind für die oxidative Umgebung im Periplasma und die Ausbildung von Disulfidbrücken essenziell. Um die Faltung der sekretierten Gluc-DH im Periplasma zu fördern, kann die Coexpression dieser Faktoren hilfreich sein.

Die extracytoplasmatische Sekretion ist für die Ausbildung der Disulfidbrücken unerlässlich, das Periplasma umfasst jedoch nur etwa 10 % des gesamten Zellvolumens (Ruiz *et al.*, 2006). Damit unterliegt die periplasmatische Expression rekombinanter Produkte einer räumlichen Limitierung. Um dies zu vermeiden, ist die Entwicklung eines *E. coli*-Stammes sinnvoll, der das rekombinante Produkt aus dem Periplasma in das umgebende Medium sekretiert. Hierfür können zelleigene Transport- bzw. Efflux-Mechanismen durch die äußere Membran genutzt oder die Sekretion mittels heterologer Sekretionssysteme, durch Fusionspartner oder durch permeabilisierender Proteine vermittelt werden (Stader & Silhavy, 1990).

Die Proteomanalyse zeigte weiterhin, dass die periplasmatisch aggregierten Proteine der Degradation ausgesetzt sind. In der vorliegenden Studie wurden einige Proteasen identifiziert (Tab. 12), so dass die Herstellung von Deletionsmutanten den proteolytischen Abbau der Gluc-DH weiter reduzieren kann. Insbesondere die Protease OmpT könnte hierfür interessant

sein, da auch Jürgen *et al.* (2000) OmpT-Fragmente bei der Analyse von *inclusion bodies* für die Expression von α -Glukosidase detektierten.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zur Expressionsoptimierung (3.4) ist es prinzipiell möglich, die Herstellung der Gluc-DH nicht auf eine Löslichkeitsvermittelnde, sondern auf eine *inclusion body* Expression auszurichten. Hierdurch könnten mögliche toxische Effekte aktiver Gluc-DH und Engpässe in der Löslichkeitsvermittlung vermieden werden. Da die Renaturierbarkeit inaktiven Produkts gezeigt wurde, sind genetische und verfahrenstechnische Optimierungsarbeiten für die Ablagerung der Gluc-DH in Einschlusskörperchen sowie die entsprechenden Veränderungen des *down-streaming* Prozesses denkbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expressionsoptimierung auf Basis einer Proteomanalyse durchgeführt. Für zukünftige Arbeiten sollte der Vergleich von Expressionsprofilen auf die Transkriptom- und Metabolomebene erweitert werden (Nie *et al.*, 2007). In einem ersten Schritt sollten hierfür entsprechende Methoden etabliert, identische Expressionsmodelle untersucht und anschließend parallel auf mRNA-, Protein- und Metabolit-Ebene miteinander verglichen werden. Weiterhin sollte die Expressionsprofil-Analyse auf alternative Expressionssysteme übertragen werden.

Die Vielfalt der existierenden ‚omics‘-Technologien sollte für die Optimierung rekombinanter Proteinexpressionen besser genutzt werden. Durch das Erstellen von Expressionsprofilen ist es möglich, das Stoffwechselverhalten der Produktionssysteme besser zu verstehen. Hierdurch können Verfahren besser gesteuert und die verwendeten Systeme auf genetischer Ebene zielgerichteter optimiert werden.

5 Zusammenfassung

Durch globale Expressionsprofil-Analysen auf Transkriptom-, Proteom- oder Metabolom-Ebene können biotechnologische Produktionsprozesse besser verstanden und die Erkenntnisse für die zielgerichtete, rationale Optimierung von Expressionssystemen genutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Überexpression einer Glukose-Dehydrogenase, die von der Roche Diagnostics GmbH für die diagnostische Anwendung optimiert worden war, in *E. coli* untersucht. Die Enzymvariante unterscheidet sich in sieben ihrer 455 Aminosäuren vom Wildtyp-Enzym und wird im sonst isogenen Wirt-/Vektor-System in signifikant geringeren Mengen (Faktor 5) gebildet. Das prokaryontische Expressionssystem wurde auf Proteom-Ebene charakterisiert. Die 2-dimensionale differenzielle Gelelektrophorese (DIGE) wurde zuvor unter statistischen Aspekten untersucht. Unter Berücksichtigung von technischen und biologischen Variationen, falsch-positiven (α -) und falsch-negativen (β -) Fehlern sowie einem daraus abgeleiteten Versuchsdesign konnten Expressionsunterschiede als signifikant quantifiziert werden, wenn sie um den Faktor $\geq 1,4$ differierten. Durch eine Hauptkomponenten-Analyse wurde gezeigt, dass die DIGE-Technologie für die Expressionsprofil-Analyse des Modellsystems geeignet ist. Der Expressionsstamm für die Enzymvariante zeichnete sich durch eine höhere Variabilität an Enzymen für den Zuckerabbau und die Nukleinsäure-Synthese aus. Im Expressionssystem für das Wildtyp-Enzym wurde eine unerwartet erhöhte Plasmidkopienzahl nachgewiesen. Als potenzieller Engpass in der Expression der rekombinanten Glukose-Dehydrogenase wurde die Löslichkeitsvermittlung identifiziert. Im Expressionsstamm für das Wildtyp-Enzym wurden viele Proteine für die Biogenese der äußeren Membran verstärkt exprimiert. Als Folge dessen wurde ein sog. *envelope stress* ausgelöst und die Zellen gingen in die stationäre Wachstumsphase über.

Die Ergebnisse der Proteomanalyse wurden weiterführend dazu genutzt, die Produktionsleistung für die Enzymvariante zu verbessern. Durch den Austausch des Replikationsursprungs im Expressionsvektor wurde die Plasmidkopienzahl erhöht und die zelluläre Expressionsleistung für die diagnostisch interessantere Enzymvariante um Faktor 7 - 9 gesteigert. Um die Löslichkeitsvermittlung während der Expression zu verbessern, wurde die Plasmidkopienzahl gesenkt und die Coexpression von Chaperonen initiiert. Die Ausbeuten aktiver Glukose-Dehydrogenase wurden durch die Renaturierung inaktiven Produkts aus dem optimierten Expressionssystem insgesamt um einen Faktor von 4,5 erhöht. Somit führte im Rahmen dieser Arbeit eine proteombasierte Expressionsprofil-Analyse zur zielgerichteten, rationalen Expressionsoptimierung eines prokaryontischen Modellsystems.

6 Literatur

- Ades, S.E.** (2004). Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 157-162.
- Alba, B.M. & Gross, C.A.** (2004). Regulation of the *Escherichia coli* sigma-dependent envelope stress response. *Mol. Microbiol.* 52, 613-619.
- Alban, A., David, S.O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S., and Currie, I.** (2003). A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics.* 3, 36-44.
- Aldor, I.S., Krawitz, D.C., Forrest, W., Chen, C., Nishihara, J.C., Joly, J.C., and Champion, K.M.** (2005). Proteomic profiling of recombinant *Escherichia coli* in high-cell-density fermentations for improved production of an antibody fragment biopharmaceutical. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1717-1728.
- Baneyx, F.** (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 411-421.
- Barrett, J.C. & Kawasaki, E.S.** (2003). Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discov. Today* 8, 134-141.
- Berndt, P., Hobohm, U., and Langen, H.** (1999). Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints. *Electrophoresis* 20, 3521-3526.
- Birkemeyer, C., Luedemann, A., Wagner, C., Erban, A., and Kopka, J.** (2005). Metabolome analysis: the potential of in vivo labeling with stable isotopes for metabolite profiling. *Trends Biotechnol.* 23, 28-33.
- Boenitz-Dulat, M., Beck, D., Kratzsch, P., Schmuck, R., and von der Eltz, H.** (2007). Improved mutants of pyrroloquinoline quinone dependent soluble glucose dehydrogenase. WO 2007/118647 A1.
- 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.
- Breuer, S., Marzban, G., Cserjan-Puschman, M., Durrschmid, E., and Bayer, K.** (1998). Off-line quantitative monitoring of plasmid copy number in bacterial fermentation by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 2474-2478.
- Bronson, G.** (1978). Bacteria induced to produce insulin identical to humans'. *Wall. St. J. (East Ed)* 17.
- Button, J.E., Silhavy, T.J., and Ruiz, N.** (2007). A suppressor of cell death caused by the loss of sigmaE downregulates extracytoplasmic stress responses and outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189, 1523-1530.
- Cagney, G. & Emili, A.** (2002). De novo peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein mixtures using mass-coded abundance tagging. *Nat. Biotechnol.* 20, 163-170.
- Carapuça, E., Azzoni, A.R., Prazeres, D.M., Monteiro, G.A., and Mergulhao, F.J.** (2007). Time-course determination of plasmid content in eukaryotic and prokaryotic cells using Real-Time PCR. *Mol. Biotechnol.* 37, 120-126.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J., and Vinella, D.** (1996). The stringent response. in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H. E.; ASM Press, Washington. 1458-1496.

- Caskey, C.T.** (1978). Recombinant DNA-an approach to gene isolation and study. *South. Med. J.* 71, 66-68.
- Cesareni, G., Helmer-Citterich, M., and Castagnoli, L.** (1991). Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet.* 7, 230-235.
- Chakraborty, A. & Regnier, F.E.** (2002). Global internal standard technology for comparative proteomics. *J. Chromatogr. A* 949, 173-184.
- Chew, L.C. & Tacon, W.C.** (1990). Simultaneous regulation of plasmid replication and heterologous gene expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 13, 47-60.
- Choi, J.H., Lee, S.J., Lee, S.J., and Lee, S.Y.** (2003). Enhanced production of insulin-like growth factor I fusion protein in *Escherichia coli* by coexpression of the down-regulated genes identified by transcriptome profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4737-4742.
- Chou, C.P.** (2007). Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 521-532.
- Cleton-Jansen, A.M., Goosen, N., Vink, K., and van de, P.P.** (1989). Cloning, characterization and DNA sequencing of the gene encoding the Mr 50,000 quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Mol. Gen. Genet.* 217, 430-436.
- Coppella, S.J., Acheson, C.M., and Dhurjati, P.** (1987). Isolation of high-molecular-weight nucleic acids for copy number analysis using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 402, 189-199.
- Cserjan-Puschmann, M., Kramer, W., Duerschmid, E., Striedner, G., and Bayer, K.** (1999). Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 43-50.
- Dahl, M.K., Francoz, E., Saurin, W., Boos, W., Manson, M.D., and Hofnung, M.** (1989). Comparison of sequences from the malB regions of *Salmonella typhimurium* and *Enterobacter aerogenes* with *Escherichia coli* K12: a potential new regulatory site in the interoperonic region. *Mol. Gen. Genet.* 218, 199-207.
- Danese, P.N., Snyder, W.B., Cosma, C.L., Davis, L.J., and Silhavy, T.J.** (1995). The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev.* 9, 387-398.
- De Keersmaecker, S.C., Thijs, I.M., Vanderleyden, J., and Marchal, K.** (2006). Integration of omics data: how well does it work for bacteria? *Mol. Microbiol.* 62, 1239-1250.
- De Las Penas, A., Connolly, L., and Gross, C.A.** (1997). The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol. Microbiol.* 24, 373-385.
- Del Solar, G. & Espinosa, M.** (2000). Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol. Microbiol.* 37, 492-500.
- Dell, R.B., Holleran, S., and Ramakrishnan, R.** (2002). Sample size determination. *ILAR. J.* 43, 207-213.
- Dokter, P., Frank, J., and Duine, J.A.** (1986). Purification and characterization of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D. 79.41. *Biochem. J.* 239, 163-167.
- Dong, H., Nilsson, L., and Kurland, C.G.** (1995). Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J. Bacteriol.* 177, 1497-1504.

- Draghici, S., Khatri, P., Eklund, A.C., and Szallasi, Z.** (2006). Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet.* 22, 101-109.
- Dunn, W.B., Bailey, N.J., and Johnson, H.E.** (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 130, 606-625.
- Ederth, J., Isaksson, L.A., and Abdulkarim, F.** (2002). Origin-specific reduction of ColE1 plasmid copy number due to mutations in a distinct region of the *Escherichia coli* RNA polymerase. *Mol. Genet. Genomics* 267, 587-592.
- Everley, P.A., Krijgsveld, J., Zetter, B.R., and Gygi, S.P.** (2004). Quantitative cancer proteomics: stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research. *Mol. Cell Proteomics*. 3, 729-735.
- Feng, J., Yamanaka, K., Niki, H., Ogura, T., and Hiraga, S.** (1994). New killing system controlled by two genes located immediately upstream of the mukB gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 243, 136-147.
- Fodor, I.K., Nelson, D.O., egria-Hartman, M., Robbins, K., Langlois, R.G., Turteltaub, K.W., Corzett, T.H., and Cutchen-Maloney, S.L.** (2005). Statistical challenges in the analysis of two-dimensional difference gel electrophoresis experiments using DeCyder. *Bioinformatics*. 21, 3733-3740.
- Fujimura, H., Sakuma, Y., and Weimer, T.** (1996). A quantitative method for the determination of plasmid copy number in recombinant yeast. *Biologicals* 24, 67-70.
- Gevaert, K., Van, D.J., Goethals, M., Thomas, G.R., Hoorelbeke, B., Demol, H., Martens, L., Puype, M., Staes, A., and Vandekerckhove, J.** (2002). Chromatographic isolation of methionine-containing peptides for gel-free proteome analysis: identification of more than 800 *Escherichia coli* proteins. *Mol. Cell Proteomics*. 1, 896-903.
- Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., and Riggs, A.D.** (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 106-110.
- Gold, L.** (1990). Expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 89-93.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., and Bukau, B.** (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13732-13737.
- Goodlett, D.R., Keller, A., Watts, J.D., Newitt, R., Yi, E.C., Purvine, S., Eng, J.K., von, H.P., Aebersold, R., and Kolker, E.** (2001). Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 1214-1221.
- Görg, A., Postel, W., and Gunther, S.** (1988). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W.** (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053.
- Görg, A., Weiss, W., and Dunn, M.J.** (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4, 3665-3685.
- Grabherr, R. & Bayer, K.** (2002). Impact of targeted vector design on Co/E1 plasmid replication. *Trends Biotechnol.* 20, 257-260.
- Graumann, K. & Premstaller, A.** (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol. J.* 1, 164-186.

- Gupta, P. & Lee, K.H.** (2007). Genomics and proteomics in process development: opportunities and challenges. *Trends Biotechnol.* *25*, 324-330.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J.** (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* *177*, 4121-4130.
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., and Aebersold, R.** (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* *17*, 994-999.
- Hahn, F.M., Eubanks, L.M., Testa, C.A., Blagg, B.S., Baker, J.A., and Poulter, C.D.** (2001). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the gene product of open reading frame (ORF) 2816 and ORF 2895 in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* *183*, 1-11.
- Han, M.J., Yoon, S.S., and Lee, S.Y.** (2001). Proteome analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* producing Poly(3-hydroxybutyrate). *J. Bacteriol.* *183*, 301-308.
- Han, M.J., Jeong, K.J., Yoo, J.S., and Lee, S.Y.** (2003). Engineering *Escherichia coli* for increased productivity of serine-rich proteins based on proteome profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 5772-5781.
- Han, M.J., Park, S.J., Park, T.J., and Lee, S.Y.** (2004). Roles and applications of small heat shock proteins in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* *88*, 426-436.
- Han, M.J. & Lee, S.Y.** (2006). The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *70*, 362-439.
- Hashimoto-Gotoh, T. & Sekiguchi, M.** (1977). Mutations of temperature sensitivity in R plasmid pSC101. *J. Bacteriol.* *131*, 405-412.
- Hecker, M., Schroeter, A., and Mach, F.** (1985). *Escherichia coli relA* strains as hosts for amplification of pBR322 plasmid DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* *29*, 331-334.
- Hecker, M.** (2003). A proteomic view of cell physiology of *Bacillus subtilis*-bringing the genome sequence to life. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *83*, 57-92.
- Hecker, M. & Volker, U.** (2004). Towards a comprehensive understanding of *Bacillus subtilis* cell physiology by physiological proteomics. *Proteomics.* *4*, 3727-3750.
- Herman, A., Wegrzyn, A., and Wegrzyn, G.** (1994). Differential replication of plasmids during stringent and relaxed response of *Escherichia coli*. *Plasmid* *32*, 89-94.
- Hermann, T., Pfefferle, W., Baumann, C., Busker, E., Schaffer, S., Bott, M., Sahn, H., Dusch, N., Kalinowski, J., Puhler, A., Bendt, A.K., Kramer, R., and Burkovski, A.** (2001). Proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* *22*, 1712-1723.
- Hermann, T. & Rieping, M.** (2003). Fermentation process for the preparation of L-threonine. US patent 6,562,601.
- Hermann, T.** (2004). Using functional genomics to improve productivity in the manufacture of industrial biochemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* *15*, 444-448.
- Hiles, I.D., Gallagher, M.P., Jamieson, D.J., and Higgins, C.F.** (1987). Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* *195*, 125-142.
- Hochstrasser, D.F., Harrington, M.G., Hochstrasser, A.C., Miller, M.J., and Merrill, C.R.** (1988). Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* *173*, 424-435.
- Hoffmann, F. & Rinas, U.** (2001). On-line estimation of the metabolic burden resulting from the synthesis of plasmid-encoded and

heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation. *Biotechnol. Bioeng.* 76, 333-340.

Hoffmann, F. & Rinas, U. (2004a). Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 89, 143-161.

Hoffmann, F. & Rinas, U. (2004b). Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 89, 73-92.

Hollywood, K., Brison, D.R., and Goodacre, R. (2006). Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics.* 6, 4716-4723.

Huang, S. & Wikswo, J. (2006). Dimensions of systems biology. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 157, 81-104.

Hunt, S.M., Thomas, M.R., Sebastian, L.T., Pedersen, S.K., Harcourt, R.L., Sloane, A.J., and Wilkins, M.R. (2005). Optimal replication and the importance of experimental design for gel-based quantitative proteomics. *J. Proteome. Res.* 4, 809-819.

Ibarrola, N., Molina, H., Iwahori, A., and Pandey, A. (2004). A novel proteomic approach for specific identification of tyrosine kinase substrates using [¹³C]tyrosine. *J. Biol. Chem.* 279, 15805-15813.

Jana, S. & Deb, J.K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 289-298.

Jiang, L., Lindpaintner, K., Li, H.F., Gu, N.F., Langen, H., He, L., and Fountoulakis, M. (2003). Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. *Amino. Acids* 25, 49-57.

Joyce, A.R. & Palsson, B.O. (2006). The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 198-210.

Jürgen, B., Lin, H.Y., Riemschneider, S., Scharf, C., Neubauer, P., Schmid, R., Hecker, M., and Schweder, T. (2000). Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 217-224.

Jürgen, B., Tobisch, S., Wumpelmann, M., Gordes, D., Koch, A., Thurow, K., Albrecht, D., Hecker, M., and Schweder, T. (2005). Global expression profiling of *Bacillus subtilis* cells during industrial-close fed-batch fermentations with different nitrogen sources. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 277-298.

Karp, N.A., Kreil, D.P., and Lilley, K.S. (2004). Determining a significant change in protein expression with DeCyder during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics.* 4, 1421-1432.

Karp, N.A. & Lilley, K.S. (2005). Maximising sensitivity for detecting changes in protein expression: experimental design using minimal CyDyes. *Proteomics.* 5, 3105-3115.

Karp, N.A. & Lilley, K.S. (2007). Design and analysis issues in quantitative proteomics studies. *Proteomics.* 7 *Suppl 1*, 42-50.

Karp, N.A., McCormick, P.S., Russell, M.R., and Lilley, K.S. (2007). Experimental and statistical considerations to avoid false conclusions in proteomics studies using differential in-gel electrophoresis. *Mol. Cell Proteomics.* 6, 1354-1364.

Karp, N.A., Spencer, M., Lindsay, H., O'Dell, K., and Lilley, K.S. (2005). Impact of replicate types on proteomic expression analysis. *J. Proteome. Res.* 4, 1867-1871.

Kaufmann, N. (1997). Development and evaluation of a new system for determining glucose from fresh capillary blood and heparinised venous blood. *Glucotrend*, Boehringer Mannheim GmbH, 1-16.

Klauck, E., Typas, A., and Hengge, R. (2007). The sigmaS subunit of RNA

polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. *Sci. Prog.* **90**, 103-127.

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.

Kolmar, H., Waller, P.R., and Sauer, R.T. (1996). The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J. Bacteriol.* **178**, 5925-5929.

Korpela, K., Buchert, P., and Soederlund, H. (1987). Determination of plasmid copy number with nucleic-acid sandwich hybridization. *J. Biotechnol.* **5**, 267-277.

Kosinski, M.J. & Bailey, J.E. (1991). Temperature and induction effects on the degradation rate of an abnormal beta-galactosidase in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **18**, 55-68.

Kosinski, M.J., Rinas, U., and Bailey, J.E. (1992). Proteolytic response to the expression of an abnormal beta-galactosidase in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 335-341.

Kuyama, H., Watanabe, M., Toda, C., Ando, E., Tanaka, K., and Nishimura, O. (2003). An approach to quantitative proteome analysis by labeling tryptophan residues. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 1642-1650.

Lange, C., Rittmann, D., Wendisch, V.F., Bott, M., and Sahl, H. (2003). Global expression profiling and physiological characterization of *Corynebacterium glutamicum* grown in the presence of L-valine. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2521-2532.

Larsen, J.N. & Jensen, K.F. (1985). Nucleotide sequence of the pyrD gene of *Escherichia coli* and characterization of the

flavoprotein dihydroorotate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **151**, 59-65.

Lee, S. & Papoutsakis, E.T. (1999). *Metabolic Engineering*. Dekker, New York.

Lee, J.H., Lee, D.E., Lee, B.U., and Kim, H.S. (2003). Global analyses of transcriptomes and proteomes of a parent strain and an L-threonine-overproducing mutant strain. *J. Bacteriol.* **185**, 5442-5451.

Lee, P.S. & Lee, K.H. (2003). *Escherichia coli*-a model system that benefits from and contributes to the evolution of proteomics. *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 801-814.

Lee, S.Y., Lee, D.Y., and Kim, T.Y. (2005). Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol.* **23**, 349-358.

Lee, C., Kim, J., Shin, S.G., and Hwang, S. (2006a). Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **123**, 273-280.

Lee, C.L., Ow, D.S., and Oh, S.K. (2006b). Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *J. Microbiol. Methods* **65**, 258-267.

Lois, L.M., Campos, N., Putra, S.R., Danielsen, K., Rohmer, M., and Boronat, A. (1998). Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 2105-2110.

Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**, 512-538.

Marouga, R., David, S., and Hawkins, E. (2005). The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 669-678.

- Matsumura, H., Reich, S., Ito, A., Saitoh, H., Kamoun, S., Winter, P., Kahl, G., Reuter, M., Kruger, D.H., and Terauchi, R.** (2003). Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 15718-15723.
- Matsushita, K., Arents, J.C., Bader, R., Yamada, M., Adachi, O., and Postma, P.W.** (1997). *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Microbiology* *143* (Pt 10), 3149-3156.
- McBroom, A.J., Johnson, A.P., Vemulapalli, S., and Kuehn, M.J.** (2006). Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J. Bacteriol.* *188*, 5385-5392.
- McBroom, A.J. & Kuehn, M.J.** (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* *63*, 545-558.
- McDonald, W.H. & Yates, J.R.** (2002). Shotgun proteomics and biomarker discovery. *Dis. Markers* *18*, 99-105.
- Mecsas, J., Rouviere, P.E., Erickson, J.W., Donohue, T.J., and Gross, C.A.** (1993). The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* *7*, 2618-2628.
- Miller, I., Crawford, J., and Gianazza, E.** (2006). Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* *6*, 5385-5408.
- Mirgorodskaya, O.A., Kozmin, Y.P., Titov, M.I., Korner, R., Sonksen, C.P., and Roepstorff, P.** (2000). Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using (18)O-labeled internal standards. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *14*, 1226-1232.
- Molloy, M.P., Brzezinski, E.E., Hang, J., McDowell, M.T., and VanBogelen, R.A.** (2003). Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics* *3*, 1912-1919.
- Mori, H. & Ito, K.** (2001). The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol.* *9*, 494-500.
- Nie, L., Wu, G., Culley, D.E., Scholten, J.C., and Zhang, W.** (2007). Integrative analysis of transcriptomic and proteomic data: challenges, solutions and applications. *Crit Rev. Biotechnol.* *27*, 63-75.
- Nishino, K., Honda, T., and Yamaguchi, A.** (2005). Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* *187*, 1763-1772.
- Nordström, K. & Austin, S.J.** (1989). Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annu. Rev. Genet.* *23*, 37-69.
- O'Farrell, P.H.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* *250*, 4007-4021.
- Ohsumi, M., Noda, H., Muro, K., Ishiba, A., Kondo, Y., and Nakao, S.** (1989). Effects of the yeast extract components pyrroloquinoline quinone and aspartic acid on vitamin B12 production in *Klebsiella pneumoniae* IFO 13541. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* *35*, 661-665.
- Olsson, I., Larsson, K., Palmgren, R., and Bjellqvist, B.** (2002). Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics* *2*, 1630-1632.
- Olsthoorn, A.J. & Duine, J.A.** (1996). Production, characterization, and reconstitution of recombinant quinoprotein glucose dehydrogenase (soluble type; EC 1.1.99.17) apoenzyme of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch. Biochem. Biophys.* *336*, 42-48.
- Olsthoorn, A.J., Otsuki, T., and Duine, J.A.** (1997). Ca²⁺ and its substitutes have two

different binding sites and roles in soluble, quinoprotein (pyrroloquinoline-quinone-containing) glucose dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **247**, 659-665.

Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics.* **1**, 376-386.

Oubrie, A., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Duine, J.A., and Dijkstra, B.W. (1999). The 1.7 Å crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* reveals a novel internal conserved sequence repeat. *J. Mol. Biol.* **289**, 319-333.

Parekh, S., Vinci, V.A., and Strobel, R.J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 287-301.

Park, M.S., Hill, C.M., Li, Y., Hardy, R.K., Khanna, H., Khang, Y.H., and Raushel, F.M. (2004). Catalytic properties of the PepQ prolidase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **429**, 224-230.

Park, S.J., Lee, S.Y., Cho, J., Kim, T.Y., Lee, J.W., Park, J.H., and Han, M.J. (2005). Global physiological understanding and metabolic engineering of microorganisms based on omics studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 567-579.

Park, J.H., Lee, K.H., Kim, T.Y., and Lee, S.Y. (2007). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7797-7802.

Parsell, D.A. & Sauer, R.T. (1989). Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes Dev.* **3**, 1226-1232.

Pavlou, A.K. & Reichert, J.M. (2004). Recombinant protein therapeutics-success rates, market trends and values to 2010. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1513-1519.

Pavlou, A.K. & Belsey, M.J. (2005). The therapeutic antibodies market to 2008. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**, 389-396.

Pedersen, S., Bloch, P.L., Reeh, S., and Neidhardt, F.C. (1978). Patterns of protein synthesis in *E. coli*: a catalog of the amount of 140 individual proteins at different growth rates. *Cell* **14**, 179-190.

Pla, J., Dopazo, A., and Vicente, M. (1990). The native form of FtsA, a septal protein of *Escherichia coli*, is located in the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **172**, 5097-5102.

Projan, S.J., Carleton, S., and Novick, R.P. (1983). Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid* **9**, 182-190.

Pushnova, E.A., Geier, M., and Zhu, Y.S. (2000). An easy and accurate agarose gel assay for quantitation of bacterial plasmid copy numbers. *Anal. Biochem.* **284**, 70-76.

Raivio, T.L., Popkin, D.L., and Silhavy, T.J. (1999). The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *J. Bacteriol.* **181**, 5263-5272.

Richarme, G. & Caldas, T.D. (1997). Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 15607-15612.

Rieping, M., Bastuck, C., Hermann, T., and Thierbach, C. (2003). Fermentation process for the preparation of L-amino acids using strains of the family Enterobacteriaceae. WO patent application 02/29080.

Riethdorf, S., Schroeter, A., and Hecker, M. (1989). RelA mutation and pBR322 plasmid amplification in amino acid-starved cells of *Escherichia coli*. *Genet. Res.* **54**, 167-171.

- Rinas, U.** (1996). Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* *12*, 196-200.
- Robertson, H.D. & Dunn, J.J.** (1975). Ribonucleic acid processing activity of *Escherichia coli* ribonuclease III. *J. Biol. Chem.* *250*, 3050-3056.
- Roessler, M., Rollinger, W., Palme, S., Hagmann, M.L., Berndt, P., Engel, A.M., Schneidinger, B., Pfeffer, M., Andres, H., Karl, J., Bodenmuller, H., Ruschoff, J., Henkel, T., Rohr, G., Rossol, S., Rosch, W., Langen, H., Zolg, W., and Tacke, M.** (2005). Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* *11*, 6550-6557.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., and Nyren, P.** (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* *242*, 84-89.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A., and Pappin, D.J.** (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics.* *3*, 1154-1169.
- Ruiz, N. & Silhavy, T.J.** (2005). Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr. Opin. Microbiol.* *8*, 122-126.
- Ruiz, N., Kahne, D., and Silhavy, T.J.** (2006). Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 57-66.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O.** (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* *270*, 467-470.
- Schirch, V. & Szebenyi, D.M.** (2005). Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *9*, 482-487.
- Schmidt, F.R.** (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *68*, 425-435.
- Schweder, T. & Hecker, M.** (2004). Monitoring of stress responses. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *89*, 47-71.
- Shaw, M.M. & Riederer, B.M.** (2003). Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* *3*, 1408-1417.
- Spiess, C., Beil, A., and Ehrmann, M.** (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* *97*, 339-347.
- Sprenger, G.A., Schorken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A.A., Taylor, S.V., Begley, T.P., Bringer-Meyer, S., and Sahm, H.** (1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 12857-12862.
- Stader, J.A. & Silhavy, T.J.** (1990). Engineering *Escherichia coli* to secrete heterologous gene products. *Methods Enzymol.* *185*, 166-187.
- Stewart, I.I., Thomson, T., and Figeys, D.** (2001). ¹⁸O labeling: a tool for proteomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *15*, 2456-2465.
- Strauch, K.L., Johnson, K., and Beckwith, J.** (1989). Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J. Bacteriol.* *171*, 2689-2696.

- Summers, D.K. & Sherratt, D.J.** (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* 36, 1097-1103.
- Swartz, J.R.** (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 195-201.
- Teich, A., Lin, H.Y., Andersson, L., Meyer, S., and Neubauer, P.** (1998). Amplification of ColE1 related plasmids in recombinant cultures of *Escherichia coli* after IPTG induction. *J. Biotechnol.* 64, 197-210.
- Thomas, J.G. & Baneyx, F.** (2000). ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol. Microbiol.* 36, 1360-1370.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., and Davison, M.** (2001). Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics.* 1, 377-396.
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J.S., and Arakawa, T.** (2004). Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol. Prog.* 20, 1301-1308.
- Tummala, S.B., Junne, S.G., Paredes, C.J., and Papoutsakis, E.T.** (2003). Transcriptional analysis of product-concentration driven changes in cellular programs of recombinant *Clostridium acetobutylicum* strains. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 842-854.
- Ünlü, M., Morgan, M.E., and Minden, J.S.** (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- Valent, Q.A., Kendall, D.A., High, S., Kusters, R., Oudega, B., and Luirink, J.** (1995). Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J.* 14, 5494-5505.
- VanBogelen, R.A. & Neidhardt, F.C.** (1999). Preparation of *Escherichia coli* samples for 2-D gel analysis. *Methods Mol. Biol.* 112, 21-29.
- Vind, J., Sorensen, M.A., Rasmussen, M.D., and Pedersen, S.** (1993). Synthesis of proteins in *Escherichia coli* is limited by the concentration of free ribosomes. Expression from reporter genes does not always reflect functional mRNA levels. *J. Mol. Biol.* 231, 678-688.
- Waggoner, A.S., Ernst, L.A., and Mujumdar, R.B.** (1993). US patent 5,268,486.
- Walsh, G.** (2006). Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat. Biotechnol.* 24, 769-776.
- Wang, H.C. & Gayda, R.C.** (1990). High-level expression of the FtsA protein inhibits cell septation in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 172, 4736-4740.
- Wang, Y.K., Ma, Z., Quinn, D.F., and Fu, E.W.** (2001). Inverse 18O labeling mass spectrometry for the rapid identification of marker/target proteins. *Anal. Chem.* 73, 3742-3750.
- Wang, Y., Wu, S.L., Hancock, W.S., Trala, R., Kessler, M., Taylor, A.H., Patel, P.S., and Aon, J.C.** (2005). Proteomic profiling of *Escherichia coli* proteins under high cell density fed-batch cultivation with overexpression of phosphogluconolactonase. *Biotechnol. Prog.* 21, 1401-1411.
- Wheelock, A.M., Morin, D., Bartosiewicz, M., and Buckpitt, A.R.** (2006). Use of a fluorescent internal protein standard to achieve quantitative two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 6, 1385-1398.
- Wiechert, W.** (2001). 13C metabolic flux analysis. *Metab Eng* 3, 195-206.

- Wilkins, M.R., Appel, R.D., Van Eyk, J.E., Chung, M.C., Gorg, A., Hecker, M., Huber, L.A., Langen, H., Link, A.J., Paik, Y.K., Patterson, S.D., Pennington, S.R., Rabilloud, T., Simpson, R.J., Weiss, W., and Dunn, M.J.** (2006). Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics*. *6*, 4-8.
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T.J., and Kahne, D.** (2005). Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* *121*, 235-245.
- Yamanaka, K., Ogura, T., Niki, H., and Hiraga, S.** (1996). Identification of two new genes, mukE and mukF, involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* *250*, 241-251.
- Yan, W. & Chen, S.S.** (2005). Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* *4*, 27-38.
- Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P.A., and Fenselau, C.** (2001). Proteolytic ¹⁸O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal. Chem.* *73*, 2836-2842.
- Yoon, S.H., Han, M.J., Lee, S.Y., Jeong, K.J., and Yoo, J.S.** (2003). Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture. *Biotechnol. Bioeng.* *81*, 753-767.
- Zhang, R. & Regnier, F.E.** (2002). Minimizing resolution of isotopically coded peptides in comparative proteomics. *J. Proteome. Res.* *1*, 139-147.
- Zhang, X., Jin, Q.K., Carr, S.A., and Annan, R.S.** (2002). N-Terminal peptide labeling strategy for incorporation of isotopic tags: a method for the determination of site-specific absolute phosphorylation stoichiometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *16*, 2325-2332.
- Zhong, J., Karberg, M., and Lambowitz, A.M.** (2003). Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. *Nucleic Acids Res.* *31*, 1656-1664.
- Zhou, H., Ranish, J.A., Watts, J.D., and Aebersold, R.** (2002). Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* *20*, 512-515.
- Zolkiewski, M.** (1999). ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *274*, 28083-28086.

7 Anhang

(1) Proteinsequenzen der exprimierten Gluc-DH Enzyme im Vergleich (Wildtyp-Enzym: WT, Enzymvariante: Var).

Gluc-DH WT	1	dvpltpsqaakaksenfdkkvilsnlkphallwgpdnqiwltteratgkilrvnpegsv
Gluc-DH Var	1
Gluc-DH WT	61	ktvfqvpeivndadgqngllgfafhpdfknpnyiyisgtfknpkstkdelpnqtiirryt
Gluc-DH Var	61
Gluc-DH WT	121	ynkstdtlekpvdlaglpsskdhqsgrlvigpdqkiyytigdqgrnqlaylflpnqaqh
Gluc-DH Var	121	.k.....f.g.....
Gluc-DH WT	181	tptqqelngkdyhtymgkvlrlnldgsipkdnpsfngvvshiytlghrnpqglaftpngk
Gluc-DH Var	181
Gluc-DH WT	241	llqseqgpnsddeinlivkgnnygwpnvagykddsgyayanysaaanksikdlaqngvkv
Gluc-DH Var	241d.....
Gluc-DH WT	301	aagvpvtkesewtgknfvplktlytvqdtynyndptcgemyicwptvapssayvykkg
Gluc-DH Var	301v.....g.....
Gluc-DH WT	361	kkaitgwentllvpslkrvifrikldptysttyddavpmfksnnryrdviaspdgnvly
Gluc-DH Var	361
Gluc-DH WT	421	vlt dtagn - vqkddgsvtntlenpgslikftykak
Gluc-DH Var	421p.....

(2) Ergebnisse der 2-D Gel- und MS-Analyse aus den Expressionsprofilen von Hoch- (WT) und Niedrig- (Var) Expressionssystem zu den Kultivierungszeitpunkten vor Induktion (fc ($t_{v.l.}$)), 1 h nach Induktion (fc ($t_{1 n.l.}$)) und 2 h nach Induktion (fc ($t_{2 n.l.}$); 3.3).

Protein-name	Spot no. ^a	Accession no. ^b	fc ($t_{v.l.}$)	fc ($t_{1 n.l.}$)	fc ($t_{2 n.l.}$)	protein function ^c
AccC	633	P24182	< 11,40I	< 11,40I	-3,43	Acetyl CoA carboxylase: biotin carboxylase subunit, fatty acid and phosphatidic acid biosynthesis
	1285		< 11,40I	< 11,40I	-2,34	
AceE	416	P0AFG8	< 11,40I	< 11,40I	2,23	Pyruvate dehydrogenase E1: energy metabolism
Adk	1343	P69441	< 11,40I	1,58	2,47	Adenylate kinase: Purine ribonucleotide biosynthesis
Amn	515	P0AE12	-1,83	-1,76	-2,45	AMP nucleosidase: salvage of nucleosides and nucleotides
Apt	620	P69503	< 11,40I	< 11,40I	-2,16	Adenine phosphoribosyltransferase: Salvage of nucleosides and nucleotides
AsnS	416	P0A8M0	< 11,40I	< 11,40I	2,23	Asparagine tRNA synthetase: aminoacyl-tRNA synthetases, tRNA modification
AtpA	546	P0ABB0	< 11,40I	-5,29	-10,15	Membrane-bound ATP synthase, F1 sector, alpha-subunit: ATP-proton motive force interconversion
	1609		< 11,40I	< 11,40I	1,78	
AtpD	1167	P0ABB4	< 11,40I	-3,73	-24,61	Membrane-bound ATP synthase, F1 sector, beta-subunit: ATP-proton motive force interconversion
CarA	792	P0A6F1	< 11,40I	2,11	2,74	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic subunit: pyrimidine ribonucleotide biosynthesis
ClpB	1230	P63284	< 11,40I	< 11,40I	-2,70	Chaperone
	1401		1,54	< 11,40I	< 11,40I	
Cmk	1343	P0A6I0	< 11,40I	1,58	2,47	Cytidylate kinase: pyrimidine ribonucleotide biosynthesis
CodA	620	P25524	< 11,40I	< 11,40I	-2,16	Cytosine deaminase: Salvage of nucleosides and nucleotides
	1139		< 11,40I	1,5	2,95	
Crr	1609	P69783	< 11,40I	< 11,40I	1,78	PTS system, glucose-specific IIA component: transport of small molecules: carbohydrates, organic acids, alcohols
CysK	845	P0ABK5	-3,74	-4,58	-7,59	Cysteine synthase A, O-acetylserine sulfhydrylase A: cysteine biosynthesis
	1052		< 11,40I	< 11,40I	-3,95	

Protein-name	Spot no. ^a	Accession no. ^b	fc (t _{v.l.})	fc (t _{1 n.l.})	fc (t _{2 n.l.})	protein function ^c
CysP	1113	P16700	< I1,40I	1,44	2,44	Thiosulfate binding protein: transport; transport of small molecules (anions)
	1141		< I1,40I	1,44	1,89	
DacA	853	P0AEB2	-3	-2,95	-6,02	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase fraction A, penicillin binding protein 5: murein sacculus, peptidoglycan
DacC	865	P08506	< I1,40I	< I1,40I	-1,53	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, penicillin binding protein 6: murein sacculus, peptidoglycan
DapA	1127	P0A6L2	< I1,40I	< I1,40I	-1,50	Dihydrodipicolinate synthase: lysine biosynthesis
DeoC	1300	P0A6L0	< I1,40I	< I1,40I	-2,33	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase: salvage of nucleosides and nucleotides
DnaK	1167	P0A6Y8	< I1,40I	-3,73	-24,61	Chaperone Hsp 70: autoregulated heat shock proteins, DNA biosynthesis
	1401		1,54	< I1,40I	< I1,40I	
Dps	1632	P0ABT2	< I1,40I	< I1,40I	1,97	global regulator, DNA protection, starvation conditions
Eda	1500	P0A955	< I1,40I	< I1,40I	2,26	2-keto-3-deoxygluconate 6-phosphate aldolase. central intermediary metabolism (Entner-Doudoroff = KDPG)
FabF	1052	P0AAI5	< I1,40I	< I1,40I	-3,95	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II: fatty acid and phosphatidic acid biosynthesis
FabG	1451	P0AEK2	< I1,40I	1,86	4,76	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase: fatty acid and phosphatidic acid biosynthesis
FabH	1061	P0A6R0	-1,42	-2,68	-6,93	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III: fatty acid and phosphatidic acid biosynthesis
FhuA	215	P06971	< I1,40I	-1,47	-2,78	outer membrane protein receptor for ferrichrome, colicin M, and phages T1, T5, and phi80
FhuC	631	P07821	< I1,40I	< I1,40I	-2,87	ATP-binding component of hydroxymate-dependent iron transport: transport; transport of small molecules (cations)
FolD	1052	P24186	< I1,40I	< I1,40I	-3,95	5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase: biosynthesis of cofactors, carriers (folic acid)
	1107		< I1,40I	< I1,40I	-2,40	

Protein-name	Spot no. ^a	Accession no. ^b	fc (t _{v.l.})	fc (t _{1 n.l.})	fc (t _{2 n.l.})	protein function ^c
FtsA	908	P0ABH0	-1,44	< I1,40I	< I1,40I	ATP-binding cell division protein: septation process, complexes with FtsZ, associated with junctions of inner and outer membranes
FusA	1576	P0A6M8	< I1,40I	< I1,40I	2,70	GTP-binding protein chain elongation factor EF-G: protein translation and modification
GatY	1230	P37192	< I1,40I	< I1,40I	-2,70	Tagatose-1,6-bisphosphate aldolase: degradation of small molecules (Carbon compounds)
Glf	908	P37747	-1,44	< I1,40I	< I1,40I	UDP-galactopyranose mutase: degradation of small molecules (Carbon compounds)
GlmS	305	P17169	< I1,40I	1,43	1,62	L-glutamine:D-fructose-6-phosphate aminotransferase: central intermediary metabolism (amino sugars)
GltD	514	P09832	< I1,40I	< I1,40I	-2,61	Glutamate synthase (NADPH) small subunit: central intermediary metabolism (pool, multipurpos conversions)
	543		< I1,40I	-4,37	-3,43	
rek. Gluc-DH	543	P15877	< I1,40I	-4,37	-3,43	Quinoprotein glucose dehydrogenase-B precursor: oxidizes glucose to gluconolactone
	546		< I1,40I	-5,29	-10,15	
	639		< I1,40I	< I1,40I	-10,53	
	858		-1,48	< I1,40I	-2,63	
	1167		< I1,40I	-3,73	-24,61	
	1283		< I1,40I	-36,58	-9,21	
	1318		< I1,40I	-28,5	-8,50	
GlyA	724	P0A825	< I1,40I	< I1,40I	2,21	Serine hydroxymethyltransferase: interconversion of serine and glycine; key enzyme in the biosynthesis of purines, lipids, hormones and other components
	733		< I1,40I	1,62	3,14	
GlyS	1658	P00961	< I1,40I	< I1,40I	2,20	Glycine tRNA synthetase beta subunit: aminoacyl tRNA synthetases, tRNA modification

Protein-name	Spot no. ^a	Accession no. ^b	fc (t _{v.l.})	fc (t _{1 n.l.})	fc (t _{2 n.l.})	protein function ^c
GpmA	1327	P62707	< 11,40l	< 11,40l	2,34	Phosphoglyceromutase 1: energy metabolism, carbon (glycolysis)
	1512		< 11,40l	1,44	2,64	
Gpt	1658	P0A9M5	< 11,40l	< 11,40l	2,20	Guanine-hypoxanthine phosphoribosyltransferase: salvage of nucleosides and nucleotides
GrxB	1418	P0AC59	< 11,40l	-5,19	-4,31	Glutaredoxin 2: carrier; biosynthesis of cofactors, carriers (thioredoxin, glutaredoxin, glutathione)
GshA	414	P0A6W9	-1,6	< 11,40l	-1,62	biosynthesis of cofactors, carriers: Thioredoxin, glutaredoxin, glutathione
HtpG	1099	P0A6Z3	< 11,40l	-1,48	-2,38	Chaperone Hsp 90
HtrA	652	P0C0V0	< 11,40l	< 11,40l	-1,79	Periplasmic serine protease Do = DegP: heat shock protein; enzyme; degradation of proteins, peptides
IlvB	414	P08142	-1,6	< 11,40l	-1,62	Acetolactate synthase I large subunit: isoleucine, valine biosynthesis
Imp	191	P31554	< 11,40l	-1,5	-2,21	Organic solvent tolerance: phenotype; adaptations, atypical conditions
InfB	290	P0A705	< 11,40l	-1,89	-2,54	Protein chain initiation factor IF-2: protein translation and modification
KatG	215	P13029	< 11,40l	-1,47	-2,78	Catalase: detoxification
KdgK	792	P37647	< 11,40l	2,11	2,74	Ketodeoxygluconokinase: degradation of small molecules (carbon compounds)
Kdul	553	Q46938	< 11,40l	< 11,40l	-2,21	Homolog of pectin degrading enzyme 5-keto 4-deoxyuronate isomerase: degradation of small molecules (carbon compounds)

Protein-name	Spot no. ^a	Accession no. ^b	fc (t _{v.l.})	fc (t _{1 n.l.})	fc (t _{2 n.l.})	protein function ^c
LacI	839	P03023	-1,52	-3,96	-5,61	LacI: transcriptional repressor of the lac operon
	841		< I1,40I	< I1,40I	-5,07	
	844		-2,2	-1,72	-2,93	
	845		-3,74	-4,58	-7,59	
	846		-3,45	-3,84	-6,02	
	852		-3,3	-3,82	-6,13	
	853		-3	-2,95	-6,02	
	865		< I1,40I	< I1,40I	-1,53	
	877		< I1,40I	-4,96	-7,64	
	908		-1,44	< I1,40I	< I1,40I	
	927		-3,65	-4,37	-6,81	
	LeuA		482	P09151	-1,57	
LeuC	515	P0A6A6	-1,83	-1,76	-2,45	3-isopropylmalate isomerase (dehydratase) subunit: leucine biosynthesis
LysS	1124	P0A8N3	< I1,40I	1,56	2,07	Lysine tRNA synthetase: constitutive
LysU	1632	P0A8N5	< I1,40I	< I1,40I	1,97	Lysine tRNA synthetase: inducible; heat shock protein, enzyme; aminoacyl tRNA synthetases, tRNA modification
ManX	194	P69797	< I1,40I	-2,27	-3,28	PTS enzyme IIAB, mannose-specific: transport of small molecules (carbohydrates, organic acids, alcohols)
	845		-3,74	-4,58	-7,59	
	1052		< I1,40I	< I1,40I	-3,95	
Map	1178	P0AE18	< I1,40I	-2,19	-3,51	Methionine aminopeptidase: protein translation and modification
Mdh	1139	P61889	< I1,40I	1,5	2,95	Malate dehydrogenase: energy metabolism, carbon (TCA cycle)
MukF	592	P60293	< I1,40I	< I1,40I	-2,53	Killing factor KicB: Cell killing
MurE	538	P22188	< I1,40I	-2	-4,28	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate-ligase: murein sacculus, peptidoglycan

Protein-name	Spot no. ^a	Accession no. ^b	fc (t _{v.l.})	fc (t _{1 n.l.})	fc (t _{2 n.l.})	protein function ^c
OmpA	890	P0A910	< 11,40l	< 11,40l	2,30	outer membrane protein 3a
	1054		< 11,40l	-5,93	-13,60	
	1103		< 11,40l	< 11,40l	-2,22	
	1107		< 11,40l	< 11,40l	-2,40	
	1230		< 11,40l	< 11,40l	-2,70	
	1300		< 11,40l	< 11,40l	-2,33	
	1658		< 11,40l	< 11,40l	2,20	
OmpC	886	P06996	< 11,40l	-7,81	-17,88	outer membrane protein C
OmpP	1099	P0A917	< 11,40l	-1,48	-2,38	Outer membrane protease OmpP precursor: protease; also acts as a receptor for bacteriophage Ox2
OmpR	546	P0AA16	< 11,40l	-5,29	-10,15	Response regulator (sensor, EnvZ) affecting transcription of ompC and ompF (regulator; global regulatory functions)
OmpT	1285	P09169	< 11,40l	< 11,40l	-2,34	Outer membrane protein 3b (a) protease VII
OppA	411	P23843	< 11,40l	-5,27	-10,61	Oligopeptide transport; periplasmic binding protein: transport; Protein, peptide secretion
PanC	1130	P31663	< 11,40l	< 11,40l	2,26	Pantothenate synthetase: biosynthesis of cofactors, carriers (pantothenate)
PckA	845	P22259	-3,74	-4,58	-7,59	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP): central intermediary metabolism (gluconeogenesis)
PdxB	879	P05459	-2,7	-2,22	-1,98	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase: biosynthesis of cofactors, carriers (pyridoxine)
PepD	553	P15288	< 11,40l	< 11,40l	-2,21	Aminoacyl-histidine dipeptidase: degradation of proteins, peptides, glyco
	1359		< 11,40l	1,51	1,72	
PepN	1124	P04825	< 11,40l	1,56	2,07	Aminopeptidase N: degradation of proteins, peptides, glyco
PepQ	544	P21165	< 11,40l	-2,36	-7,19	Proline dipeptidase: degradation of proteins, peptides, glyco
PfIB	733	P09373	< 11,40l	1,62	3,14	Formate acetyltransferase 1: energy metabolism, carbon (anaerobic respiration)

Protein-name	Spot no. ^a	Accession no. ^b	fc (t _{v.l.})	fc (t _{1 n.l.})	fc (t _{2 n.l.})	protein function ^c
Pgk	835	P0A799	< I1,40I	1,42	2,48	Phosphoglycerate kinase: energy metabolism, carbon (glycolysis)
PheA	844	P0A9J8	-2,2	-1,72	-2,93	Chorismate mutase-P: phenylalanine biosynthesis
	845		-3,74	-4,58	-7,59	
PheS	724	P08312	< I1,40I	< I1,40I	2,21	Phenylalanine tRNA synthetase alpha-subunit: aminoacyl tRNA synthetases, tRNA modification
PhoR	845	P08400	-3,74	-4,58	-7,59	Positive and negative sensor protein for pho regulon: global regulatory functions
PpiB	1658	P23869	< I1,40I	< I1,40I	2,20	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B: protein translation and modification
PrsA	1103	P0A717	< I1,40I	< I1,40I	-2,22	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase: purine ribonucleotide biosynthesis
	1295		< I1,40I	1,48	2,49	
Pta	191	P0A9M8	< I1,40I	-1,5	-2,21	Phosphotransacetylase: degradation of small molecules (carbon compounds)
PurC	1359	P0A7D7	< I1,40I	1,51	1,72	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase: purine biosynthesis
PurH	416	P15639	< I1,40I	< I1,40I	2,23	Phosphoribosylaminoimidazole arboxamideformyltransferase: purine ribonucleotide biosynthesis
PurK	932	P09029	< I1,40I	< I1,40I	2,18	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase: purine ribonucleotide biosynthesis
PurN	1373	P08179	< I1,40I	1,42	2,23	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase 1: purine ribonucleotide biosynthesis
PyrB	1076	P0A786	< I1,40I	2,88	4,76	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic subunit: pyrimidine ribonucleotide biosynthesis
	1093		< I1,40I	2,88	3,11	
PyrD	939	P0A7E1	< I1,40I	-11,5	-5,56	Dihydroorotate dehydrogenase: pyrimidine ribonucleotide biosynthesis
RbsB	1295	P02925	< I1,40I	1,48	2,49	D-ribose periplasmic binding protein: transport; transport of small molecules (carbohydrates, organic acids, alcohols)

Protein-name	Spot no. ^a	Accession no. ^b	fc (t _{v.l.})	fc (t _{1 n.l.})	fc (t _{2 n.l.})	protein function ^c
Rf2	1658	P07012	< 11,40l	< 11,40l	2,20	Peptide chain release factor 2 (RF-2): directs the termination of translation in response to the peptide chain termination codons UGA and UAA by similarity
RfaD	1359	P67910	< 11,40l	1,51	1,72	ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase: surface polysaccharides and antigens
RfbB	890	P37759	< 11,40l	< 11,40l	2,30	dTDP-glucose 4,6 dehydratase: central intermediary metabolism (Sugar-nucleotide biosynthesis, conversions)
Rho	633	P0AG30	< 11,40l	< 11,40l	-3,43	Transcription termination factor Rho: RNA synthesis, modification, DNA transcription
Rnc	1355	P0A7Y0	< 11,40l	-2,95	-3,34	RNase III: degradation of RNA
RplI	1385	P0A7R1	< 11,40l	< 11,40l	-2,37	50S ribosomal subunit protein L9: structural component; ribosomal proteins - synthesis, modification
	1500		< 11,40l	< 11,40l	2,26	
RpoA	1373	P0A7Z4	< 11,40l	1,42	2,23	RNA polymerase alpha subunit: RNA synthesis, modification, DNA transcription
RpoS	1043	P13445	< 11,40l	1,59	2,21	Sigma S factor, sigma 38: synthesis of many growth phase related proteins
SdhA	631	P0AC41	< 11,40l	< 11,40l	-2,87	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit: energy metabolism, carbon (TCA cycle)
SerA	724	P0A9T0	< 11,40l	< 11,40l	2,21	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase: serine biosynthesis
SodA	1533	P00448	< 11,40l	1,49	1,80	Superoxide dismutase manganese: detoxification
SodB	1576	P0AGD3	< 11,40l	< 11,40l	2,70	Superoxide dismutase, iron: detoxification
SucB	543	P0AFG6	< 11,40l	-4,37	-3,43	2-oxoglutarate dehydrogenase: energy metabolism, carbon (TCA cycle)
Tgt	724	P0A847	< 11,40l	< 11,40l	2,21	tRNA-guanine transglycosylase: aminoacyl tRNA synthetases, tRNA modification

Protein-name	Spot no. ^a	Accession no. ^b	fc (t _{v.l.})	fc (t _{1 n.l.})	fc (t _{2 n.l.})	protein function ^c
Tig	515	P0A850	-1,83	-1,76	-2,45	Trigger factor: molecular chaperone involved in cell division
	591		< 11,40l	< 11,40l	-3,33	
	1099		< 11,40l	-1,48	-2,38	
TktA	240	P27302	1,4	< 11,40l	< 11,40l	Transketolase 1 isozyme: central intermediary metabolism (non-oxidative branch, pentose pathway)
TnaA	631	P0A853	< 11,40l	< 11,40l	-2,87	Tryptophanase: degradation of small molecules (amino acids)
TolC	553	P02930	< 11,40l	< 11,40l	-2,21	Outer membrane channel: specific tolerance to colicin E1; segregation of daughter chromosomes
TufA	886	P0A6N1	< 11,40l	-7,81	-17,88	Protein chain elongation factor: protein translation and modification
UbiB	1346	P0AEN1	< 11,40l	-1,44	-2,32	Ferrisiderophore reductase: energy metabolism, carbon (electron transport)
Udp	1124	P12758	< 11,40l	1,56	2,07	Uridine phosphorylase: salvage of nucleosides and nucleotides
	1576		< 11,40l	< 11,40l	2,70	
YaeT	131	P0A940	< 11,40l	-2,09	-3,93	Outer membrane protein assembly factor
	1230		< 11,40l	< 11,40l	-2,70	
YafA	693	P04335	-1,41	< 11,40l	-1,43	Hypothetical protein
YajQ	1620	P0A8E7	1,55	1,52	2,90	UPF0234 protein
YchF	543	P0ABU2	< 11,40l	-4,37	-3,43	Putative GTP-binding protein
YeaD	1127	P39173	< 11,40l	< 11,40l	-1,50	UPF0010 protein
YecO	1346	P76290	< 11,40l	-1,44	-2,32	Protein
YgfZ	1021	P0ADE8	< 11,40l	< 11,40l	1,91	Protein
YihK	1359	P32132	< 11,40l	1,51	1,72	Putative GTP-binding factor: non-standard protein translation
YifG	608	P61887	< 11,40l	< 11,40l	-2,25	Putative ligase

^a Nummerierung entsprechend der DeCyder™ Software. Kursiv geschriebene Spotnummern enthalten mehr als ein Protein pro Spot.

^b UniProt Accession No.

^c Die Beschreibung der Proteinfunktion basiert auf den EcoCyc, UniProt und/oder Ecogp Datenbanken.

Veröffentlichungen

Schmidt, H., Schmuck, R., Uden, G., Düfel, H. (2008). Proteome Profiling of *Escherichia coli* and rational expression optimization of a recombinant glucose dehydrogenase (in Bearbeitung).

Schmidt, H., Schmuck, R., Uden, G., Düfel, H. (2008). Expression profiling and rational optimization of a prokaryotic host-/vector-expression system. Dechema Tagungsband zur European BioPerspectives, Hannover, Germany (akzeptiert).

Schmidt, H., Schmuck, R., Uden, G., Düfel, H. (2007). Rational optimization of host-/vector-expression systems by use of a proteomics expression profiling approach. Biospektrum Tagungsband zur Jahrestagung der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM), Osnabrück, Germany, p. 186-187.

Breitling, R., Klingner, S., Pietrucha, R., Geyer, A., Callewaert, N., Müller, A., Contreras, R., Shao, Z., Schmidt, H., Düfel, H., Alexandrov, K. (2005). *Leishmania tarentolae* - a novel eukaryotic host for secretion of recombinant proteins. International Symposium Protein Sorting, Freiburg/Breisgau, Germany.