

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet Proteomik

**Methodische Arbeiten zur Analyse  
des Gesamtproteoms von  
*Corynebacterium glutamicum***

Carsten Lück

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Back  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. A. Görg  
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. (Zonguldak Univ./Türkei) H. Parlar

Die Dissertation wurde am 06.05.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.06.2008 angenommen.



## **„Ohne de Schein laaft nix“**

Arbeit ist des Bürgers Zierde,  
Scheine\* sind der Mühe Preis,  
so mein Vater rezitierte,  
Schiller war´s, soviel ich weiß.

*\* Otmar Lück, Denker und Schwenker:  
Scheine = Abitur, Diplom, Promotion*



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Angelika Görg für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, das große Vertrauen und die wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H. Parlar für die Übernahme des Koreferates, sowie Herrn Prof. Dr. W. Back für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Zudem möchte ich Herrn Dr. Walter Weiss für Anregungen und Diskussionsbeiträge, sowie der mir jederzeit entgegengebrachte freundschaftliche Hilfsbereitschaft und Geduld danken.

Ich danke allen Mitarbeitern der AG Proteomik, insbesondere Herrn Dr. Robert Wildgruber und Herrn Dr. Oliver Drews, für die Hilfsbereitschaft zu Beginn meiner Zeit in Freising. Herrn Dipl.-Ing. Florian Weiland danke ich für die gute Zusammenarbeit während seiner Diplomarbeit und die langen Stunden im Keller am MALDI-TOF-MS. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Andreas Klaus für die freundschaftliche Unterstützung, das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, sie haben mich immer und in allen Lebenslagen unterstützt und sich geduldig alle Freuden- aber auch Frustausbrüche angehört. Ohne ihre intensive Unterstützung, die weit über das Selbstverständliche hinausging, hätte ich es sehr viel schwieriger gehabt sowohl im Studium als auch in der anschließenden Promotion. Danke dafür.

Zu guter Letzt und am allerwichtigsten, bedanke ich mich bei Tanja für ihr Verständnis, ihre Hilfsbereitschaft, ihre seelische Unterstützung und grenzenlose Geduld und ihre bis zuletzt anhaltenden Motivationshilfen.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Teilprojekts 7 des Verbundprojekts: „Neue Methoden zur Proteomanalyse: Anwendung und Verknüpfung mit Metabolomanalysen am Beispiel von *Corynebacterium glutamicum*“ (Förderkennzeichen 0312843C).

## Veröffentlichungen

Helm M, Lück C, Prestele J, Hierl G, Huesgen PF, Frohlich T, Arnold GJ, Adamska I, Görg A, Lottspeich F, Gietl C.: Dual specificities of the glyoxysomal/peroxisomal processing protease Deg15 in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104(27): 11501-6.

Fanous A, Weiland F, Lück C, Görg A, Friess A, Parlar H.: A proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum* after exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). *Chemosphere* 2007, 69(1): 25-31.

Görg A, Lück C, Weiss W: Sample prefractionation in granulated Sephadex IEF gels. *Methods in Molecular Biology* 2008, 424(1): 277-286.

## Vorträge

C. Lück, W. Weiss, A. Görg: Improvement of 2DE with immobilized pH-Gradients for the analysis of alkaline, hydrophobic and low abundance proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *First BMBF Statusseminar* (12. –14. Mai 2003, Bad Honnef).

## Posterpräsentationen

C. Lück, O. Drews, G. Reil, H. Parlar, A. Görg: Towards a database of very alkaline *Corynebacterium glutamicum* Proteins. *Proteomic Forum 2003*. **Abstract** Nr. 193 at S. 277 Abstractbook.

C. Lück, W. Weiss, A. Görg: Detection and identification of very alkaline and low abundance *C. glutamicum* proteins. *2nd BMBF Colloquium* (30. Mai – 1. Juni 2005 in Potsdam).

C. Lück, W. Weiss, G. Reil, A. Görg: Proteome analysis of *C. glutamicum*: Strategies for the detection / identification of alkaline and low abundance proteins. *HUPO 4th Annual World Congress 2005*. **Abstract** Nr. 24.25 In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 4, No. 8, S.241, 2005.

C. Lück, W. Weiss, G. Reil, A. Görg: Sample prefractionation with Sephadex IEF for enrichment of low abundance proteins and improvement of MALDI-MS spectra. *HUPO 4th Annual World Congress 2005*. **Abstract** Nr. 35.27 In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 4, No. 8, S.346, 2005.

F. Weiland, C. Lück, A. Klaus, G. Reil, A. Görg: Proteome analysis of *C. glutamicum* wild-type strains and mutants overproducing L-Lysine. *HUPO 4th Annual World Congress 2005*. **Abstract** Nr. 24.45 In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 4, No. 8, S.249, 2005.

A. Klaus, C. Lück, F. Weiland, A. Görg: Two-Dimensional Gel Electrophoresis Of Low Abundance Proteins. *7 th Siena Meeting 2006*. **Abstract** Nr 132 S. 257 Abstractbook

C. Lück, F. Weiland, A. Klaus, A. Görg: Differential Proteome Analysis Of *C. Glutamicum* Wild-type Vs. Overexpression Mutants And Proteomic Profiling After Growth On Different Carbon Sources. *7 th Siena Meeting 2006*. **Abstract** Nr 156 S. 281 Abstractbook

F. Weiland, C. Lück, A. Klaus, A. Görg: Proteome Analysis Of *C. Glutamicum*: Strategies For The Detection / Identification Of Alkaline And Hydrophobic Proteins. *7 th Siena Meeting 2006*. **Abstract** Nr 250 S. 379 Abstractbook

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Aufgabenstellung</b>	<b>3</b>
<b>3 Proteomik – Kenntnisse und Stand der Technik</b>	<b>5</b>
3.1 Proteomik.....	5
3.2 2DE mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Dalt) .....	12
3.3 Entwicklung maßgeschneiderter IPGs.....	13
3.4 Auftrennung, Detektion und Identifikation von basischen Proteinen .....	14
3.5 Vorfraktionierungsverfahren.....	15
3.6 Vorteile der Proteindetektion mit fluoreszierenden Farbstoffen.....	16
3.7 Difference Gel Electrophoresis (DIGE).....	17
3.8 Massenspektrometrie (MS).....	18
3.9 Weitere in der Proteomik verwendete Methoden .....	22
3.10 Einsatz der Bioinformatik in der 2DE .....	23
3.10.1 Computergestützte Gelauswertung.....	23
3.10.1.1 Digitalisierung der 2D-Elektrophorese Gele .....	24
3.10.1.2 Digitalisierung durch Durchlichtdensitometrie .....	24
3.10.1.3 Digitalisierung durch Fluoreszenzimaging .....	25
3.10.1.4 2DE Gel-Auswertungssysteme .....	26
3.10.2 Datenbanken .....	27
3.10.2.1 allgemeine Datenbanken .....	27
3.10.2.2 2DE Datenbanken.....	27
3.11 <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	28
3.11.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 (Wildtyp).....	29
3.11.2 <i>Corynebacterium glutamicum</i> DM1730 (Produktionsstamm) .....	29
3.11.3 Biotechnologische Bedeutung von <i>C. glutamicum</i> .....	30
3.11.4 Der Lysin Biosyntheseweg in <i>C. glutamicum</i> .....	30
3.11.5 Aufbau des <i>C. glutamicum</i> Proteoms .....	32
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>33</b>
4.1 Anzucht von <i>C. glutamicum</i> .....	33
4.1.1 Verwendete <i>C. glutamicum</i> Stämme.....	33
4.1.2 Anzuchtmedien.....	33
4.1.3 Wachstumsbedingungen.....	34
4.1.4 Fermenterproben.....	34

4.1.5	Wachstumskurven .....	35
4.1.5.1	Fermenteranzucht .....	35
4.1.5.2	Schüttelkolbenanzucht .....	36
4.2	Proteinextraktion.....	38
4.2.1	Extraktionsmethode bei Verwendung von Bakterien aus der Schüttelkolbenanzucht.....	38
4.2.2	Extraktionsmethode bei Verwendung der Fermenterproben.....	38
4.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration des Extraktes .....	39
4.3	2D-Gelelektrophorese.....	39
4.3.1	Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (IPGs) .....	39
4.3.1.1	Herstellung von IPG-Gelen .....	39
4.3.1.2	Rehydratisierung der IPG-Streifen .....	43
4.3.1.3	IEF mit der IPGphor .....	44
4.3.2	Zweite Dimension: SDS-PAGE .....	47
4.3.2.1	Herstellung von SDS Gelen .....	47
4.3.2.2	Äquilibrierung der IPG-Streifen .....	49
4.3.2.3	Befüllen des Elektrophorese-Tanks .....	50
4.3.2.4	Laufparameter.....	52
4.3.2.5	Beendigung der SDS-PAGE .....	52
4.4	Isoelektrische Vorfraktionierung in horizontalen Sephadex-IEF Gelen.....	52
4.5	Proteinvisualisierung.....	52
4.5.1	Silberfärbung nach Blum <i>et al.</i> (modifiziert) .....	53
4.5.2	Coomassie Brilliant Blau Färbung.....	54
4.5.3	SYPRO Ruby Färbung .....	54
4.6	Geltrocknung.....	54
4.7	Difference Gel Elektrophoresis (DIGE).....	55
4.7.1	Proteinsolubilisierung für DIGE .....	55
4.7.2	Fluoreszenzlabeling für DIGE.....	55
4.7.3	2DE-Gelelektrophorese der DIGE-Proben .....	56
4.8	Proteinidentifizierung mittels MALDI-MS .....	56
4.8.1	Probenvorbereitung .....	56
4.8.2	MALDI-MS Parameter.....	57
4.8.3	Proteinidentifizierung.....	57
4.9	Computergestützte Auswertung der 2DE-Gele und Proteinmustervergleich.....	58
4.9.1	Auswertung der 2DE-Gele nach Färbungen.....	58
4.9.1.1	Digitalisierung der Gele.....	58
4.9.1.2	Detektion der Proteinspots.....	58
4.9.1.3	Editieren der Spots .....	60
4.9.1.4	Spotmustervergleich mit anderen Gelen (Matching) .....	61
4.9.1.5	Dual Channel Imaging.....	63
4.10	Auswertung der 2DE-Gele nach Fluoreszenzmarkierung.....	65

4.10.1	Scannen der DIGE Gele.....	65
4.10.2	Imageanalyse mittels DeCyder Software.....	65
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>67</b>
5.1	Optimierungsstrategien.....	68
5.1.1	Proteinsolubilisierung.....	68
5.1.2	Einfluss der in der Rezeptur verwendeten Immobiline auf die Qualität des pH-Gradienten und des 2DE Musters .....	71
5.1.3	Ermittlung der optimalen Probenauftragsmenge .....	72
5.1.4	Ermittlung der optimalen IPGs anhand des virtuellen und experimentell ermittelten Gesamtproteoms .....	74
5.2	2DE Analyse des sauren und neutralen <i>C. glutamicum</i> Proteoms durch eine Kombination unterschiedlich enger, überlappender, der tatsächlichen Proteinverteilung angepasster IPGs .....	76
5.2.1	Saurer pH-Bereich: IPG 2.5 –5.0, IPG 3.5–4.5, IPG 4.0-5.0, IPG 4.4-5.2.....	76
5.2.2	Schwach saurer bis neutraler pH-Bereich: IPG 4.75-7.25 .....	79
5.2.3	Resultat der Optimierungen: IPGs für Routineanalytik: IPG 3.4-5.4 und IPG 4.9-6.9.....	80
5.2.4	Ultraenge überlappende pH-Gradienten.....	80
5.3	2D elektrophoretische Analyse des basischen <i>C. glutamicum</i> Proteoms .....	83
5.3.1	<i>In silico</i> Darstellung des alkalischen <i>C. glutamicum</i> Proteoms.....	83
5.3.2	Trennung und Identifizierung der alkalischen <i>C. glutamicum</i> Proteine .....	84
5.3.3	Verwendung unterschiedlicher Detergenzien zur besseren Solubilisierung hydrophober alkalischer <i>C. glutamicum</i> Proteine .....	85
5.3.4	Referenzkarte des basischen <i>C. glutamicum</i> Proteoms.....	89
5.4	Nachweis und Identifizierung niedrig-exprimierter <i>C. glutamicum</i> Proteine .....	91
5.4.1	Optimierung der isoelektrischen Vorfraktionierung in Sephadex-Gelen.....	93
5.4.2	Reproduzierbarkeit der Sephadex-IEF.....	97
5.4.3	Erhöhte Anzahl von Spots nach Vorfraktionierung in Sephadex-IEF Gelen .....	102
5.4.4	Erhöhte Qualität der MS-Spektren nach Sephadex-IEF .....	102
5.4.5	Nachweis und Identifikation von niedrig-abundanten Proteinen .....	107
5.5	Vergleichende Proteomanalyse des Wildtyps <i>ATCC13032</i> und des Produktionsstamms <i>DM1730</i> ( <i>C. glutamicum</i> ) nach Anzucht auf MM1-Medium.....	116
5.5.1	Referenzkarte identifizierter Proteine im pH-Bereich 3.4-6.9 .....	116
5.5.2	DIGE-Vergleich von <i>C. glutamicum</i> <i>ATCC13032</i> und <i>DM1730</i> auf MM1-Medium.....	120
5.5.2.1	Cg0583 - (fusA) Elongations Faktor G .....	121
5.5.2.2	Cg1337 - (hom) Homoserin-Dehydrogenase .....	124
5.5.2.3	Cg2560 - (aceA) Isocitrat Lyase .....	124
5.5.3	Sub-Proteome-DIGE .....	125
5.6	Vergleichende Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> <i>ATCC13032</i> nach Anzucht in Vollmedium und Minimalmedium.....	128
5.6.1	Cg3119 - (cysJ) Probable Sulfite Reductase (Flavoprotein) .....	133
5.6.2	Cg3323 - Myo-inositol-1-phosphat-Synthase.....	135
5.6.3	Cg0203 - (iolE) Phosphat isomerase/Epimerase .....	135

5.6.4	Cg0310 - (katA) Katalase .....	136
5.6.5	Cg3118 - (cysI) Sulfid-Reduktase (Hämoprotein) .....	137
5.6.6	Cg0755 - (metY) O-Acetylhomoserin (Thiol)-Lyase.....	137
5.6.7	Cg0779 - (trpS) Tryptophan tRNA-Synthetase.....	138
5.6.8	Cg1215 - (nadC) Putative Nicotinat-Nucleotid-Pyrophosphorylase .....	138
5.6.9	Cg2214 - Predicted Fe-S-Cluster Redoxenzym.....	138
5.6.10	Cg0556 - (ubiE) Ubiquinon/Menaquinon- Biosynthese Methyltransferase.....	139
5.6.11	Cg0672 - (rplJ) - 50S Ribosomal Protein L10.....	139
5.7	Vergleichende Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 nach Anzucht auf verschiedenen C-Quellen.....	141
5.7.1	Image-Overlays (DIGE) der <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 Proteome nach Anzucht in Glucose-, Fructose-, Acetat-, Lactat- bzw. Glutamin-Medium.....	143
5.7.2	2D-Referenzkarte zur Identifizierung differentiell exprimierter Proteine bei Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen .....	146
5.8	Vergleichende Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 nach Anzucht in Acetat- und Glucosemedium.....	149
5.8.1	Quantifizierung und Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 3.4-5.4 und pH 4.9-6.9.....	151
5.8.2	Übersicht der Acetat- induzierten bzw. co-regulierten Proteine im pH-Bereich 3.4-6.9.	156
5.8.2.1	Acetataktivierung.....	156
5.8.2.2	Glyoxylatzyklus.....	157
5.8.2.3	Zitronensäurezyklus.....	157
5.8.2.4	Gluconeogenese .....	158
5.8.2.5	„Allgemeine Proteine“ .....	159
5.8.3	Vergleich von Proteom und Transkriptom .....	160
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>163</b>
6.1	Optimierungsstrategien.....	163
6.2	Analyse des alkalischen <i>C. glutamicum</i> Proteoms .....	164
6.3	Nachweis und Identifizierung gering-exprimierter <i>C. glutamicum</i> Proteine .....	164
6.4	Anwendungen.....	165
6.4.1	Vergleichende Proteomanalyse des Wildtyps ATCC13032 und Produktionsstamms DM1730 ( <i>C. glutamicum</i> ) nach Anzucht auf MM1 Medium .....	166
6.4.2	Vergleichende Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 nach Anzucht in Vollmedium und Minimalmedium.....	167
6.4.3	Vergleichende Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 nach Anzucht auf verschiedenen C-Quellen am Beispiel von Glucose vs. Acetat .....	167
<b>7</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>169</b>
<b>Anhang I</b>	.....	<b>170</b>
<b>Anhang II</b>	.....	<b>179</b>
<b>Anhang III</b>	.....	<b>186</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	.....	<b>190</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Komplexität des Gen-Protein Verhältnisses.....	6
Abbildung 3-2: Genom – Proteom.....	7
Abbildung 3-3: Gleiches Genom - unterschiedliche Proteome.....	7
Abbildung 3-4: Post-Translationale Modifikationen (PTMs) von Proteinen .....	9
Abbildung 3-5: Prinzip der isoelektrischen Fokussierung (IEF) .....	10
Abbildung 3-6: Prinzip der 2D-Elektrophorese .....	11
Abbildung 3-7: Struktur der Immobiline .....	12
Abbildung 3-8: Geometrie des IPG Gel Streifens.....	13
Abbildung 3-9: Prinzip der zweidimensionalen <i>Fluorescence Difference Gel Electrophoresis</i> (2D DIGE) ...	18
Abbildung 3-10: Prinzip der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) .....	20
Abbildung 3-11: MALDI-TOF-MS .....	21
Abbildung 3-12: Peptide Mass Fingerprint (PMF) .....	22
Abbildung 3-13: Digitalisierung von 2DE-Gelen.....	25
Abbildung 3-14: Fluoreszenzimaging.....	26
Abbildung 3-15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>C. glutamicum</i> .....	28
Abbildung 3-16: Die drei L-Lysin-Biosynthesewege in <i>C. glutamicum</i> .....	31
Abbildung 3-17: Virtuelles Proteom von <i>C. glutamicum</i> .....	32
Abbildung 4-1: Fermenteranzucht von <i>C. glutamicum</i> (Degussa) .....	35
Abbildung 4-2: Wachstumskurve von <i>C. glutamicum</i> in BHI-Medium (Schüttelkolbenanzucht) .....	36
Abbildung 4-3: Wachstumskurve von <i>C. glutamicum</i> in MM1 Medium (Schüttelkolbenanzucht).....	37
Abbildung 4-4: Verwendete IPGs.....	40
Abbildung 4-5: Zusammenbau der Gießkassette.....	41
Abbildung 4-6: Gießen eines pH-Gradientengels.....	42
Abbildung 4-7: Rehydratisierung der IPG-DryStrips vor der IEF.....	44
Abbildung 4-8: IEF in individuellen IPG Strip-Holdern mit integrierten Elektroden (IPGphor).....	44
Abbildung 4-9: Probenauftrag .....	46
Abbildung 4-10: Positionierung des Probenhalters auf dem IPG-Streifen.....	46
Abbildung 4-11: Lagerung der IPG-Streifen .....	46
Abbildung 4-12: Gießen der SDS-Gele .....	49
Abbildung 4-13: Aufbringen des IPG Streifens auf das SDS Gel.....	51
Abbildung 4-14: Prinzipien der vertikalen SDS-Gelelektrophorese .....	52
Abbildung 4-15: „Spot detection Wizard“ .....	59
Abbildung 4-16: Detektierte Proteinspots .....	59
Abbildung 4-17: Spotdetektion in Abhängigkeit des gewählten Schwellenwerts.....	60
Abbildung 4-18: Werkzeuge zur manuellen Nachbearbeitung der detektierten Spots.....	60
Abbildung 4-19: Verwendete Parameter für den Spotmustervergleich .....	61
Abbildung 4-20: Overlay warping .....	62
Abbildung 4-21: Additives Farbmodell und Farbmischung.....	63
Abbildung 4-22: Konvertierung von Grau in RGB-Farbstufen.....	63
Abbildung 4-23: Umwandlung von Grau- in Rot- bzw. Grünstufen .....	64
Abbildung 4-24: Farbaddition digital überlagerter 2D-Gel Images .....	64
Abbildung 5-1: Optimierung der Proteinextraktion .....	70
Abbildung 5-2: Reproduzierbarkeit der optimierten Proteinextraktionsmethode .....	71
Abbildung 5-3: Einfluß der in der Rezeptur verwendeten Immobiline.....	72
Abbildung 5-4: Optimierung der Probenauftragsmenge .....	74
Abbildung 5-5: Virtuelles Proteom von <i>C. glutamicum</i> .....	75
Abbildung 5-6: Experimentell ermitteltes Proteom von <i>C. glutamicum</i> im IPG 3-10.....	75
Abbildung 5-7: Experimentell ermitteltes Proteom von <i>C. glutamicum</i> im IPG 3-11.....	76
Abbildung 5-8: IPG 2.5-5.....	77
Abbildung 5-9: „Zoom-in“-Gele im sauren bis neutralen pH-Bereich .....	78
Abbildung 5-10: Optimierte IPGs für die Routineanalytik von <i>C. glutamicum</i> .....	81

Abbildung 5-11: Kombination (ultra-)enger IPGs (max. 1 pH Einheit).....	82
Abbildung 5-12: „Blow-up“ Experimente: Erhöhte Auflösung durch Verwendung enger IPGs .....	82
Abbildung 5-13: Virtuelles alkalisches Proteom von <i>C. glutamicum</i> .....	84
Abbildung 5-14: ASB 14 (4 %) .....	86
Abbildung 5-15: ASB 14-4 (4 %).....	86
Abbildung 5-16: BDM (4 %).....	87
Abbildung 5-17: C8Ø (4 %).....	87
Abbildung 5-18: IPG 6-12 SDS- Extrakt.....	88
Abbildung 5-19: IPG 6-12. Referenzkarte basischer <i>C. glutamicum</i> Proteine .....	89
Abbildung 5-20: Vorhersage der Proteinhäufigkeit (Abundance).....	92
Abbildung 5-21: Sephadex-IEF-Tray (Prototyp) aus Polycarbonat.....	94
Abbildung 5-22: Verbessertes Sephadex-IEF-Tray in der Multiphor-Apparatur .....	95
Abbildung 5-23: Sephadexentnahme nach IEF Vorfraktionierung .....	96
Abbildung 5-24: Reproduzierbarkeit der Sephadex-IEF .....	98
Abbildung 5-25: Quantitative Reproduzierbarkeit der Sephadex-IEF .....	99
Abbildung 5-26: Erhöhte Spotanzahl nach Vorfraktionierung (Sephadex-IEF) mit engen IPGs (I). 100	
Abbildung 5-27: Erhöhte Spotanzahl nach Vorfraktionierung (Sephadex-IEF) mit engen IPGs (II) 101	
Abbildung 5-28: Identifizierte Proteine nach Vorfraktionierung mit Sephadex-IEF .....	103
Abbildung 5-29: Identifizierte Proteine ohne bzw. nach Vorfraktionierung.....	105
Abbildung 5-30: Erhöhte Sequenzabdeckung durch Vorfraktionierung I.....	108
Abbildung 5-31: Erhöhte Sequenzabdeckung durch Vorfraktionierung II .....	109
Abbildung 5-32: 2D Elektrophorese von <i>C. glutamicum</i> Proteinen nach Vorfraktionierung.....	110
Abbildung 5-33: Identifizierte Proteine ohne bzw. nach Vorfraktionierung.....	112
Abbildung 5-34: Referenzkarte von <i>C. glutamicum</i> im pH-Bereich 3.4-5.4 (Fermenteranzucht).....	117
Abbildung 5-35: Referenzkarte <i>C. glutamicum</i> im pH-Bereich 4.9-6.9 (Fermenteranzucht).....	118
Abbildung 5-36: Identifizierte <i>C. glutamicum</i> Proteine im Bereich von pH 3.4-6.9 .....	119
Abbildung 5-37: L-Lysin Produktionsweg.....	119
Abbildung 5-38: 2D-DIGE Gel von in MM1-Medium angezüchteten <i>C. glutamicum</i> Stämmen .....	122
Abbildung 5-39: 2D-DIGE Gel von in MM1-Medium angezüchteten <i>C. glutamicum</i> Stämmen .....	123
Abbildung 5-40: Prinzip der Sub-Proteome DIGE Technologie .....	125
Abbildung 5-41: Mikropräparative 2D-DIGE- von zwei <i>C. glutamicum</i> Stämmen.....	126
Abbildung 5-42: Identifizierte Proteine nach Sub-Proteome-DIGE.....	127
Abbildung 5-43: Differentiell exprimierte <i>C. glutamicum</i> Proteine im pH-Bereich 3.4 - 5.4 nach Anzucht in Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1). 2D-DIGE.....	129
Abbildung 5-44: Differentiell exprimierte <i>C. glutamicum</i> Proteine im pH-Bereich 4.9 – 6.9 nach Anzucht in Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1). 2D-DIGE.....	130
Abbildung 5-45: Differentiell exprimierte <i>C. glutamicum</i> Proteine im pH-Bereich 4.9 – 6.9 nach Anzucht in Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1). 2D-DIGE.....	131
Abbildung 5-46: Differentiell exprimierte <i>C. glutamicum</i> Proteine im pH-Bereich 4.9 – 6.9 nach Anzucht in Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1). 2D-DIGE.....	132
Abbildung 5-47: Biosyntheseweg der Selenamino-säuren .....	134
Abbildung 5-49: Schwefelmetabolismus .....	134
Abbildung 5-50: Inositolphosphat-Metabolismus .....	135
Abbildung 5-51: Tryptophanmetabolismus .....	136
Abbildung 5-52: Methanmetabolismus .....	137
Abbildung 5-53: Nicotinat und Nicotinamid Metabolismus.....	139
Abbildung 5-54: Vergleichende Proteinexpression von <i>C. glutamicum</i> IPG 3.4-5.4 .....	143
Abbildung 5-55: Glutamin <i>vs.</i> Acetatmedium.....	144
Abbildung 5-56: Glutamin- <i>vs.</i> Lactatmedium.....	144
Abbildung 5-57: Glucose- vs. Fructosemedium .....	145
Abbildung 5-58: Glucose- vs. Acetatmedium.....	145
Abbildung 5-59: Referenzkarte im pH-Bereich 3.4 – 5.4 (Schüttelkolbenanzucht) .....	147
Abbildung 5-60: Referenzkarte im pH-Bereich 4.9 – 6.9 (Schüttelkolbenanzucht) .....	148

---

Abbildung 5-61: Zentralstoffwechselwege von <i>C. glutamicum</i> .....	149
Abbildung 5-62: Identifizierung und Quantifizierung differentiell exprimierter Proteine von <i>C. glutamicum</i> nach Anzucht in Acetat- bzw. Glucosemedium, IPG 3.4-5.4.....	152
Abbildung 5-63: Identifizierung und Quantifizierung differentiell exprimierter Proteine von <i>C. glutamicum</i> nach Anzucht in Acetat- bzw. Glucosemedium, IPG 4.9-6.9.....	154
Abbildung 5-64: Vergleich Transkriptomanalyse - Proteomanalyse .....	161

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: „IPG-Rezepte“ .....	41
Tabelle 4-2: Parameter für die IEF auf IPGphor .....	45
Tabelle 4-3: „Rezepte“ für vertikale SDS-Gele .....	48
Tabelle 4-4: Äquilibrieren des IPG Streifens vor der SDS-PAGE .....	50
Tabelle 4-5: Silberfärbeprotokoll nach Blum <i>et al.</i> (modifiziert) .....	53
Tabelle 4-6: MALDI Parameter für das Ettan MALDI-ToF-Pro.....	57
Tabelle 4-7: Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (CyDyes) .....	65
Tabelle 5-1: Getestete Detergenzien zur erhöhten Solubilisierung von hydrophoben Proteinen.....	85
Tabelle 5-2: Identifizierte basische <i>C. glutamicum</i> Proteine.....	90
Tabelle 5-3: Farbige pI-Marker.....	94
Tabelle 5-4: IEF Laufparameter in Sephadex-Gelen.....	95
Tabelle 5-5: IPG-IEF-Laufbedingungen.....	97
Tabelle 5-6: Identifizierte <i>C. glutamicum</i> Proteine im Bereich von pH 5.0 – 6.0.....	104
Tabelle 5-7: Identifizierte Proteine im Bereich pH 5.0 – 5.7 .....	106
Tabelle 5-8: Gering exprimierte Proteine im Bereich pH 5.5 – 6.7 (s. Abb. 5-32) .....	111
Tabelle 5-9: Identifizierte gering exprimierte Proteine im Bereich pH 5.0 – 6.7 .....	113
Tabelle 5-10: Differentiell exprimierte Proteine von DM1730 im Vergleich zu ATCC13032 .....	121
Tabelle 5-11: Differentiell exprimierte <i>C. glutamicum</i> Proteine im pH-Bereich 3.4 - 5.4 nach Anzucht im Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1).....	128
Tabelle 5-12: Differentiell exprimierte <i>C. glutamicum</i> Proteine im pH-Bereich 4.9 – 6.9 nach Anzucht im Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1).....	133
Tabelle 5-13: Labelschema .....	142
Tabelle 5-14: Differentiell exprimierte Proteine im Acetat/Glucose Vergleich, IPG 3.4-5.4.....	153
Tabelle 5-15: Differentiell exprimierte Proteine im Acetat/Glucose Vergleich, IPG 4.9-6.9.....	155
Tabelle 5-16: Vergleich Transkriptom-Proteom: Differentiell exprimierte, in Aminosäure- produktionswege involvierte Gene bzw. Proteine.....	160

**Abkürzungsverzeichnis**

Abkürzung	Bedeutung
2DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
A	Ampere
AA	Acrylamid
AcCySR	N-Acetylcysteinyl-Konjugat
AICAR	Aminoimidazol Carboxamid Ribonucleotid
ATCC	American Type Culture Collection
ATCH	Adrenocorticotrophes Hormon
BHI	<i>Brain-Heart-Infusion</i>
Bis	Bisacrylamid
C	Anteil Quervernetzer
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy Zimtsäure
CBB	Coomassie Brilliant Blau
COG	<i>Clusters of Orthologous Groups of Proteins</i>
Da	Dalton
DIGE	<i>Difference Gel Electrophoresis</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IAA	Iodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPS	<i>Internal Pooled Standard</i>
MALDI	<i>Matrix assisted Laser desorption / ionization</i>
<i>mid-log</i>	Mitte der logarithmischen Wachstumsphase
min	Minute

Min	Minimal
MIP	Myo-Inositol-Phosphat
MS	Massenspektrometrie
MT	<i>C. glutamicum</i> Stamm DM1730 (Mutante)
m/z	Verhältniss Masse zu Ladung
NEPHGE	<i>Non-equilibrium-pH-Gradient Elektrophoresis</i>
OD	Optische Dichte
$\Delta$ OD	Veränderung der optischen Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
PMT	Spannung am <i>Photomultiplier</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
R	Korrelationskoeffizient
R <sup>2</sup>	Bestimmungsmaß
<i>rpm</i>	<i>Revolutions per Minute</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
s	Sekunde
T	Gehalt an Acrylamid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
tif	<i>Tagged image file</i>
ToF	<i>Time of flight</i>
Tris	Trizma Base
t/a	Tonnen pro Jahr
V	Volt
WT	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 (Wildtyp)

## 1 Einleitung

Der Begriff „Proteom“, der 1994 von Marc Wilkins bei einer der legendären 2D Elektrophorese Tagungen in Siena/Italien als Analogie zum „Genom“ (bzw. zur Genomforschung) geprägt wurde [1, 2], ist heute aus der biologischen Grundlagenforschung nicht mehr wegzudenken. Die Proteomanalyse ist mittlerweile eine eigene Forschungsdisziplin mit weltweit etablierten Proteomikzentren, die unter Verwendung unterschiedlichster Analysetechniken bzw. -technologien zur Identifizierung und Quantifizierung aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen in einer Zelle, einem Organismus oder biologischen Flüssigkeiten exprimiert sind, angewandt wird.

Das Proteom ist im Gegensatz zum Genom hochdynamisch, d.h., eine sich stetig verändernde „Gesamtheit“. Nicht alle Proteine einer Zelle sind zur gleichen Zeit exprimiert, sondern sind je nach Bedarf unterschiedlich hoch- oder herunterreguliert; sie decken einen enormen Konzentrationsbereich von weniger als 10 bis  $10^8$  Molekülen/Zelle ab, können posttranslational (z.B. durch limitierte Proteolyse, Anhängen von Zucker-, Phosphat- oder anderen Gruppen) modifiziert sein, und dadurch zusätzlich unterschiedlichste, z.T. temporäre- Funktionen ausüben. Proteine spiegeln das aktuelle Zellgeschehen wider und können z.B. bei der vergleichenden Proteomanalyse potentielle Biomarker darstellen. Proteine arbeiten in Netzwerken, deren systematische Erforschung in der Systembiologie angestrebt wird.

Mit Einführung der hochauflösenden 2D Elektrophorese (2DE) durch O’Farrell im Jahr 1975 [3] zur Analyse komplexer Proteingemische wurde die Grundlage der klassischen Proteomanalyse gelegt. Der Ansatz, eine systematische Analyse aller Proteine und deren Kartierung, insbesondere der menschlichen Proteine (Human Protein Index), durch Verwendung der 2D Elektrophorese durchzuführen, wurde bereits Anfang der 1980er Jahren diskutiert [4-7]. Allerdings konnte erst durch die Entwicklung der 2D Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Dalt) durch Görg *et al.* [8], die für die Kartierung erforderliche Reproduzierbarkeit und Auflösung erzielt werden. Die 2DE mit IPG’s nach Görg [9-16] wurde zur weltweiten Standardmethode für die gelbasierende Proteomanalytik.

Ein weiterer entscheidender Schritt in der Proteomanalytik war die in den 1980er Jahren entwickelte Massenspektrometrie zur Analyse von Proteinen und Peptiden. Mit der „Matrix-assisted-laser-desorption/ionisation“ (MALDI) [17, 18] und der „Electrospray-ionisation (ESI) [19] Technologie gelang es erstmals, Proteine und Peptide massenspektrometrisch zu analysieren, ohne diese zu zerstören. John Fenn sowie K. Tanaka wurden hierfür mit Nobelpreisen ausgezeichnet. Ab diesem Zeitpunkt war es möglich, komplexe Proteingemische durch Kombination von 2D Elektrophorese und Massenspektrometrie aufzutrennen, nachzuweisen und zu identifizieren.

Die ständig wachsenden Referenzdaten aus den Sequenzdatenbanken der Genomforschung tragen dazu bei, um eine schnelle Hochdurchsatzanalyse mittels MALDI-MS zu ermöglichen. Weitere Technolo-

gien für die Proteomanalytik, die größtenteils komplementär zur klassischen gelbasierenden Proteomanalyse sind, wurden entwickelt bzw. befinden sich in Entwicklung. Die hochautomatisierte Analyse in Analogie zu den automatischen Sequenzierungsapparaturen der Genomforschung ist allerdings noch nicht in Sicht, bzw. auch unwahrscheinlich, angesichts der Komplexität und Vielfalt der Proteine, Protein-Proteininteraktionen und letztlich des gesamten „Proteinuniversums“.

Obwohl das Hauptanwendungsgebiet der Proteomanalyse ganz klar im Feld der biologischen und medizinisch-pharmazeutischen Grundlagenforschung liegt, beispielsweise zur Aufklärung der molekularen Mechanismen die zellulären Prozessen zugrunde liegen, zur Analyse von Protein-Netzwerken, zum Auffinden von Proteinbiomarkern zur Frühdiagnostik bestimmter Erkrankungen wie z.B. Krebs oder Diabetes, oder zur Identifizierung von Zielproteinen (Targets) für die Entwicklung hochspezifischer Arzneimittel, stellt auch die industrielle Biotechnologie ein wichtiges Forschungs- und Anwendungsgebiet für die unterschiedlichsten „-omics“-Technologien (Genomics, Transkriptomik, Proteomik, Metabolomik, Fluxomik) dar, welche heutzutage verstärkt zur zielgerichteten Optimierung von Produktionsstämmen eingesetzt werden. Die kombinierte Analyse des Proteoms und Metaboloms kann beispielsweise zur Identifikation metabolischer „Flaschenhälse“ (Engpässe), zur Steigerung der Ausbeute von Fermentationsprozessen durch Optimierung der Fermentationsparameter oder zur gezielten Verbesserung der Syntheseleistungen biologischer Systeme durch „Protein design“ und „Metabolic engineering“ eingesetzt werden. Die Entwicklung leistungsfähigerer Produktionsstämmen für wirtschaftlich bedeutende Metabolite (z.B. Aminosäuren) durch ein gezieltes Eingreifen in Stoffwechselwege setzt jedoch die detaillierte Analyse von Stoffwechselwegen und deren Regulation, sowie die Kenntnis der daran beteiligten Proteine/Enzyme voraus. Die Entwicklung der oben erwähnten „-omics“ Methoden hat dazu beigetragen, dass die Forschung auf diesem Gebiet in den letzten Jahren stark an Dynamik gewonnen hat.

Einer der wichtigsten biotechnologisch eingesetzten Mikroorganismen ist das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum*, das seit seiner Entdeckung in den 1950er Jahren eine herausragende industrielle Bedeutung auf Grund seiner Fähigkeit zur Produktion großer Mengen an Aminosäuren wie z.B. L-Glutamat und L-Lysin erlangt hat. Neben seiner Bedeutung für die Biotechnologie erwies sich *C. glutamicum* aufgrund seiner geringen Genomgröße und Apathogenität außerdem als idealer Organismus für die funktionelle Genomforschung bei mykolsäurehaltigen Actinomyceten, zu welchen auch pathogene Vertreter wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Corynebacterium diphtheriae* gehören. *C. glutamicum* stellt als nicht-pathogener Vertreter dieser Gruppe, einen exzellenten Modellorganismus für die klinische Forschung, als auch für die Biotechnologie dar.

## 2 Aufgabenstellung

Da es sich bei *Corynebacterium glutamicum* um einen sehr wichtigen L-Lysin und L-Glutamat Produzenten (mehr als 1,8 Millionen Tonnen Glutamat pro Jahr) handelt, sind genetisch verbesserte Produktionsstämme zur Steigerung der Ausbeute bei der biotechnologischen Gewinnung von Aminosäuren im großtechnischen Maßstab von erheblichem wirtschaftlichen Interesse. Obwohl bei *C. glutamicum* bereits zahlreiche Untersuchungen auf der Genomebene durchgeführt wurden, sind für ein verbessertes Verständnis der Stoffwechselwege zur Produktionssteigerung grundlegende Daten aus allen „-omics“ Technologien (Genom, Transkriptom, Proteom und Metabolom) erforderlich. In diesem Zusammenhang stellt insbesondere die Proteomanalyse Methoden und Werkzeuge für die verschiedensten Fragestellungen zur Verfügung:

- Zur Grundlagenforschung des *Corynebacterium glutamicum* Proteoms. z.B. unter welchen Umwelt- und Wachstumsbedingungen sind welche Proteine wie reguliert? Unterschiede zwischen Wildtypstamm und Produktionsstamm etc.
- Erhöhung der Ausbeute von Produktionsstämmen durch besseres Verständnis der auf der Proteinebene ablaufenden Prozesse und der gegenseitigen Beziehung/Regulation der Proteine.
- *Corynebacterium glutamicum* dient als Modellorganismus für viele grampositive Bakterien mit einem hohen G+C-Gehalt. Die hier erhaltenen Ergebnisse könnten auch bei diesen Organismen zur Beantwortung unterschiedlichster Fragestellungen dienen und zu einem besseren Verständnis biologischer Mechanismen in den nahe verwandten humanpathogenen Organismen *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* und den pflanzenpathogenen Vertretern *Corynebacterium sepeidonicum* und *Corynebacterium fascians* beitragen.

**Ziel** der vorliegenden Arbeit im Rahmen eines BMBF Proteom-Forschungsprojektes (Teilprojekt 7 des Verbundprojekts: „Neue Methoden zur Proteomanalyse: Anwendung und Verknüpfung mit Metabolomanalysen am Beispiel von *Corynebacterium glutamicum*) war die Optimierung der 2D Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG's) zur Analyse des Gesamtproteoms von *Corynebacterium glutamicum* zum Nachweis möglichst aller Proteine über den gesamten pH-Bereich von 2.5-12 mit maximaler Auflösung, Nachweisempfindlichkeit und Reproduzierbarkeit für die qualitative und quantitative Analyse aller (d.h. Proteinkartierung) bzw. differentiell exprimierter Proteine in Abhängigkeit genetischer und physiologischer Bedingungen.

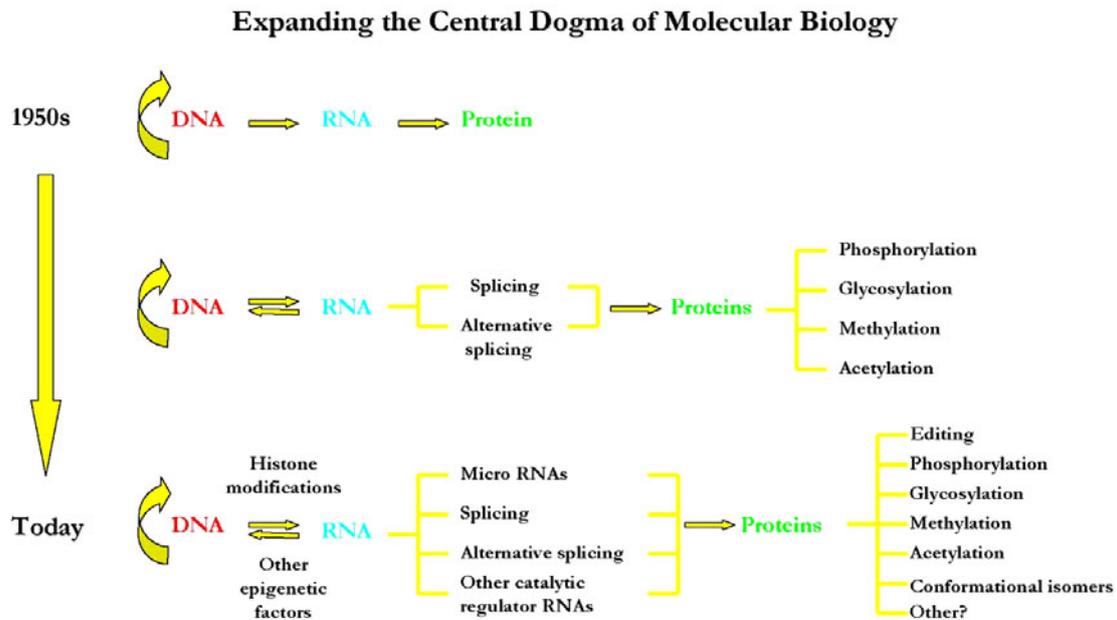
Im Einzelnen sollten zur Erlangung einer optimalen Auflösung enge, überlappende, immobilisierte pH-Gradienten für die 2D Elektrophorese generiert, die Trennbedingungen für stark basische ( $> \text{pH } 10$ ) Proteine optimiert und der Nachweis gering exprimierter („low abundance“) Proteine durch entsprechende Anreicherungs- bzw. Vorfraktionierungsverfahren in Kombination mit hochauflösenden ultraengen pH-Gradienten ermöglicht werden. Protokolle/Detergenzien für die maximale Solubilisierung aller Proteine, einschließlich hydrophober Proteine sollten geprüft und gegebenenfalls angewendet werden. Mit diesem breit angelegten Ansatz sollten Strategien und Techniken entwickelt werden, die eine wesentlich detailliertere Untersuchung des *C. glutamicum* Proteoms als bisher ermöglichen. Unter anderem diene ein Wachstumsvergleich von *C. glutamicum* in Glucose- bzw. Acetatmedium als Anwendungsbeispiel für die genannten Optimierungen.

### 3 Proteomik – Kenntnisse und Stand der Technik

#### 3.1 Proteomik

Eines der größten wissenschaftlichen Forschungsprojekte ging mit der Sequenzierung des menschlichen Erbgutes, u.a. durch Craig Venter *et. al.* [20, 21] erfolgreich zu Ende. Ziel des Vorhabens war es, die auf 25000 geschätzte Anzahl von menschlichen Genen mit seinen circa 3 Milliarden Basenpaaren, komplett durchzusequenzieren. Mittlerweile wurden durch die Entwicklung schneller automatisierter Sequenzierungsgeräte beinahe fast täglich Genome einfacher Organismen, wie Bakterien (*Escherichia coli*, *C. glutamicum*) oder Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) als Eukaryontenvertreter, aber auch komplexere Genome wie von *Arabidopsis*, Reis, etc. komplett sequenziert.

Im Laufe der letzten Jahre wurde man sich jedoch zusehends darüber klar, dass Informationen auf der Genomebene allein nicht für alle Fragestellungen der Biologie und Medizin ausreichend sind. Die Erbinformation der Lebewesen in Form von Genen stellt einen statischen Zustand für die Zelle oder den Organismus dar. Sie verändert sich nur dann, wenn die DNS durch äußere Einflüsse, wie z.B. durch Strahlung oder Chemikalien, mutiert. Die translatierten Genprodukte, also die Proteine, bilden die dynamische Zusammensetzung der Zellen, die den physiologischen Zustand widerspiegeln. Wenn man zugrunde legt, dass, wie in Abbildung 3-1 dargestellt, nicht immer ein einzelnes Gen ein Protein codiert, sondern ein Gen auch mehrere Proteine codieren kann, oder mehrere Gene dieselben Proteine codieren können und zudem noch komplexere Konstellationen möglich sind, ist es fast unmöglich, nur aus der Geninformation eine Aussage über den Zustand der Proteine zu treffen. Berücksichtigt man auch die möglichen Veränderungen an Proteinen nach der Translation, ist die Komplexität auf Proteinebene in einer Zelle kaum vorstellbar. Auch Umwelteinflüsse, die auf jeden Organismus unterschiedlich einwirken können spielen dabei eine wichtige Rolle. Daher ist es notwendig, den Organismus auf der Proteinebene zu analysieren, um Wechselwirkungen und Stoffwechselforgänge charakterisieren zu können. Die Zahl der Proteine, die es zu analysieren gilt, ist weit größer als zunächst angenommen. Das „Dogma“, dass ein Gen ein Protein codiert, wurde ersetzt durch die Erkenntnis, dass bei Eukaryoten etwa 10 Proteine pro Gen zu erwarten sind (vgl. Abb. 3-1). Das bedeutet für die rund 25000 codierenden Gene des Menschen eine theoretische Gesamtzahl von mehr als 250000 Proteinen. Die Zahl der Proteine ist im übrigen nicht identisch mit der primär abgelesenen genetischen Information, dem Transkriptom. Durch das Zusammenwirken verschiedener Gene und des unterschiedlichen Zusammensetzens der Exons nach Entfernen der Introns (Spleissen) sowie der zahlreichen epigenetischen Einflüsse entstehen weit mehr Proteine als zunächst angenommen. Hinzu kommen eine Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen (PTMs), die weder aus dem Genom noch aus dem Transkriptom vorherzusehen sind.

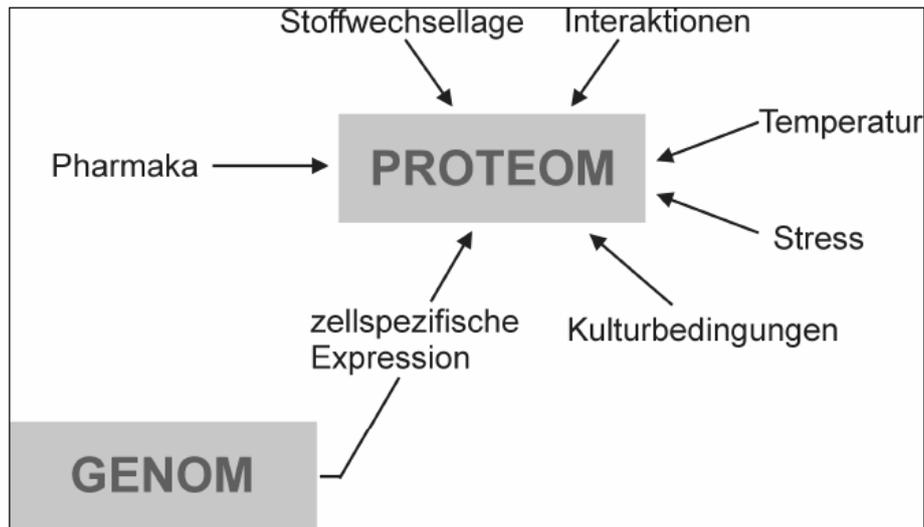


**Abbildung 3-1: Komplexität des Gen-Protein Verhältnisses**

Das Schema spiegelt die potentielle Zahl der Proteine wider.

Als Marc Wilkins 1994 den Begriff „Proteom“ als Pendant zum „Genom“ einführte, hatte er eine neue, einprägsame Bezeichnung für die aufstrebende Proteinanalytik kreiert, die noch weitere Wortschöpfungen wie Transkriptomics, Metabolomics, Glycomics etc. zur Folge hatte. Mit der Proteomanalytik, die nicht nur einzelne Proteine, sondern vornehmlich die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen in einer Zelle oder einem Organismus exprimiert sind, erfasst, hat die Wissenschaft unter Verwendung unterschiedlichster Technologien sich zum Ziel gesetzt, das statische Abbild des Genoms durch die dynamischen Regulationsnetzwerke der Proteine zu ergänzen und zu erklären.

Die physiologischen Vorgänge und die phänotypischen Veränderungen, die Lebewesen während ihres Daseins erfahren, sind, obwohl durch die Umwelt beeinflussbar, in den Genen codiert. Sie werden aber von Proteinen organisiert und durchgeführt, wobei zu verschiedenen Stadien des Zellzyklus unterschiedliche Proteine zum Einsatz kommen. Darüber hinaus kann sich ein Proteom durch Einflüsse von außen verändern. Solche Einflüsse können z.B. Temperatur, Stress, Kulturbedingungen (bei Zellkulturen) oder auch Medikamente sein (Abb. 3-2).



**Abbildung 3-2: Genom – Proteom**

Das statische Genom im Vergleich zum dynamischen Proteom, welches den aktuellen Zustand einer Zelle widerspiegelt

Ein typisches Beispiel zur Veränderlichkeit des Proteoms ist die Verwandlung einer Raupe in einen Schmetterling. In Abbildung 3-3 ist rechts ein Schmetterling, ein Exemplar der Spezies Segelfalter, abgebildet. Das Bild links zeigt eine Raupe derselben Art. Diese zwei Erscheinungsformen sind phänotypisch sehr unterschiedlich, obwohl sie das gleiche Genom besitzen. Das Proteom bestimmt das Aussehen und die Form.



**Abbildung 3-3: Gleiches Genom - unterschiedliche Proteome**

Raupe und Schmetterling der Spezies Segelfalter: ein Genom, unterschiedliche Proteome (Quelle: Corel Draw)

Die Proteomanalyse beschäftigt sich mit den quantitativ ermittelten Proteinmustern eines Organismus, einer Zelle oder eines Organells zu bestimmten Zeitpunkten und unter exakt definierten Randbedingungen. Neben der kompletten Analyse von bestimmten Proteomen zur Kartierung aller Proteine dient die differentielle Proteomanalyse zum Nachweis genetischer oder physiologischer Unterschiede und zur Detektion potentieller Biomarker. Man kann zum Beispiel Gewebe von gesunden Personen mit Gewebe von Patienten, bzw. Zellen zu unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus, oder auch verschiedene Stämme eines Organismus miteinander vergleichen. Unterschiedliche Proteinmuster stellen sich z.B. in der 2DE in Form von Intensitäts- oder Positionsveränderungen von Proteinspots dar. Diese Unterschiede in den Proteinmustern können auf unterschiedlich aktivierte Proteine hindeuten, denen wiederum wichtige Aufgaben zugeteilt sein könnten. Sie sind entweder an diesen Veränderungen beteiligt, als Ergebnis dieser Veränderungen entstanden oder abgebaut worden. Solche Proteine sind in der medizinischen Forschung und Diagnostik von sehr großem Interesse, da man hier mittels Proteomanalyse Aufschluss über die Intensität und das Fortschreiten von Krankheitsstadien erhält, oder Vergleiche von krankem und gesundem Gewebe durchführen kann. Durch die gezielte Suche nach solchen Proteinen, auch „Target-Proteine“ oder „potentielle Biomarker“ genannt, die mit einem speziellen Zustand assoziiert sind, erhofft sich die Forschung Hilfe für die Diagnose, Prognose und die Therapie von Krankheiten. Auch die pharmazeutische Forschung kann mit Hilfe von Proteomanalysen Wirkstoffe wie Toxine oder Zytostatika testen oder den Wirkungsmechanismus neuer Antibiotika auf pathogene Organismen besser vorhersagen. Als weiteres Forschungsgebiet ist hier u. a. die industrielle Biotechnologie zu nennen, bei der die Ausbeute von Fermentationsprozessen durch proteombasierte, optimierte Fermentationsparameter gesteigert werden kann.

Zusätzliche Variabilität und Vielfalt bringen die co- bzw. posttranslationalen Modifikationen (PTM) der Proteine mit sich (Abb. 3-4). Mögliche Modifikationen sind unter anderem Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen oder Verknüpfungen mit Kohlenhydraten oder Lipiden. Solche Modifikationen an den Proteinen spielen bei den dynamischen Prozessen auf Proteinebene eine Schlüsselrolle und haben auf die Funktionen und Eigenschaften eines Proteins einen erheblichen Einfluss. Die Erforschung der verschiedenen PTM's und deren Auswirkungen sind nur mit der Proteomanalyse eindeutig zu erforschen und zu erklären.

Auch wenn „Proteomics“ noch eher ein Konzept ist als eine ausgefeilte Technik, zeichnen sich prinzipiell geeignete Verfahren ab. Das gesamte Proteom kann durch verschiedene Methoden erfasst werden; die klassische ist die zweidimensionale Elektrophorese in Kombination mit hochempfindlicher Massenspektrometrie und entsprechenden Datenbanken. Unter dem Begriff „Elektrophorese“ versteht

man Trenntechniken, die die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld ausnutzen. Die elektrophoretische Mobilität, das heißt die Wanderungsgeschwindigkeit, ist dabei direkt proportional zur Nettoladung der Teilchen und zur angelegten Feldstärke, sowie umgekehrt proportional zur Reibung im umgebenden Medium. Die pK-Werte der geladenen Gruppen und die Molekülgröße, sowie die Art, Konzentration und pH-Wert des Puffers, Temperatur, Feldstärke und Beschaffenheit des Trägermaterials beeinflussen die Wanderungsgeschwindigkeit maßgeblich.

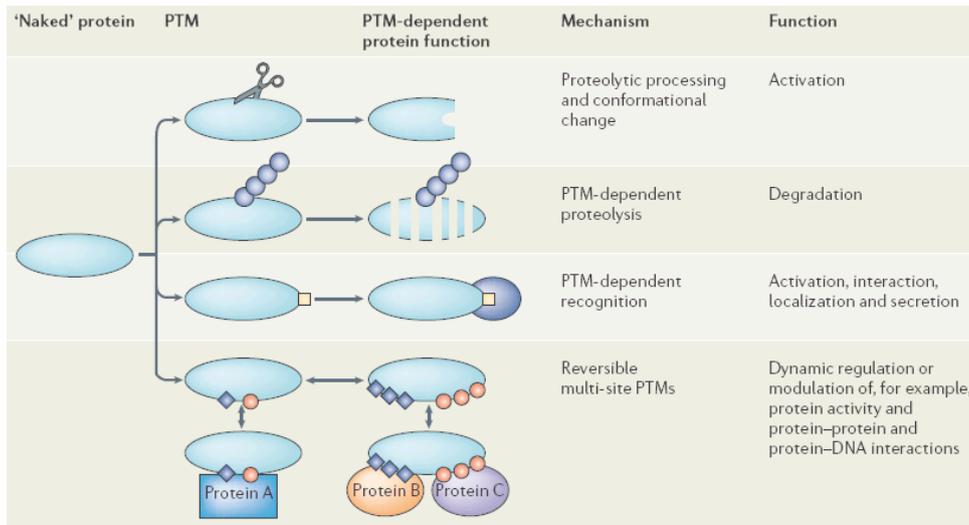
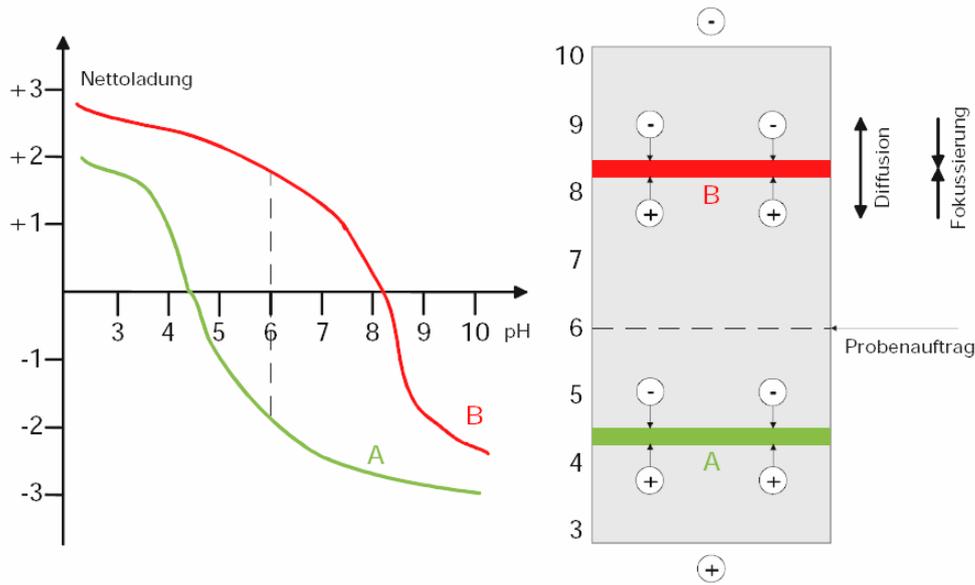


Figure 2 | **Mechanism of action of post-translational modifications.** Post-translational modifications (PTMs) can function in various ways. Proteolytic processing leads to activation by cleavage at distinct sites in a protein. In addition, PTMs might serve as the 'kiss of death' to tag proteins for destruction — for example, the polyubiquitylation-mediated degradation of proteins. Alternatively, a PTM might induce conformational changes or form a docking site to mediate molecular recognition and stabilize protein-ligand and protein-protein interactions. PTMs are also involved in the sequestration of proteins to cellular organelles and macromolecular structures. PTMs are often transient, which provides a way to rapidly and dynamically regulate protein activities, the assembly-disassembly of macromolecular complexes and the translocation of proteins between cellular compartments.

**Abbildung 3-4: Post-Translationale Modifikationen (PTMs) von Proteinen und deren Wirkungsweise [22]**

Wichtig für die heutzutage verwendete 2DE Technik war die in den 60iger Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelte isoelektrische Fokussierung (IEF) [23, 24], die durch den Einsatz von Trägerampholyten möglich wurde. Dabei wird durch von Verwendung von niedermolekularen, zwitterionischen Trägerampholyten ein pH-Gradient im Gel etabliert, in dem die Proteine bis zu dem pH Wert wandern, der ihrem isoelektrischen Punkt (pI) entspricht (Nettoladung gleich Null) (Abb. 3-5). Da die elektrophoretische Mobilität der Proteine von ihrer Ladung abhängt, beträgt am pI die Mobilität null, d.h. das Protein bewegt sich nicht mehr. Der isoelektrische Punkt ist proteinspezifisch und hängt von der Zahl basischer und saurer Aminosäuren ab.

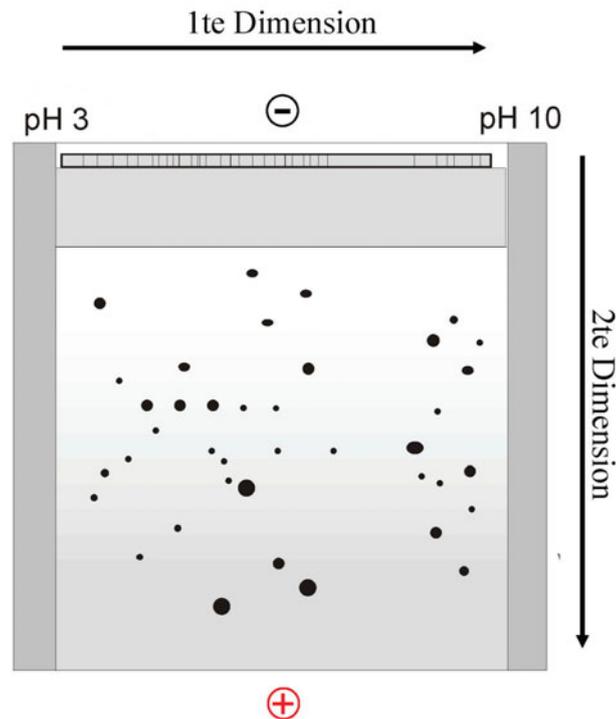


**Abbildung 3-5: Prinzip der isoelektrischen Fokussierung (IEF)**

Die schematische Darstellung zeigt zwei verschiedenen Proteine (A und B) mit unterschiedlichen iso-elektrischen Punkten ( $pI = 4.4$  bzw.  $8.3$ ) und deren Ladungsverhältnisse während ihrer Wanderung im elektrischen Feld entlang des pH-Gradienten.

Fast zeitgleich wurde die Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS) [25] zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen eingeführt. Dabei wird Natriumdodecylsulfat (SDS), ein anionisches Detergens, benutzt, um die Eigenladung der Proteine zu überlagern. Es bilden sich ab einer bestimmten SDS-Konzentration Micellen aus, wobei sich die Proteine im Inneren dieser Micellen befinden. Nach außen sind nur die negativen Ladungen der SDS-Moleküle zu sehen, wodurch eine Aggregation der Proteine verhindert wird. Durch die Anlagerung von SDS entstehen gestreckte Moleküle, was eine effektive Trennung der Proteine nach ihrer Größe ermöglicht. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die mit negativer Ladung ummantelten Proteine zur Anode. In einem bestimmten Größenbereich ergibt sich fast lineare Abhängigkeit des Logarithmus der Molekulargewichte und der zurückgelegten Strecke der Moleküle. Dadurch ist es möglich, diese Gele mit Proteinstandards zu kalibrieren [26, 27].

Durch Kombination beider Trenntechniken, der isoelektrischen Fokussierung mit Trägerampholyten unter Zusatz von Detergenzien und Harnstoff und der SDS-Elektrophorese, gelang es O'Farrell erstmalig, eine *hochauflösende* 2D Elektrophorese durchzuführen. Sie wurde zur Grundlage der heutigen 2D Elektrophorese zur Auftrennung komplexer Proteingemische [3] (Abb. 3-6).



**Abbildung 3-6: Prinzip der 2D-Elektrophorese**

Die Proteine werden nach zwei unterschiedlichen Parametern getrennt: 1. Dimension (IEF) nach isoelektrischen Punkten (pI); 2. Dimension (SDS-PAGE) nach Molmasse (Mr)

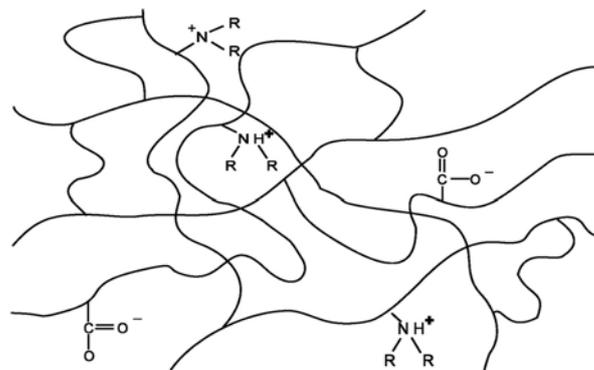
Die Verwendung von Trägerampholyten begrenzte jedoch das Potential der 2D Elektrophorese für die Proteomanalytik, denn das Profil des mit Trägerampholyten generierten pH-Gradienten ist abhängig von der Fokussierungszeit und der Produktionscharge. Des Weiteren bildet sich mit fortschreitender Fokussierungszeit ein pH Plateau aus, d.h. durch Abwanderung der alkalischen Trägerampholyte zur Kathode flacht der pH-Gradient in der Mitte ab (d.h. er verliert seine Linearität), und basische Proteine gehen durch die sog. Kathodendrift verloren. Der mit Trägerampholyten gebildete pH-Gradient übersteigt letztlich nicht den pH Wert von 7,5. Aus diesen Gründen führte O'Farrell zur Trennung basischer Proteine die „non equilibrium pH-Gradient gel electrophoresis“ (NEPHGE [28]) ein, die nur kurze Fokussierungszeiten verwendet und damit auf die Fokussierung bis zum Gleichgewicht (d.h. bis zum Erreichen eines konstanten Proteinmusters) verzichtet.

Um die Nachteile der Trägerampholytfokussierung und der dadurch bedingten mangelnden Reproduzierbarkeit der 2DE Muster zu beheben, wurde das Konzept der immobilisierten pH-Gradienten (IPG) 1982 [29] eingeführt und die 2D Elektrophorese mit IPGs entwickelt [8]. Die von Görg *et al.* [8] etablierte 2D Elektrophorese mit IPGs wurde fortlaufend optimiert [9-15] und ist heute Standardmethode der gelbasierenden Proteomanalytik.

### 3.2 2DE mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Dalt)

Die 2D Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Dalt) nach Görg et al. [8-10, 12-14], ist bis *dato* die Grundlage der klassischen, gelbasierenden Proteomanalytik. Diese Technik beruht auf der Verwendung von Immobilinen<sup>TM</sup> [29], einem Patent der damaligen Firma LKB Schweden. Es handelt sich hierbei um Acrylamid-Derivate, die neben der reaktiven C=C Doppelbindung eine puffernde Gruppe, z.B. eine Carboxyl- oder eine tertiäre Aminogruppe tragen (Abb. 3-7). Die Immobiline werden nach Etablierung eines pH-Gradienten während des Gießvorgangs des Gels in die Acrylamidmatrix mit einpolymerisiert (Abb. 3-7), somit ist der pH-Gradient fest verankert und unabhängig von der Fokussierungszeit, d.h. sprichwörtlich „immobilisiert“.

pK	Formula	Name	$M_r$
1.2	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	2-Acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid	207
3.1	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{OH}$	2-Acrylamido-glycolic acid	145
3.6	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	<i>N</i> -Acryloyl-glycine	129
4.6	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$	4-Acrylamido-butyric acid	157
6.2	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	2-Morpholino ethylacrylamide	184
7.0	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	3-Morpholino propylacrylamide	199
8.5	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	<i>N,N</i> -Dimethyl aminoethyl acrylamide	142
9.3	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	<i>N,N</i> -Dimethyl aminopropyl acrylamide	156
10.3	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	<i>N,N</i> -Diethyl aminopropyl acrylamide	184
>12	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	<i>N,N,N</i> -Triethyl aminoethyl acrylamide	198

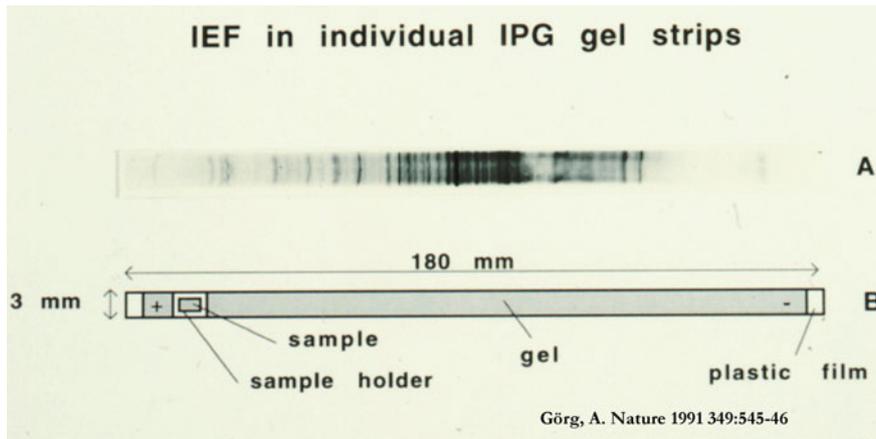


**Abbildung 3-7: Struktur der Immobiline [30] und deren Vernetzung in der Acryl-amidmatrix zur Formung eines zeitstabilen, immobilisierten pH-Gradienten (IPG)**

Zur Zeit sind zehn verschiedene Immobiline-Spezies zwischen pK 1 und 13 erhältlich (Abb. 3-7). Diese reichen aus, um nahezu jeden beliebigen IPG zwischen pH 2.5 und pH 12 zu generieren. Um den gewünschten pH-Wert zu erhalten, wird das Mischungsverhältnis der verwendeten Immobiline durch Anwendung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet, entsprechend dem Prinzip einer Säure-Base-Titration. Der pH-Gradient entsteht dann durch die kontinuierliche Veränderung des Immobilin-Mischungsverhältnisses während des Gießens der Gele mit dem Gradientenmischer [29]. Für komplexe pH-Gradienten erfolgt die Berechnung mit Hilfe von speziellen Computerprogrammen [31-33].

Die Gießtechnik für IPGs und die Herstellung der auf Plastikfolie polymerisierten IPG-Streifen (Abb 3-8) wurden von Görg *et al.*[8] entwickelt und von LKB (Schweden) in Produktion genommen. Heute

werden die IPG-Streifen mit unterschiedlichsten pH-Gradienten und Trenndistanzen von mehreren Firmen (GE Healthcare, Bio-Rad, Serva) produziert.



**Abbildung 3-8: Geometrie des IPG Gel Streifens**

Erhöhte Reproduzierbarkeit der IEF mit IPGs: (i) Dimensionsstabilität durch Trägerfolie (ii) Zeit- und (iii) Produktionschargen-unabhängiger pH-Gradient [34]

### 3.3 Entwicklung maßgeschneiderter IPGs

Das perfekte 2DE-Gelsystem sollte eine robuste, wenig störanfällige Methode zur Analyse eines größtmöglichen  $pI$ - und  $M_r$ -Bereichs sein, idealerweise mit einer maßgeschneiderten IPG-Dimension, die perfekt auf die Häufigkeitsverteilung der Proteine hinsichtlich ihrer  $pI$ 's abgestimmt ist. In den letzten Jahren wurde die 2DE Elektrophorese mit IPGs [8, 12] kontinuierlich verbessert. Beispielsweise wurden IPGs bis pH 12 entwickelt, die eine reproduzierbare Trennung von Proteinen mit  $pI$ s bis 11.7 ermöglichen und so den Nachweis basischer Proteine wesentlich erleichtern [11]. Analog wurden IPGs mit engen pH-Intervallen und verlängerter Trenndistanz entwickelt (z.B. 1 pH-Einheit über eine Trenndistanz von 24 cm), welche eine deutlich bessere Auflösung gestatten als die üblicherweise eingesetzten weiten pH 3-10 oder pH 4-7 Gradienten [8-10, 12-14, 35-38]. Ein zusätzlicher Nutzen dieses Ansatzes besteht darin, dass sich damit eine Kombination mit einer Protein-Vorfractionierungstechnik eine höhere Proteinbeladungskapazität erzielen lässt, und dadurch einen besseren Nachweis von niedrig abundanten Proteinen erlaubt.

Die Identifizierung aller in einem bestimmten Zelltyp exprimierten Proteine stellt aufgrund ihrer extremen Konzentrationsunterschiede ein erhebliches Problem dar. Proteomstudien haben gezeigt, dass die Mehrzahl der auf 2DE-Gelen identifizierten Proteine sogenannte "house-keeping"-Proteine sind. Diese Proteine kommen in Mengen von  $10^5$ - $10^6$  Molekülen pro Zelle vor, während z.B. Rezeptoren nur in Mengen von wenigen (10 bis max. 100) Kopien pro Zelle vorhanden sind. Bisher gelang es nur in Ausnahmefällen auf 2DE-Gelen Proteine mit einem Codon Bias-Wert  $< 0.2$  zu identifizieren, welcher als Grenzwert für geringe Abundanz definiert wurde [39]. Wenn man bedenkt, dass z.B. mehr als die Hälfte

te der über 6000 Genprodukte der Hefe *S. cerevisiae* einen Codon Bias Index  $< 0.2$  aufweisen, erscheint es unwahrscheinlich, dass alle *S. cerevisiae* Proteine ohne vorherige Anreicherung auf 2DE-Gelen sichtbar gemacht werden können. Nachweislich waren bei den bisherigen Untersuchungen des *S. cerevisiae* Proteoms durchschnittlich nur etwa 1000-1400 Spots im pH-Bereich zwischen 4-8 zu finden [39]. Diese Anzahl entspricht ca. 20%, der aus dem Hefegenom theoretisch zu erwartenden und etwa 30%, der unter den gegebenen Wachstums- und Umweltbedingungen exprimierten Proteine.

Ein Grund für die relativ geringe Anzahl nachweisbarer Proteine auf 2DE-Gelen sind Spots, die mehr als ein Protein enthalten. Dies tritt auf, wenn weite pH-Gradienten (z.B. pH 3-10) eingesetzt werden, um einen Überblick über das Proteom eines Organismus zu erhalten. Ein Lösungsansatz zur Verbesserung des Auflösungsvermögens besteht, wie bereits oben erwähnt, in der Verwendung überlappender IPG-Streifen mit verlängerter Trenndistanz, welche enge pH-Bereiche abdecken [36].

Eine zusätzliche Herausforderung für die Proteomanalyse ist die ungleichmäßige Häufigkeitsverteilung von Proteinen, bezüglich ihrer isoelektrischen Punkte und Molekulargewichte innerhalb eines Proteoms. Das kann nicht nur anhand der aus den Genomsequenzen theoretisch errechneten  $pI$ 's und  $Mr$ 's abgeleitet, sondern auch experimentell mittels 2D Elektrophorese bestätigt werden [36]. Mit Hilfe der IPG-Technologie ist es bei Einsatz entsprechender Computerprogramme [31-33] prinzipiell möglich, den Verlauf des pH-Gradienten in IPG-Streifen innerhalb gewisser Grenzen nahezu beliebig zu wählen. Infolgedessen bietet sich zur Erhöhung des Auflösungsvermögens die Verwendung maßgeschneiderter, idealerweise nichtlinearer IPGs an. Dabei sollte der Verlauf des pH-Gradienten so gestaltet werden, dass er der Häufigkeitsverteilung der Proteine optimal angepasst ist; d.h. Regionen mit einer großen Anzahl an Proteinen werden „gespreizt“, während Bereiche, in denen nur eine geringe Anzahl von Proteinen zu erwarten ist, „gestaucht“ werden. Verschiedene Softwareprogramme, die die Berechnung und Optimierung von nichtlinearen, konkaven und konvexen exponentiellen Gradienten ermöglichen, sind in der Literatur beschrieben und teilweise auch kommerziell erhältlich [31-33]. Die Hauptschwierigkeit liegt allerdings weniger in der Berechnung entsprechender Gradienten, als vielmehr im zeit- und arbeitsaufwändigen Austesten und Optimieren der Rezepturen.

Mit der IPG-Technologie steht eine hochadaptive Analysentechnik zur Auftrennung nahezu aller zu erwartender Proteine zur Verfügung.

### 3.4 Auftrennung, Detektion und Identifikation von basischen Proteinen

Die Notwendigkeit der Auftrennung basischer Proteine zeigt sich darin, dass über ein Drittel aller Proteine, z.B. von *Corynebacterium glutamicum*, isoelektrische Punkte  $> 7$  aufweisen. Bis vor kurzem war die 2D elektrophoretische Trennung stark alkalischer Proteine nur mit großen Einschränkungen möglich, da die vorhandene Technik, die sogenannte *Non-Equilibrium-pH-Gradient-Electrophoresis (NEPHGE)* [28]

keine Gleichgewichtsfokussierung darstellte und somit keine reproduzierbaren Trennungen zuließ. Erst die IPG Technologie ermöglichte die reproduzierbare Auftrennung stark basischer Proteine in echten „steady-state“ Fokussierungen [10, 11]. Durch Weiterentwicklung dieser Technik ist es heute möglich, relativ einfach zu handhabende IPG-Streifen mit weiten pH-Gradienten (z.B. IPG 3-12) [10, 35] für die Trennung basischer Proteine einzusetzen. Im Gegensatz dazu stellen enge, basische IPGs (z.B. IPG 6-12, 9-12 oder 10-12) weiterhin eine Herausforderung für die Routineanalytik dar. Auch in neueren Publikationen [40, 41] wird immer noch darauf hingewiesen, dass basische pH-Gradienten bzw. *zoom-in* Gradienten im basischen Bereich [35, 37] nicht zu den Standardfokussierungsmethoden zählen. Bei basischen pH-Gradienten gibt es mehrere Probleme zu bewältigen: Einerseits tritt das Phänomen des reversen elektro-endoosmotischen Wasserflusses in Richtung Anode auf, andererseits wandert DTT in Richtung Anode und kann somit im basischen Bereich nicht mehr als Reduktionsmittel dienen. In verschiedenen Publikationen wurden Lösungsansätze aufgezeigt, die die IEF im alkalischen Bereich verbessern bzw. vereinfachen sollten, z.B. durch Verwendung von N,N-dimethylacrylamid, Beimengen von Isopropanol, Carboxymethylcellulose und Glycerin [11], Ersetzen von DTT durch Tributylphosphin oder Hydroxyethyl-disulfid (*DeStreak<sup>TM</sup>*) [42, 43] und/oder die Erhöhung der Voltzahl bei der IEF, um eine kürzere Gesamtfokussierungszeit zu erzielen [11, 35]. Die IEF im basischen bzw. stark basischen Bereich bleibt eine Herausforderung, und es besteht immer noch die Möglichkeit bzw. die Notwendigkeit der Optimierung und Standardisierung.

### 3.5 Vorfraktionierungsverfahren

Mit Hilfe der in Kapitel 3.3 angesprochenen *zoom-in* pH-Gradienten kann die Auflösung der 2DE stark erhöht werden. Allerdings ist die Proteinbeladungskapazität von IPG-Streifen -bedingt durch den Aufbau der Fokussierungsapparatur- u.a. aufgrund des limitierten Probenauftragevolumens begrenzt. Mit Vorfraktionierungsmethoden wird versucht, diese Einschränkung zu umgehen [44, 45]. Eine von Görg *et al.* [46] entwickelte Vorfraktionierungsmethode mit dem Trennmateriale Sepharose (Sephadex<sup>TM</sup>) stellt eine schnelle, 2DE kompatible und kostengünstige Alternative zu teuren Vorfraktionierungsapparaturen (z.B. Rotofor) dar. Durch Vorfraktionierung ist es möglich, Proteine zu detektieren und zu analysieren, die nur in sehr geringen Mengen in Organismen vorkommen, so genannte „low-abundance Proteine“ (z.B. Rezeptorproteine). Diese Proteine spielen häufig eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion und bei Krankheitsprozessen. Die Bestrebungen zielen deshalb heutzutage darauf ab, möglichst viele von ihnen in der jeweiligen krankheitsbezogenen Fragestellung zu finden. Die Weiterentwicklung und Verbesserung von Analyseverfahren, insbesondere von Vorfraktionierungsmethoden, ist infolgedessen sehr wichtig, um ein Instrument zu erhalten, mit dem man alle Proteine erfassen kann, auch diejenigen, die sehr gering exprimiert sind.

### 3.6 Vorteile der Proteindetektion mit fluoreszierenden Farbstoffen

Zwar ist es durch Vorfraktionierung möglich, die so genannten low-abundance Proteine anzureichern, jedoch kommen sie auch nach der Anreicherung immer noch in sehr geringen Mengen in der Probe vor. Da andere Proteine in derselben Probe üblicherweise in viel höheren Konzentrationen vorliegen, benötigt man Detektionsverfahren, die einen großen linearen dynamischen Bereich aufweisen (idealerweise fünf Größenordnungen), damit man sowohl gering als auch stärker exprimierte Proteine detektieren und quantifizieren kann. Die oft verwendeten Färbemethoden wie z.B. Silber- oder Coomassie Blau-Färbungen sind hierfür nicht besonders geeignet. Silberfärbungen sind zwar sehr sensitiv (Nachweisgrenze  $< 1$  ng/Protein pro Spot), verfügen aber nur über einen relativ engen linearen dynamischen Bereich ( $< 1$  Größenordnung), so dass man bei größeren Proteinmengen schnell in den Sättigungsbereich gerät, weshalb quantitative Aussagen nur eingeschränkt möglich sind. Coomassie Blau-Färbungen verfügen über einen etwas größeren dynamischen Bereich (maximal 1,5 Größenordnungen), aber ihr Einsatzgebiet ist aufgrund ihrer geringeren Nachweisempfindlichkeit (max. 50 ng/Protein pro Spot) auf Gele mit hohen Proteinkonzentrationen beschränkt, z.B. für die Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie.

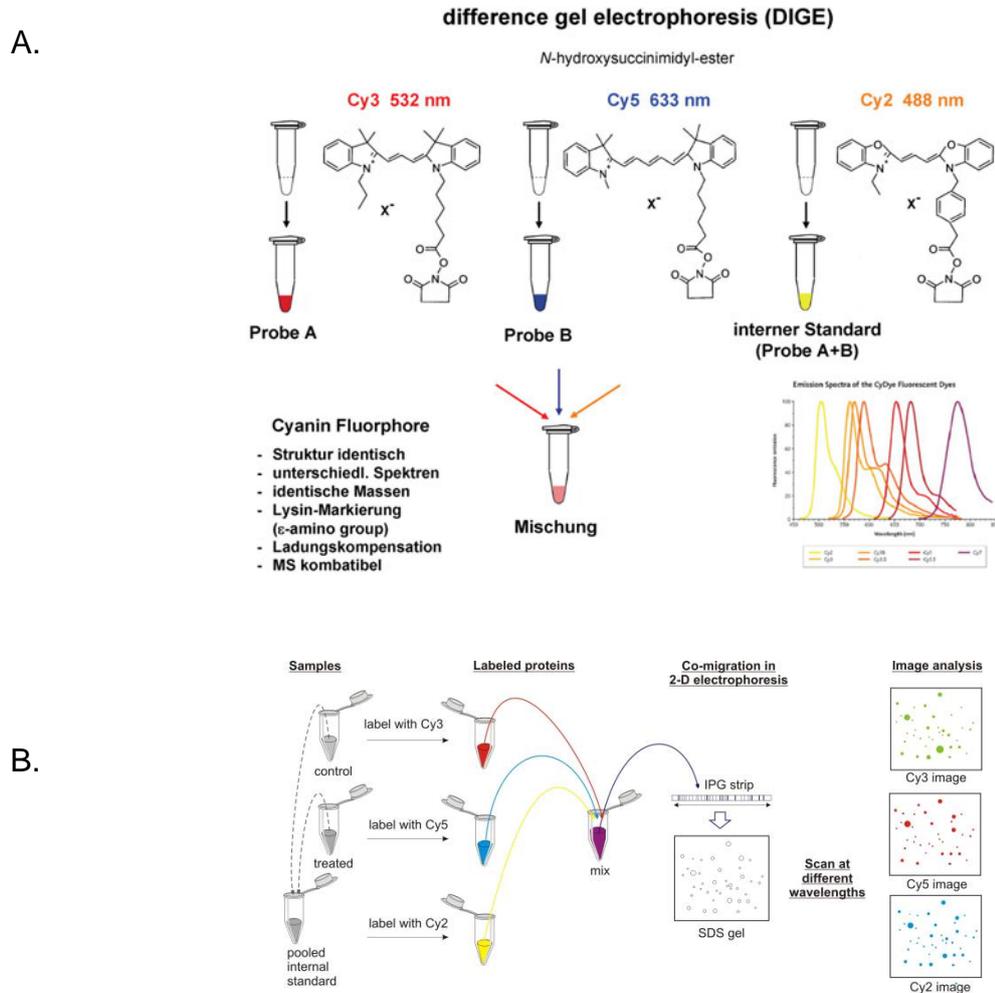
Detektionsverfahren mit fluoreszierenden Farbmolekülen bieten hier große Vorteile. Einerseits sind sie sehr sensitiv (Nachweisgrenze ca. 1 ng Protein / Spot), andererseits über einen großen Bereich (ca. 3-4 Größenordnungen) linear, d.h. sie erlauben die Detektion und Quantifizierung niedrig exprimierter Proteine auch in Gegenwart größerer Mengen anderer Proteine. Bei der Verwendung fluoreszierender Farbstoffe unterscheidet man prinzipiell zwei Methoden: a) das kovalente Anbinden der Fluorophore an die Proteine vor der elektrophoretischen Trennung (Proteinmarkierung) und b) das Anfärben der Proteine nach der elektrophoretischen Trennung; hierbei lagern sich die Farbmoleküle entweder durch Interaktion mit den SDS-Micellen oder direkt durch elektrostatische Bindungen an die Proteine an (Proteinfärbung). Eine weitverbreitete Proteinfärbung mit fluoreszierenden Farbmolekülen ist z.B. SYPRO RUBY™. Bei dieser Färbemethode kann man Proteinspots mit Konzentrationen von 1- 1000 ng detektieren und quantifizieren. Ein Beispiel für eine Proteinmarkierung sind die CyDyes™. Hierbei handelt es sich um cyaninbasierende Farbmoleküle, die sich an die Aminosäure Lysin kovalent binden. Diese auch DIGE genannte Färb- und Detektionsmethode wird im Kapitel 3.7 näher beschrieben.

Beide auf fluoreszierenden Farbstoffen beruhenden Techniken benötigen spezielle Scanner oder Digitalkameras zum Sichtbarmachen der Proteine im 2D Gel. Trotz der relativ hohen Kosten der Fluoreszenzfarbstoffe und der entsprechenden Fluorometer stellen sie zur Zeit die einzig sinnvolle Möglichkeit einer hochsensitiven Detektion und zuverlässigen Quantifizierung von Proteinen über einen großen linearen Konzentrations- und Messbereich dar.

### 3.7 Difference Gel Electrophoresis (DIGE)

Bei der differentiellen Proteomanalyse werden die Spotmuster zweier oder mehrerer unterschiedlicher Proben (z.B. gesund/krank oder gestresst/ungestresst) miteinander verglichen. Beim konventionellen 2DE Workflow werden die Proben auf individuellen 2D Gelen aufgetrennt, angefärbt, quantifiziert und die erhaltenen Spotmuster schließlich mit entsprechenden Image-Analyse-Programmen miteinander verglichen. Aufgrund der vielen Einzelschritte kann man die Spotmuster nicht immer perfekt überlagern, weshalb die Imageanalyse sehr zeitaufwändig sein kann. Zur Vereinfachung dieses arbeitsaufwändigen Verfahrens und zur Verbesserung der Spot-Quantifizierung wurde die DIGE-Technik entwickelt [47]. DIGE ist die Abkürzung für **D**ifference **G**el **E**lectrophoresis. Bei dieser Technik werden bis zu drei Proteinproben vor der elektrophoretischen Trennung *in einem einzigen Gel* mit fluoreszierenden Farbstoffen (Cy2, Cy3 bzw. Cy5) markiert. Da die Markierung an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins erfolgt, verfügen die CyDyes über eine positive Ladung, um den Verlust der positiven Ladung am Lysin zu kompensieren, und dadurch den pI des Proteins nicht zu verändern. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind einander strukturell ähnlich und weisen nahezu identische Massen auf, besitzen aber unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren, wodurch es möglich ist, die Proteine unterschiedlicher Proben *vor* der IEF zu markieren, und anschließend auf einem einzigen 2D Gel aufzutrennen (Abb. 3-9). Nach aufeinanderfolgender Anregung bei den unterschiedlichen Wellenlängen erhält man für jede Probe ein eigenes farbcodiertes Spotmuster. Im einfachsten Fall werden die erhaltenen Images anschließend im Computer übereinandergelegt und voneinander „subtrahiert“, so dass man die Unterschiede (d.h. differentiell regulierte Proteine) zwischen den einzelnen Proben aufgrund von Farbunterschieden direkt sichtbar machen kann. Infolge der Co-Migration der Proteine werden methodische Varianzen ausgeschaltet, was sich in einer erhöhten Reproduzierbarkeit und einer verlässlicheren Proteinquantifizierung (insbesondere bei Verwendung eines internen Standards, s.u.) sowie einer stark vereinfachten Image-Analyse niederschlägt.

Die am weitesten verbreitete Methode vergleicht zwei Proben unter Zuhilfenahme eines internen Standards (IPS) miteinander. Der IPS ist eine Mischung von gleichen Proteinmengen von miteinander zu vergleichenden Proben. Diese Mischung wird mit Cy2 markiert und die anderen Proben jeweils mit Cy3 bzw. Cy5. Bei jedem elektrophoretischen Lauf werden gleiche Mengen der Cy3 bzw. Cy5 markierten Probe inklusive des internen Standards miteinander aufgetrennt. Bei der am Ende der Analyse stattfindenden Bildauswertung werden die Proteinspots automatisch zum internen Standard normalisiert. Dadurch, dass der IPS in jedem Gel in gleicher Konzentration vorhanden ist, werden Gel-zu-Gel Variationen mit in die Normalisierung einbezogen. Somit ist es möglich, Proteinspots sehr präzise zu quantifizieren und zwei Proben mit statistischer Absicherung direkt zu vergleichen.



**Abbildung 3-9: Prinzip der zweidimensionalen *Fluorescence Difference Gel Electrophoresis* (2D DIGE) [47]**

A. Struktur/Eigenschaften der CyDye-Farbstoffe. B. DIGE-Versuchsaufbau

### 3.8 Massenspektrometrie (MS)

Die Entwicklung der sanften Ionisierungsarten (d.h. der Einsatz von massenspektrometrischen Verfahren für Biomoleküle) „electrospray-ionisation“ (ESI) Methode [19] und der „matrix-assisted laser desorption/ionisation“ (MALDI) Methode [17, 18] ermöglichten eine schnelle und zuverlässige Identifizierung bzw. Charakterisierung der Proteine in der Proteomanalyse.

Eine Reihe von Problemen, z.B. geringe Intensitäten und störende Fragmentierungen, die beim Ionisieren schwerflüchtiger organischer Substanzen auftraten, konnten Ende der 80er Jahre von Karas und Hillenkamp sowie Tanaka gelöst werden [17, 18]. Die Verwendung kleiner organischer Verbindungen, die bei der eingestrahlten Laserwellenlänge im UV-Bereich eine hohe Absorption zeigten, brachte den Durchbruch. Etwa zur gleichen Zeit wurde von Fenn *et al.* die „electrospray-ionisation“ (ESI) Methode

[19] entwickelt. Als Lohn für diese Arbeiten wurden 2002 J.B. Fenn and K. Tanaka mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Massenspektrometer detektieren Ionen im gasförmigen Zustand. Es erweist sich als schwierig, Biomoleküle, wie Proteine oder Peptide, in den gasförmigen Zustand zu bringen, ohne sie zu beschädigen. Bei der MALDI-Methode wird in saurer Lösung eine verhältnismäßig große Anzahl Matrixmoleküle mit einer viel kleineren Menge an Probe vermischt. Empfehlenswert ist ein  $10^3$ - $10^4$  facher Überschuss an Matrix zum Schutz der Analytmoleküle, andernfalls würden die Analyten durch das direkte Einwirken des Lasers zerstört. Als Matrices werden Verbindungen verwendet, die Lichtenergie absorbieren können (s.u.). Ein Teil der Lösung wird für die Messung auf einen Metallträger pipettiert. Die Matrix kristallisiert mit den Analytmolekülen aus, sobald sich das Lösungsmittel verflüchtigt hat. Die Matrixmoleküle nehmen die Energie des gepulsten Lasers auf, wenn diese auf einen Kristall trifft. Dabei wird die Energie oder ein Teil davon an die Analyten weitergegeben. Die Übertragung der Energie hat die Desorption und gleichzeitig die Ionisation der Analytmoleküle zur Folge. Es bilden sich einfach protonierte Ionen. Wie diese Ionisation zustande kommt ist noch unbekannt [17]. Als Laserquelle wird dabei meist ein Stickstoff-Laser mit einer Wellenlänge im ultravioletten Strahlungsbereich von 337 nm benutzt. Als typische Matrixsubstanzen werden beispielsweise eingesetzt: Bernsteinsäure, 2,5-Dihydrobenzoesäure (DHB), 3,5-Dimethoxy-4-hydroxycimtsäure (Sinapinsäure),  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure.

Eine MALDI-MS Analyse sieht in der Praxis folgendermaßen aus:

Die zu analysierende Probe wird mit der Matrix auf einem metallischen Probenhalter in einem Verhältnis von circa 1: 1000-10000 gemischt. Durch die Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zu einer Kokristallisation von Analyt und Matrix. Dabei wird das Analytmolekül in den Kristallverband der Matrix eingebettet. Entscheidend für das Funktionieren des nachfolgenden Prozesses ist dabei der Einbau der Probe in das Kristallgitter der Matrix. Als nächstes schießt man mit einem Laser einen wenige Nanosekunden dauernden Impuls auf die Probe, die sich im Vakuum des MS befindet. Ein Großteil der Laserenergie wird durch die Matrix absorbiert und es kommt zu einer Desorption einiger Schichten der Präparation aus Matrix und Analyt in die Gasphase. Die labilen Biomoleküle bleiben intakt, weil die Matrix dabei den Großteil der Energie absorbiert. Die Matrixmoleküle scheinen auch bei der Ionisation eine Rolle zu spielen, indem radikale Matrixmoleküle Protonen an die Analytmoleküle übertragen. In Abbildung 3-10 ist die MALDI Ionisation vereinfacht dargestellt.

Neben der Ionisation der Analyten ist die Massenanalyse der zweite wichtige Bestandteil in der Massenspektrometrie. Im Laufe der Zeit wurden drei unterschiedliche Techniken entwickelt. Eine der Methoden beruht auf dem Prinzip der Massentrennung nach der Flugzeit (time-of-flight, TOF-MS). Bei den anderen Methoden erfolgt die Trennung durch ein mit Metallstäben erzeugtes elektrisches

Quadrupolfeld („quadrupole MS“) oder durch selektive Ausstoßung von Ionen aus einem Feld, das eine dreidimensionale Falle darstellt („ion trap MS“). Mit der Messung einer Probe, die aus z. B. einem Peptidgemisch besteht, können mit einem dieser Massenanalysatoren die Massen der Peptide aus der Probe ermittelt werden. Durch eine Hintereinanderschaltung von zwei Massenanalysatoren kann eine gezielte Sequenzierung der Peptide erzielt werden. Dieses Verfahren wird als Tandem-MS bezeichnet und kann sowohl mit zwei gleichen Analysatoren als auch mit zwei unterschiedlichen Analysatoren hintereinandergeschaltet durchgeführt werden. Alle drei Analyserarten können mit MALDI als auch mit ESI als Ionenerzeugungsmethode gekoppelt werden. Es werden aber die Verknüpfungen MALDI mit einem TOF-Analysator bzw. ESI mit dem Quadrupol oder dem Ion-Trap-Analysator bevorzugt. Ein TOF-Analysator trennt die Ionen in einem Flugrohr. Alle Prozesse geschehen im Hochvakuum. Die desorbierten positiv geladenen Ionen werden zunächst durch eine Gegenelektrode angezogen. Diese Gegenelektrode, auch Grid (Gitter) genannt, bewirkt eine Beschleunigung der Ionen, bevor sie in das Flugrohr eintreten. Alle Ionen nehmen die gleiche kinetische Energie auf, bewegen sich aber aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. So treffen auf den Detektor zuerst kleine Ionen und zum Schluss erst die großen Ionen. Es gibt Geräte mit einfachem linearem Flugweg oder mit am Ende dieses Weges befindlichen Reflektoren, die die Ionen in eine andere Richtung lenken. Somit wird der Flugweg verlängert, und die Genauigkeit der Detektion verbessert. In Abbildung 3-11 ist ein Reflektron-TOF-Massenanalysator vereinfacht dargestellt.

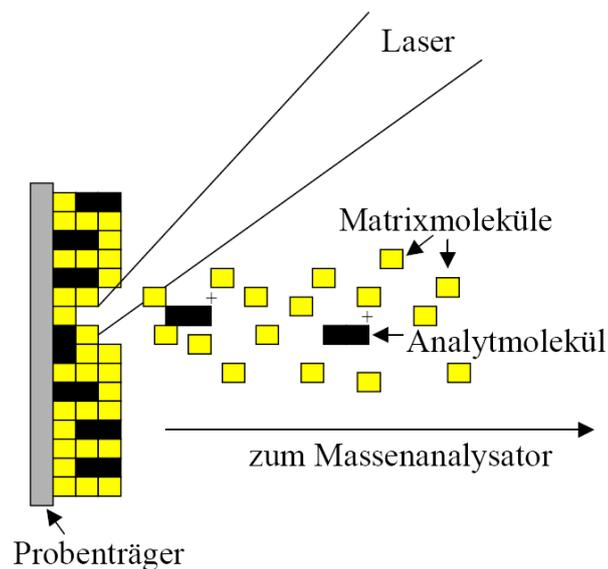


Abbildung 3-10: Prinzip der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) [17,18]

Zur Identifizierung eines Proteins wird in der Regel zuerst ein „peptide mass fingerprint“ (PMF) des Proteins aufgenommen. Die aus 2DE-Gelen zu analysierenden Proteinen werden zuerst enzymatisch oder chemisch in Peptide gespalten. So können die Peptide aus der SDS-Gelmatrix extrahiert werden. Es entsteht ein

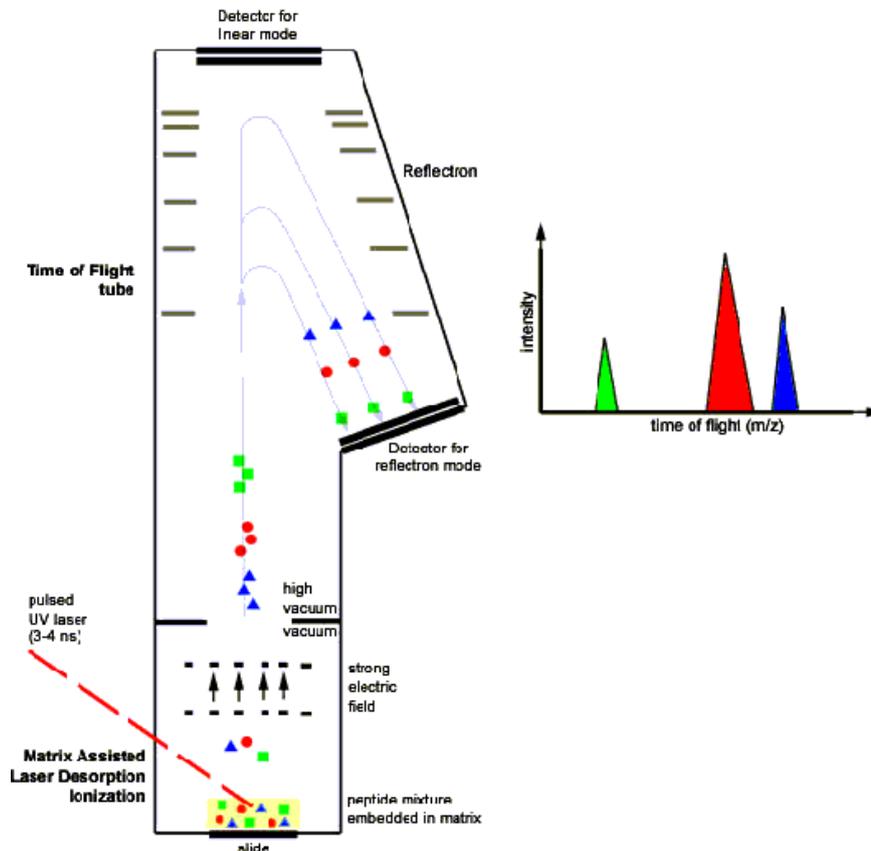
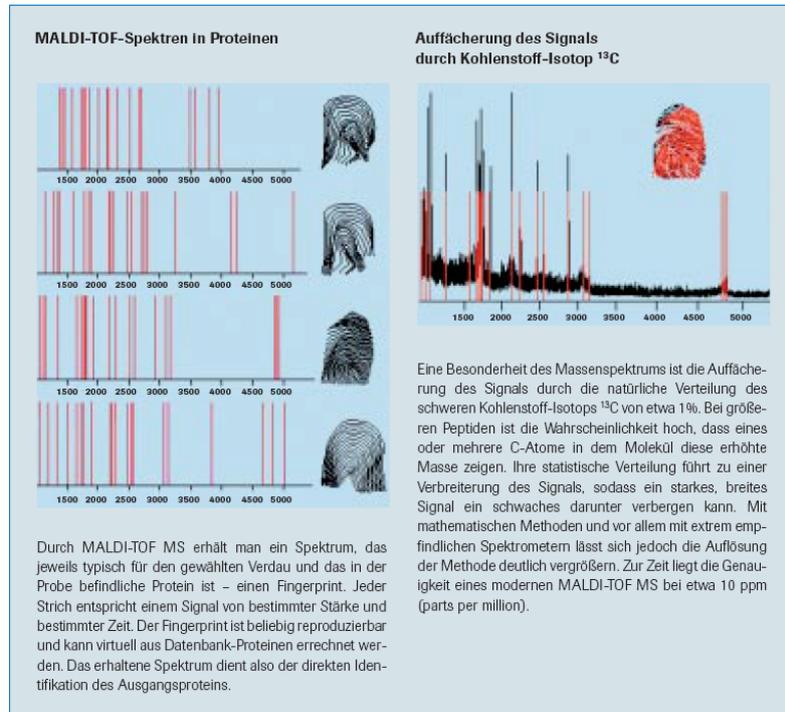


Abbildung 3-11: MALDI-TOF-MS

Aufbau eines MALDI-Reflekttron-TOF-Massenanalysators [48]

Gemisch aus unterschiedlich langen Peptiden. Wenn ein Protein mit einem bestimmten Enzym fragmentiert wird, erhält man mit dem Einsatz desselben Enzyms auch immer wieder die gleichen Fragmente. Daher ist ein solches Fragmentgemisch mit einem charakteristischen Fingerabdruck vergleichbar. Für die Spaltung eines Proteins in Peptide werden gewöhnlich Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin, Lys-C oder Asp-N benutzt. Diese Enzyme haben die Eigenschaft nur nach oder vor bestimmten Aminosäuren zu spalten. Zum Beispiel spaltet Trypsin nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Das Enzym Asp-N spaltet die Peptidbindung vor Aspartaten. Eine chemische Fragmentierung kann durch den Einsatz von Bromcyan (CNBr) erzielt werden. CNBr spaltet Proteine nach der Aminosäure Methionin. Durch diese Eigenschaft der Enzyme oder des Bromcyans kann man ein Polypeptid immer wieder in dieselben Fragmente teilen. Nach der Fragmentierung werden die Peptide in Lösung gebracht. Dieses Peptidgemisch wird in eine für die Massenspektrometrie compatible Lösung gebracht und als Ganzes

ohne weitere Fraktionierung vermessen. Es resultiert ein Massenspektrum, welches für dieses Protein einen charakteristischen „Peptidmassen-Fingerabdruck“ liefert. Diese Spektren werden zuerst kalibriert, dann werden alle Peaks markiert. Die so erhaltene Peptidmassentabelle kann in unterschiedliche Suchprogramme eingegeben und über Proteindatenbanken identifiziert werden (Abb. 3-12). In diesen Datenbank befindet sich die Gesamtheit aller möglichen Peptide je nach Verdauart. Da dieser Proteinverdau im Computer stattgefunden hat, also nur virtuell, spricht man auch von dem *in-silico* Verdau.



**Abbildung 3-12: Peptide Mass Fingerprint (PMF) [49]**

Identifizierung/Charakterisierung von Proteinen durch spezifische Peptidmassenspektren („Fingerabdrücke“)

### 3.9 Weitere in der Proteomik verwendete Methoden

Eine weitere komplementäre Technik zur 2DE-Gelelektrophorese stellt die sogenannte Multidimensionale Protein-Identifikation (*Multidimensional Protein-Identification Technology*, MudPIT) dar [50]. Bei dieser Methode werden Proteinextrakte durch die Verwendung einer zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und anschließend identifiziert. Nachdem die Proteine durch einen proteolytischen Verdau in Peptide zerlegt sind, werden sie zunächst auf eine starke Kationenaustauscher-Säule (*Strong Cation Exchange*, SCX) geladen. Mittels eines Salzstufengradienten wird anschließend jeweils ein kleiner Teil der Peptide schrittweise auf eine nachgeschaltete *Reversed Phase*-Säule eluiert. Auf dieser werden die einzelnen Peptid-Fractionen zunächst entsalzt, aber auch getrennt, bevor sie in Abhängigkeit ihrer Hydrophobizität in einem Acetonitrilgradienten getrennt und schließlich analysiert werden. Dabei erfolgt die Ionisierung der aufgetrennten Peptide mittels Elektrospray, da bei dieser Methode eine direkte Kopplung zwischen der Flüssigkeitschromatographie und der Ionisierung aus einer Lösung

heraus möglich ist. Das Potential zur Identifizierung ganzer Proteome durch die Verwendung der zweidimensionalen Chromatographie konnte am Beispiel von *S. cerevisiae* demonstriert werden [50]. Innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden wurden dabei parallel fast 1500 Proteine identifiziert, unabhängig davon, ob es sich um so genannte *high-* oder *low-abundance* Proteine oder um Proteine mit extremen pI-Werten oder Molekulargewichten handelte. Fast 10% der identifizierten Proteine zählten zu integralen Membranproteinen, was das enorme Potential dieser Technik auch für membrane proteomics verdeutlicht [51]. Ein Vorteil gegenüber der 2DE-Gelelektrophorese liegt darin, dass sich diese Methode sehr gut automatisieren lässt [52]. Die Auswertung der Messergebnisse erfordert jedoch eine extrem leistungsfähige Bioinformatik. Quantitative Aussagen, die einen Vergleich verschiedener zellulärer Zustände (z. B. Wildtyp vs. Mutante) erlauben, also eines der Hauptanwendungsgebiete der Proteomforschung, sind zurzeit nur eingeschränkt möglich. Der Einsatz von metabolischen Markierungen wie etwa  $N^{14}/N^{15}$  könnte diesen Nachteil allerdings in Zukunft überwinden, wobei die Reproduzierbarkeit dieser Methode immer noch ein immenses Problem darstellt. Auch ist es fast unmöglich, eine PTM-Analyse auf diesen Geräten durchzuführen.

### **3.10 Einsatz der Bioinformatik in der 2DE**

Die Bioinformatik ist eine interdisziplinäre Wissenschaft, die eine Schnittstelle zwischen Biotechnologie und Computerwissenschaften vertritt, sie entwickelt Algorithmen und Software zur Simulation biologische Prozesse, zum Analysieren von molekular biologischen Daten und zur Datenbankerstellung.

Für einen erfolgreichen Abschluss eines Proteomprojektes ist die Bioinformatik essentiell. Sie umfasst heutzutage mehrere Bereiche, die im Folgenden näher erläutert werden.

#### **3.10.1 Computergestützte Gelauswertung**

Bei der Auswertung von Proteinexpressionsmustern nach der 2D-Elektrophorese werden computergestützte Auswertesysteme eingesetzt. Diese computergestützte Bildauswertung ist bei komplexen 2D-Elektrophoresegele ein essentielles Werkzeug zur Speicherung, Strukturierung und Analyse der anfallenden Daten.

Anfallende Daten sind die mittels Densitometern beziehungsweise Fluoreszenz- oder Phosphorimager digitalisierten (gescannten) Abbildungen der Gele. Außerdem werden die Position der Proteine im Gel und Quantifizierungen der exprimierten Proteine bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen, wie zum Beispiel bei der Stressantwort auf Kälteschock oder dem Vergleich verschiedener Wildtypen oder Mutanten einer Spezies gespeichert. Diese Daten können zu Datenbanken ausgebaut und ausgewertet werden.

Die Arbeitsschritte der computergestützten Gelauswertung umfassen:

- Visualisierung der Proteinspots
- Digitalisierung der Gele
- Automatische Spoterkennung und Quantifizierung
- Proteinmustervergleich
- Auswertung der Ergebnisse
- Erstellung von Datenbanken

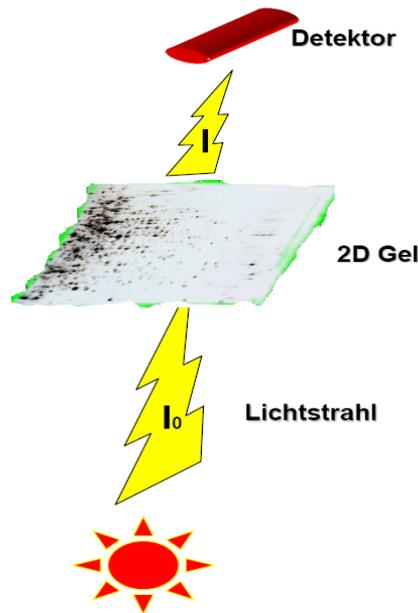
### 3.10.1.1 Digitalisierung der 2D-Elektrophorese Gele

Nach der elektrophoretischen Trennung müssen die Proteine zunächst visualisiert werden. Dies erfolgt durch Färbemethoden wie Coomassie Blau-, Silber- oder Fluoreszenzfärbung (z.B. Sypro Ruby). Alternativ können die Proteine radioaktiv markiert werden und eine Detektion durch Röntgenfilm oder Phosphorimaging erfolgen. Die Proteindetektionsmethode bestimmt die Methode der Digitalisierung. So werden Gele mit sichtbaren (gefärbten) Spots mittels Laser- oder Durchlichtdensitometern (Scannern), fluoreszenzgefärbte Proteine mit Fluoreszenzimagern und radioaktive Proben mit Phosphorimagern digitalisiert. Die wichtigsten Parameter beim Digitalisieren der Gele sind die optische Auflösung, die Farbtiefe und der lineare Messbereich des Scanners oder Imagers. Der Scanner sollte eine physikalische Auflösung von 100  $\mu\text{m}$  bzw. 254 dpi haben. Die Bilddateien sollten zudem mit einer Farbtiefe von mindestens 8 bit =  $2^8 = 256$  Graustufen digitalisiert werden. Der lineare Messbereich eines Densitometers hängt bei Durchlicht- bzw. Laserscannern von der Lichtquelle ab und spielt bei der Quantifizierung der Proteinspots eine wichtige Rolle.

### 3.10.1.2 Digitalisierung durch Durchlichtdensitometrie

Coomassie Blau- oder silbergefärbte Gele werden mittels Densitometern, wie Laser- oder Flachbettscannern digitalisiert. CCD-Kameras können ebenfalls eingesetzt werden, sind aber für große 2DE-Gele (20 x 25cm<sup>2</sup>) weniger gut geeignet, da bei CCD-Kameras das Gel auf eine Mattscheibe gelegt wird und von unten mit einer Lichtquelle ausgeleuchtet wird. Dies führt zu unterschiedlicher Ausleuchtung der Gele, vor allem in Randbereichen und somit zu schlechter Quantifizierbarkeit der Proteinspots.

Beim Digitalisieren wird die optische Dichte (OD) kleiner Abschnitte des zu digitalisierenden Objekts, in diesem Fall des 2DE-Gels, gemessen. Dazu wird eine Lichtquelle mit konstanter Geschwindigkeit senkrecht zum Gel bewegt und die Menge des Durchlichts detektiert



**Abbildung 3-13: Digitalisierung von 2DE-Gelen**

Digitalisierung von 2DE-Gelen mittels Durchlichtdensitometern

Die optische Dichte (= Absorptionseinheit) ist ein Maß für die Menge des absorbierten Lichts und wird nach folgender Gleichung definiert:

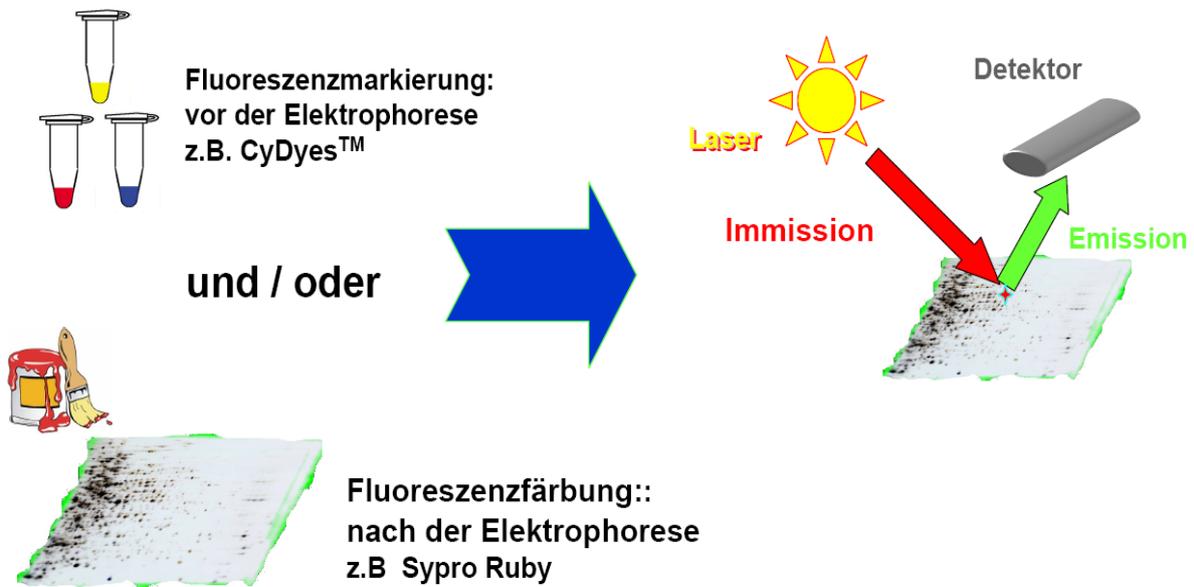
$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

$A$ =Absorptionseinheit (O.D.);  $I_0$ =ausgesandtes Licht;  $I$ =detektiertes Licht

Laserscanner besitzen die stärkste Lichtquelle und haben somit den höchsten linearen Messbereich von bis zu  $OD=4$  gefolgt von Flachbettscannern, die je nach Lichtquelle eine  $OD$  von bis zu 3 erreichen.

### 3.10.1.3 Digitalisierung durch Fluoreszenz Imaging

Beim Fluoreszenz Imaging kann die Probe vor der 2DE-Elektrophorese mit Fluoreszenzfarbstoffen, (wie zum Beispiel CyDyes<sup>TM</sup>) markiert, oder das Gel nach der Elektrophorese „gefärbt“ werden. Die an Proteine gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe senden nach Anregung durch einen Laser bestimmter Wellenlänge Licht aus. Sypro Ruby wird beispielsweise mit Licht von 300 nm und 450 nm angeregt. Das emittierte Licht (bei Sypro Ruby 630 nm) wird von einem CCD-Detektor gemessen.



**Abbildung 3-14: Fluoreszenzimaging**

Digitalisierung von 2DE-Gelen mittels Fluoreszenzimaging

Der lineare Messbereich hängt beim Fluoreszenzimaging auch von der Art der verwendeten Farbstoffe ab. So ist es möglich z.B. mit Sypro Ruby über einen Bereich von  $10^4$  linear zu quantifizieren.

#### 3.10.1.4 2DE Gel-Auswertungssysteme

Liegen die Gele in digitalisierter, computerlesbarer Form vor, können sie mit Hilfe von Auswertesystemen analysiert werden. Ein Auswertesystem ermöglicht sowohl eine qualitative Analyse der digitalisierten Elektrophoresegele, als auch eine Quantifizierung der einzelnen Proteinspots mit einer höheren Genauigkeit, wie sie durch visuellen Vergleich erreicht werden kann. Zusätzlich können die gesammelten Daten strukturiert, gespeichert, zur Erstellung von Proteindatenbanken sowie zur Steuerung automatisierter Spot-Picker verwendet werden.

Es sind verschiedene Bildauswertungssysteme für Elektrophoresegele kommerziell erhältlich. Die wichtigsten sind: ImageMaster 2DE Elite, Progenesis (Amersham Biosciences), PDQuest (Biorad), Melanie (GeneBio), Same Spots (Nonlinear Dynamics), Delta2DE (Decodon), Z3 (Compugen) und Proteome Weaver (Definiens/Biorad).

### 3.10.2 Datenbanken

#### 3.10.2.1 allgemeine Datenbanken

Es gibt unterschiedliche Arten von Datenbanken, die man als Proteindatenbanken bezeichnet. In Proteinsequenzdatenbanken werden alle Proteinsequenzen gesammelt, die vorher auf DNS (Deoxyribonukleinsäure) Ebene untersucht und von der DNS übersetzt wurden. Diese Datenbanken sind öffentlich und frei zugänglich. Zwei dieser Datenbanken sind die NCBI- (National Center for Biotechnology Information [53]) und die ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server [54] – Datenbank. Sie beinhalten verschiedene Informationen über die eingetragenen Proteine, wie z.B. die Proteinsequenz, den Gennamen, den Genort und -falls bekannt- die Funktion.

Bei umfangreichen Proteomprojekten ist man mit den erhaltenen Proteintreffern noch nicht am Ziel. In einem Proteomprojekt wird eine ungeheuer große Zahl an Daten und Informationen generiert, die ohne die Hilfe der Bioinformatik nicht überblickt, ausgewertet und verwaltet werden kann. Eine intelligente Datenverwaltung ist somit ein weiterer Beitrag, den die Bioinformatik leisten muss. Eine vollständige Kombination sämtlicher unterschiedlichster Informationen ist notwendig. Dabei sind nicht nur offensichtlich wichtige Daten wie Masse oder Konzentration der Peptide und deren Spotposition im Gel, sondern auch unstrukturierte Daten über Herkunft, Herstellung und Probenaufarbeitungshistorie, sowie Literaturdaten und biologische oder medizinische Daten von enormer Bedeutung.

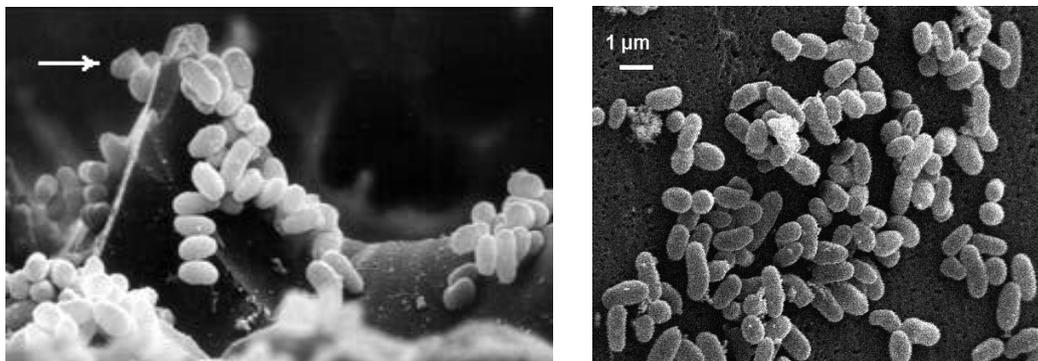
#### 3.10.2.2 2DE Datenbanken

Als Proteindatenbanken werden auch solche Datenbanken bezeichnet, die die Ergebnisse von Proteomanalysen zusammenfassen. 2DE Datenbanken enthalten ein Referenzgel der untersuchten Probe und verschiedene Informationen zu den identifizierten Proteinen. Diese Proteindatenbanken spiegeln das Proteom eines Organismus unter bestimmten Bedingungen zu einer bestimmten Zeit wider. Die Datenbanken sind so aufgebaut, dass man Abfragen nach bestimmten Proteinen durchführen oder Proteine mit bestimmten Eigenschaften anzeigen lassen kann. Die wichtigste Eigenschaft solcher Datenbanken ist die, dass sie eine Referenz für die untersuchte Probe unter den bestimmten Bedingungen, die angegeben sind, darstellen. Man kann in weiteren Versuchen Veränderungen an der Probe oder an den Bedingungen vornehmen und die Ergebnisse mit den Einträgen in der Datenbank vergleichen. Verschiedene 2DE Proteindatenbanken wurden schon erstellt. Die meisten 2DE Datenbanken sind unter dem „WORLD-2DE-PAGE“ Portal (<http://www.expasy.org/world-2DEpage>) auf dem „ExPASy Molecular Biology Server“ zusammengestellt.

### 3.11 *Corynebacterium glutamicum*

Das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* wurde in den 1950er Jahren in einem großangelegten Screening-Projekt zur Isolierung L-Glutaminsäure-produzierender Mikroorganismen in Bodenproben aus dem Ueno Zoo in Tokyo entdeckt [55] und nimmt bis heute eine herausragende Stellung unter den Aminosäure-produzierenden Mikroorganismen ein. *C. glutamicum* gehört phylogenetisch zur Familie der *Corynebacteriaceae*, die auf Grund ihres hohen G+C-Gehaltes und ihrer komplexen mycol-säurehaltigen Zellwand zu den mycolsäurehaltigen Actinomyceten gezählt wird. Im Gegensatz zu eng verwandten Humanpathogenen wie z. B. *C. diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* wird *C. glutamicum* als apathogener, sicher zu handhabender Organismus eingestuft. Auf Grund seines gut untersuchten Zentralmetabolismus und des großen Repertoires an etablierten molekularbiologischen Methoden eignet er sich sehr gut als Modellorganismus für die nah verwandten humanpathogenen Organismen *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*. Mit *Corynebacterium sepeidonicum* und *Corynebacterium fascians* besitzt die Gattung *Corynebacterium* auch pflanzenpathogene Vertreter. Eine wichtige Gemeinsamkeit innerhalb der Gruppe der *Corynebacterineae* ist die besondere Organisation der Zellhülle, die außerhalb der Zellwand unter anderem noch eine weitere Lipid-Doppelschicht, die sogenannte Mycomembran, enthält [56]. Diese aus Mycolsäuren gebildete Lipid-Doppelschicht stellt eine zusätzliche Permeabilitätsbarriere für hydrophile Solute dar und unterscheidet *Corynebacterineae* von anderen Gram-positiven Bakterien. Für die antibiotische Behandlung von Infektionen mit pathogenen Bakterien der Unterordnung *Corynebacterineae* ist die Mycomembran ein wichtiger Angriffspunkt, da viele gängige Antibiotika nicht in das Cytoplasma von *Corynebacterineae* gelangen können.

Morphologisch kennzeichnet dieses Bakterium seine namensgebende Keulenform (*coryne*, griechisch „Keule“). Es bildet unregelmäßige, nicht sporulierende, aerob wachsende Stäbchen der Größe 0,7-1,0 µm x 1,0-3,0 µm aus (Abbildung 3-15). Der für *C. glutamicum* typische Schnappmechanismus bei der Zellteilung führt zur charakteristischen Ausbildung einer V-Form.



**Abbildung 3-15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. glutamicum***

Die namensgebende keulenförmige Morphologie und die Ausbildung der V-Form in Folge des Schnappmechanismus der Zellteilung (Pfeil) sind erkennbar. (Quelle: Nina Möker, Institut für Biochemie der Universität zu Köln)

### 3.11.1 *Corynebacterium glutamicum ATCC13032* (Wildtyp)

Dieser Stamm hat ein zirkuläres Genom mit einer Größe von 3.282.708 Basenpaaren, wobei der GC-Anteil 63,1% beträgt. Man nimmt an, dass dieser Stamm 3.123 Gene besitzt. Das komplette Genom wurde 1996 physikalisch und genetisch kartiert [57].

Als Besonderheit kann z.B. die fehlende *S-Layer* Schicht (im Gegensatz zu anderen *Corynebacterium glutamicum* Stämmen wie ATCC17965) angegeben werden, da das hierzu nötige Protein PS2 fehlt und auch kein entsprechendes Gen gefunden wurde [58].

### 3.11.2 *Corynebacterium glutamicum DM1730* (Produktionsstamm)

Dieser Stamm enthält im Vergleich zum Wildtypstamm ATCC13032 folgende vier Punktmutationen:

1. Pyruvat-Decarboxylase (pyc): Prolin wurde an Position 458 durch Serin ausgetauscht. Durch diese Mutation wird die Rückbildung von Acetyl-CoA zu Pyruvat verhindert.
2. Homoserin-Dehydrogenase (hom): Valin wurde an Position 59 durch Alanin ausgetauscht. Diese Mutation forciert die L-Lysin Produktion dadurch, dass Aspartatsemialdehyd nicht mehr in Homoserin umgewandelt werden kann und somit der L-Lysin Produktion zur alleinigen Verfügung steht.
3. Aspartat-Kinase (lysC): Threonin wurde an Position 311 durch Isoleucin ausgetauscht. Durch diese Mutation entfällt die Inhibierung von lysC durch L-Lysin.
4. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (zwf): Alanin wurde an Position 243 durch Threonin ausgetauscht. Diese Mutation forciert den Glykolyseweg, da aus  $\alpha$ -D-Glucose-6-Phosphat kein D-Glucono- $\delta$ -lacton-6-Phosphat mehr entstehen kann. Dadurch steht mehr  $\alpha$ -D-Glucose-6-Phosphat der Glykolyse zur Verfügung.

Die ersten drei Punktmutationen wurden von Onishi *et al.* [59] beschrieben. Die vierte Punktmutation wurde von Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. (Japan) zum Patent angemeldet [60]. Durch die ersten drei Mutationen wurde die L-Lysinproduktion dieses Stammes auf  $3,0 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erhöht, während der klassische L-Lysin Produktionsstamm B-6 nur eine Produktionsrate von ca.  $1,9 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreichte. Des Weiteren konnte man die Wachstumsrate im Vergleich zum L-Lysin Produktionsstamm B-6 deutlich erhöhen. Dies zeigt sich dadurch, dass die *mid-log* Phase nach ca. 5 h erreicht wurde, der Stamm B-6 benötigt hierfür ca. 10 h [59].

### 3.11.3 Biotechnologische Bedeutung von *C. glutamicum*

Die Mitglieder der Familie der Corynebacteriaceae werden industriell häufig eingesetzt, da sie in der Lage sind, zahlreiche Biotransformationen auszuführen. Hauptsächlich *C. glutamicum* hat durch seine Fähigkeit zur Produktion von diversen Aminosäuren, Nukleotiden und Vitaminen eine herausragende wirtschaftliche Bedeutung erlangt und ist heute der wichtigste, biotechnologisch genutzte Vertreter dieser Gruppe. Eine kontinuierlich betriebene Stamm- und Prozessentwicklung macht derzeit eine Jahresproduktion von ca. 1,8 Millionen Tonnen L-Glutamat und ca. 550.000 Tonnen L-Lysin mit einem jährlichen Marktwachstum von 6 - 7% möglich [61]. L-Glutamat findet in Form seines Natriumsalzes als Geschmacksverstärker in Lebensmitteln Verwendung. L-Lysin kommt vorwiegend als Futtermittelzusatz in der Viehhaltung, aber auch als Grundstoff in der Kosmetikindustrie zum Einsatz. Weitere mit Hilfe von *C. glutamicum* produzierte Aminosäuren sind L-Alanin, L-Isoleucin und L-Glutamin.

Die wachsende wirtschaftliche Bedeutung von *C. glutamicum* führte in den letzten Jahrzehnten zur intensiven Analyse des Kohlenstoff- und Aminosäuremetabolismus. Viele der beteiligten Enzyme konnten bereits biochemisch charakterisiert werden. Erste weiterführende Arbeiten zum „genetischen Design“ von Stoffwechselwegen begannen trotz der frühen Entdeckung erst Anfang der 1980er Jahre [62]. Seitdem trägt die intensiv betriebene Erforschung der Metabolitenflüsse zu einem immer genaueren Verständnis interagierender Stoffwechselwege bei [63-66]. In mehreren unabhängigen, industriell finanzierten Sequenzierungsprojekten gelang zudem die vollständige Aufklärung der Genomsequenz von *C. glutamicum*. Mit ihrer Veröffentlichung ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), [www.gib.genes.nig.ac.jp](http://www.gib.genes.nig.ac.jp)) ist die Anwendung systematischer, global angelegter Techniken zur Analyse von Transkriptom, Proteom und Metabolom möglich.

### 3.11.4 Der Lysin Biosyntheseweg in *C. glutamicum*

Für Prokaryonten sind drei verschiedene Wege zur Biosynthese von L-Lysin bekannt (Abb. 3-16). Die Succinylase- und Acetylasewege unterscheiden sich dabei lediglich durch die Art der Schutzgruppe, die vor der Transaminierungsreaktion an das Substrat gebunden wird, um ein Recycling zum Imin zu verhindern. Der Dehydrogenaseweg verläuft über eine reduktive Aminierung von L- $\Delta^1$ -Piperidin-2,6-dicarboxylat zu *meso*-2,6-Diaminopimelat. In *C. glutamicum* sind sowohl der Succinylaseweg als auch der Dehydrogenaseweg vorhanden. Der Dehydrogenaseweg ist aber nicht essentiell, sondern wird nur bei erhöhtem Fluss von Metaboliten in Richtung *meso*-2,6-Diaminopimelat benötigt, da sonst N-Succinyl-diaminopimelat in der Zelle angehäuft wird [67].

Der Mechanismus der Lysin-Biosynthese beginnt mit der Phosphorylierung von L-Aspartat zu L- $\beta$ -Aspartyl-Phosphat, das anschließend unter NADPH-Verbrauch zu einem L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd

reduziert wird. Nun wird durch Kondensation ein Pyruvatmolekül angeknüpft und durch eine weitere Wasserabspaltung das cyclische Imin L-2,3-Dihydropicolinat ausgebildet. Dieses wird unter NADPH-Verbrauch zu L- $\Delta^1$ -Piperidin-2,6-dicarboxylat reduziert. Als nächster Schritt kann nun entweder die NADPH verbrauchende Reduktion von L-2,3 Dihydropicolinat zu *meso*-2,6-Diaminopimelat erfolgen (Dehydrogenaseweg), oder der energetisch aufwändigere Succinylaseweg eingeschlagen werden. Bei diesem Weg wird nach der Hydrolyse von L- $\Delta^1$ -Piperidin-2,6-dicarboxylat die  $\alpha$ -ständige Aminogruppe durch Succinylierung *gecappt* und somit ein Recycling verhindert. Das so entstandene N-Succinyl-L-2-Amino-6-Ketopimelat wird durch anschließende Transaminierung zu N-Succinyl-L, L-2,6-Diaminopimelat. Anschließend erfolgen eine hydrolytische Abspaltung der Succinylgruppe und die Isomerisierung zum Meso-2,6-Diaminopimelat. Der letzte Schritt ist eine Decarboxylierung des *meso*-2,6-Diaminopimelats zu L-Lysin und ist in beiden Biosynthesewegen gleich.

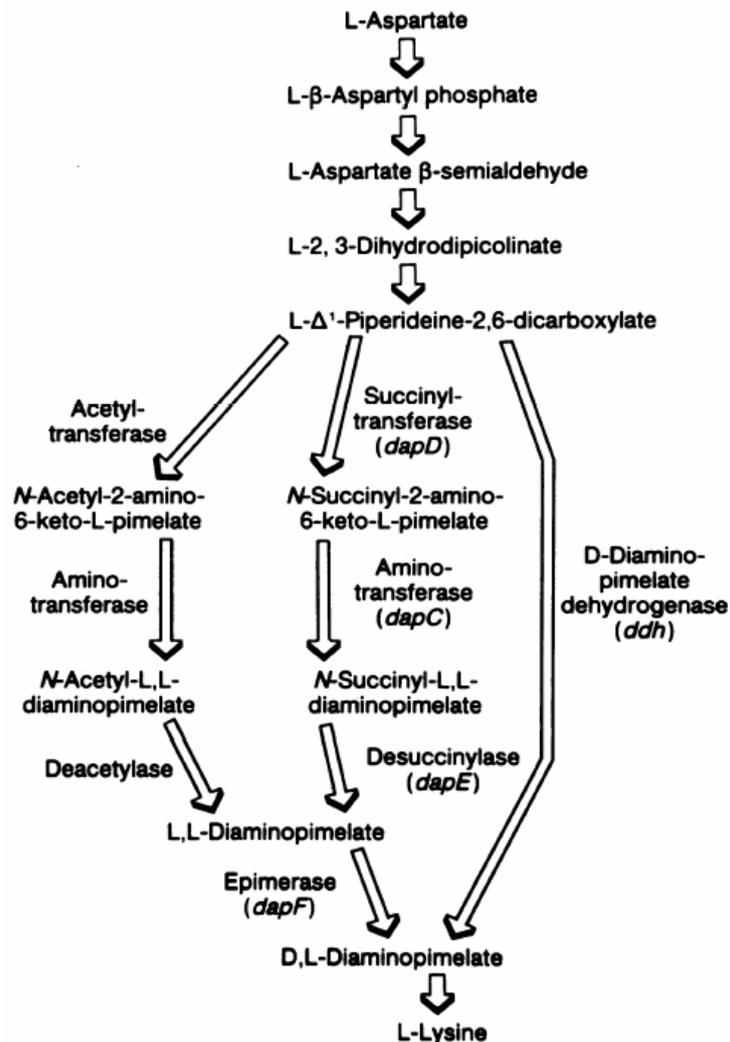
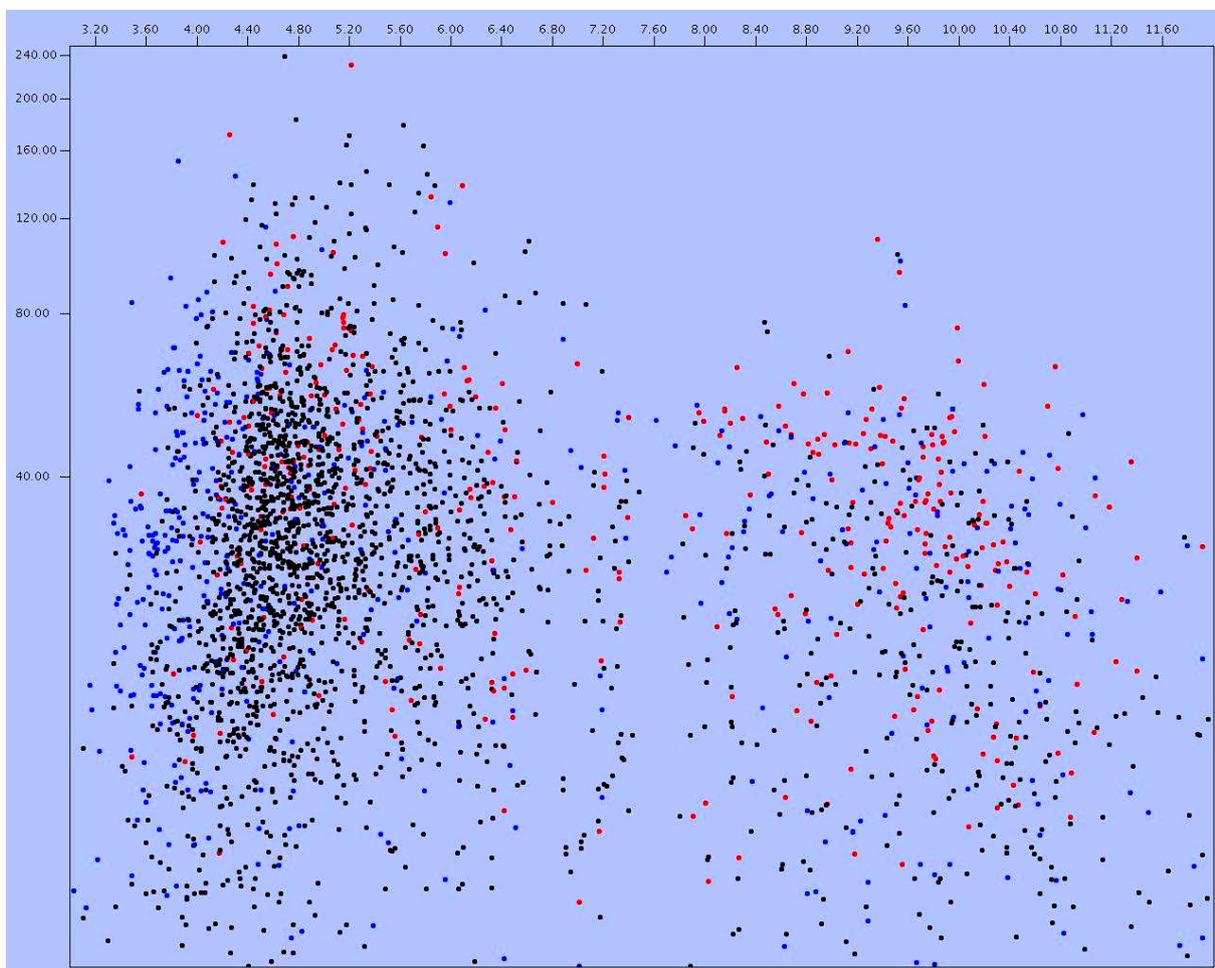


Abbildung 3-16: Die drei L-Lysin-Biosynthesewege in *C. glutamicum* nach Onishi *et al.* [59]

### 3.11.5 Aufbau des *C. glutamicum* Proteoms

Die hypothetische Proteinkarte von *C. glutamicum* (Abb. 3-17) zeigt die für Mikroorganismen typische Verteilung mit einer Häufung der Proteine im pH-Bereich 3-6, einer Lücke im neutralen Bereich und einer weiterer Häufung im basischen Bereich.

Das saure und neutrale Proteom wurden bereits ansatzweise mit weiten pH-Gradienten untersucht [68-70]. Bei diesen Analysen wurden, bedingt durch das eingeschränkte Auflösungsvermögen der verwendeten Gradienten viele Proteine durch andere überdeckt bzw. überlagert. Um eine bessere Übersicht über das Proteom zu bekommen, benötigt man hochauflösende IPG-Gradienten, die Bereiche mit hohem Proteinvorkommen spreizen, damit man möglichst alle Proteine detektieren und identifizieren kann. Des Weiteren gab es bis *dato* noch keinerlei Proteominformation über das basische *C. glutamicum* Proteom. Ebenso wenig wurden bislang niedrig abundante *C. glutamicum* Proteine nachgewiesen.



**Abbildung 3-17: Virtuelles Proteom von *C. glutamicum***

Schwarze Spots: cytoplasmatische Proteine, rote Spots: Membranproteine, blaue Spots: sekretierte Proteine (x-Achse: pH-Wert, y-Achse kDa)[71, 72]

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Anzucht von *C. glutamicum*

#### 4.1.1 Verwendete *C. glutamicum* Stämme

Verwendet wurden:

- Wildtypstamm ATCC13032
- Produktionsstamm DM1730

#### 4.1.2 Anzuchtmedien

Die Medien wurden wie nachfolgend beschrieben hergestellt. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren bei 121 °C für 15 Minuten. Zusätze wie Zucker, Magnesiumsulfat und Calciumcarbonat wurden separat sterilisiert. Die Spurensalze wurden sterilfiltriert (0,45 µm Filter).

Für jeweils 1 Liter H<sub>2</sub>O :

BHI Medium: 37 g Brain-Heart-Infusion

MM1 Medium: 5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
5 g Harnstoff  
2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Das MM1 Medium wurde mit NaOH der pH-Wert auf 7, eingestellt und das Medium autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde folgende Substanzen hinzugefügt:

10 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>  
200 µg Biotin (in Ethanol gelöst)  
50 ml 50% (w/v) Glucose  
1 ml Spurensalze

Spurensalze/ 1 Liter H <sub>2</sub> O :	28,5 g	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	16,5 g	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	6,4 g	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,764 g	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
	0,128 g	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	0,044 g	NiCl x 6 H <sub>2</sub> O
	0,064 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	0,048 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	0,050 g	SrCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	0,050 g	BaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	0,028 g	KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12 H <sub>2</sub> O

Der pH-Wert der Spurensalzlösung wurde mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 1 eingestellt.

Nach Sterilfiltration wurde 1ml dieser Lösung einem Liter MM1 Medium zugefügt.

### 4.1.3 Wachstumsbedingungen

Die Anzucht der *C. glutamicum* Stämme in BHI Medium erfolgte bei 30°C in einem Rotationsschüttler bei einer Schüttlerfrequenz von 120 *rpm* in Schüttelkolben. Eine Vorkultur wurde in BHI Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 7 bei 30°C und 120 *rpm* herangezogen. Von dieser Vorkultur wurden dann 1 ml auf 150 ml BHI Medium gegeben.

Bei der Anzucht in MM1 Medium wurde zunächst eine Vorkultur in BHI Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 7 bei 30°C und 120 *rpm* herangezogen. Von dieser wurden 20 ml in das MM1 Medium gegeben und bei 30°C und 120 *rpm* eine Übernachtskultur angezogen. Das entsprechende Volumen dieser Übernachtskultur wurde in frisches MM1 Medium überführt um eine OD<sub>600</sub> von 1 einzustellen.

Darin wuchsen die Bakterien bis zu OD<sub>600</sub> von 7 bei 30°C und 120 *rpm*.

### 4.1.4 Fermenterproben

Von der Firma Degussa wurden Fermenterproben vom Stamm ATCC13032 und DM1730 zur Verfügung gestellt. Diese Proben wurden nach 60h Wachstum geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

## 4.1.5 Wachstumskurven

### 4.1.5.1 Fermenteranzucht

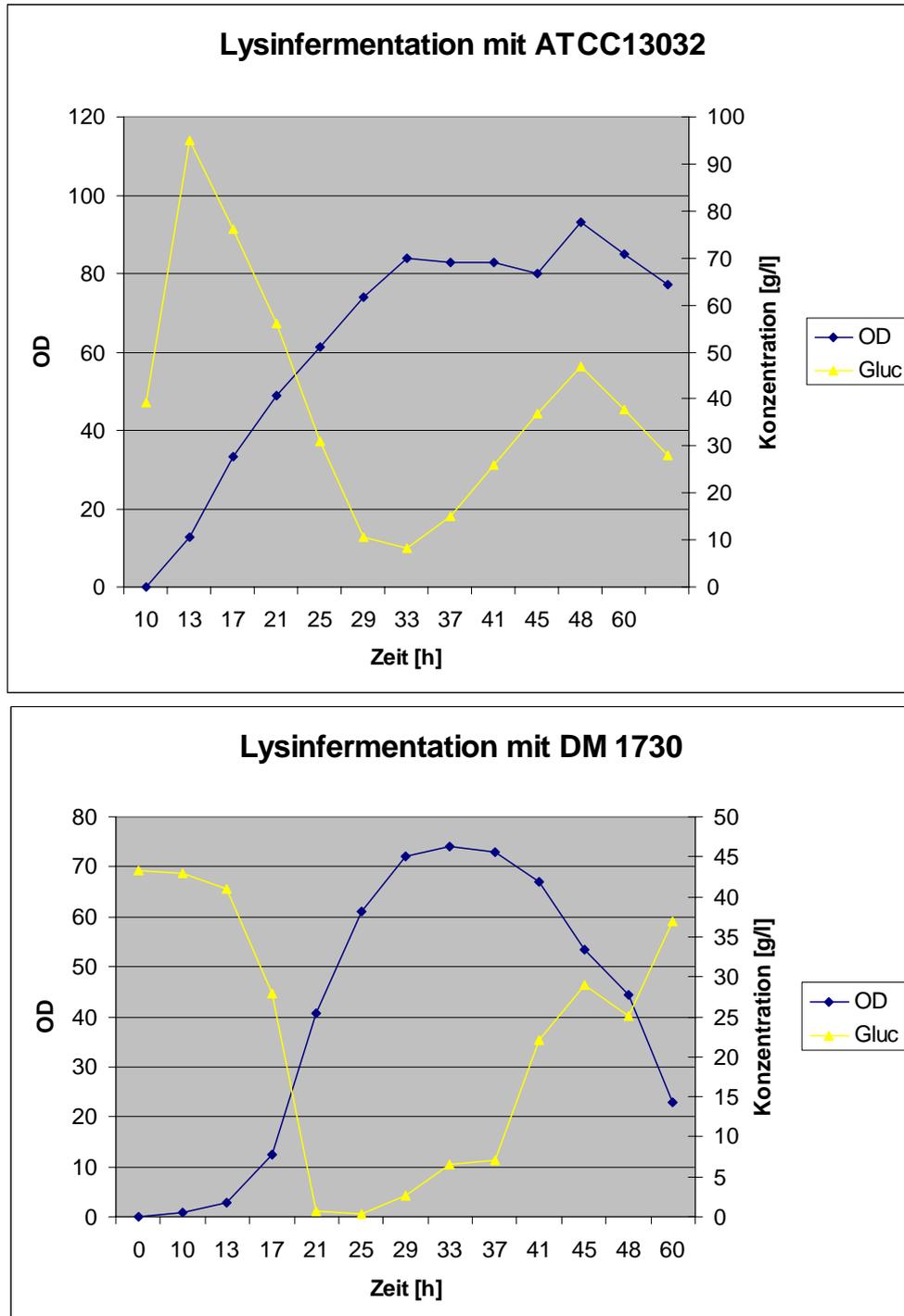
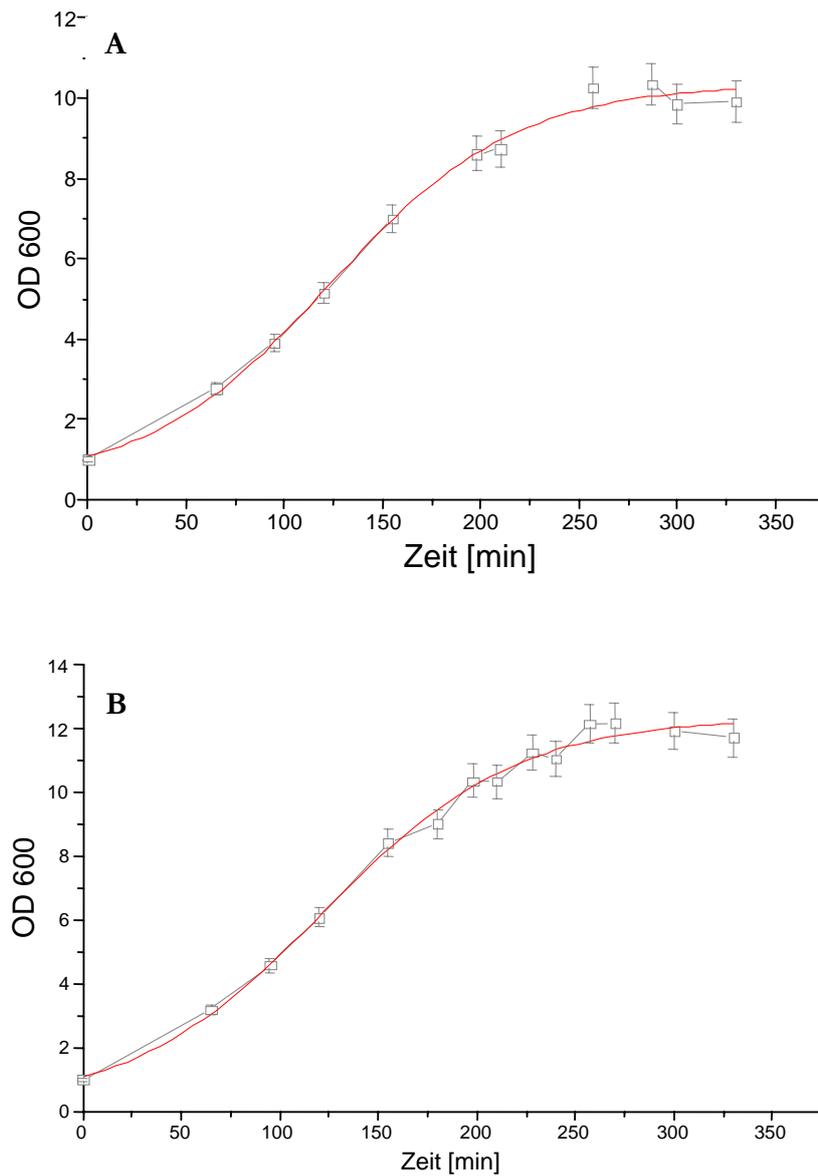


Abbildung 4-1: Fermenteranzucht von *C. glutamicum* (Degussa)

Wachstumskurven der Fermenteranzucht bei der Firma Degussa bei konstanter Glucosezufuhr.

#### 4.1.5.2 Schüttelkolbenanzucht

Um die Mitte der logarithmischen Wachstumsphase, bei der die Zellernte stattfand, zu bestimmen wurden an drei Tagen jeweils drei Corynebakterienkulturen angezchtet und der Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) in einer Dreifachbestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen (Abbildungen 4-2 und 4-3).



**Abbildung 4-2: Wachstumskurve von *C. glutamicum* in BHI-Medium (Schüttelkolbenanzucht)**

A: Wildtypstamm B: Produktionsstamm

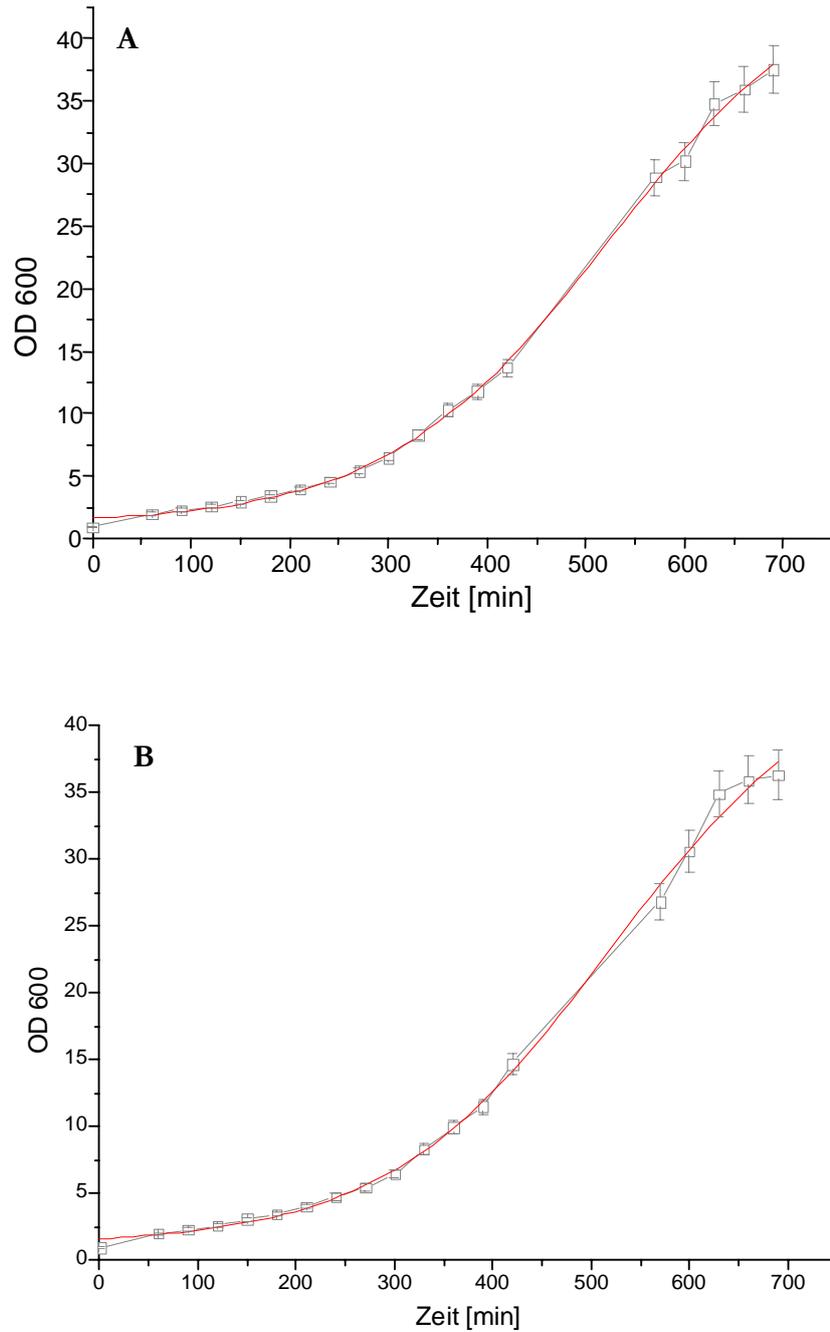


Abbildung 4-3: Wachstumskurve von *C. glutamicum* in MM1 Medium (Schüttelkolbenanzucht)

A: Wildtypstamm B: Produktionsstamm

Als Erntezeitpunkt wurde die Mitte der logarithmischen Wachstumsphase festgelegt, da hier die meisten exprimierten Proteine zu erwarten sind, ohne störende Einflüsse durch externe Faktoren, wie z.B. Nahrungs- oder Sauerstoffknappheit bedingt durch die Schüttelkolbenanzucht.

Bei der Anzucht in BHI Medium wurde die Mitte der logarithmischen Wachstumsphase bei einer  $OD_{600}$  von 6 und in MM1 Medium bei einer  $OD_{600}$  von 18 erreicht.

## 4.2 Proteinextraktion

### 4.2.1 Extraktionsmethode bei Verwendung von Bakterien aus der Schüttelkolbenanzucht

100 ml eines Anzuchtkolbens wurden in 10 x 10 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und die Zellen bei 8000 g bei 4°C zehn Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2,5 ml eiskaltem PBS Puffer resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets von vier Röhrchen in einem vereint und anschließend in insgesamt 7,5 ml PBS Puffer aufgenommen. Nach nochmaligem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in 2,5 ml Harnstoff/Thioharnstoff-Lysis-Puffer (7M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 4% CHAPS; 4% DTT; 2% Pharmalyte 3-10) aufgenommen. Je 250 µl der Zellsuspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss wurde durch Ultraschallbehandlung beschleunigt. Es erfolgten 30 Pulse (jeweils 0.5 sec.) bei 60 Watt. Nach der Beschallung wurden die Proben eine Minute auf Eis gekühlt und ein zweites Mal beschallt, um eine vollständige Zellyse zu erhalten. Dann wurden die Proben 30 Minuten bei 4°C und 5000 g abzentrifugiert, und der Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren.

### 4.2.2 Extraktionsmethode bei Verwendung der Fermenterproben

50 ml einer von der Firma Degussa im Rahmen des BMBF-Projektes zur Verfügung gestellten Fermenter-Anzucht wurden in 5 x 10 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und die Zellen bei 8000 g bei 4°C zehn Minuten lang abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2,5 ml eiskaltem PBS Puffer resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt um eine sehr gute Reinigung der Bakterienzellen vom Fermentermedium zu erreichen. Anschließend wurde das Zellpellet in 2,5 ml Harnstoff/Thioharnstoff-Lysis-Puffer aufgenommen bzw. für eine alternative Extraktionsmethode in 100 mM Tris/HCl (pH 9,5) und 1% SDS. Je 250 µl der Probe wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend wie oben unter 4.2.1 beschrieben.

### 4.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration des Extraktes

Die Ermittlung der Proteinkonzentration ist wichtig, um identische bzw. genau definierte Mengen an Protein auf die 2DE-Gele auftragen zu können. Hierzu wurde das *2DE Quant Kit* von Amersham Biosciences verwendet. Es beruht auf der Fällung der quantitativ zu erfassenden Proteine, während andere störende Substanzen wie SDS, DTT, Harnstoff, Thioharnstoff, CHAPS, Pharmalyte oder IPG-Puffer in Lösung bleiben. Das durch Zentrifugation entstehende Proteinpellet wird in einer alkalischen, kupferhaltigen Lösung resuspendiert. Die Kupferionen binden hierbei an das Polypeptidrückgrat der Proteine. Die Reaktion ist also von Aminosäureseitenketten und somit auch von der Aminosäurezusammensetzung unabhängig. Nach Zugabe eines Reagenz, das mit den ungebundenen Kupferionen reagiert, wird die Absorption gemessen. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional der Proteinkonzentration der Probe. Mit Hilfe einer Kalibrationskurve lässt sich die Proteinkonzentration durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 480 nm bestimmen.

## 4.3 2D-Gelelektrophorese

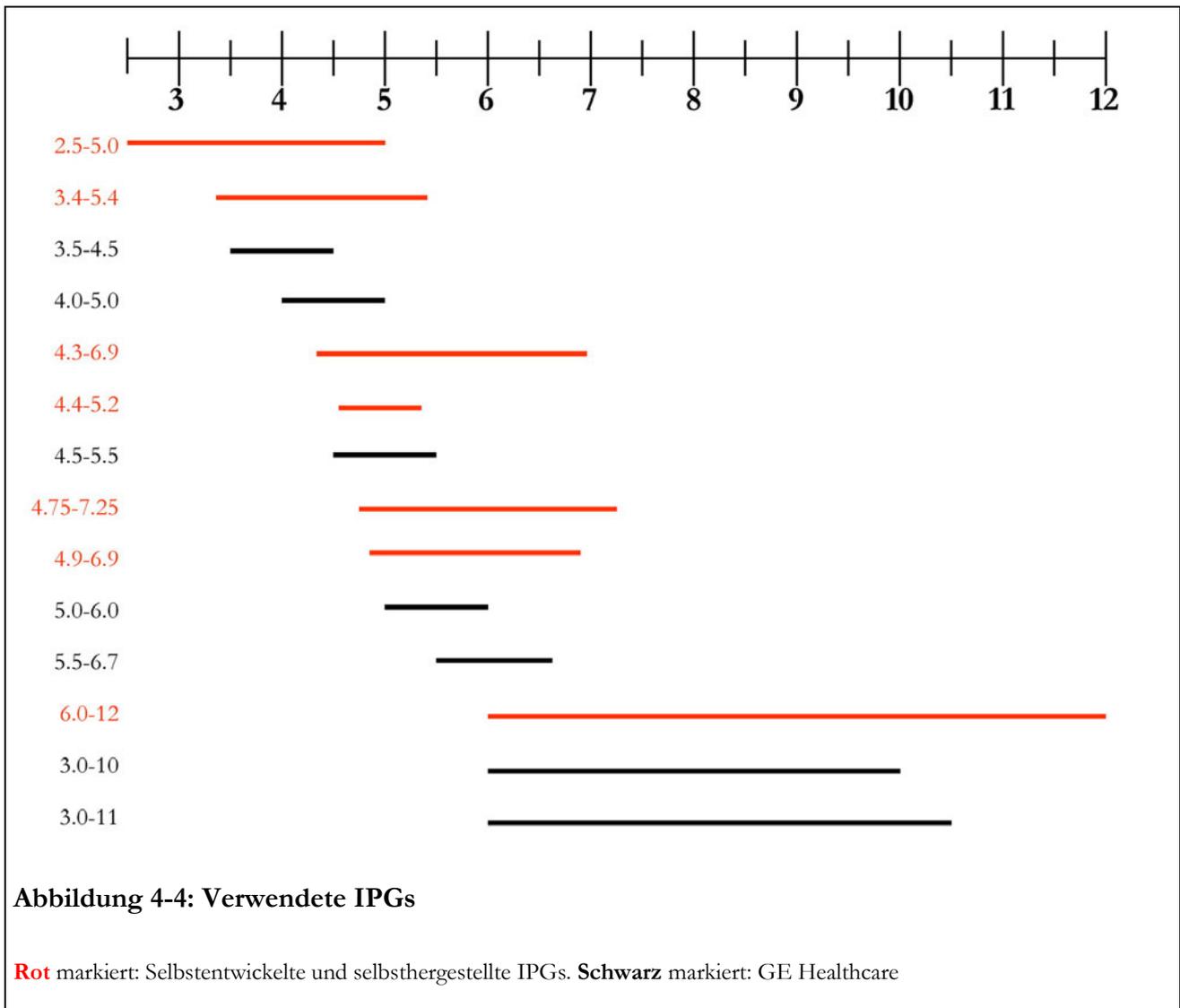
### 4.3.1 Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (IPGs)

#### 4.3.1.1 Herstellung von IPG-Gelen

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedenste pH-Gradienten eingesetzt, wobei sowohl kommerziell erhältliche verwendet bzw. neue Rezepturen entwickelt und optimiert wurden. Die Abbildung 4-4 gibt einen Überblick über verwendete IPGs mit mindestens einer pH- Einheit Trenndistanz.

#### Reagenzlösungen:

- Acrylamid-Bisacrylamid Lösung ( 30% T, 3 % C)  
29,1 g Acrylamid und 0,9 g Bisacrylamid in 80 ml Millipore Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen, 1 g Mischbettionenaustauscher Serolit MB-1 zugeben, 10 Minuten rühren und filtrieren
- Ammoniumpersulfat (35%-ige Lösung)  
0,4 g Ammoniumpersulfat in 1 ml Millipore Wasser lösen
- Immobiline- Lösungen  
Immobiline pK 1,0; pK 3,1; pK 3,6; pK 4,6; pK 6,2; pK 7,0; pK 8,5; pK 9,3; pK 10,3; pK 13 als Fertiglösungen (GE Healthcare LifeSciences bzw. Sigma-Aldrich/Fluka)
- TEMED (100%)



### Verwendete IPG-Gel „Rezepte“

Die Zusammensetzung der Lösungen für die Herstellung der IPG Gele wurden mit Computerprogrammen [35-37] berechnet und die einzelnen Komponenten entsprechend den in Tab. 4-1 aufgelisteten Mengenverhältnissen gemischt und dann mit NaOH bzw. HCl auf pH 7 titriert. Für ein 25 x 20 x 0.5 mm<sup>3</sup> großes IPG Gel wurden jeweils knapp 15 ml der sauren bzw. basischen Lösung benötigt. Die Katalysatoren (TEMED und Ammoniumpersulfat) wurden erst unmittelbar vor dem Start der Polymerisation zugegeben.

pH-Gradient	2.5 - 5.0		3.4 - 5.4		4.3 - 6.9		4.4 - 5.2		4.75 - 7.25		4.9 - 6.9		6.0 - 12.0	
	saure Lösung	basische Lösung												
Imobiline 1.0 [µl]	148	-	87	-	-	-	63	-	182	-	-	-	-	-
Imobiline 3.6 [µl]	389	190	523	75	-	-	-	-	-	-	358	140	1367	-
Imobiline 4.6 [µl]	295	443	200	746	707	530	585	752	682	453	480	166	-	-
Imobiline 6.2 [µl]	-	-	-	-	441	620	316	632	484	262	715	499	188	251
Imobiline 7.0 [µl]	-	514	282	750	-	2	-	-	145	543	-	263	323	125
Imobiline 8.5 [µl]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75	365	84
Imobiline 9.3 [µl]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	219	-	-	497	32
Imobiline 10.3 [µl]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	485
Imobiline > 13.0 [µl]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	345
Acrylamid / Bis [µl]	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2250	2250
Wasser [µl]	9628	11314	9368	10889	9313	10901	9495	11076	8966	10982	8906	11308	5000	11400
Glyoxalin [g]	3,75		3,75		3,75		3,75		3,75		3,75		3,75	
TEMED (100%)	10µl	10µl												
Persulfate (40%)	15µl	15µl												
Gesamtvolumen	15ml	15ml												

Tabelle 4-1: „IPG-Rezepte“

### Durchführung

Die Gießkassette (Abb. 4-5), bestehend aus zwei 200 x 260 mm großen Glasplatten (A und B), einer Gelträgerfolie (GelBond PAGFilm) (C) und einer 0,5 mm starken Silikongummi-Dichtung (B), wird folgendermaßen zusammengebaut:

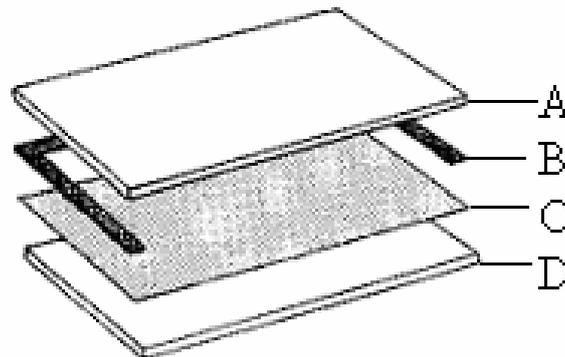


Abbildung 4-5: Zusammenbau der Gießkassette (Görg *et al.* [8])

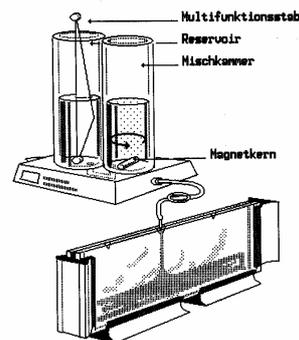
A=Deckglasplatte; B=0.5 mm dicke Dichtung aus Silikongummi; C=Gelträgerfolie (Gel-Bond PAGfilm); D=rückwärtige Glasplatte

Zuerst muss die obere Glasplatte (d.h. Glasplatte mit Gummidichtung) mit einem hydrophobisierenden Reagenz (Repel Silane) vorbehandelt werden, damit sich später das polymerisierte Gel von der Glasplatte lösen lässt. Anschließend pipettiert man einige Tropfen Wasser auf die Glasplatte ohne Dichtung, und walzt mit Hilfe einer Hartgummiwalze die Gel-Trägerfolie (GelBond PAGfilm) mit der hydrophoben Seite nach unten luftblasenfrei auf. Danach wird die Deckglasplatte mit der Dichtung (Dicke: 0.5 mm) nach unten auf die Gel-Trägerfolie aufgelegt. Die Kassette wird zusammengeklammert und ca.

eine halbe Stunde in den Kühlschrank bei 4°C gestellt, um zu verhindern, dass die Gellösung nach dem Einfüllen vorzeitig bzw. zu schnell polymerisiert.

Zur Herstellung der Polymerisationslösung benötigt man sowohl eine basische und eine saure Immobilisierungslösung, wobei letztere zum Aufbau eines Dichtegradienten (und damit zur Stabilisierung des pH-Gradienten) zusätzlich 25% Glycerol enthält. Die Menge an Acrylamid und Bisacrylamid ist in beiden Lösungen identisch. Der pH-Wert entspricht den in Abbildung 4-4 angegebenen Anfangs- und Endpunkten des pH-Gradienten. Vor dem eigentlichen Gießvorgang müssen beide Lösungen mit 1N Salzsäure bzw. 1N Natronlauge auf einen pH von 7,0 titriert werden, damit eine optimale Polymerisationskinetik erzielt wird. Den Radikalstarter TEMED und das Ammoniumpersulfat gibt man erst unmittelbar vor dem Gießvorgang hinzu.

Das Gießen des Gels erfolgt mit der Gradientengießtechnik für ultradünne Gele nach Görg *et al.* [73]. Hierzu wird ein Gradientenmischer (Abb. 4-6) auf einen Magnetrührer gestellt und der Auslaufschlauch in den oberen Spalt der Gießkassette eingeführt, wobei das Auslassventil des Gradientenmixers noch geschlossen sein muss. Die saure Lösung wird in die Mischkammer mit einem Magnetrührer gegeben. Bevor die basische Lösung in die andere Kammer mit einem sich darin befindenden Nivellierstab hineinpipettiert wird, ist es notwendig, den Verbindungstunnel zwischen den beiden Kammern kurz zu entlüften. Zum Gießen des Gels öffnet man das Durchlassventil und das Auslassventil zur gleichen Zeit, um die vorgekühlte Glasplatte bis knapp unterhalb der Oberkante zu befüllen. Während des gesamten Vorgangs ist es wichtig darauf zu achten, dass der Flüssigkeitspegel in beiden Zylindern des Mixers gleichmäßig schnell fällt. Weitere Details siehe [15].



**Abbildung 4-6: Gießen eines pH-Gradientengels (Görg *et al.* [8])**

Nach dem Gießvorgang lässt man die Kassette 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen, um eine Nivellierung des Dichtegradienten zu erhalten, bevor das Gel eine Stunde lang in einem Trockenschrank bei 50 °C auspolymerisiert wird. Nach Beendigung der Polymerisation wird die Kassette geöffnet und das auf der Trägerfolie gebundene Gel vorsichtig von der Glasplatte abgelöst. Im Folgenden wäscht man das Gel 6 x 10 Minuten in Millipore-Wasser, um nicht einpolymerisierte Monomere zu entfernen, und daraufhin noch weitere 30 Minuten in einer 2%-igen Glycerollösung. Im Anschluss wird das Gel über

Nacht in einem staubfreien Schrank mit Hilfe eines Ventilators bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird die Oberfläche des Gels mit einer Schutzfolie abgedeckt und kann dann mehrere Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Vor Gebrauch werden die getrockneten IPG Gele mit Hilfe einer Papierschnidemaschine in 3 mm breite Einzelstreifen geschnitten und die Schutzfolie abgezogen.

Die kommerziell erhältlichen Fertiggele von z.B. GE Healthcare (IPG Dry Strips), Bio-Rad oder Serva werden bereits als Einzelstreifen geliefert.

#### 4.3.1.2 Rehydratisierung der IPG-Streifen

**Prinzip:** Vor Verwendung der IPG-Streifen müssen diese rehydratisiert werden, damit in ihnen Bedingungen für völliges Entfalten, in-Lösung-Gehen der Proteine, Reduktion der Disulfid-Brücken und Verhinderung von Carbamylierungen herrschen. Dies geschieht durch Quellen der IPG-Streifen in der Rehydratisierungslösung. Im Falle von gleichzeitiger Zugabe von Probe beim Rehydratisierungsvorgang spricht man von *in-gel-rehydration*, bei nachträglicher Zugabe in einem Probenauftragsbehälter von *cup-loading*.

Reagenzlösungen:

- Harnstoff-Thioharnstoff-CHAPS-DTT Rehydratisierlösung:  
(6M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 1% CHAPS; 0,4% DTT;  
0,5% Pharmalyte 3-10)

18,02 g Harnstoff und 7,612 g Thioharnstoff in 30,8 ml Millipore-Wasser lösen. Mit einer Spatelspitze (500 mg) Mischbettionenaustauscher versetzen, 10 Minuten rühren und filtrieren. 0,4 g CHAPS, 160 mg DTT und 200  $\mu\text{l}$  Pharmalyte 3-10 zu 40 ml Filtrats zugeben.

Die Rehydratisierlösungen werden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Aufgetaute Rehydratisierlösungen sollten nicht wieder eingefroren werden!

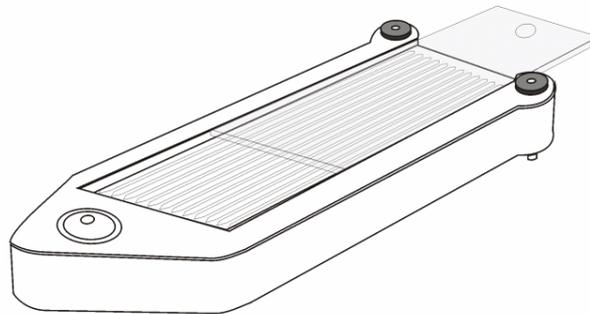
**Durchführung :**

#### *Cup loading*

Die Rehydratisierung der IPG-Streifen erfolgt entweder in einer Quellkassette oder in einem Reswelling Tray (Abb. 4-7). Für einen 18 cm langen IPG-Streifen pipettiert man 350  $\mu\text{l}$  (bzw. 450  $\mu\text{l}$  im Falle eines 24 cm langen IPG-Streifens) der entsprechenden Quelllösung in eine Vertiefung des Trays und legt den IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei hinein. Der IPG-Streifen muss über die gesamte Länge mit Flüssigkeit benetzt und frei beweglich sein. Im Anschluss wird er mit 2 ml Silikonöl überschichtet und der Tray geschlossen. Die Rehydratisierung erfolgt normalerweise über Nacht bei Raumtemperatur ( $20^{\circ}\text{C}$ ).

### ***Sample In-Gel Rehydration***

Die Rehydratisierung der IPG-DryStrips erfolgt genauso wie oben unter *cup loading* beschrieben, nur dass in diesem Fall die zu analysierende Probe bereits der Rehydratisierungslösung zugegeben wird.

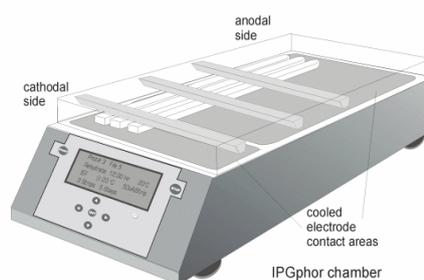


**Abbildung 4-7: Rehydratisierung der IPG-DryStrips vor der IEF**

#### **4.3.1.3 IEF mit der IPGphor**

##### **Durchführung**

Die über Nacht rehydratisierten IPG-Streifen werden aus dem Reswelling Tray herausgenommen und kurz in Millipore-Wasser getaucht, um überschüssigen Quellpuffer zu entfernen und somit ein Auskristallisieren von Harnstoff bei der darauffolgenden IEF zu unterbinden. Anschließend legt man die IPG-Streifen mit der Gelseite nach oben auf ein mit Millipore-Wasser angefeuchtetes Filterpapier und entfernt durch vorsichtiges Andrücken mit einem weiteren mit Millipore-Wasser benetzten Filterpapier das auf der Geloberfläche haftende, überschüssige Wasser.



**Abbildung 4-8: IEF in individuellen IPG Strip-Holdern mit integrierten Elektroden (IPGphor)**

Bei der IPGphor verwendet man sogenannte *Strip-Holder* die je einen IPG-Gelstreifen aufnehmen können (Abb. 4-9), und der durch Auflegen auf die Kühlplatte gleichzeitig mit dem Elektrodenkontaktbereich verbunden ist. Anstelle individueller Strip-Holder kann auch ein multipler Strip-Holder (*Manifold*) (Abb. 4-9) verwendet werden. Die gequollenen IPG-Streifen werden in den *Strip-Holdern* so positioniert, dass das saure Ende zur Anode zeigt (Abb.4-10). Auf das anodale und kathodale Ende des Gelstreifens

wird jeweils ein 1 mm starkes mit destilliertem Wasser angefeuchtetes Filterpapier (Größe: 3x5 mm<sup>2</sup>) aufgelegt und leicht angedrückt. Die einzelnen, beweglichen Elektroden werden darauf platziert. Anschließend bringt man den ebenfalls beweglichen Probenauftragsbehälter (*Sample cup*) angrenzend an die Elektrode an der Anode an, so dass er dicht mit dem Gelstreifen abschließt. Auf den gesamten Streifen werden ca. 4 ml *Dry Strip Cover Fluid* pipettiert. Anschließend wird die in Lysispuffer gelöste Probe in den Probenauftragsbehälter gegeben und mit einigen Tropfen *Dry Strip Cover Fluid* überschichtet. Die Temperatur während der IEF beträgt 20°C.

Die weiteren verwendeten Parameter können Tabelle 4-2 entnommen werden.

pH-Gradient	150V	300V	600V	Gradient auf 8000V	8000V	Voltstunden
2.5 - 5.0	1 h	1 h	1,5 h	1 h	7 h	56000
3.4 - 5.4	1 h	1 h	1,5 h	1 h	6 h	48000
3.5 - 4.5	1 h	2 h	2 h	1 h	12 h	116000
4.0 - 5.0	1 h	2 h	2 h	1 h	12 h	116000
4.3 - 6.9	1 h	1 h	1,5 h	1 h	6 h	48000
4.4 - 5.2	1 h	2 h	2 h	1 h	12 h	116000
4.5 - 5.5	1 h	2 h	2 h	1 h	12 h	116000
4.75 - 7.25	1 h	1 h	1,5 h	1 h	6 h	48000
4.9 - 6.9	1 h	1 h	1,5 h	1 h	6 h	48000
5.0 - 6.0	1 h	2 h	2 h	1 h	12 h	116000
5.5 - 6.7	1 h	2 h	2 h	1 h	12 h	116000
6 - 12	1 h	1 h	1 h	1 h	3 h	32000
3 - 10	1 h	1 h	1 h	1 h	3 h	32000
3 - 11	1 h	1 h	1 h	1 h	3 h	32000
Trenndisanz	2 h	2 h	2 h	1 h	20 h	160000

**Tabelle 4-2: Parameter für die IEF auf IPGphor für 18cm lange IPG-Streifen**

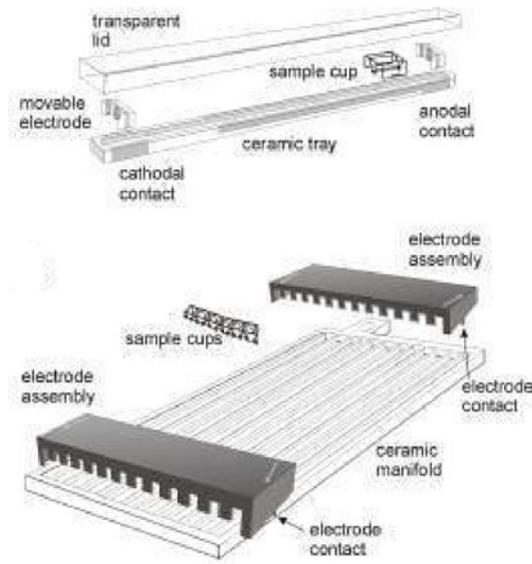


Abbildung 4-9: Probenauftrag in individuellen *cup loading strip holdern* (oben) und multiplen *cup-loading strip holder* („Manifold“) (unten) [74]



Abbildung 4-10: Positionierung des Probenhalters auf dem IPG-Streifen [34]

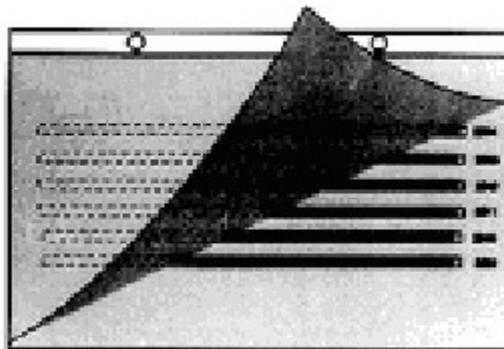


Abbildung 4-11: Lagerung der IPG-Streifen in einer Klarsichthülle bei  $-70^{\circ}\text{C}$  nach erfolgter IEF [74]

Nach Beendigung der IEF werden die IPG-Streifen in eine Klarsichthülle gelegt (Abb. 4-11) und bis zur weiteren Verwendung für die SDS-PAGE bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.3.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Nach der IEF werden die Proteine in der zweiten Dimension mit Hilfe einer SDS-PAGE nach ihrer Masse (genauer: Molekülgröße bzw. hydrodynamischem Radius) getrennt. Man kann durch verschiedene Acrylamidkonzentrationen das Trennverhalten der zweiten Dimension verändern. Durch eine höhere Konzentration von Acrylamid (AA) werden die niedermolekularen Proteine besser getrennt, während bei geringeren Konzentrationen die hochmolekularen Proteine besser getrennt werden. Eine meistens verwendete Konzentration von  $T = 13\%$  Acrylamid (AA) stellt einen Kompromiss für eine zufriedenstellende Auftrennung von Proteinen im Massenbereich zwischen 10-100 kDa dar.

#### 4.3.2.1 Herstellung von SDS Gelen

Reagenzlösungen:

- Acrylamidlösung (30,8% T, 2,6 % C)  
(30 % AA und 0,8 % Bis in Millipore-Wasser)  
Um 1 Liter der Lösung herzustellen, löst man 300 g AA und 8,0 g Bis-AA in etwa 500 ml Millipore-Wasser und füllt dann auf 1000 ml auf. Anschließend wird die Lösung mit 10 g Mischbettionenaustauscher versetzt, eine Stunde gerührt und filtriert.
- Gelpuffer:  
(1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS)  
18,2 g Trizma-Base und 0,4 g SDS in etwa 80 ml Millipore-Wasser lösen. Mit 4 N HCl auf pH 8,8 titrieren und mit Millipore-Wasser auf 100 ml auffüllen.
- Ammoniumpersulfatlösung (10 %)  
1,0 g Ammoniumpersulfatlösung (APS) in 10 ml Millipore-Wasser lösen (frisch ansetzen)
- Glycerol-Lösung  
(50% Glycerol und 0,01% Bromphenolblau in Millipore-Wasser)  
250 ml Glycerol (100%) in 250 ml Millipore-Wasser lösen, mit 50 mg Bromphenolblau versetzen und für einige Minuten rühren
- Überschichtungspuffer / Gelpuffer-gesättigtes 2-Butanol  
Zu 20 ml Gelpuffer werden 30 ml 2-Butanol gegeben und die Lösung einige Minuten gerührt. Vor der Verwendung müssen sich beide Phasen wieder getrennt haben. Zum Überschichten der Gellösung wird nur die obere, leichtere 2-Butanolphase verwendet.
- TEMED (100%)

	IsoDalt		EttanDalt	
	T = 13 %	T = 15 %	T = 13 %	T = 15 %
Acrylamidlösung [ml]	422	487	379,8	438,3
Glycerol (100%) [g]	50	50	45	45
Gelpuffer [ml]	250	250	225	225
Millipore-Wasser [ml]	283	217,5	254,7	195,8
APS (10%) [ml]	7	7	6	6
TEMED [ $\mu$ l]	55	55	50	50
Endvolumen [ml]	1000	1000	900	900

**Tabelle 4-3: „Rezepte“ für vertikale SDS-Gele**

Angebene Mengen sind ausreichend für 14 *IsoDalt*- bzw. 12 *EttanDalt*-Gele

## Durchführung

### Aufbau der Gießkammer

Zwei durch ein Scharnier verbundene Glasplatten stellen zusammen mit einem 1 mm starken Abstandhalter (*Spacer*) eine Gießkassette (*IsoDalt* : 200 mm x 237 mm x 1mm, *EttanDalt* : 204 mm x 255 mm x 1mm) dar. Da am oberen Ende 2 cm zum Fixieren des IPG-Gelstreifens mit Agaroselösung frei bleiben müssen, ergibt sich eine effektive Trenndistanz von 18 cm. Zwischen die einzelnen Gießkassetten werden alternierend Klarsichtfolien eingeordnet und zur gleichmäßigen Druckverteilung an beide Enden noch Schaumgummimatten eingesetzt. Zum Schließen der Gießkammer justiert man die Deckplatte und schraubt sie über Kreuz fest.

### Gießen der SDS-Gele

Am Anfang wird das an der Kammer angebrachte Gießreservoir mit einem Trichter verschlossen, in den man im Anschluss die kurz zuvor mit TEMED und APS versetzte Gellösung gießt. Anschließend gibt man Glycerollösung dazu, die durch ihre höhere Dichte die Gellösung im Einflussbereich verdrängt und die Gellösung unterschichtet. (Abb. 4-12).

Die SDS-Gele werden nach dem Gießen an der Oberkante mit je 1 ml Gelpuffer-gesättigtem 2-Butanol überschichtet, damit eine glatte und horizontale Gelkante entsteht. Der Polymerisationsvorgang dauert bei Raumtemperatur mindestens drei Stunden, wird aber zwecks besserer Reproduzierbarkeit meistens über Nacht durchgeführt.

Nach abgeschlossener Polymerisation entnimmt man die Glasplatten und wäscht sie außen sorgfältig mit destilliertem Wasser ab, auch das Butanol wird von der Geloberfläche abdekantiert. Damit vom Spülvorgang noch vorhandenes Wasser ablaufen kann, stellt man die Gießkassetten mit der Oberkante

nach unten auf ein Drahtgestell. Die beiden randständigen Gele in der Gießkammer werden i.A. verworfen, da bei diesen keine gleichmäßige Dicke gewährleistet ist.

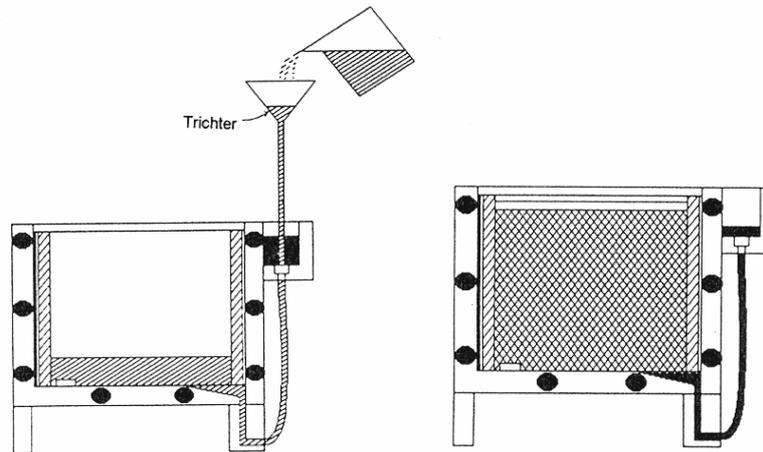


Abbildung 4-12: Gießen der SDS-Gele [75, 76]

#### 4.3.2.2 Äquilibration der IPG-Streifen

Die Äquilibration der IEF-Gele vor der SDS-Elektrophorese dient vor allem dazu, die fokussierten Proteine optimal mit SDS zu beladen. Ohne diesen Schritt wäre ein unzureichender Proteintransfer aus der ersten in die zweite Dimension gegeben, verbunden mit einer vertikalen Streifenbildung, die auf die in diesem Fall nur sukzessive in Lösung gehenden Proteine zurückzuführen ist [16]. Der Zusatz von Harnstoff und Glycerol verbessert den Transfer, während Iodacetamid im zweiten Äquilibrationsschritt zur Alkylierung der Sulfhydrylgruppen dient und somit eine sukzessive Reoxidation (*Spot-Streaking*) der Proteine während der SDS-PAGE verhindert (Tab. 4-4).

#### Reagenzlösungen

- Trenngelpuffer:  
(1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS )  
18,2 g Trizma-Base und 0,4 g SDS in etwa 80 ml Millipore-Wasser lösen. Mit 4 N HCl auf pH 8,8 titrieren und mit Millipore-Wasser auf 100 ml auffüllen.
- Äquilibrationpuffer:  
(6 M Harnstoff, 30 % Glycerol, 2 % SDS in 0,05 M Trenngelpuffer, pH 8,8)  
180 g Harnstoff, 150 g Glycerol, 10 g SDS und 16,5 ml Trenngelpuffer in Millipore-Wasser lösen und auf 500 ml mit Millipore-Wasser auffüllen.

## Durchführung

Zur Äquilibration werden die IPG-Gelstreifen mit der Gelseite nach oben in einen leeren IPG-Strip-Tray gelegt. Nun gießt man 100 ml Äquilibrationpuffer, in dem zuvor 1 g DTT gelöst wurden, in den Tray und bewegt die Flüssigkeit 15 Minuten auf einem Horizontalschüttler. Nach Abgießen des ersten Äquilibrationpuffers werden die IPG-Streifen für weitere 15 Minuten in 100 ml Äquilibrationpuffer, in dem 4,8 g Iodoacetamid gelöst wurde, geschüttelt. Im Anschluss daran werden die IPG Gelstreifen sofort für die zweite Dimension eingesetzt.

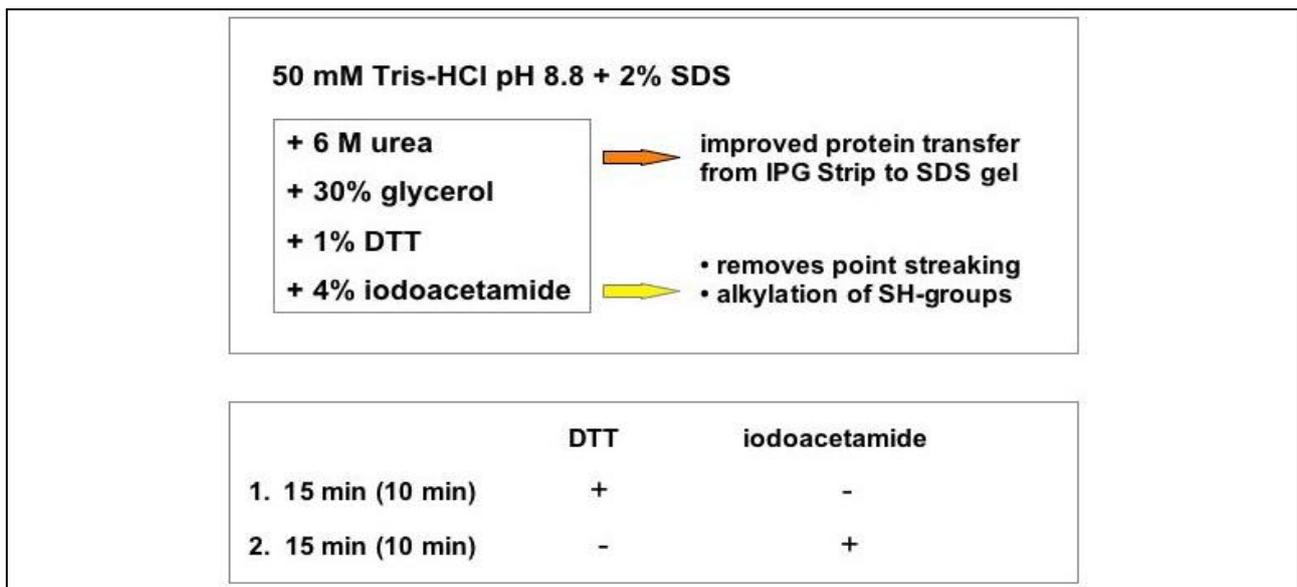


Tabelle 4-4: Äquilibrieren des IPG Streifens vor der SDS-PAGE [8, 16]

### 4.3.2.3 Befüllen des Elektrophorese-Tanks

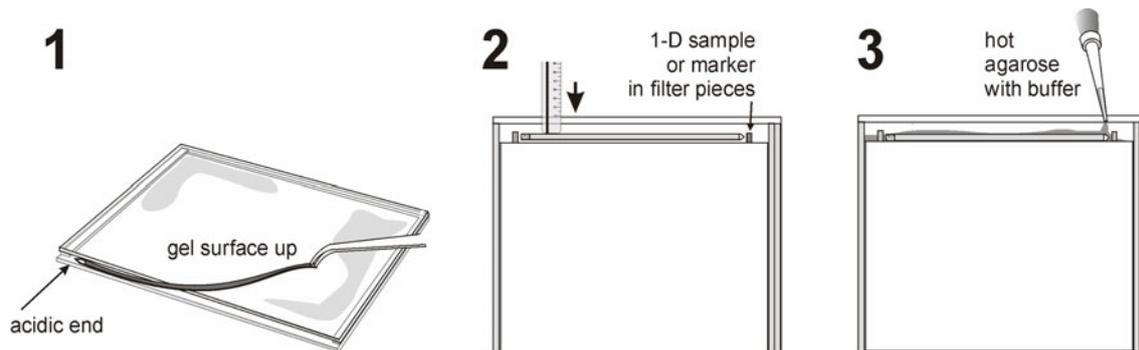
#### Reagenzlösungen

- Tankpuffer-Konzentrat (4-fach konzentriert)  
19,9 g SDS, 58 g Trizma Base und 299,6 g Glycin in 5,0 Liter Millipore-Wasser lösen
- Bromphenolblau-Lösung : (0,25 % Bromphenolblau in Trenngelpuffer)  
25 mg Bromphenolblau in 10 ml Trenngelpuffer lösen
- Agaroselösung  
Man gibt zu 100 ml Tankpuffer 500 mg Agarose und 300 µl Bromphenolblaulösung, kocht die Lösung auf, bis sie klar ist und temperiert sie anschließend im Wasserbad auf 80°C.

IsoDalt: Die Tankkammer wird mit 15 Liter Millipore-Wasser befüllt und daraufhin die Umwälzpumpe eingeschaltet. Im Anschluss gibt man 5 Liter des Tankpuffer-Konzentrats hinzu und durchmischt den Tankpuffer ca. 1 h lang zur Temperierung auf 20°C.

**EttanDalt:** Man befüllt die Tankkammer mit 5,625 Liter Millipore-Wasser, gibt im Anschluss 1,875 Liter des Tankpuffer-Konzentrats hinzu und schaltet die Umwälzpumpe ein. Einbringen der äquilibrierten IPG-Streifen in die Gelkassetten

Zunächst werden die äquilibrierten IPG-Streifen kurz in den Tankpuffer getaucht, um das darauffolgende Einschleiben in die Gießkassette zu erleichtern. Hierzu fasst man den IPG-Gelstreifen mit einer Pinzette an einem Ende und führt den Streifen mit der Gelseite zum Bearbeitenden zeigend und der Kathode nach rechts in die Kassette ein (Abb. 4-13 (1)).



**Abbildung 4-13: Aufbringen des IPG Streifens auf das SDS Gel**

Einbringung (1 und 2) eines IPG-Streifens in ein vertikales SDS-Gel und Fixierung mit Agarose (3) [74]

Mit einem kleinen Spatel kann der IPG-Streifen nun nach unten geschoben werden, bis er auf dem SDS-Gel aufliegt. Rechts neben den Gelstreifen wird nun ein mit zuvor 7  $\mu$ l Molekulargewichtsmarkerlösung getränktes und anschließend getrocknetes Filterpapierstück (5 x 2mm<sup>2</sup>) eingebracht. (Abb. 4-14 (2)). Anschließend fixiert man den IPG-Streifen und das Filterpapierstückchen mit ca. 5 ml ca. 70-80°C heißer Agaroselösung, die nach wenigen Minuten bei Raumtemperatur erstarrt (Abb. 4-13 (3)).

Der aufgezeigte Arbeitsvorgang wird für alle IPG-Streifen durchgeführt.

Daraufhin werden die Gießkassetten in die Tankkammer eingebracht.

**IsoDalt:** Hier ist darauf zu achten, dass die Kassetten mit dem Scharnier nach unten zwischen die Barrierenkämme geschoben werden (Abb. 4-14 A), d.h. der IPG-Streifen steht senkrecht. Der überschüssige Tankpuffer wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

**EttanDalt:** Die Kassetten werden so eingebracht, dass sich der IPG-Gelstreifen am oberen Ende befindet. Zum Schluß wird der Tank noch mit 2 Liter 2-fach konzentriertem Tankpuffer bis zur Markierung aufgefüllt (Abb. 4-14 B).

Der Kammerdeckel wird anschließend geschlossen, und die Elektrophorese gestartet.

#### 4.3.2.4 Laufparameter

Der Proteintransfer vom IPG-Streifen auf das SDS-Gel erfolgt für 1 h bei 50 mA, danach 1 h bei 80 mA. Anschließend wird die Stromstärke auf 160 mA (alle Angaben für 10 SDS-Gele) erhöht. Die Spannung wird auf 200 V begrenzt. Die Trennzeit beträgt bei diesen Parametern etwa 18 h (bei 20°C).

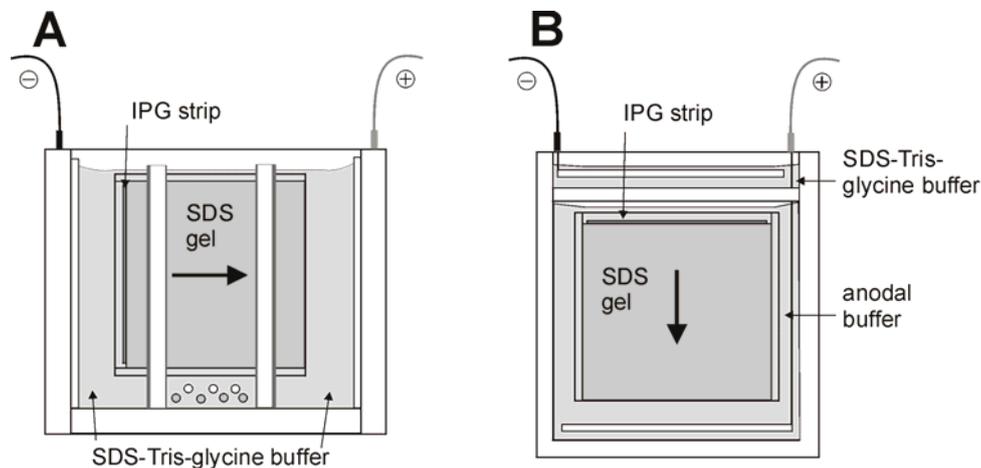


Abbildung 4-14: Prinzipien der vertikalen SDS-Gelelektrophorese [76]

A: IsoDalt, B: EttanDalt

#### 4.3.2.5 Beendigung der SDS-PAGE

Die Trennung wird gestoppt, wenn die Bromphenolblaufront der Agaroselösung das SDS-Gel vollständig durchwandert hat. Daraufhin werden die Kassetten aus dem Tank entnommen und mit einem Spatel vorsichtig geöffnet. Der IPG-Streifen und die Agaroseüberschichtung werden entfernt, und das Gel in eine Glaswanne mit Fixierlösung überführt.

#### 4.4 Isoelektrische Vorfraktionierung in horizontalen Sephadex-IEF Gelen

Diese Proteinvorfraktionierungstechnik auf Basis der präparativen Sephadex-IEF für die 2DE mit IPG-Streifen wurde von *Görg et. al.* [46] erstmals beschrieben. Diese Methode beruht auf einer isoelektrischen Fokussierung mit Trägerampholyten in einem Flachbettgel aus Sepharose.

Ein Teil der Arbeit befasst sich mit der Weiterentwicklung und Verbesserung dieser Technik. Die genaue Beschreibung ist in Kapitel 5-4 zu finden.

#### 4.5 Proteinvisualisierung

Nach Beendigung der SDS-PAGE müssen die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine sichtbar gemacht werden. Dies kann durch Silberfärbung, der Anfärbung mit anionischen Farbstoffen (z.B. Coomassie Blau) oder durch Fluoreszenzdetektion erfolgen.

#### 4.5.1 Silberfärbung nach Blum *et al.* (modifiziert)

##### Reagenzlösungen :

- Fixierlösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure)  
1 Liter Lösung: 400 ml Ethanol mit 100 ml Eisessig und 500 ml Millipore-Wasser mischen
- Sensitivierlösung (0,02% Natriumthiosulfat)  
200 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat in 1 Liter Millipore-Wasser lösen
- Silbernitratlösung (0,2 % Silbernitrat, 0,02 % Formaldehyd)  
2 g Silbernitrat in 1 Liter Millipore-Wasser lösen und kurz vor Gebrauch mit 0,2 ml Formaldehyd-Lösung (37%-ig) versetzen
- Entwicklerlösung (3% Natriumcarbonat, 0,05 % Formaldehyd, 0,005 % Natriumthiosulfat)  
30 g Natriumcarbonat und 5 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat in 1 Liter Millipore-Wasser lösen und unmittelbar vor Gebrauch 0,5 ml Formaldehyd (37%-ige Lsg.) hinzufügen.
- Stopplösung (0,5 % Glycin)  
5 g Glycin in 1 Liter Millipore-Wasser lösen

Pro 2DE-Gel werden 500 ml der jeweiligen Lösungen benötigt.

##### Durchführung

Die Durchführung der Färbung erfolgt entsprechend dem in Tabelle 4-5 aufgeführten Protokoll.

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit
Fixieren	Fixierlösung	> 3 h
Waschen	30% Ethanol	20 min
Waschen	15% Ethanol	20 min
Waschen	Millipore-Wasser	20 min
Sensitivieren	Sensitivierlösung	1 min
Waschen	Millipore-Wasser	3 x 20 s
Imprägnieren mit Silbernitrat-Lösung	Silbernitratlösung	Mind. 20 min
Waschen	Millipore-Wasser	3 x 20 s
Entwickeln	Entwicklerlösung	2-5 min
Waschen	Millipore-Wasser	20 s
Stoppen	Stopplösung	Mind. 5 min
Lagerung	Millipore-Wasser	-

**Tabelle 4-5: Silberfärbeprotokoll nach Blum *et al.* (modifiziert)[77]**

### 4.5.2 Coomassie Brillant Blau Färbung

Die verwendeten Färbemethoden sind kolloidale CBB-Färbungen, basierend auf der Methode von Neuhoff *et. al.* [78, 79]

Nach einer mindestens dreistündigen Fixierung in 40% Ethanol und 10% Essigsäure wird das Gel in 500 ml der Färbelösung gelegt, und die Proteine mindestens 3 Stunden angefärbt. Die Entfärbung findet in mehreren Schritten durch 25% Ethanol und 8% Essigsäure statt. Als Färbelösung wurde zunächst RotiBlue G-250 (Fa. Roth) verwendet. Dazu wurden 100 ml des 5-fach Konzentrats in 300 ml H<sub>2</sub>O und 100 ml Methanol verdünnt.

Alternativ wurde die Coomassie Färbemethode *Blue Silver* verwendet [80]:

- 200 ml Millipore H<sub>2</sub>O + 100 ml H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (85%ig) + 100 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lösen
- 1,2 g Coomassie G-250 zugeben und lösen
- 600 ml Millipore H<sub>2</sub>O zugeben
- 200 ml Methanol zugeben (unter Rühren)

Die Färbung erfolgte wie oben unter „Roti Blue“ beschrieben. Die Coomassie-Blau-Färbung wurde immer dann gewählt, wenn die Proteine anschließend mit MALDI-MS identifiziert wurden.

### 4.5.3 SYPRO Ruby Färbung

Die Gele wurden entsprechend dem Protokoll von Molecular Probes angefärbt. Nach Fixierung in 40% Ethanol und 10% Essigsäure wurden auf jedes 2D-Gel 300ml der unverdünnten Färbelösung gegeben. Nach der Färbung über Nacht wurden die Gele laut Protokoll eine Stunde mit 10% Ethanol und 7% Essigsäure entfärbt und danach eingescannt. Da SYPRO Ruby sehr leicht von Glas absorbiert wird, sollten für diese Färbungen unbedingt Behälter aus Polypropylen verwendet werden.

Eine kostengünstigere Möglichkeit stellt die Färbung mit Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate, welches der Grundstoff von SYPRO Ruby ist) dar, wie von Lamanda *et. al.* beschrieben [81].

## 4.6 Geltrocknung

2D-Gele müssen, um eine Zerstörung zu verhindern, vor der Lagerung speziell getrocknet werden.

### Reagenzlösung:

- Schrumpflösung (30% Ethanol, 10% Glycerin)  
100 g Glycerin und 300 ml Ethanol mit Millipore-Wasser auf 1 Liter auffüllen

## Durchführung

Nach dem Einscannen wird ein Gel ca. 8 - 10 min in 500 ml Schrumpflösung geschüttelt. Zusätzlich werden pro Gel zwei Cellophanfolien in einer weiteren Glaswanne ebenfalls in die Schrumpflösung eingelegt. Im Anschluss daran spannt man ein Gel feucht zwischen die beiden Cellophanfolien auf einen Rahmen. Dabei ist es wichtig, die eingeschlossene Flüssigkeit mit einem Glasstab herauszudrücken, um spätere Risse im Gel zu vermeiden. Die Gele werden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet (vorteilhafterweise mit einem Ventilator) und danach zur Aufbewahrung in eine Klarsichtfolie eingeschweißt.

## 4.7 Difference Gel Elektrophoresis (DIGE)

Das Prinzip der DIGE-Technologie wurde bereits in Kap. 3-7 näher erläutert. Zunächst werden die Proteine vor der 2DE mit CyDye Farbstoffen *gelabelt*. Bei der Methode des *minimal labeling* wird nur ein Lysinrest eines Proteins, und nur ca. 3% sämtlicher Proteine im Extrakt *gelabelt*. Durch dieses *labeling* ändert sich der isoelektrische Punkt des Proteins nicht signifikant, und seine Masse erhöht sich nur um ca. 450 Da. Dadurch wird sichergestellt, dass sich das Proteinmuster im Vergleich zu den mit Coomassie Blau gefärbten Gelen nicht signifikant verändert, was die Zuordnung der Spots erleichtert. Dies steht im Gegensatz zum Sättigungslabelling, bei dem sich die Masse der Proteine stark verändert. Nach dem *labeling* wurden gleiche Proteinmengen der verschiedenen Extrakte gemischt und davon eine 2DE durchgeführt.

### 4.7.1 Proteinsolubilisierung für DIGE

Die Proteinextrakte wurden wie in 4.2 beschrieben hergestellt. Anschließend wurden die Extrakte mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde danach mit Hilfe des 2DE-QuantKit bestimmt. Ein Unterschied besteht zu der normal üblichen Extraktion: Der verwendete Lysispuffer darf weder DTT noch Pharmalyte enthalten, da diese die Reaktion der CyDye Farbstoffe mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin aufgrund ihrer Eigenschaft als Reduktionsmittel (DTT) oder primäres Amin (Pharmalyte) beeinträchtigen. Aus diesem Grund wurden diese Stoffe erst nach der *labeling* Reaktion zugegeben. Das pH-Optimum für die *labeling* Reaktion beträgt 8,5. Dieser pH-Wert wurde durch Zugabe von 30 mM Tris in den Lysispuffer eingestellt.

### 4.7.2 Fluoreszenzlabeling für DIGE

Die CyDye Farbstoffe wurden vor ihrem ersten Gebrauch in DMF aufgenommen. Das DMF sollte möglichst frisch sein (nicht älter als drei Monate), da es nach einiger Zeit in Aminkomponenten zerfällt die die *labeling* Reaktion stören. Die gelösten CyDyes sind bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für maximal 6 Monate haltbar. Direkt vor dem *labeling* wurden die Farbstoffe mit DMF auf eine Konzentration von 0,4 mM verdünnt. 50

$\mu\text{g}$  der Proteinprobe wurden unter Kühlung der Probe auf Eis mit 400 pmol des CyDyes gemischt. Die *labeling* Reaktion fand anschließend im Dunkeln für 30 Minuten statt. Durch Zugabe von 10 mM Lysin pro 400 pmol CyDye wurde die Reaktion gestoppt. Nach weiteren 10 Minuten auf Eis wurde 1  $\mu\text{l}$  50% DTT und 1  $\mu\text{l}$  Pharmalyte (pH 3-10) pro 50  $\mu\text{l}$  der Probenlösung zugegeben. Anschließend wurden die Proben sofort für 2DE-Gelelektrophorese verwendet.

Nach dem *labeling* wurden die verschiedenen Extrakte gemischt und der interne gepoolte Protein-Standard (IPS) zugegeben. Die zu vergleichenden Extrakte wurden zuvor mit Cy3 oder Cy5 *gelabelt*. Der IPS wurde mit Cy2 *gelabelt*. Der IPS bestand aus der vereinten Mischung der eingesetzten Extrakte. Die jeweils eingesetzte Proteinmenge der Extrakte im IPS war identisch.

### 4.7.3 2DE-Gelelektrophorese der DIGE-Proben

IEF, Äquilibrierung und SDS-PAGE wurden im Wesentlichen unter den in Kapitel 4-3 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die hauptsächlichen Unterschiede bestehen in der Verwendung von *low-fluorescent* Glasplatten, da die Gele in den Glaskassetten gescannt wurden und die Eigenfluoreszenz der normalen Glasplatten Signale überlagern können. Der zweite Unterschied ist der Ausschluss von Licht während der IEF und der zweiten Dimension zur Vermeidung von irreversiblen Reaktionen der CyDyes mit Licht (*photo-bleaching*).

## 4.8 Proteinidentifizierung mittels MALDI-MS

### 4.8.1 Probenvorbereitung

Nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Blau wurden die zu identifizierenden Spots von Hand gepickt. Dazu wurden Pipettenspitzen mit einem Skalpell auf den jeweilige Spottedurchmesser zugeschnitten und der Spot ausgestanzt. Anschließend wurde der Spot in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Die aus den 2D-Gelen ausgestanzten Spots wurden zunächst mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  Entfärbelösung (50% Acetonitril (v/v), 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) dreimal für 20 Minuten bei 37°C und 300 rpm im Thermomixer (Eppendorf) gewaschen. Nach dem Entfernen der letzten Entfärbelösung wurden die Proben 30 Minuten lang in der SpeedVac vollständig getrocknet. Danach wurden die Proben mit 10  $\mu\text{l}$  Trypsinlösung (20  $\mu\text{g}$  Trypsin in 100  $\mu\text{l}$  1 mM HCl und 1500  $\mu\text{l}$  25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Die Elution der restlichen Peptide aus dem Gelstück erfolgte mittels 30  $\mu\text{l}$  Elutionlösung (50% Acetonitril (v/v) und 0,5% (v/v) TFA). Diese Lösung wurde in das Gefäß mit dem Gelstück gegeben und 20 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Dieser Überstand wurde mit dem Überstand des tryptischen Verdauens vereint und 90 Minuten in der SpeedVac vollständig getrocknet. Nicht zur sofortigen Messung benötigte Proben wurden bei -20°C eingefroren. Vor der Messung wurde die Probe in 5  $\mu\text{l}$  Elutionslösung aufgenommen

und 5 Minuten im Ultraschallbad gelöst. Zur Kristallisation der Matrix wurde die *Dried Droplet* Methode verwendet. Es wurden 0,5 µl der Probe mit 0,5 µl der Matrix (2mg/ml CHCA, 50% (v/v) Acetonitril, 0,1% (v/v) TFA und 10 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) [82] gemischt und unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurden die getrockneten Spots mit 1,5 µl Waschpuffer (2 mg/ml Diammoniumcitrat) [82] für 5 Sekunden gewaschen und danach die Flüssigkeit wieder abgezogen.

#### 4.8.2 MALDI-MS Parameter

Die externe Kalibrierung des Ettan MALDI-ToF-Pro Massenspektrometers erfolgte durch ein Gemisch aus Bradykinin Fragment 1-7, Angiotensin II (human), P<sub>14</sub>R und ATCH Fragment 18-39 (human) und wurde alle zwei Wochen durchgeführt. Die interne Kalibrierung der Proben erfolgte durch die Eigenverdauprodukte von Trypsin: Trypsin II und Trypsin IV. Die weiteren Einstellungen sind in Tabelle 4-6 wiedergegeben.

Detection mode	Reflectron	
Low mass rejection	500 m/z	
Laser mode	8 Shot	
Acceleration potential	20 kV	
Pulsed extraction / Focus mass	On / 2000 m/z	
Target Region / Auto adjust	30% / On	
Laser Power / Auto adjust	47% / Off	
Accumulated Shots	300	
Selective Accumulation	On	
Parameters	Mass	Intensity
Min.	800 m/z	8
Max.	4000 m/z	100

**Tabelle 4-6: MALDI Parameter für das Ettan MALDI-ToF-Pro**

#### 4.8.3 Proteinidentifizierung

Die Proteinidentifizierung fand durch Vergleich mit der NCBI Datenbank Coryne 150104 (Kalinowski Annotation) statt. Ein Protein wurde als identifiziert angesehen, wenn mindestens 5 Peptide zugeordnet werden konnten und zusätzlich die *Expectation* (d.h. Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Ergebnisses) unter 0,05 lag.

## 4.9 Computergestützte Auswertung der 2DE-Gele und Proteinmustervergleich

### 4.9.1 Auswertung der 2DE-Gele nach Färbungen

Zur computergestützten Bildauswertung wurde ein Computersystem bestehend aus einem Pentium PC, einem Epson Expression Pro Durchlichtscanner, Amersham Bioscience Typhoon Phosphor-/Fluoreszenzimager und der Auswertungssoftware Quantity One, Labscan v3.0, ImageMaster 2DE Elite v3.1, v4.1 verwendet.

#### 4.9.1.1 Digitalisierung der Gele

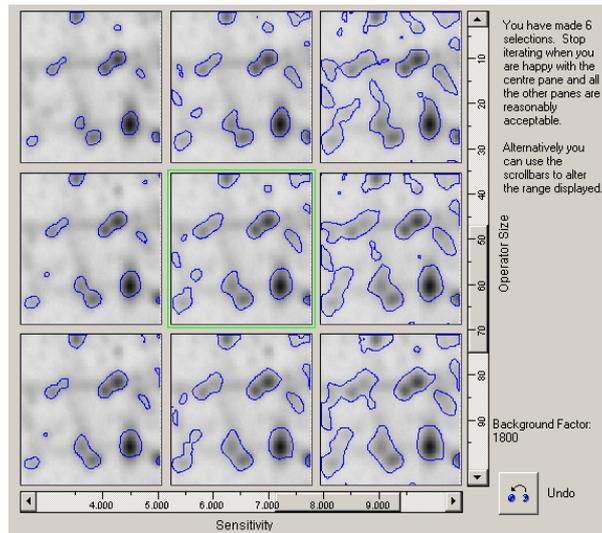
Zur Durchführung quantitativer Analysen ist es notwendig, den Scanner vor dem Betrieb mit einem Graukeil definierter optischer Dichten zu kalibrieren, um gleichbleibende und somit vergleichbare Ergebnisse bei der Auswertung erzielen zu können. Hierzu wird der Graukeil im Durchlichtmodus mit der Software *Labscan* digitalisiert. Anschließend werden die gescannten Graustufen von der Software mit den tatsächlichen Graustufen verglichen und eine densitometrische Ausgleichskurve berechnet.

Die Gele werden zum Digitalisieren luftblasenfrei auf die Glasplatte des Densitometers gelegt und bei 8-bit (bzw. 16-bit) Graustufen und einer Auflösung von 200 dpi gescannt. Anschließend werden die digitalisierten Abbildungen der Gele im Tiff - Format gespeichert.

#### 4.9.1.2 Detektion der Proteinspots

Zur Spoterkennung werden vom Auswertesystem Parameter für Empfindlichkeit, Größe des Operators, Gelhintergrund und Entstörfilter benötigt. Die Wahl der Parameter beeinflusst die Treffgenauigkeit der Spoterkennung. Um die jeweils richtigen Parameter für die eingescannten Gele zu finden bietet die *ImageMaster* Software Hilfsprogramme, wie den sogenannten "Spot Detection Wizard" (siehe Abb. 4-15). Hierbei werden Parameter solange interpoliert und optisch dargestellt, bis ein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht wird.

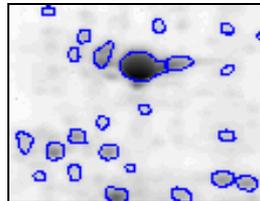
Die Parameter hängen primär von der Art der Digitalisierung der Gele ab. Je nach verwendeter Auflösung benötigt das Auswertesystem unterschiedliche Parameter zur optimalen Spotdetektion. Es ist empfehlenswert, Gelserien immer mit der gleichen Auflösung und mit dem gleichen Scanner zu digitalisieren.



**Abbildung 4-15: „Spot detection Wizard“**

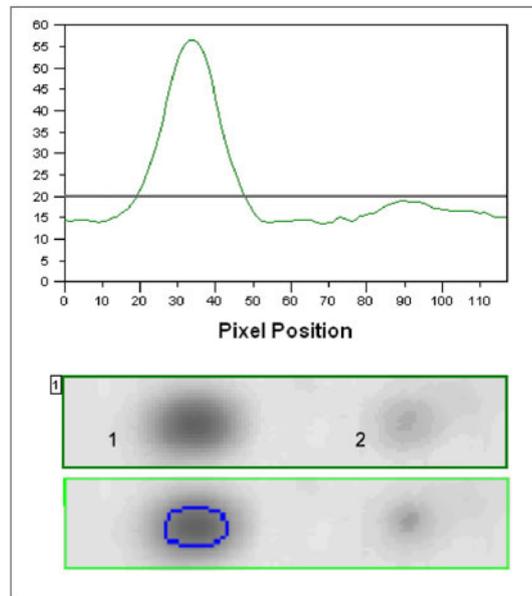
Hilfsprogramm zur Ermittlung der optimalen Parameter für die Spotdetektion mit dem Auswertesystem ImageMaster 2DE-Elite v3.1(GE Healthcare)

Sind geeignete Parameter gefunden, werden sie auf alle Gele der Versuchsserie angewandt. Nach der automatischen Erkennung erscheinen die detektierten Spots wie in Abb. 4-16 farbig umrandet.



**Abbildung 4-16: Detektierte Proteinspots**

Bei der Spotdetektion ist es nötig, einen geeigneten Wert für die Empfindlichkeit und den Hintergrundfaktor für alle Gele einzugeben. Abbildung 4-17 zeigt die Detektion eines Proteinspots (1) dessen Grauwertpeak oberhalb des Hintergrundschwennwertes (in diesem Fall Grauwert=20) liegt, dieser wird als Spot erkannt (blau umrandet). Der Wert von Spot (2) liegt knapp darunter und wird somit vom Auswertesystem nicht als Spot akzeptiert.

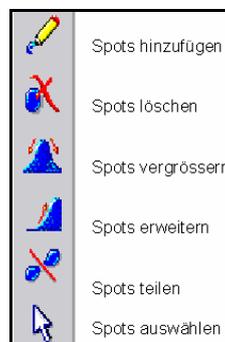


**Abbildung 4-17: Spotdetektion in Abhängigkeit des gewählten Schwellenwerts**

Bei unterschiedlicher Anfärbung von Proteinspots einer Gelserie z.B. durch geringfügig differierende Entwicklungszeiten bei der Silberfärbung kann es vorkommen, dass ein Spot auf dem stärker gefärbten Gel erkannt wird, auf dem schwächer gefärbten jedoch nicht. Daher ist es nötig, die Detektion zu überprüfen und die Gele manuell zu editieren.

#### 4.9.1.3 Editieren der Spots

Aufgrund der Limitationen der Image-Analyse Software ist es unwahrscheinlich, dass alle Spots korrekt identifiziert werden. Des Weiteren werden leichte Verunreinigungen des Gels als mögliche Proteinspots erkannt. Demzufolge muss das Bild in der Regel manuell nachbearbeitet werden. Dafür bietet das Bildauswertungssystem ImageMaster 2DE Elite Korrekturmöglichkeiten, die es erlauben, Spots hinzuzufügen, zu löschen, zu erweitern, zu teilen und zu verkleinern (Abbildung 4-18).

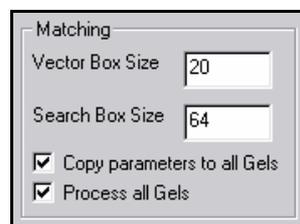


**Abbildung 4-18: Werkzeuge zur manuellen Nachbearbeitung der detektierten Spots**

Die Nachbearbeitung der Spots ist der für den Anwender arbeitsintensivste Abschnitt. Dabei liegt die Dauer des Editierens der Spots, je nach verwendetem Auswerteprogramm, Anzahl der auf dem Gel befindlichen Spots und des Ergebnisses der automatisierten Spotdetektion, bei 2-6 Stunden pro 2D-Elektrophoresegel.

#### 4.9.1.4 Spotmustervergleich mit anderen Gelen (Matching)

Wurden alle Gele editiert, kann der Proteinmustervergleich innerhalb einer Gelserie durchgeführt werden. Beim Vergleich der Gele wird nach unterschiedlichen Proteinen innerhalb der Gelserie gesucht. Dabei ist es notwendig, ein Gel als Referenzgel zu definieren. Dieses Gel wird anschließend mit den übrigen Gelen des Versuchs verglichen. Auch bei dem Spotmustervergleich (Matching) ist es nötig, Parameter für die Suchfunktion anzugeben (Abbildung 4-19). In den Versuchsreihen wurden folgende Parameter verwendet: *Vector Box Size*: 20 und *Search Box Size*: 64

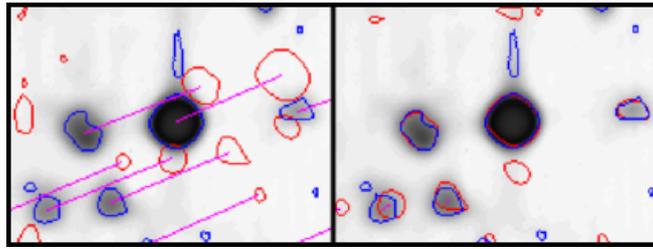


**Abbildung 4-19: Verwendete Parameter für den Spotmustervergleich**

Der Proteinmustervergleich läuft nach Angabe der Parameter automatisch ab. Da eine Verschiebung der Spotposition innerhalb einer Gelserie durch experimentelle Einflüsse (z.B. Schrumpfen der Gele) unvermeidbar ist, enthält das Auswertesystem Funktionen, die es ermöglichen, diese Positionsabweichungen auszugleichen. Die Spots werden demnach auf ihre relative Position zueinander verglichen, da sich die Spotmuster selbst durch die Versuchsbedingungen nur geringfügig ändern. Nach dem Mustervergleich (Matching) ist es nötig, die gefundenen Übereinstimmungen (d.h. die Trefferquote) zu kontrollieren und eventuell falsch zugeordnete Spots manuell zu korrigieren.

Hierbei ist es möglich (und meistens auch nötig) Fixpunkte („Seed“ bzw. „Landmarks“) identischer Proteinspots auf alle Gele zu setzen (sinnvoll sind ca. 50 Fixpunkte auf einem 25cm x 20cm großen Gel), d.h. Spots manuell einander zuzuordnen. Die Fixpunkte sollten gleichmäßig über das gesamte Gel verteilt sein. Das Markieren der ca. 50 Fixpunkte nimmt pro Gel in etwa 15-30 Minuten Arbeitszeit in Anspruch.

Das Bildauswertesystem bietet zu diesem Arbeitsschritt Kontrollfunktionen an, die erkennen lassen, ob die Proteinspots untereinander richtig zugeordnet wurden. Zum Beispiel wird das Spotmuster des Referenzgels mit der Funktion "Overlay Warping" so verzerrt, dass richtig zugeordnete Spots deckungsgleich dargestellt werden (Abbildung 4-20).



**Abbildung 4-20: Overlay warping**

Links: Darstellung der Spotmuster ohne Warpingfunktion / Rechts: Spotmuster mit Warpingfunktion

Mit einer der Vektorfunktionen kann die Abweichung, also der Versatz der Spotkoordinaten der Elektrophoresegele im Vergleich zum Referenzgel, angezeigt werden. Dieser Versatz wird mit Hilfe von Linien (Vektoren) dargestellt, die in der Spotmitte beginnen und durch ihre Länge und Richtung Auskunft über die Verschiebungen der einzelnen Proteinspots geben.

Bei der Kontrolle muss nun geprüft werden, ob die Linien in jedem Abschnitt des Gels tendenziell in dieselbe Richtung weisen und möglichst gleich lang sind (idealerweise sind die Linien in benachbarten Gelbereichen parallel und etwa gleich lang). Kreuzen sich Linien oder treten Linien auf, die im Vergleich zu den umgebenden auffallend länger oder kürzer sind, besteht der Verdacht einer falschen Zuordnung.

Treten Fehler bei dem Proteinmustervergleich auf, so können die Zuordnungen auch einzeln manuell korrigiert werden. Bei mehreren Falschidentifizierungen der Spots ist es jedoch genauer und einfacher, das Bildauswertesystem die Korrekturen selbst vornehmen zu lassen. Dazu müssen in den Gelabschnitten, in denen Fehler beobachtet wurden, weitere Referenzpunkte (Landmarks) eingefügt werden, und der Vergleichsalgorithmus erneut gestartet werden.

Sind alle Kriterien erfüllt, können die Daten der untersuchten 2DE-Elektrophoresegele ausgewertet werden. Qualitative und quantitative Unterschiede werden als Histogramme in Tabellen oder direkt als farbige Markierung im Gelabbild angezeigt. Zusätzlich ist es jederzeit möglich, weitere Gele in ein vorhandenes Matchset aufzunehmen und mit dem Standardgel zu vergleichen. Abschließend ist es möglich, Datenbanken der untersuchten Gelserien anzulegen. Außerdem können Proteinspots mit Annotationen versehen, XML- bzw. HTML-Dateien generiert und Internetverknüpfungen zu Proteindatenbanken erstellt werden.

#### 4.9.1.5 Dual Channel Imaging

Mit Bildbearbeitungssystemen wie Adobe Photoshop oder Micrografix Picture Publisher ist es möglich, mit Hilfe des additiven Farbmodells die Farbdarstellung zu ändern. Das additive Farbmodell basiert auf den drei Farben rot, grün und blau, den sogenannten Primärfarben oder Kanälen (siehe Abbildung 4-21) Werden diese drei Primärfarben in verschiedenen Prozentanteilen gemischt, kann jede beliebige Farbe erzeugt werden. Wenn die Farben Rot und Grün gemischt werden, erhält man zum Beispiel die Farbe gelb. Alle drei Primärfarben kombiniert ergeben in der Addition die Farbe Weiß.

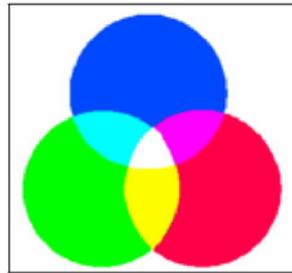


Abbildung 4-21: Additives Farbmodell und Farbmischung

Es können mit Hilfe der Software Graustufenbilder digital in Primärfarbstufen, wie in Abbildung 4-22 gezeigt, umgewandelt werden.

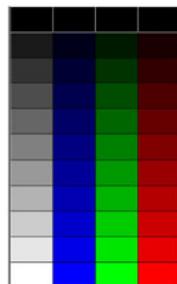
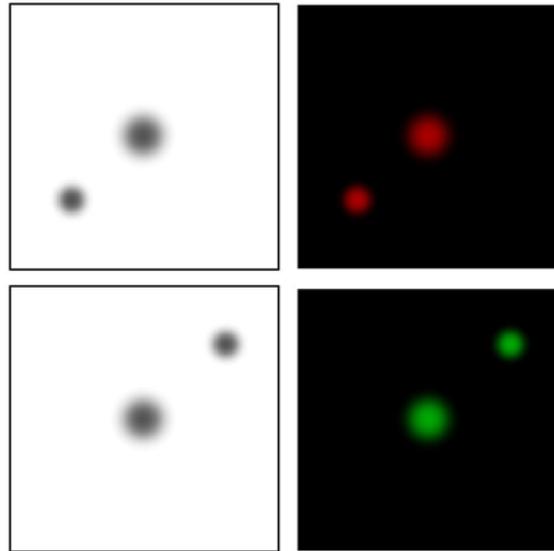


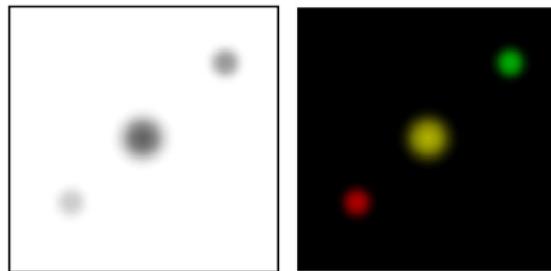
Abbildung 4-22: Konvertierung von Grau in RGB-Farbstufen

Im folgenden Beispiel (Abbildung 4-23) wurden die 8-bit Graustufenbilder zunächst in 8-bit Grün- bzw. 8-bit Rotstufen konvertiert.



**Abbildung 4-23: Umwandlung von Grau- in Rot- bzw. Grünstufen zur digitalen Überlagerung unterschiedlicher 2D-Gele**

Um qualitative Unterschiede im Proteinmuster auf einfache Weise zu finden, können diese Bilder im Computer digital überlagert, und eine Farbaddition durchgeführt werden (Abbildung 4-24).



**Abbildung 4-24: Farbaddition digital überlagerter 2D-Gel Images**

Dabei entsteht bei übereinstimmenden Mustern die jeweilige Mischfarbe, in diesem Fall aus Rot und Grün die Farbe Gelb. Zudem bleiben die jeweiligen Unterschiede farblich erkennbar und können dem ursprünglichen Bild bzw. Gel zugeordnet werden.

Diese Technik ist für den visuellen Vergleich digitalisierter Elektrophoresegele von Nutzen, um Unterschiede der Proteinexpression zwischen zwei Gelen auf einfache Weise zu untersuchen und zu dokumentieren. Es ist außerdem möglich zwei verschiedene Proben auf einem einzigen Gel zu trennen und anzufärben. Zum Beispiel lassen sich *in vivo* radioaktiv markierte Proteinproben gestresster Zellen zusammen mit unmarkierten Proteinproben ungestresster Zellen mischen. Nach elektrophoretischer Trennung der Proteine und Digitalisierung der Gele nach Färbung und Exposition, ist es möglich, das Autoradiogramm und das Bild des gefärbten Gels zu überlagern und Stressproteine auf einfache Weise zu identifizieren [83]. Manche kommerziellen Auswertesysteme wie Definiens ProteomeWeaver, Decodon Delta2D oder Compugen Z3 haben diese Technik bereits implementiert.

## 4.10 Auswertung der 2DE-Gele nach Fluoreszenzmarkierung

### 4.10.1 Scannen der DIGE Gele

Nach der zweiten Dimension (SDS-PAGE) wurden die Gele in der Glaskassette gescannt. Dadurch, dass sie noch in der Kassette verblieben, wurde sichergestellt, dass sämtliche Gele dieselben Dimensionen hatten, welches das Spot *matching* der verschiedenen Gele erheblich erleichterte. Die Glasplatten wurden mit destilliertem Wasser und einem fusselreien Tuch abgewischt und anschließend im Amersham Bioscience Typhoon 9400 Phosphor-/Fluoreszenzimager Variable Mode Imager digitalisiert. Die drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (Tab. 4-7) wurden dabei nacheinander angeregt.

Fluorophor	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Emissionsfilter [nm]	verwendeter Laser
Cy2	489	506	500 - 540	Blue2 (488)
Cy3	550	570	565 - 595	Green (532)
Cy5	649	670	655 - 685	Red (633)

**Tabelle 4-7: Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (CyDyes) [84], [85]**

Für jeden verwendeten Fluorophor wurde ein separates Bild erstellt und als Datei auf dem Computer abgespeichert. Durch einen Vor-Scan mit einer Auflösung von 1000  $\mu\text{m}$  pro Pixel werden die entsprechenden Scan-Parameter überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die Spannung am Photomultiplier wurde so eingestellt, dass der lineare Bereich (fünf Zehnerpotenzen) maximal ausgenutzt werden konnte. Dies wurde mittels der ImageQuant Software überprüft. Die Höhe der Intensitäten der Fluoreszenzfarbstoffe durfte einen Wert von 100.000 Einheiten nicht übersteigen. War dies der Fall, so musste die Spannung am Photomultiplier (PMT) gesenkt werden. Wenn der lineare Bereich nicht ganz ausgenutzt wurde, so musste die PMT gesteigert werden. Anschließend wurden die Gele mit Hilfe der gleichen Software virtuell zugeschnitten. Durch das Zuschneiden konnten Bereiche (z.B. unterer Gelrand), in denen sonst nur Artefakte erkannt werden konnten, von der Detektion mit der DeCyder Software ausgeschlossen werden. Danach wurde der Haupt-Scan mit einer Auflösung von 100  $\mu\text{m}$  pro Pixel durchgeführt.

### 4.10.2 Imageanalyse mittels DeCyder Software

Die Auswertung der Bild-Daten erfolgt mit Hilfe der DeCyder<sup>TM</sup>-Software. In einem ersten Schritt werden die drei Bild-Dateien eines Gels in das DIA-Modul (*Differential In-gel Analysis*) der Software geladen, prozessiert und quantifiziert. Die Spotdetektion erfolgt über die Einstellung eines einzigen Parameters, der Anzahl der erwarteten Spots. Ein Wert von 2500 erwies sich dabei als vorteilhaft, da bei höheren Werten viele Artefakte detektiert wurden. Bei niedrigeren Werten wurden dagegen einige Spots nicht er-

kannt. Nachdem die Anzahl der detektierten Spots von der Software ermittelt sind, werden die erhaltenen Rohdaten durch die Verwendung entsprechender Filter ( $Slope \geq 1,1$ ;  $Area \leq 100$ ;  $Peak Height \leq 100$ ;  $Volume \leq 10000$ ) vorselektiert. Vermeintliche Proteinspots, wie z. B. Staubpartikel, werden somit von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden die generierten Daten in das BVA-Modul (*Biological Variation Analysis*) der Software geladen, mit dessen Hilfe die einzelnen quantifizierten 2DE-Gele verglichen und ausgewertet wurden. Zunächst wird die Lage der Proteinspots zwischen den einzelnen Gelen abgeglichen (*Matching*). Dies wurde bei 40 zufällig ausgewählten Spots überprüft, ob die Zuordnung korrekt war. Wenn dies der Fall war, wurde das Gel als korrekt abgeglichen angesehen. Im Falle von einander falsch zugeordneten Spots wurden die Fehler korrigiert, und die Zuordnung nach dem Markieren von Spots, die auf allen Gelen vorhanden waren und somit als Orientierungspunkte („*landmarks*“) für die Software dienen konnten, neu durchgeführt. Die anschließende statistische Analyse erfolgt ausschließlich auf Grundlage des verwendeten internen Standards [86]. Dieser wird durch die Software zwischen den einzelnen Gelen eines Experiments normalisiert. Durch die Vorgabe bestimmter Kriterien z.B. *Average Ratio* (bei denen die der Quotient der Fluoreszenzintensität der Cy3 und Cy5 gelabelten Extrakte einen Wert von 2 überschritt) und der t-Test (statistischer Test, mit dessen Hilfe ausgesagt werden kann, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass der Mittelwert der erhaltenen Werte in einem Intervall von hier 0,5% um den wahren Mittelwert liegt) einen Wert unter 0,005 haben musste, wurden aus den analysierten Daten differentiell exprimierte Spots ermittelt.

Danach wurden die Gele mit Coomassie-Blau angefärbt und die differentiell exprimierten Spots gepickt. Diese wurden durch anschließende MALDI-MS analysiert und dann mit Hilfe von Datenbanken identifiziert.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Die 2D-Elektrophorese mit weiten pH-Gradienten (z.B. IPG 3-11) in der ersten Dimension (IEF) eignet sich hervorragend für die Analyse sehr kleiner Proteome (z.B. von *Mycoplasma genitalium*) oder von Subproteomen (z.B. Mitochondrien). Allerdings reicht das erzielbare Auflösungsvermögen für die Analyse komplexer Proteome, insbesondere von eukaryotischen Organismen, in aller Regel nicht aus. Zusätzlich wird aufgrund von co- und posttranslationalen Modifikationen und differentiellem Gen-Splicing eine größere Zahl an Proteinen exprimiert, als dies die Zahl der offenen Leserahmen (ORFs) allein erwarten ließe. Die Folge ist eine Co-Migration von Proteinen mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften ( $pI$ ,  $M_r$ ), was deren Trennung und Identifizierung erheblich erschwert. Die mit der Analyse komplexer Proteome verbundenen Schwierigkeiten lassen sich durch die Verwendung enger (1-2 pH Einheiten) oder ultraenger ( $< 1$  pH Einheit) IPGs verringern, wenn auch nicht vollständig beseitigen, denn Sie bieten gewissermassen eine „Zoom-in-Funktion“ an, mit deren Hilfe man überladene Regionen auf 2DE-Gelen erheblich besser auflösen kann.

Ein Großteil der vorliegenden Arbeit konzentriert sich auf die Analyse des sauren und neutralen pH-Bereichs des *C. glutamicum* Proteoms, da in diesem Bereich die größte Zahl an Proteinen bzw. Proteinclustern zu finden ist. Zunächst wurde systematisch untersucht, inwiefern sich eine verbesserte Trennung und Sichtbarmachung des sauren und neutralen *C. glutamicum* Proteoms durch eine Kombination unterschiedlich enger, überlappender IPGs erzielen lässt, welche in ihrer Summe einen nichtlinearen pH-Gradientenverlauf ergeben. Diese „maßgeschneiderten“ IPGs wurden optimal an die aus der Genom-Sequenz abgeleitete hypothetische Proteinverteilung des *C. glutamicum* Proteoms angepasst, wodurch wir in der Lage waren, Bereiche mit hoher Proteinanzahl zu „spreizen“, und Bereiche mit geringer Proteinanzahl ohne erkennbare Einbuße an Auflösungsvermögen zu komprimieren. Durch die Konstruktion unterschiedlich weiter IPGs sowie durch einen relativ kurzen Überlappungsbereich der einzelnen Gele wurde außerdem erreicht, dass für die Abdeckung des Bereichs von pH 3.5 bis 7 nur zwei IPGs benötigt werden, was vor allem in der Routineanalytik und für physiologische Studien mit hohem Probenaufkommen von großem Vorteil ist. Ein weiterer Teil dieser Optimierungsschritte konzentrierte sich auf das basische Proteom von *C. glutamicum*, welches nahezu ein Drittel des Gesamtproteomes ausmacht und von dem bis *dato* noch keine detaillierten Informationen vorlagen. Diese Untersuchungen führten erstmals zur Erstellung einer 2DE Referenzkarte und einer Proteindatenbank des stark alkalischen *C. glutamicum* Proteoms.

Um die Syntheseleistungen von Produktionsstämmen, z.B. durch "Protein Design" oder "Metabolic Engineering" gezielt zu verbessern, sind umfassende Kenntnisse des Stoffwechsels und dessen Regulation erforderlich. Hierfür kommen heutzutage in einem systembiologischen Ansatz die sogenannten „-omics“- Technologien (d.h., Genomik, Transkriptomik, Proteomik, Metabolomik) zum Einsatz. Für

eine komplette Analyse des *C. glutamicum* Proteoms reicht die 2DE allein jedoch nicht aus, da Proteine, die in der Zelle nur in geringer Kopienzahl vorkommen (die sogenannten „low-abundance“ Proteine) entweder überhaupt nicht oder nur unzureichend erfasst werden. Eine Möglichkeit der Darstellung dieser Proteine ist der Einsatz von Vorfraktionierungsverfahren. Durch Kombination „maßgeschneiderter“ IPGs und der dadurch bestehenden Möglichkeit einer genau auf das *C. glutamicum* Proteom abgestimmten „Zoom-In-Funktion“ in Verbindung mit einer Vorfraktionierung auf Basis der Sephadex-IEF konzentrierten wir uns im zweiten Teil der Arbeit auf das Auffinden von niedrig-abundanten Proteinen, da diesen Proteinen z.B. in der Signaltransduktion und der Regulation von Stoffwechselwegen eine herausragende Rolle zukommt.

Im letzten Teil dieser Arbeit werden schließlich modernste Analyseverfahren (2D DIGE) zur vergleichenden Proteomanalyse des Wildtyps und eines Produktionsstamms von *C. glutamicum*, sowie zum Vergleich der Proteinexpressionsmuster nach Anzucht auf unterschiedlichen Nährmedien und C-Quellen eingesetzt, um eventuell neue potentielle Zielproteine ("Targets") zur Verbesserung der Produzenten-Stämme zu finden. Qualitative vor allem aber quantitative Vergleiche der Proteinexpressionsmuster von Produktionsstämmen mit dem des Wildtyps können Aufschlüsse über mögliche Engpässe ("Bottlenecks") in den Stoffwechselwegen geben und somit letztlich zur Entwicklung leistungsfähigerer Produktionsstämmen beitragen.

## 5.1 Optimierungstrategien

Zur möglichst umfassenden Darstellung des *C. glutamicum* Proteoms musste zunächst sowohl eine Optimierung der Proteinextraktion als auch der elektrophoretischen Auftrennung (Trennparameter, IPGs etc.) durchgeführt werden. Im Folgenden sollen einige Strategien zum Erzielen optimaler Trennergebnisse kurz erläutert werden. Hierzu zählen zum z. B. die Gewinnung der entsprechenden Proteinextrakte, die Ermittlung der optimalen Proteinkonzentration, die Auswahl der geeigneten Immobiline und nicht zuletzt Herstellung und Einsatz geeigneter IPGs für die 2D-Elektrophorese.

### 5.1.1 Proteinsolubilisierung

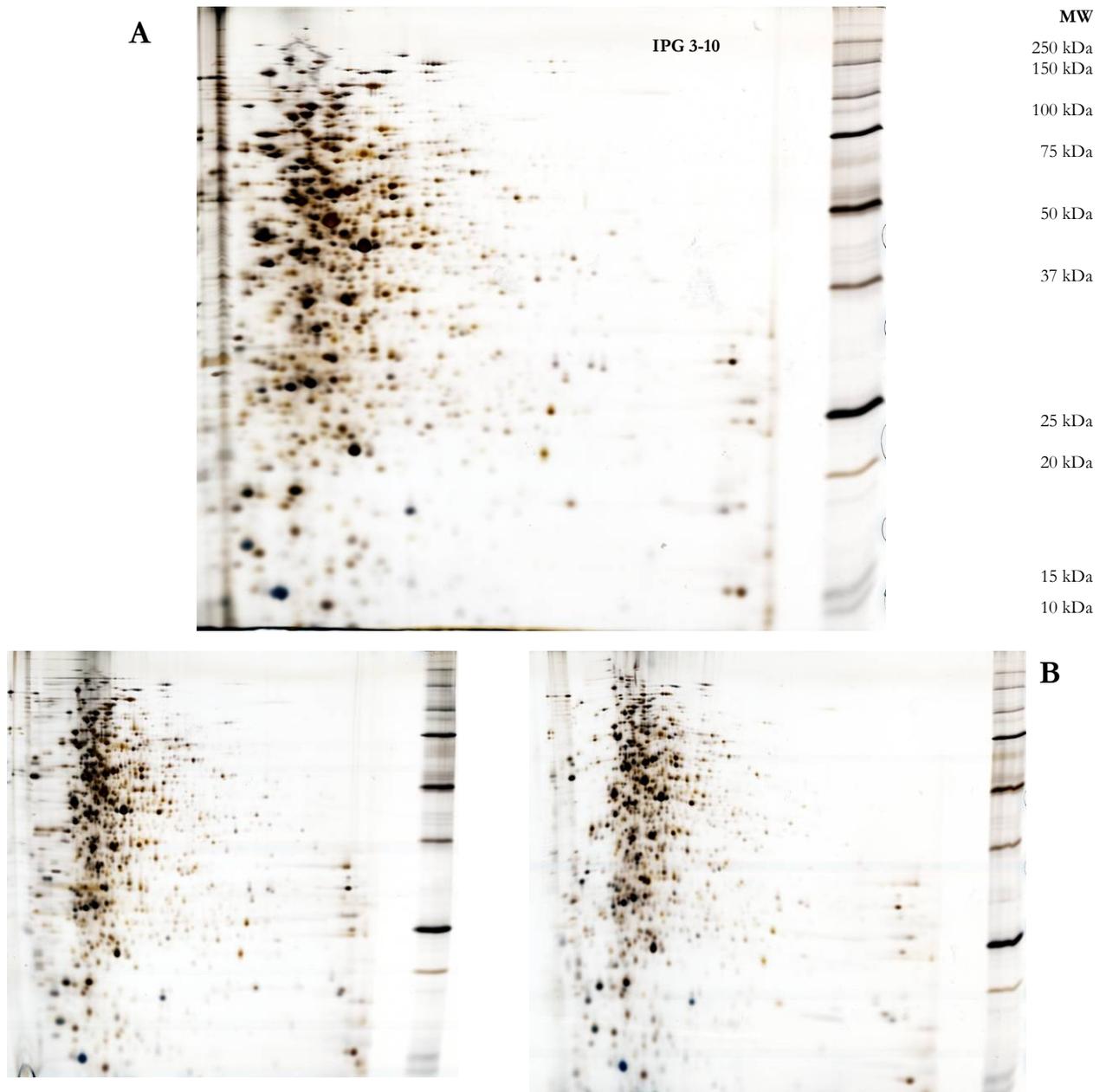
Von der Firma Degussa wurden uns im Rahmen eines BMBF Projektes (Teilprojekt 7 des Verbundprojektes: „Neue Methoden zur Proteomanalyse: Anwendung und Verknüpfung mit Metabolomanalysen am Beispiel von *Corynebacterium glutamicum*“) freundlicherweise Fermenterproben zur Verfügung gestellt. Der *C. glutamicum* Produktionsstamm DM 1730 wurde in einem 10 Liter Fermenter, der eine bessere Reproduzierbarkeit als Schüttelkolbenexperimente erlaubt, angezogen und daraus zu genau definierten Zeitpunkten Proben entnommen. Dadurch hatten wir eine ausreichende Zahl an Biomasse zur Verfügung, um die folgenden Experimente durchzuführen, ohne störende Varianzen aufgrund unterschiedlicher Wachstumsbedingungen berücksichtigen zu müssen. Außerdem war es für den Vergleich der e-

lektrophoretischen Trennungen, und insbesondere zum Festlegen sogenannter „Landmarks“ (d.h. Spots, die auf allen untersuchten Gelen vorliegen) und damit zur Definition von Überlappungsbereichen zwischen unterschiedlichen Gelen unumgänglich, einen einheitlichen Proteinextrakt zu verwenden. Die Proteinextraktion wurde wie in Kapitel 4.2 beschrieben durchgeführt. Für die optimale Extraktion einer möglichst großen Zahl an Proteinen wurden folgende Solubilisierungspuffer mit unterschiedlichen Detergenzien getestet:

- Harnstoff-Thioharnstoff-CHAPS-Lysis-Puffer
- Harnstoff-Thioharnstoff-ASB14-Lysis-Puffer
- Harnstoff-Thioharnstoff-ASB14-DM-Lysis-Puffer

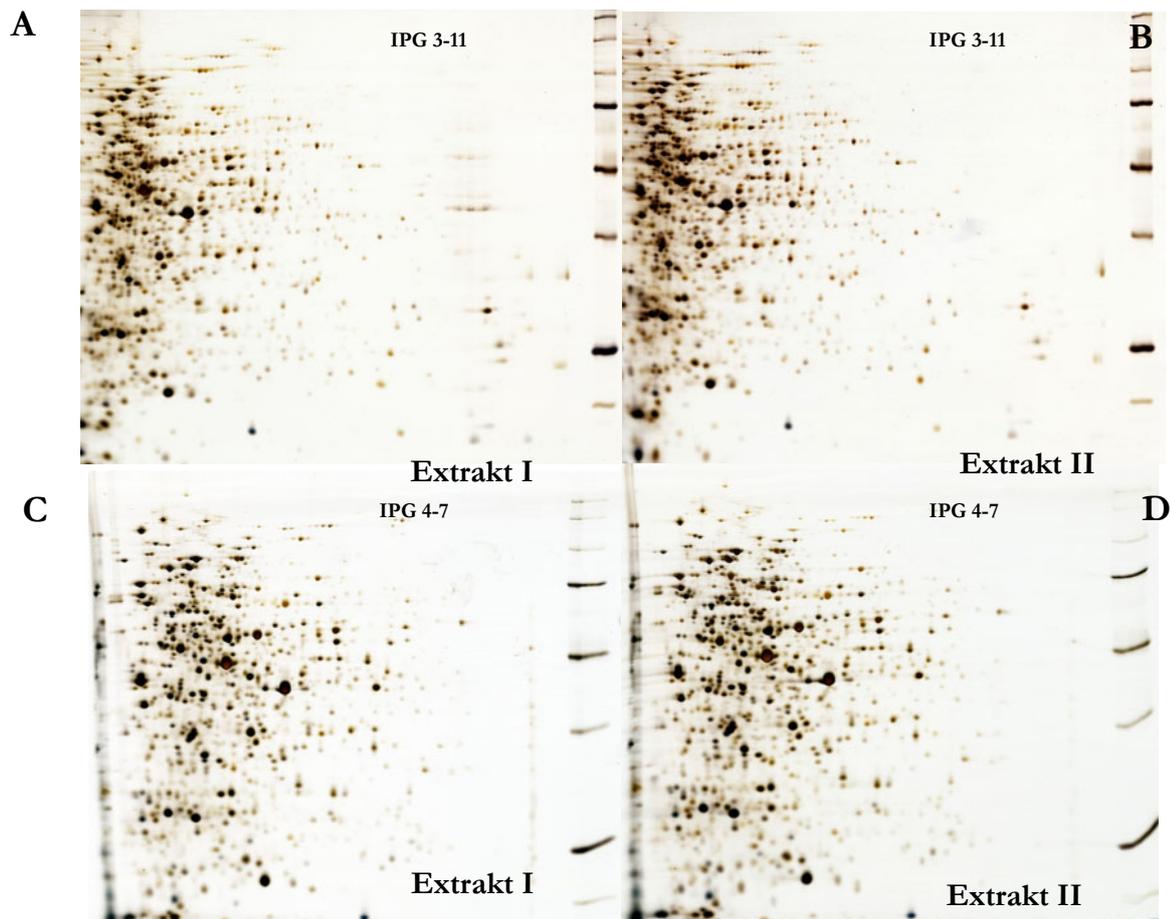
Mit dem in vielen Proteomprojekten als Standard-pH-Gradienten eingesetzten IPG 3-10 wurden mit den drei verschiedenen Lysis-Puffer-Extrakten folgende Ergebnisse erzielt:

Eigentlich waren bei den ASB14 und ASB14- $\beta$ DM Extrakten größere Spotzahlen zu erwarten, da mit diesen Extraktionspuffern laut Literaturangaben [87] hydrophobe Proteine besser solubilisiert werden. In der Praxis stellten wir beim Vergleich der 2D Gele jedoch keine merklichen Unterschiede hinsichtlich Spotanzahl und -muster fest (Abb. 5-1). Aus diesen Gründen wurde der Harnstoff/Thioharnstoff/CHAPS Lysepuffer als Standard-Extraktionspuffer beibehalten, und die Mehrzahl der Untersuchungen zwecks besserer Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen mit diesem Extrakt durchgeführt. Des Weiteren war die Reproduzierbarkeit der Proteinsolubilisierung sehr hoch, was man an den nahezu identischen Proteinkonzentrationen der einzelnen Extraktionen und den fast identischen 2DE-Spotmustern ersehen kann (Abb. 5-2).



**Abbildung 5-1: Optimierung der Proteinextraktion durch Verwendung unterschiedlicher Detergenzien**

A: Harnstoff/Thioharnstoff/CHAPS Lysispuffer-Extrakt, B: Harnstoff-Thioharnstoff-ASB14-Lysis-Puffer Extrakt, C: Harnstoff-Thioharnstoff-ASB14- $\beta$ DM-Lysis-Puffer Extrakt von *C. glutamicum*. IPG-Dalt: IPG 3-10; SDS-PAGE 13%T. Silberfärbung.



**Abbildung 5-2: Reproduzierbarkeit der optimierten Proteinextraktionsmethode**

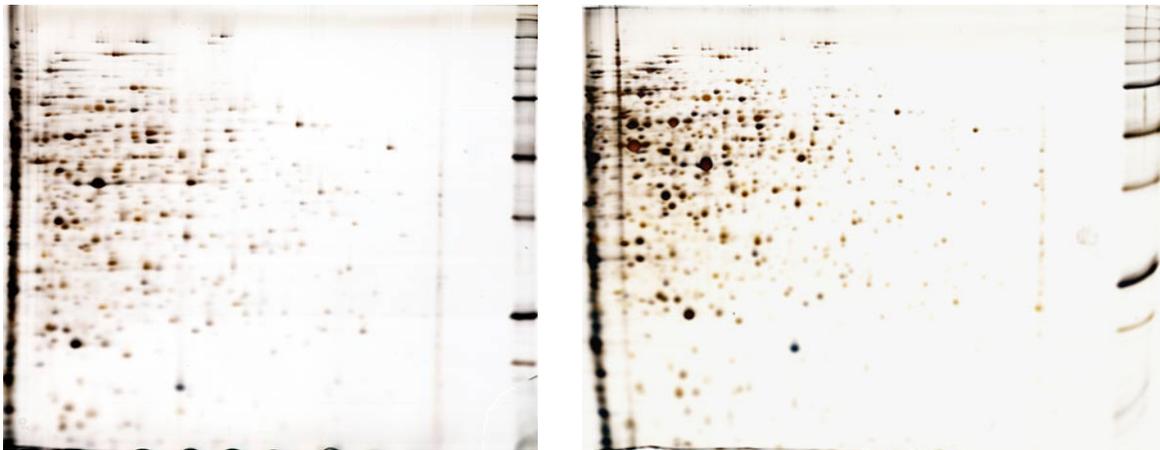
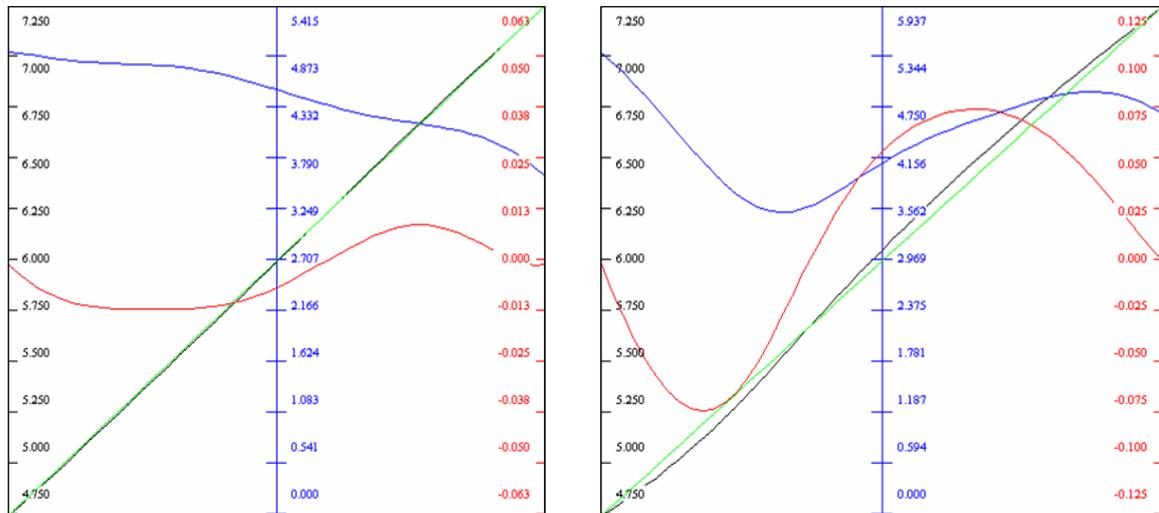
Proteinextrakte I und II (technische Replikate) liefern nahezu identische 2D Muster.

A = Extrakt I, IPG 3-11; B = Extrakt II, IPG 3-11; C = Extrakt I, IPG 4-7; D = Extrakt II, IPG 4-7

### 5.1.2 Einfluss der in der Rezeptur verwendeten Immobiline auf die Qualität des pH-Gradienten und des 2DE Musters

Die Berechnung von unterschiedlichen, immobilisierten pH-Gradienten erfolgt mit Hilfe geeigneter Rechenprogramme unter Verwendung der nach ihren pK-Werten charakterisierten Immobiline. Es zeigte sich jedoch, dass der theoretisch ermittelte pH-Gradient nicht unbedingt für die Praxis geeignet ist. Dies soll anhand des IPG 4.75-7.25 exemplarisch erläutert werden: Unter Verwendung des Immobiline pK 3.1 erhält man -zumindest theoretisch- einen zufriedenstellenderen pH-Gradientenverlauf und eine gleichmäßigere Pufferkapazität (Abb. 5.3 links oben) als ohne dieses Immobiline (Abb. 5.3 rechts oben). Die rote Kurve beschreibt die Pufferkapazität, wobei eine parallel zur x-Achse verlaufende Gerade ideal wäre. Die schwarze Linie beschreibt den gewünschten linearen Gradientenverlauf, während die grüne Linie den tatsächlich erhaltenen pH-Gradienten anzeigt. Vergleicht man jedoch die entsprechenden 2D elektrophoretischen Trennungen, so erkennt man unschwer, dass das Trennergebnis mit dem IPG-Gel ohne Immobiline pK 3.1 deutlich besser ausfiel (Abb. 5.3 B, unterer Teil). Hieraus kann man den Schluss ziehen, dass es nicht ausreicht, nur die Rezepte mit Hilfe des Computers zu berech-

nen, sondern, dass die Brauchbarkeit des berechneten IPGs letztlich durch zeitaufwändiges Austesten (und unter Zuhilfenahme von Erfahrungswerten) ermittelt werden muss.



**Abbildung 5-3: : Einfluß der in der Rezeptur verwendeten Immobiline auf die Qualität des pH-Gradienten und des 2DE Musters**

Vergleich von zwei verschiedenen IPG-„Rezepturen“ (IPG 4.75-7.25), die sich nur durch die Auswahl der Immobiline unterscheiden. Links: mit Immobiline pK 3.1; Rechts: ohne Immobiline pK 3.1  
Grün=gewünschter pH-Gradient; schwarz=berechneter pH-Gradient; blau= $\beta$ -Power; rot=Pufferkapazität

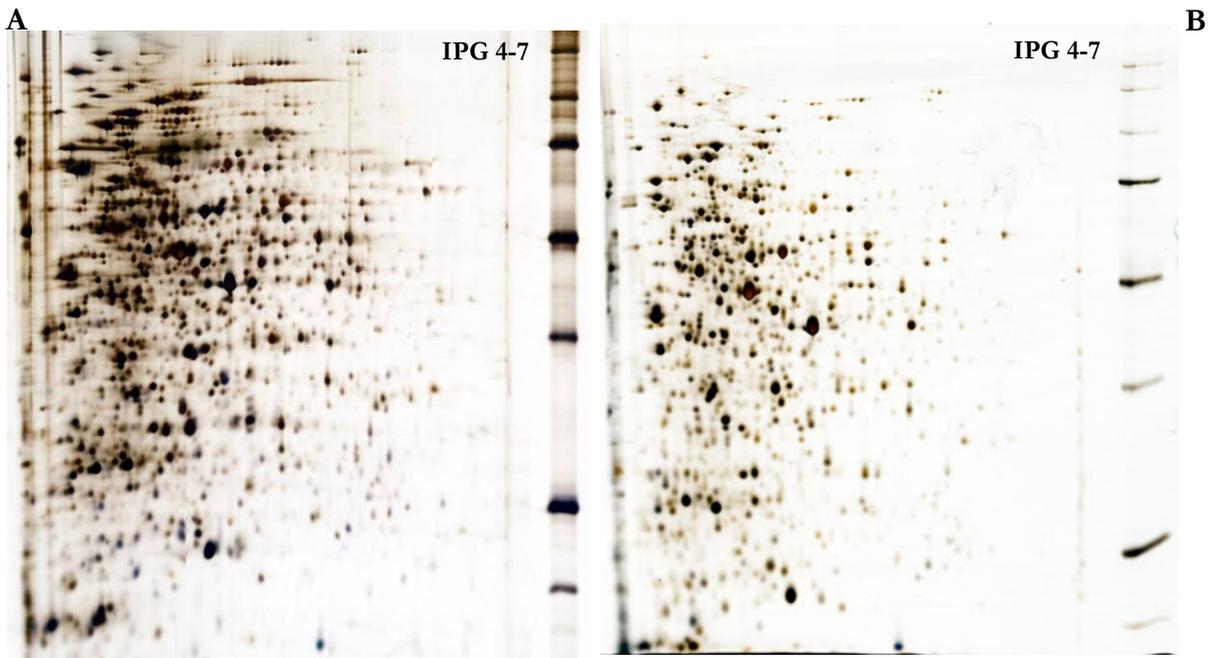
Insgesamt wurden im Verlauf dieser Arbeit mehr als ein Dutzend unterschiedlicher IPGs (weite, enge, ultraenge; sehr saure bis sehr alkalische) entwickelt und getestet, von denen etwa die Hälfte, die an sie gestellten Anforderungen erfüllten und für die weiteren Untersuchungen verwendet wurden.

### 5.1.3 Ermittlung der optimalen Probenauftragsmenge

Generell versucht man, die Proteinauftragsmenge pro 2D Gel so zu wählen, dass man die größtmögliche Zahl gut voneinander getrennter Spots erhält. Es gibt jedoch auch Ausnahmen von dieser Regel: Beispielsweise werden mikropräparative Gele oft überladen, wenn es darum geht, ein ganz bestimmtes, niedrig exprimiertes Protein für eine weitere proteinchemische Charakterisierung zu isolieren. In diesem

Fall „fließen“ benachbarte Proteinspots oft ineinander (Clusterbildung), was zu dem (auf den ersten Blick paradoxen) Ergebnis führt, dass trotz höherer Proteinbeladung eine geringere Zahl an Proteinen detektierbar ist als auf Gelen mit geringerer Proteinbeladung. Wird zuviel Probe aufgetragen, kann es neben Überladung des Gels und der eben erwähnten Clusterbildung auch zu Proteinpräzipitation an den Elektroden und zum Verlust von Proteinen kommen. Abgesehen von diesen Gesichtspunkten sind außerdem die IPG-Streifenlänge sowie die Steilheit des verwendeten pH-Gradienten zu berücksichtigen. Je länger ein IPG-Streifen, und je flacher der pH-Gradient (z.B. bei *Zoom-in* Gelen), desto mehr Probe kann/muss aufgetragen werden. Schließlich hängt die Probenauftragsmenge auch von der Empfindlichkeit des verwendeten Detektionssystems ab (z.B. Coomassie- oder Silberfärbung), sowie der Färbedauer bei der Silberfärbung oder der Aktivität und Expositionszeit bei radioaktiv markierten Proben. Insgesamt gesehen ist die optimale Probenauftragsmenge je nach Fragestellung und Detektionsmethode zu ermitteln und festzulegen.

Im Folgenden soll verdeutlicht werden, wie entscheidend sich die Proteinmenge auf das Ergebnis auswirken kann: In Abbildung 5-4 A ist der saure Bereich völlig „überladen“, und viele Spots laufen teilweise ineinander. Andererseits erkennt man im neutralen pH-Bereich eine größere Zahl an Spots als in Abbildung 5-4 B., während hier die Auflösung im Bereich zwischen pH 4 und 5 viel besser ist, d.h. in der Praxis muss man einen Kompromiss finden, bzw. es muss die Fragestellung entscheiden, welche Proteinbeladung gewählt werden soll. Jedoch stößt man auch bei engen IPGs relativ schnell an eine Grenze (ca. 1 mg Protein/ IPG Streifen) jenseits derer eine rapide Verschlechterung der Trennergebnisse zu verzeichnen ist, da der Großteil der Proteine *pI*s außerhalb dieses Bereichs besitzt und somit viele Proteine an den Rändern des IPG-Streifens präzipitieren, wodurch die IEF erheblich gestört wird. Will (oder muss) man trotzdem höhere Probemengen laden, sind Vorfraktionierungsverfahren unverzichtbar (vgl. Kapitel 5.4).



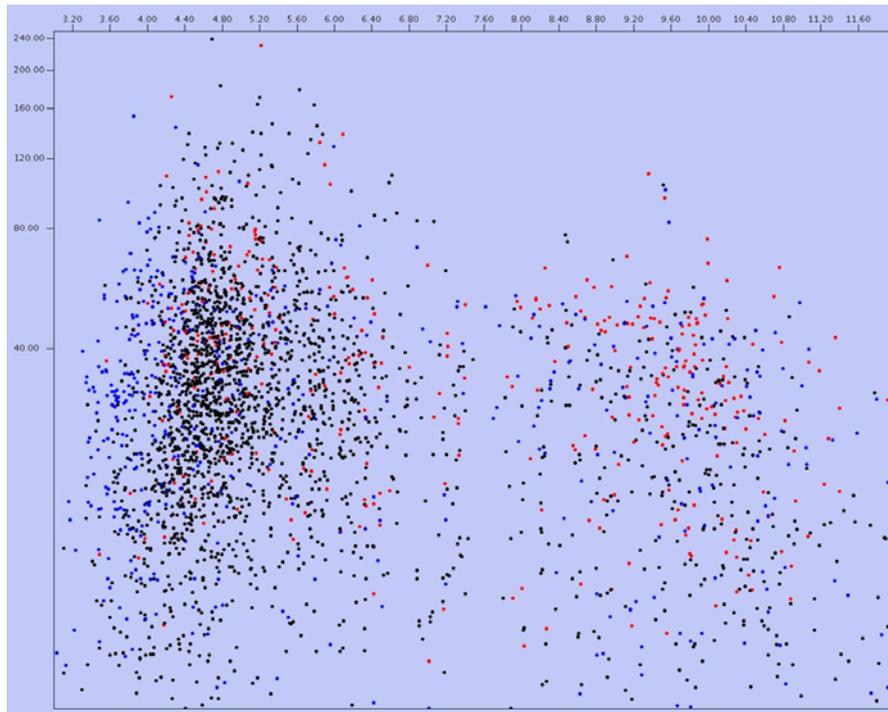
**Abbildung 5-4: Optimierung der Probenauftragsmenge hinsichtlich Auflösung und Anzahl der Spots**

A) 300 µg Probenauftragsmenge; B) 100 µg Probenauftragsmenge. Die verringerte Proteinmenge (Abb. B) führt zu erhöhter Auflösung zu Lasten der Detektion gering exprimierter Proteine. IPG 4-7. Silberfärbung.

#### 5.1.4 Ermittlung der optimalen IPGs anhand des virtuellen und experimentell ermittelten Gesamtproteoms

Sowohl zum Überblick über das *C.glutamicum*-Proteom, als auch als Ausgangsbasis für die Entwicklung engerer IPGs eignet sich neben der hypothetischen 2DE-Karte (Abb. 5-5) am besten ein weiter IPG. Hier bietet sich neben dem IPG 3-10 (Abb. 5-6) vor allem der nicht lineare IPG 3-11 mit 24 cm Trenndistanz (Abb. 5-7) an, der im Bereich von pH 4.5-6.5 stark gespreizt ist.

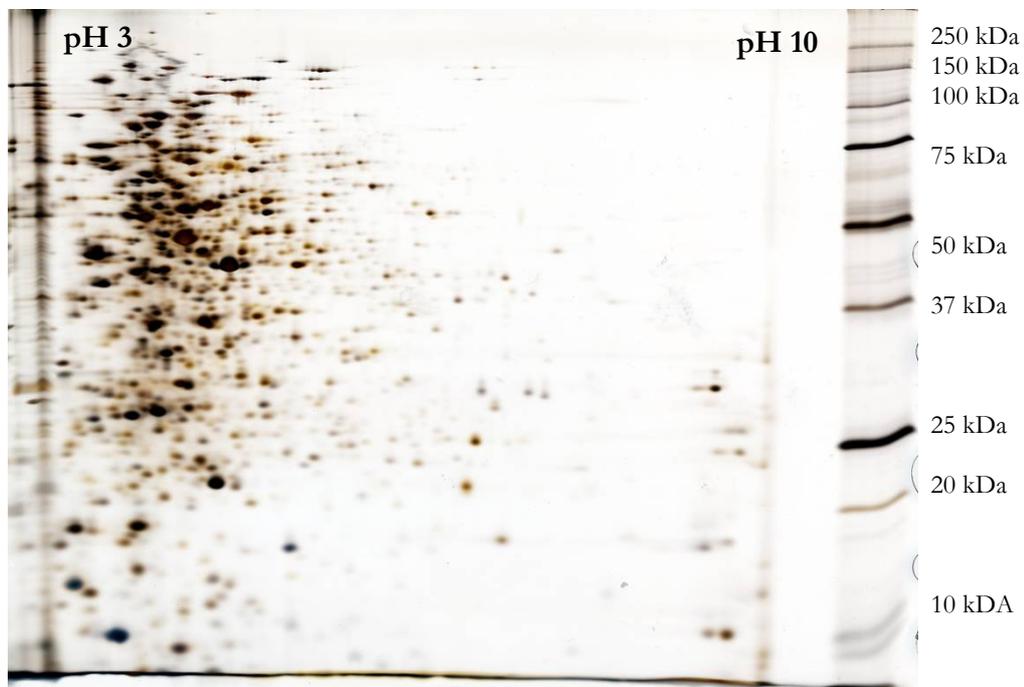
Mit Hilfe computergestützter Gelauswerte-Software konnten auf dem IPG 3-10 2D-Gel nach Silberfärbung insgesamt **660** Spots gezählt werden, während mit dem IPG 3-11 NL 2D-Gel aufgrund der längeren Trenndistanz und der stärkeren Spreizung im sauren Gelbereich **724** Spots detektiert wurden. Zwar konnten die Proteincluster im Bereich zwischen pH 4 und 5.5 mit diesem IPG etwas stärker entzerrt werden als mit dem IPG 3-10, aber dennoch eignen sich diese IPGs primär nur zu Übersichtszwecken, da das erzielte Auflösungsvermögen für detailliertere Proteomstudien zu gering ist.



**Abbildung 5-5: Virtuelles Proteom von *C. glutamicum***

Der Vergleich der Abbildungen 5-5, 5-6 und 5-7 verdeutlicht, dass die hypothetische 2D-Karte (Abb. 5-5) die tatsächliche Proteinverteilung (s. Abb. 5.6-5.7) im Wesentlichen korrekt wiedergibt.

Schwarze Spots: cytoplasmatische Proteine, rote Spots: Membranproteine, blaue Spots: sekretierte Proteine (x-Achse: pI-Wert, y-Achse kDa)[71, 72]



**Abbildung 5-6: Experimentell ermitteltes Proteom von *C. glutamicum* im IPG 3-10 (18 cm Trenndistanz). Silberfärbung.**

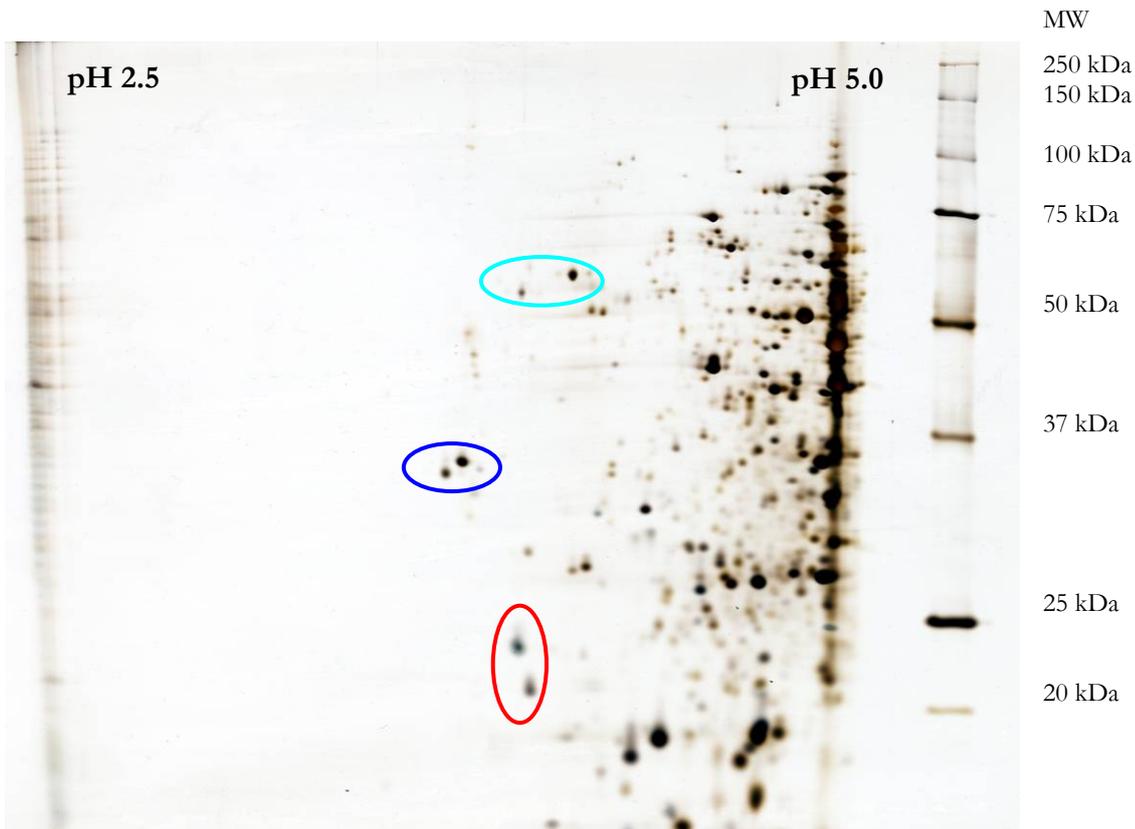


Abbildung 5-7: Experimentell ermitteltes Proteom von *C. glutamicum* im IPG 3-11 (24 cm Trenndistanz). Silberfärbung.

## 5.2 2DE Analyse des sauren und neutralen *C. glutamicum* Proteoms durch eine Kombination unterschiedlich enger, überlappender, der tatsächlichen Proteinverteilung angepasster IPGs

### 5.2.1 Saurer pH-Bereich: IPG 2.5 –5.0, IPG 3.5–4.5, IPG 4.0-5.0, IPG 4.4-5.2

Wie aus Abb. 5-6 und 5-7 sowie aus der virtuellen 2D Karte zu ersehen ist, befindet sich der Hauptteil der *C. glutamicum* Proteine im pH-Bereich von 4 bis 5.5, der mit weiten pH-Gradienten (z.B. IPG 3-11) nur unzulänglich aufgetrennt werden kann. Daher wurden für diesen pH-Bereich individuelle IPGs generiert und getestet. Um sicherzustellen, dass auch diejenigen Proteine erfasst werden, welche eventuell sehr saure *pIs* aufweisen – was aus Ab. 5-7 nicht unbedingt ersichtlich ist-, wurde zunächst ein IPG 2.5-5.0 generiert. Mit Hilfe dieses IPGs konnte gezeigt werden, dass im cytosolischen *C. glutamicum* Proteom so gut wie keine Proteine mit *pIs* < 3.5 nachweisbar sind (Abb. 5-8). Um nicht unnötige Trenndistanz zu vergeuden erschien es daher sinnvoll, für die weiteren Untersuchungen nur IPGs mit einem pH-Wert > 3.5 zu verwenden.

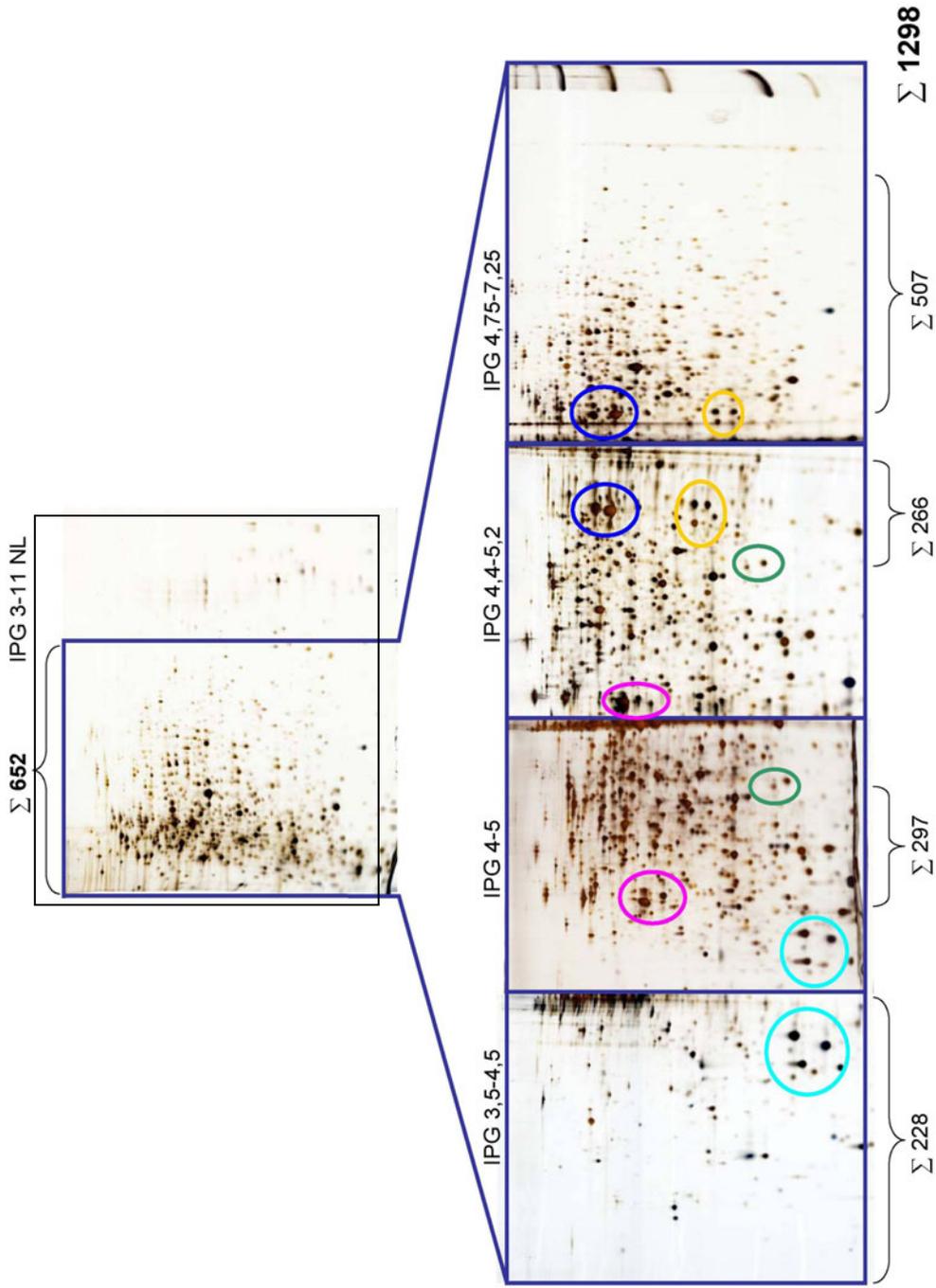


**Abbildung 5-8: IPG 2.5-5**

Die 2DE mit IPG 2.5-5 zeigt, dass das *C. glutamicum*-Proteom offensichtlich keine Proteine enthält, die einen pI unter 3.2 besitzen. IPG 2.5-5.0; SDS-PAGE 12%T. Silberfärbung.

Im Folgenden wurden die pH-Intervalle 3.5-4.5, 4.0-5.0, und 4.4-5.2 zur optimalen Auflösung im pH-Bereich von 3.5-5.2 getestet. Wie aus Abb. 5-9 ersichtlich, konnten nach Ausschließen von Mehrfachzählungen im Überlappungsbereich insgesamt **791** silbergefärbte Proteinspots im Bereich pH 3.5-5.2 detektiert werden, im Gegensatz zu den **282** Spots im gleichen pH-Bereich des IPG 3-11NL. Dies entspricht etwa dem 2.8-fachen der mit dem IPG 3-11NL in diesem pH-Bereich detektierbaren Proteinspots.

Ähnliche Resultate berichteten auch Wildgruber *et al.* [36], die mit einer Kombination enger, überlappender IPGs insgesamt mehr als dreimal so viele Proteine der Hefe *S. cerevisiae* nachweisen konnten als in einem IPG 3-10. Allerdings war zunächst unklar, ob es sich bei dieser erhöhten Anzahl Proteine um zusätzliche (z.B. niedrig-abundante) Proteine oder aber um Isoformen bereits bekannter Proteine handelt, oder um beides. Zur Beantwortung dieser Frage identifizierten Westbrook *et al.* [88] massenspektrometrisch die in engen IPGs aufgetrennten Proteine und fanden, dass es sich sowohl um neue, bisher nicht gefundene Proteine als auch um zusätzliche Isoformen bereits bekannter Proteine handelte.



**Abbildung 5-9: „Zoom-in“-Gele im saueren bis neutralen pH-Bereich**

Die unteren vier 2D Gele entsprechen dem blaumarkierten Ausschnitt des 2D Gels mit IPG 3-11. Deutlich zu erkennen ist die bessere Auflösung mit erhöhter Spotzahl durch Verwendung enger, überlappender IPGs. Die Spots in den Überlappungsbereichen der einzelnen Gele wurden jeweils nur 1x gezählt.

### 5.2.2 Schwach saurer bis neutraler pH-Bereich: IPG 4.75-7.25

Da das Proteom von *C. glutamicum* die typische Proteinverteilung mit einer gehäuften Proteinzahl zwischen pH 4 und 5, einer abnehmenden Häufigkeit zwischen pH 5 und 7, sowie einer Lücke im neutralen pH-Bereich zwischen pH 7 und 8 aufweist, wurde ein IPG entwickelt, der den gesamten schwach sauren bis neutralen Bereich von pH 5 - 7.25 abdeckt, und außerdem mit seinem sauren Ende mit dem IPG 4.4-5.2 zur Konstruktion eines virtuellen 2D-Gels überlappt. Dieser IPG 4.75-7.25 (Abb. 5-9) erlaubt eine exzellente Trennung der im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich vorkommenden Proteine. In Übereinstimmung mit der hypothetischen 2DE-Karte nimmt bei diesem IPG die Zahl der detektierbaren Proteine mit steigendem pH-Wert immer mehr ab; ab pH 7 sind so gut wie keine Spots mehr nachweisbar.

Durch Kombination des IPG 4.4-5.2 mit dem IPG 4.75-7.25 waren im Bereich zwischen pH 4.4 und 7.25 insgesamt **1066** silbergefärbte Spots detektierbar, im Vergleich zu den **660** Spots bzw. **724** Spots auf dem gesamten IPG 3-10 bzw. IPG 3-11NL 2DE-Gel. Im Bereich zwischen pH 4.75 und 7.25 lauten die entsprechenden Zahlen **507** vs. **372** Spots, d.h. die Anzahl der auf dem IPG 4.75-7.25 detektierten Proteinspots stieg um das 1,36-fache. Diese relativ moderate Zunahme ist vor allem darauf zurückzuführen, dass im *C. glutamicum* Proteom nur relativ wenige Proteine mit pIs > 6 vorhanden sind, und diese daher auch mit dem IPG 3-11 NL gut auftrennbar sind, während der Bereich < pH 6 aufgrund der grösseren Zahl an Proteinen schlechter aufgelöst ist. Interessanterweise wurden die einzelnen Spots nicht nur besser voneinander getrennt, sondern eine ganze Reihe scheinbarer Einzelspots auf den IPG 3-10, IPG 3-11NL oder IPG 4-7 Gelen wurde in mehrere Einzelspots aufgelöst. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren massenspektrometrischen Untersuchungen überein, die zeigten, dass auf IPG 4-7 Gelen bis zu 10% der untersuchten Spots mehr als eine unterschiedliche Proteinspezies enthielten [89], während bei IPG 3-10 Gelen der entsprechende Prozentsatz sogar viermal so hoch war, wobei pro Spot bis zu sechs verschiedene Proteine gefunden wurden [39].

Zusammenfassend kann man festhalten, dass grundsätzlich, wie am Beispiel von *C. glutamicum* veranschaulicht, die Verwendung enger überlappender IPGs zu einer größeren Zahl detektierbarer Spots pro pH-Einheit führt. Das erhöhte Auflösungsvermögen, vor allem in überladenen Gelregionen, führt zu einer Vereinfachung der Image-Analyse und einer Verkürzung des Zeitbedarfs für das Spot-Editing, zum vereinfachten Spot-Picking aufgrund der besser voneinander getrennten und der geringeren Zahl an überlappenden Spots und zu einer vereinfachten Spotidentifizierung mittels MS aufgrund der geringeren Kreuzkontamination durch benachbarte Spots. Dies ist insbesondere von Bedeutung, wenn ein stark exprimiertes und ein schwach exprimiertes Protein in sehr nahe benachbarten Spots liegen [36].

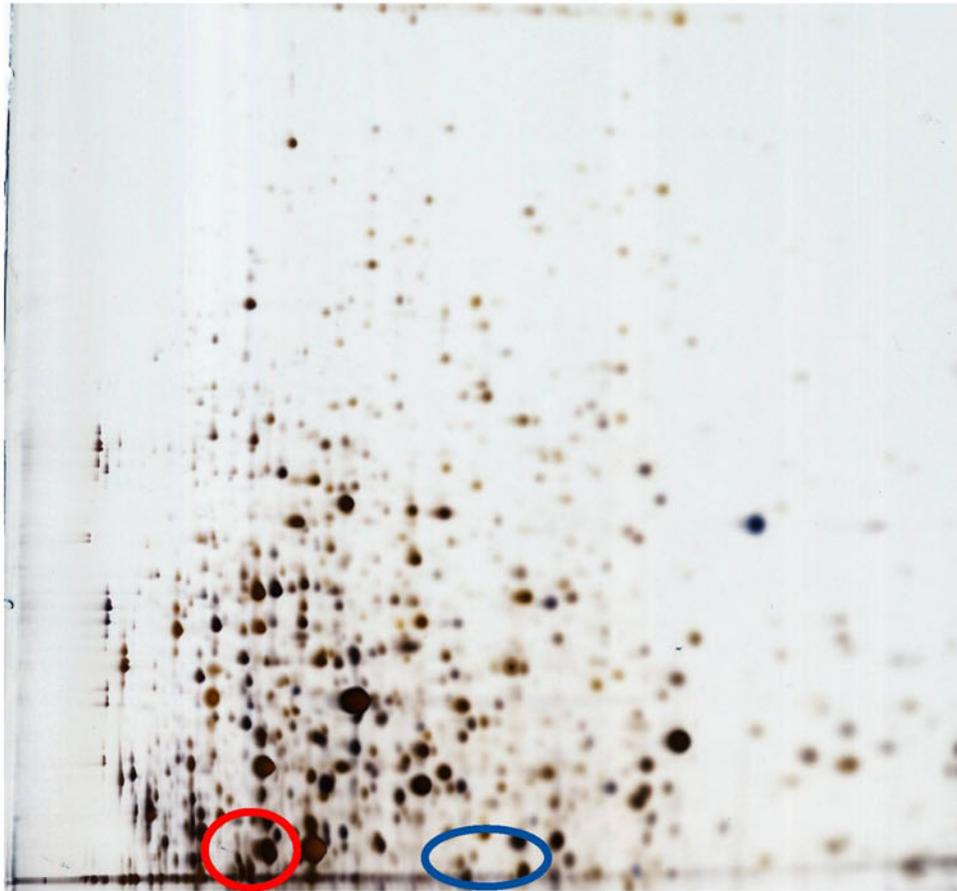
### 5.2.3 Resultat der Optimierungen: IPGs für Routineanalytik: IPG 3.4-5.4 und IPG 4.9-6.9

Die Kombination der IPGs 3.5-4.5, 4-5, 4.4-5.2 und 4.75-7.25 (Abb.5-9) ermöglichte eine im Vergleich zu den IPGs 3-10, 3-11NL oder IPG 4-7 deutlich verbesserte Auftrennung des sauren und neutralen *C. glutamicum* Proteoms. Nachteilig war allerdings, dass hierfür vier 2D-Gele notwendig waren, während für die Routineanalytik und für physiologische Studien mit großem Probeaufkommen eine möglichst geringe Anzahl an 2D-Gelen erwünscht ist. Eine Alternative zu den drei IPGs 3.5-4.5, IPG 4-5 und IPG 4.4-5.2 wäre ein nichtlinearer IPG 3.4-5.4. Der Verlauf des pH-Gradienten sollte zwischen pH 3.7-4.0 relativ steil verlaufen (da in diesem Bereich nur wenige Proteine vorkommen) und dann abflachen, um optimal an die Proteinverteilung des *C. glutamicum*-Proteoms angepasst zu sein. Für den schwach sauren bis neutralen pH-Bereich ist der bereits entwickelte IPG 4.75-7.25 nicht ganz optimal, da über pH 7 nur wenige Spots detektierbar sind. Unter der oben genannten Vorgabe wurde der IPG 3.4-5.4 (Abb. 5-10) entwickelt, welcher in Kombination mit einem ebenfalls neu entwickelten IPG 4.9-6.9 (Abb.5-10), der den Gradienten 4.25-7.25 ersetzte, die ideale Lösung zur optimalen Auftrennung des sauren und neutralen Bereichs des *C. glutamicum*-Proteoms darstellt.

### 5.2.4 Ultraenge überlappende pH-Gradienten

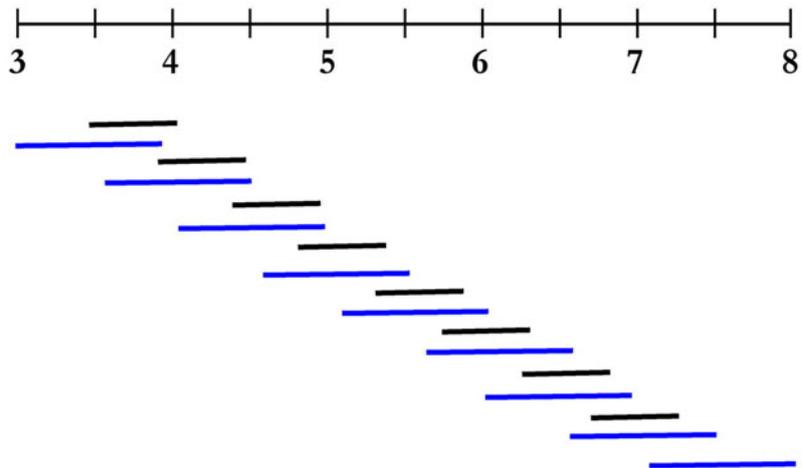
Da die IPG Technologie die Generierung nahezu aller pH-Gradienten ermöglicht, wurden enge überlappende pH-Gradienten mit 0.6 bzw. 0.9 pH-Einheiten hergestellt (Abb. 5-11) und exemplarisch am Beispiel von *C. glutamicum* veranschaulicht, wobei komplexere eukaryotische Proteome wie z.B. Leber oder Hefe (vgl. Wildgruber *et. al.* [36]) weit mehr von dem potenziell höheren Auflösungsvermögen profitieren dürften.

Die Abbildung 5-12 veranschaulicht die Trennergebnisse des in der Proteomanalytik sehr häufig verwendeten IPG 4-7 im Vergleich zum selbstentwickelten IPG 4.75-7.25 und einem ultraengen IPG 4.7-5.4. Deutlich zu erkennen ist die erhöhte Auflösung mit zunehmend engerem pH-Intervall.



**Abbildung 5-10: Optimierte IPGs für die Routineanalytik von *C. glutamicum***

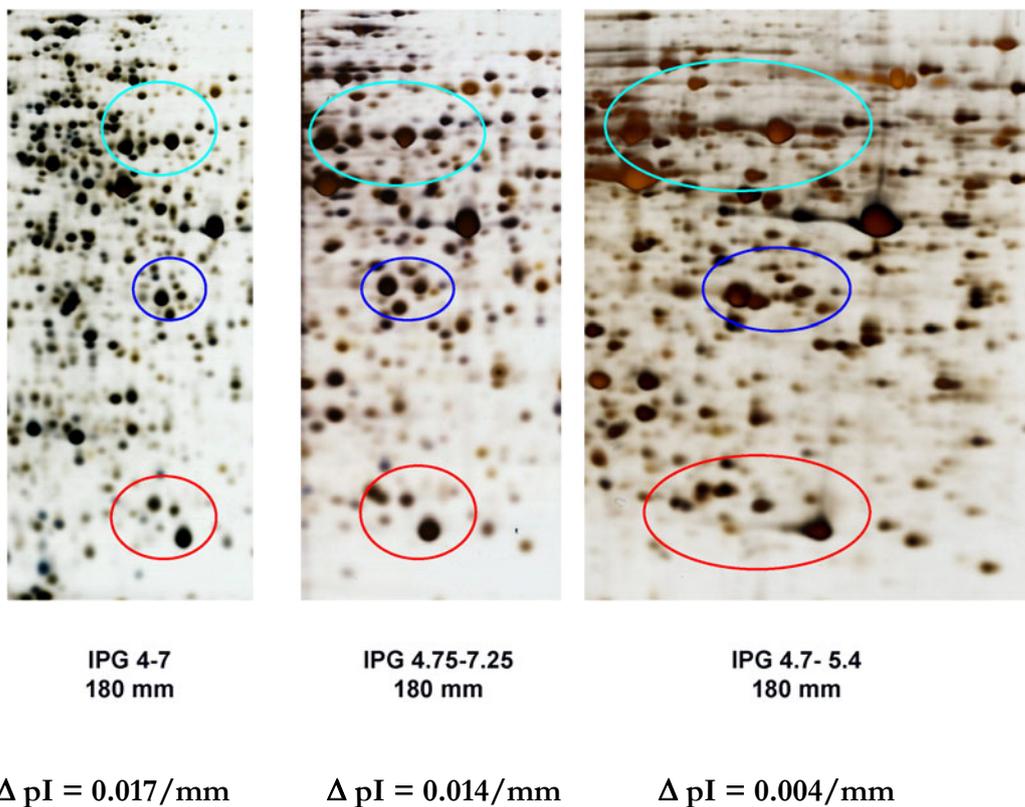
Resultat der Optimierungsstrategien: IPGs 3.4-5.4 und 4.9-6.9 mit einer Trenndistanz von 18cm. Die Markierungen (Ovale) veranschaulichen den Überlappungsbereich der beiden pH-Gradienten.



**Abbildung 5-11: Kombination (ultra-)enger IPGs (max. 1 pH Einheit)**

Schwarz: IPGs mit 0,6 pH-Einheiten Trenndistanz und jeweils 0,2 pH-Einheiten Überlappungsbereich

Blau: IPGs mit 0,9 pH-Einheiten Trenndistanz und jeweils 0,4 pH-Einheiten Überlappungsbereich



**Abbildung 5-12: „Blow-up“ Experimente:** Erhöhte Auflösung durch Verwendung enger IPGs

Farbige Kreise markieren korrespondierende Spotbereiche

### 5.3 2D elektrophoretische Analyse des basischen *C. glutamicum* Proteoms

Bisherige Proteomstudien von *C. glutamicum* konzentrierten sich hauptsächlich auf den pH-Bereich von 4-7. Für diesen Bereich wurden bereits 2DE-Karten erstellt [68-70, 90], wenn auch keine hochauflösenden. Für den basischen Bereich  $> \text{pH } 10$  gab es jedoch *bis dato* keine detaillierten Analysen, da aufgrund der fast ausschließlichen Verwendung von IPGs 3-10 oder IPGs 3-11NL der stark alkalische Teil entweder ganz fehlte oder nur mit geringer Auflösung analysiert wurde. Da das *C. glutamicum* Genom komplett sequenziert ist [91], ist es möglich, das alkalische Proteom durch *in silico* Studien darzustellen (Abb. 5-13). Auf diesen Informationen aufbauend wurde die 2D-Elektrophorese entsprechend angepasst und optimiert, um reproduzierbare 2DE-Muster in diesem Bereich zu erhalten. Die getrennten Spots wurden anschließend mit MALDI-TOF-MS/PMF identifiziert, um erstmals eine 2D Proteindatenbank alkalischer *C. glutamicum* Proteine zu erstellen.

#### 5.3.1 *In silico* Darstellung des alkalischen *C. glutamicum* Proteoms

Das theoretische Gesamtproteom von *C. glutamicum* (Abb. 5-5) weist eine ungleichmäßige Proteinverteilung auf. Diese sogenannte „bimodale“ Proteinverteilung ist typisch für Mikroorganismen [40, 41, 72], wobei sich bei *C. glutamicum* ca.  $\frac{2}{3}$  der Proteine im sauren Bereich und ca.  $\frac{1}{3}$  im basischen Bereich befinden. Die vorliegende *in silico* Analyse wurde mit der Proteinannotation von Kalinowski [91] durchgeführt, welche 3086 annotierte Proteine beinhaltet. Davon haben 770 Proteine einen pH Wert über 7.0. Das Molekulargewicht dieser Proteine reicht von 2 bis 110 kDa, wobei über 90% ein  $M_r$  zwischen 10 und 100 kDa besitzen. Nahezu 300 dieser Proteine sind als Membranproteine mit mindestens 2 TMH anzusehen, welche voraussichtlich nicht bzw. nur unzureichend auf 2DE-Gelen darstellbar sind.

Der *Codon adaptation index* (CAI) (vgl Kap. 5.4) ist ein Instrument, mit dessen Hilfe Vorhersagen über den Expressionsgrad von Proteinen gemacht werden können. Der Algorithmus zur Berechnung dieser Vorhersage berücksichtigt den synonymen *Codon usage bias* [92]. Im Fall von *C. glutamicum* Proteinen mit einem *pI* Werte  $> 7$  hat der CAI Werte zwischen 0.08 und 0.844. Bezugnehmend auf diese Daten haben 157 Spots einen theoretischen CAI unter 0.25 und sind somit als niedrig-abundante Proteine anzusehen. Andererseits sind 90 Proteine in diesem Bereich als hoch-abundante Proteine anzusehen; hiervon sind über 60% ribosomale Proteine. Folglich bleiben nach Abzug aller nicht zu detektierbaren Proteine ca. 240 Proteine übrig, die normalerweise auf einem 2DE- Gel im pH-Bereich  $> 7$  nachweisbar sein sollten. Davon sind wiederum vermutlich mehr als die Hälfte Transposasen, Prophagen-encodierte sowie unbekannte und hypothetische Proteine, welche voraussichtlich nicht unter den gewählten Wachstumsbedingungen exprimiert werden.

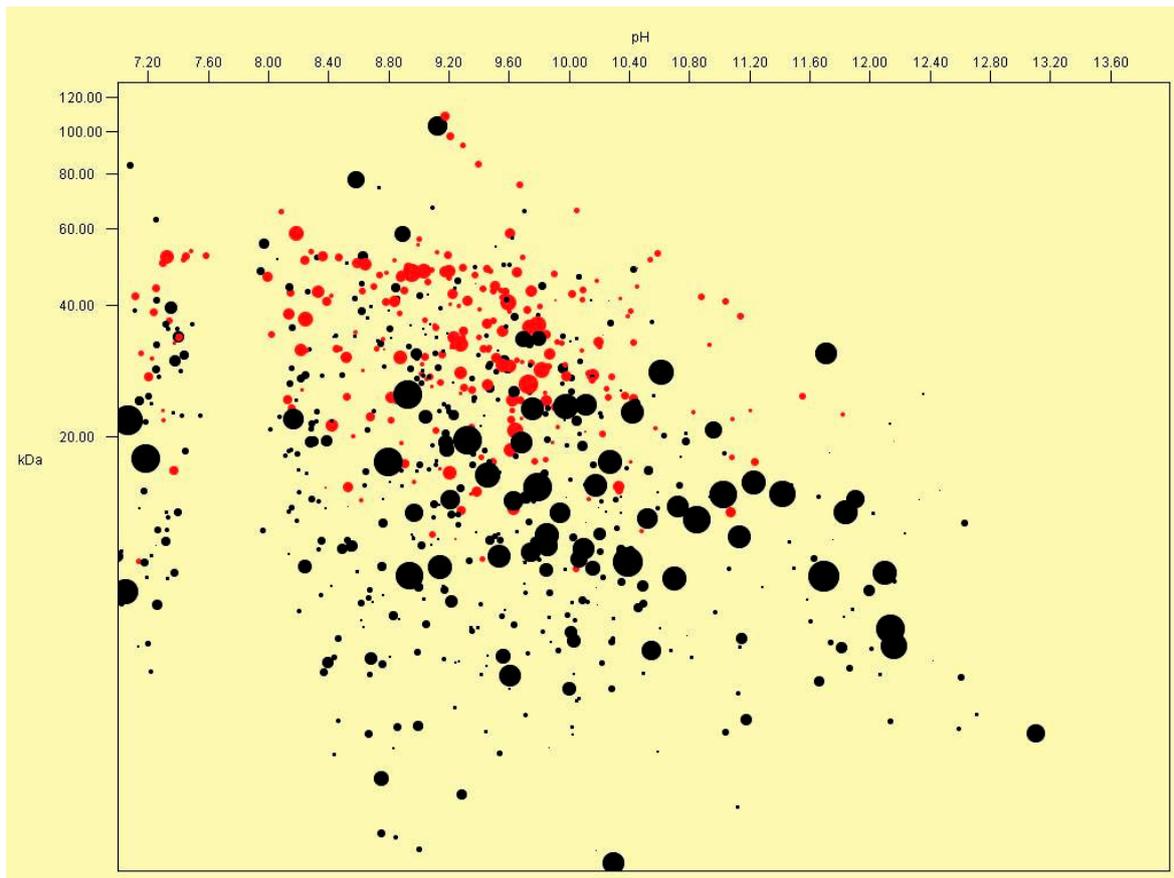


Abbildung 5-13: Virtuelles alkalisches Proteom von *C. glutamicum*

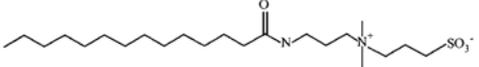
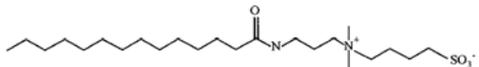
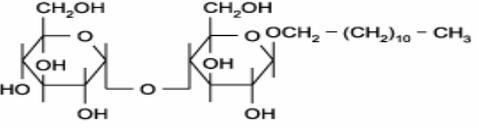
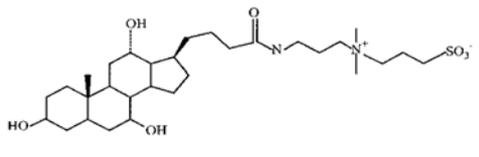
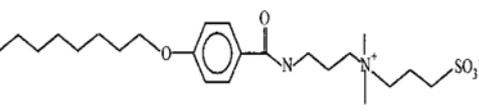
Rot: hypothetische Membranproteine mit mindestens 2 Transmembranhelices (TMH); das Volumen der Spots ist proportional zur theoretischen Menge des Proteins in der Zelle. Computerprogramm: JVirGel [70,71].

### 5.3.2 Trennung und Identifizierung der alkalischen *C. glutamicum* Proteine

Um sehr gute und reproduzierbare Trennungen im basischen Bereich zu erhalten, wurden IPGs 6-12 verwendet und die Laufkonditionen an die von Drews *et. al.* [37] und Wildgruber *et. al.* [35] publizierte Protokolle angepasst. Die Proteinextrakte wurden mit anodalem Cup-Loading aufgetragen und die isoelektrische Fokussierung bei einer maximalen Spannung von 8000V durchgeführt. Außerdem wurde der zulässige Stromfluss pro IPG-Streifen von 50 $\mu$ A auf 75  $\mu$ A erhöht, um eine schnellere isoelektrische Fokussierung (bis zu 28000 Vh) zu gewährleisten. Eine schnelle IEF ist sehr wichtig, da bei diesen IPGs der reverse elektroosmotische Fluss (EOF) von der Kathode zur Anode den Proteinen entgegenwirkt, und somit die Trennung und das Proteinmuster stört.

### 5.3.3 Verwendung unterschiedlicher Detergenzien zur besseren Solubilisierung hydrophober alkalischer *C. glutamicum* Proteine

Da im basischen pH-Bereich von *C. glutamicum* sehr viele hydrophobe Proteine vorkommen, wurde zunächst eine bessere Solubilisierung dieser Proteine, basierend auf der Verwendung anderer Detergenzien als CHAPS, ins Auge gefasst. In der Literatur [93-101] findet man Hinweise auf effizientere Detergenzien, z.B. ASB-14,  $\beta$ -DM und anderer zwitterionischer Detergenzien als Ersatz von bzw. Ergänzung zu CHAPS. In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst eine Reihe von Experimenten durchgeführt, bei denen CHAPS durch andere Detergenzien ersetzt wurde (vgl. Tabelle 5-1).

Kürzel	Name	Strukturformel
ASB-14	Amidosulfobetaine-14	
ASB-14-4	Tetradecanoylamidopropyl-dimethylammonio-butanesulfonate	
$\beta$ DM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside	
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate	
C8Ø	4-n-Octylbenzoylamido-propyl-dimethylammonio Sulfobetaine	

**Tabelle 5-1: Getestete Detergenzien zur erhöhten Solubilisierung von hydrophoben Proteinen für die 2D Elektrophorese**

Diese Detergenzien wurden im Lysepuffer, in dem die Extraktion stattfand (äquivalent zu 4.2), als auch im IPG-DryStrip Quellpuffer verwendet. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der einzelnen Extraktionen, bei jeweils identischer Proteinbeladung der 2DE-Gele.



**Abbildung 5-14: ASB 14 (4 %)**

IPG 6-12 von *C.glutamicum* Proteinen mit einer Proteinbeladung von 120µg



**Abbildung 5-15: ASB 14-4 (4 %)**

IPG 6-12 von *C.glutamicum* Proteinen mit einer Proteinbeladung von 120µg



**Abbildung 5-16:  $\beta$ DM (4 %)**

IPG 6-12 von *C.glutamicum* Proteinen mit einer Proteinbeladung von 120 $\mu$ g

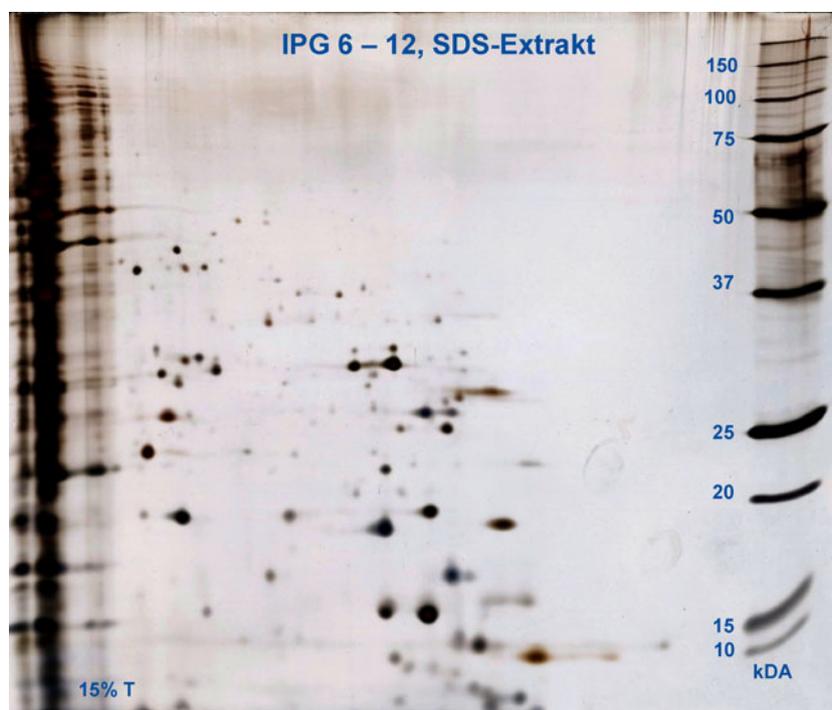


**Abbildung 5-17: C8O (4 %)**

IPG 6-12 von *C.glutamicum* Proteinen mit einer Proteinbeladung von 120 $\mu$ g

Interessanterweise war bei Verwendung anderer Detergenzien als CHAPS im Gegensatz zu einzelnen, anderslautenden Berichten in der Literatur keine Zunahme der Spotzahl im hochmolekularen basischen Bereich, in dem theoretisch die meisten hydrophoben Proteine (Abb. 5-13 rote Spots) zu erwarten gewesen wären, festzustellen. Negativ fiel auf, dass manche dieser Detergenzien verstärkt zur Streifenbildung im 2D-Gel führten, während CHAPS im Gegensatz dazu die am besten aufgelösten 2DE-Muster lieferte. Der u.a. von Drews *et. al.* [37] beschriebene Ansatz, bei dem die hydrophoben Proteine initial mit SDS-Puffer extrahiert und der Extrakt anschließend 1+3 mit Lysispuffer verdünnt wird, damit die SDS-Konzentration unter die für die IEF kritische Grenze von 0.2% gesenkt wird, führte ebenfalls zu einem sehr zufriedenstellenden Ergebnis, und ermöglichte die Detektion von ca. 150 Spots (Abb. 5-18).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass dem in der Literatur beschriebenen Ansatz durch Verwendung anderer zwitterionischer Detergenzien als CHAPS eine größere Zahl hydrophober Proteine zu solubilisieren und 2DE elektrophoretisch aufzutrennen, kein Erfolg beschieden war: Es wurden nicht mehr Spots detektiert, während das 2D-Muster durch die vermehrt auftretende Streifenbildung eher verschlechtert wurde. Hingegen lieferte das von Drews *et. al.* [37] etablierte Protokoll zur Trennung stark basischer *L. lactis* Proteine auch bei *C. glutamicum* sehr gute Ergebnisse. Mit dessen Hilfe konnten im Folgenden erstmals stark basische Proteine von *C. glutamicum* zur Erstellung einer 2DE Referenzkarte und einer 2D Proteindatenbank reproduzierbar aufgetrennt, detektiert und massenspektrometrisch identifiziert werden.



**Abbildung 5-18: IPG 6-12 SDS- Extrakt**

Der SDS-Extrakt ermöglicht eine sehr gute Auflösung ohne vermehrte Streifenbildung.

### 5.3.4 Referenzkarte des basischen *C. glutamicum* Proteoms

Insgesamt wurden ca. 120 Spots aus einem mit Coomassie Blau gefärbten 2DE Gel (pH-Bereich 6-12) ausgestanzt und anschließend mit MALDI-ToF-MS Peptidmassen-Fingerprinting analysiert. Hierbei konnten 96 Spots identifiziert und 64 unterschiedlichen Proteinen zugeordnet werden (Abb. 5-19). Die größte Einzelgruppe der identifizierten Proteine stellten (wie nicht anders zu erwarten) die ribosomalen Proteine dar. Daneben gelang aber auch die Identifizierung einer Reihe von Enzymen (Dehydrogenasen, Hydrolasen, Transferasen, Oxidasen, Reduktasen, Methylasen), sowie einiger hypothetischer Proteine. Eine vollständige Liste aller identifizierten Proteine findet sich in Tabelle 5-2.

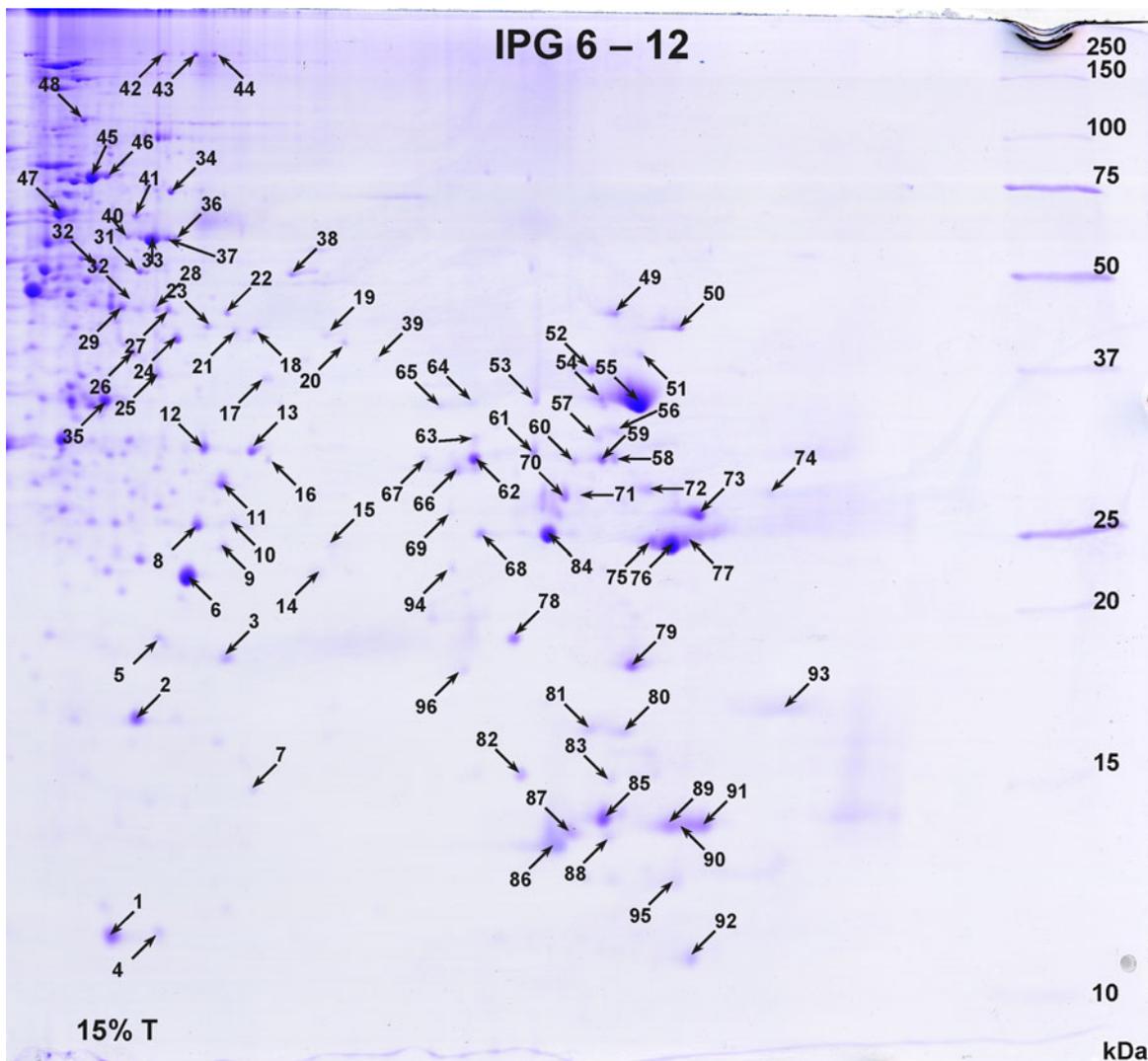


Abbildung 5-19: IPG 6-12. Referenzkarte basischer *C. glutamicum* Proteine

SDS-Extrakt mit anodalem Cuploading. Eine vollständige Auflistung aller identifizierten Proteine befindet sich in Tabelle 5-2.

Nummer auf Gel	Proteinname	UniProtKB entry	pI	MW [kD]
1	30S ribosomal protein S6	Q8NLF9	6,72	10,96
2	Putative membrane protein Cgl2017/cg2211	Q8NPF9	6,41	16,37
3	30S ribosomal protein S16	Q8NNX3	7,18	17,84
4	50S ribosomal protein L4	Q8NT08	10,10	23,61
5	Phosphohistidine phosphatase SixA	Q8NU39	6,32	18,98
6	50S ribosomal protein L5	Q8NSZ2	7,07	21,79
7	Hypothetical protein Cgl1374	Q8NQQ2	9,68	33,34
8	CAMP-binding domains-Catabolite gene activator	Q79VI7	6,71	24,99
9	Membrane protease subunits, stomatin/prohibitin homologs	Q8NL82	7,28	27,30
10	Hypothetical protein Cgl2735	Q8NM45	7,19	21,63
11	Membrane protease subunits, stomatin/prohibitin homologs	Q8NL82	7,28	27,30
12	Hypothetical protein Cgl0587	Q8NST0	6,87	30,04
13	Short-chain dehydrogenases of various substrate specificities	Q8NMU2	7,25	28,47
14	50S ribosomal protein L5	Q8NSZ2	7,07	21,79
15	Hypothetical membrane protein	Q8NS64	8,21	24,11
16	Short-chain dehydrogenases of various substrate specificities	Q8NMU2	7,25	28,47
17	Predicted glycosyltransferases	Q8NTV4	7,40	35,30
18	Phosphate starvation-inducible protein PhoH, predicted ATPase	Q8NNB6	8,61	38,76
19	Hypothetical protein Cgl2121	Q8NNR6	8,66	39,77
20	Predicted phosphohydrolases	Q8NTN0	8,44	33,45
21	Predicted transcriptional regulator	Q8NQE2	7,31	36,12
22	Dihydroorotate dehydrogenase	Q8NQC0	7,35	39,56
23	Putative periplasmic protein kinase ArgK and related GTPases of G3E family	Q8NQB0	6,74	39,24
24	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide)pyrophosphoryltransferase	Q8NNN5	6,92	38,46
25	Aspartate carbamoyltransferase	Q8NQ38	6,51	33,89
26	GTP-binding protein era homolog	Q8NNB9	6,18	33,42
27	Uncharacterized ACR	Q8NMJ5	6,40	39,73
28	ABC-type transporter, ATPase component	Q8NSN2	6,32	39,10
29	Predicted Fe-S-cluster redox enzyme	Q8NPF6	6,15	40,03
30	Glycine/D-amino acid oxidases	Q8NNY8	5,73	39,20
31	Predicted glycosyltransferases	Q8NNIC8	6,23	41,32
32	Glycine/D-amino acid oxidases (Deaminating)	Q8NLD0	5,99	44,70
33	IMP dehydrogenase/GMP reductase	Q8NM99	6,43	50,81
34	TRNA and rRNA cytosine-C5-methylases	Q8NQ48	5,19	48,33
35	Hypothetical UPF0042 protein Cgl1591/cgl1794	Q8NQ56	6,02	34,71
36	IMP dehydrogenase/GMP reductase	Q8NM99	6,43	50,81
37	IMP dehydrogenase/GMP reductase	Q8NM99	6,43	50,81
38	Molybdopterin biosynthesis enzyme	Q8NS03	8,13	44,18
39	Pantothenate kinase	Q8NRQ2	8,78	35,31
40	IMP dehydrogenase/GMP reductase	Q8NM99	6,43	50,81
41	Hypothetical protein Cgl0186	Q8NTW6	6,09	55,84
42	Transcription termination factor Rho	Q8NR58	6,91	83,96
43	Transcription termination factor Rho	Q8NR58	6,91	83,96
44	Glycine/D-amino acid oxidases (Deaminating)	Q8NLD0	5,99	44,70
45	ABC-type transporter, duplicated ATPase component	Q8NP32	6,03	63,07
46	ABC-type transporter, duplicated ATPase component	Q8NP32	6,03	63,07
47	FAD/FMN-containing dehydrogenases	Q8NTW2	5,68	53,06
48	Excinuclease ATPase subunit	Q8NRG4	5,80	83,43
49	Uncharacterized BCR	Q8NRX4	9,62	37,61
50	RRNA methylases	Q8NMD8	9,78	33,62
51	Uncharacterized BCR	Q8NQ58	9,58	35,61
52	16S rRNA uridine-516 pseudouridylate synthase	Q8NQK8	6,84	28,13
53	Hypothetical protein Cgl2560	Q8NML3	8,98	30,84
54	Hypothetical protein Cgl1374	Q8NQQ2	9,68	33,34
55	Hypothetical protein Cgl1374	Q8NQQ2	9,68	33,34
56	Glycosyltransferases involved in cell wall biogenesis	Q8NTE4	9,50	31,37
57	SAM-dependent methyltransferases	Q8NNS9	9,46	28,96
58	ABC-type transporter, duplicated ATPase component	Q8NP32	6,03	63,07
59	Membrane protease subunits, stomatin/prohibitin homologs	Q8NL82	7,28	27,30
60	ABC-type transporter, ATPase component	Q8NNF5	9,59	28,82
61	Hypothetical protein Cgl1333	Q8NQU1	9,33	30,03
62	50S ribosomal protein L1	Q9LAK5	8,91	25,04
63	Transcriptional regulator	Q8NT56	8,91	32,13
64	Hypothetical protein Cgl0007	Q8NUD2	9,02	35,35
65	Hypothetical protein Cgl0007	Q8NUD2	9,02	35,35
66	Hypothetical protein	Q9KKE6	8,97	27,14
67	50S ribosomal protein L1	Q9LAK5	8,91	25,04
68	ABC-type transporter, ATPase component	Q8NME8	9,36	24,49
69	L-lactate dehydrogenase (FMN-dependent)	Q8NLM3	5,71	43,98
70	Predicted ATPase involved in cell division	Q8NS77	9,46	25,75
71	Hypothetical protein Cgl1374	Q8NQQ2	9,68	33,34
72	50S ribosomal protein L3	Q8NT09	9,75	23,16
73	50S ribosomal protein L4	Q8NT08	10,10	23,61
74	50S ribosomal protein L1	Q9LAK5	8,91	25,04
75	30S ribosomal protein S4	Q8NSV4	9,95	23,33
76	30S ribosomal protein S4	Q8NSV4	9,95	23,33
77	30S ribosomal protein S4	Q8NSV4	9,95	23,33
78	Acetolactate synthase, small subunit	Q79VG4	9,18	18,75
79	50S RIBOSOMAL PROTEIN L6	Q8NSX7	9,67	19,33
80	Glycine/D-amino acid oxidases	Q8NLD0	5,99	44,70
81	IMP dehydrogenase/GMP reductase	Q8NM99	6,43	50,81
82	50S ribosomal protein L9	Q8NLG1	9,17	15,94
83	Hypothetical UPF0042 protein Cgl1591/cgl1794	Q8NQ56	6,02	34,71
84	ABC-type transporter, ATPase component	Q8NME8	9,36	24,49
85	30S ribosomal protein S8	Q8NSX8	9,60	14,29
86	Molybdopterin biosynthesis enzyme	Q8NS03	8,13	44,18
87	Preprotein translocase subunit SecE	Q9LAK8	9,46	11,53
88	30S ribosomal protein S4	Q8NSV4	9,95	23,33
89	50S RIBOSOMAL PROTEIN L14	Q8NSZ4	9,93	13,34
90	50S RIBOSOMAL PROTEIN L14	Q8NSZ4	9,93	13,34
91	50S RIBOSOMAL PROTEIN L14	Q8NSZ4	9,93	13,34
92	Hypothetical membrane protein	Q8NR15	10,22	10,10
93	30S ribosomal protein S7	Q8NT20	10,25	17,48
94	50S ribosomal protein L9	Q8NLG1	9,17	15,94
95	FAD/FMN-containing dehydrogenases	Q8NTW2	5,68	53,06
96	ABC-type transporter, ATPase component	Q8NME8	9,36	24,49

Tabelle 5-2: Identifizierte basische *C. glutamicum* Proteine

#### 5.4 Nachweis und Identifizierung niedrig-exprimierter *C. glutamicum* Proteine

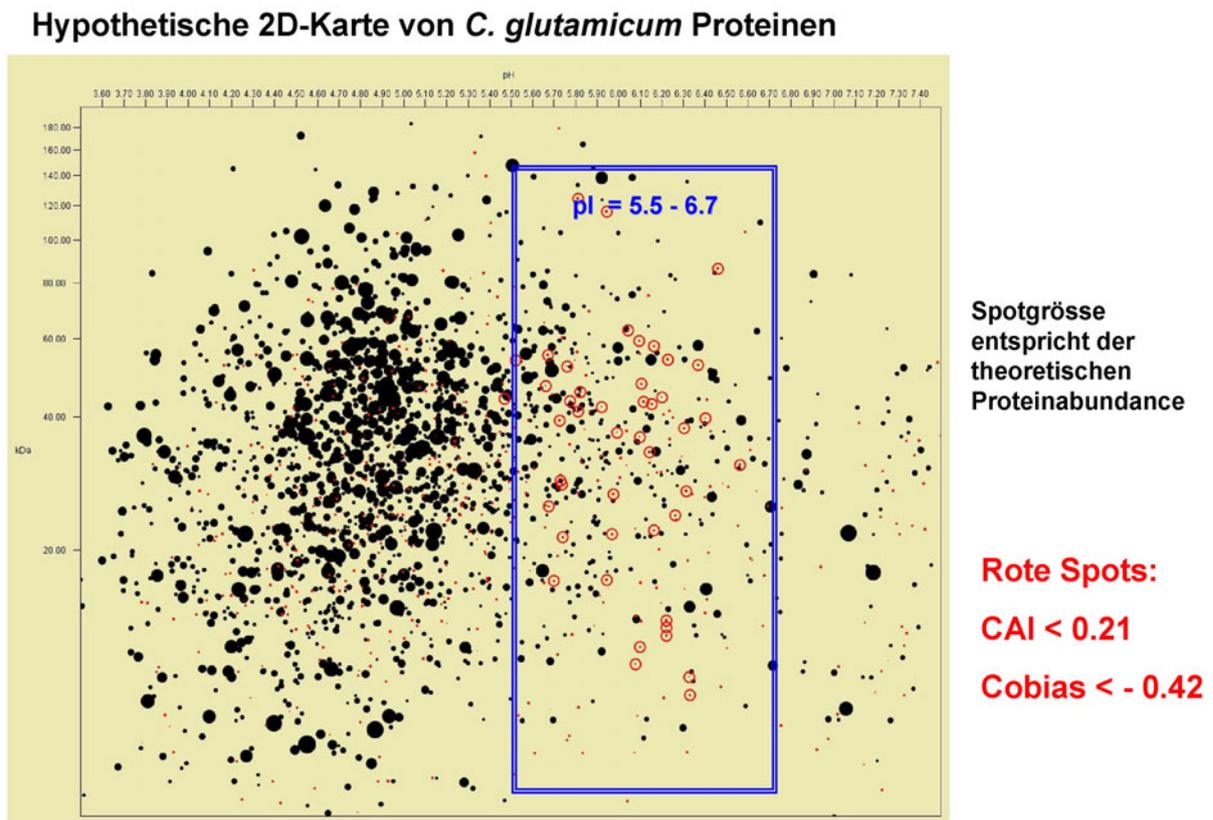
Da es für Proteine, anders als für Nucleinsäuren, keine Amplifizierungsmöglichkeit analog zur PCR gibt, bleiben letztlich zwei Möglichkeiten für den Nachweis niedrig-exprimierter Proteine: Zum einen durch hochsensitive Proteindetektionsverfahren, wie z.B. durch Markierung mit radioaktiven Isotopen und Nachweis durch Multiphotonendetektions-(MPD)-Technologie. Nachteilig ist jedoch neben den hohen apparativen Kosten vor allem die Unmöglichkeit, die auf diese Weise detektierten Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren, da die vorhandenen Proteinmengen hierzu in aller Regel nicht ausreichend sind. Der andere Ansatz zum Nachweis niedrig exprimierter Proteine auf 2D Gelen besteht in der Auftragung einer größeren Proteinmenge. Diese ist allerdings dadurch limitiert, dass mit zunehmender Proteinbeladung mehr und mehr Proteine an der Auftragsstelle aggregieren bzw. an den Elektroden präzipitieren und dadurch die elektrophoretische Auftrennung erheblich beeinträchtigen; die einzig sinnvolle Abhilfe ist der Einsatz von Proteinvorfraktionierungsverfahren vor der eigentlichen 2D Elektrophorese.

Im Nachfolgenden wurde die von Görg *et al.* entwickelte Methode eines ursprünglich zur analytischen Trennung und Charakterisierung technischer Enzyme eingesetzten Proteintrennverfahrens (basierend auf Sephadex-IEF) zur Vorfraktionierung von Proteinen [46] angewendet bzw. optimiert. Hierbei werden bis zu 10 Milligramm eines komplexen Proteingemischs zunächst auf einem Sephadex-IEF Gel in 5-10 Fraktionen (je nach verwendetem pH-Gradienten) aufgetrennt, und die gewonnenen Fraktionen anschließend 2D elektrophoretisch in engen IPG-Streifen des entsprechenden pH-Bereichs näher analysiert. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu anderen Vorfraktionierungsverfahren liegt neben dem geringen apparativen Aufwand vor allem darin, dass die vorfraktionierten Proben ohne zusätzlichen Reinigungs- oder Aufkonzentrierungsschritt mit hoher Ausbeute elektrophoretisch aus dem Sephadex-Gel direkt in das IPG-Gel transferiert und anschließend auf hochauflösenden 2DE-Gelen analysiert werden. Da Mengen bis zu 5 Milligramm der vorfraktionierten Probe auf einem einzigen 2DE-Gel aufgetragen werden können, sollte es möglich sein, auch niedrig abundante Proteine zu detektieren und massenspektrometrisch zu identifizieren.

Zur Definition der niedrig-exprimierten Proteine verwendeten wir den *Codon-Adaptive-Index* (CAI) [92] und den *Codon Bias* [102]. Beide beschreiben das Phänomen, dass Varianten des universellen genetischen Codes von verschiedenen Spezies unterschiedlich verwendet werden. Das heißt, bestimmte Codons des degenerierten Codes werden bevorzugt benutzt, was letztlich der tRNA Konzentration innerhalb der Zelle entspricht. Die Codon Usage spielt eine große Rolle bei der Regulation der Proteinbiosynthese. Selten verwendete Codons können die Translation bremsen, während häufig genutzte Codons die Translation beschleunigen können. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die Menge der in der Zel-

le vorkommenden Proteine ziehen. Obwohl die Menge der Proteine von sehr vielen Faktoren abhängt, zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen dem Vorkommen der Proteine in der Zelle und der *Codon-Usage*; dies wurde auch für niedrig exprimierte Proteine gezeigt [103, 104].

Der Codon-Adaptive-Index wird in dem Computerprogramm JVirGel [71, 72] (Abbildung 5-20) verwendet, welches wir zur Vorhersage des Vorkommens von niedrig exprimierten Proteinen benutzten. Die Daten von *C. glutamicum* verifizierten wir mit Hilfe einer Datenbank, die uns freundlicherweise Herr Dr. Jörn Kalinowski (Universität Bielefeld) im Rahmen unseres BMBF-Projektes zur Verfügung gestellt hatte. Diese Datenbank wurde speziell für *C. glutamicum* basierend auf den Algorithmen der Veröffentlichung von McHardy *et. al.* [102] berechnet. Die beiden verwendeten Algorithmen zeigten trotz ihrer unterschiedlichen mathematischen Grundlage nur eine Abweichung von 10% zueinander. Für den *CAI* definierten wir Proteine als niedrig abundant, wenn ihr Wert kleiner 0,21 war. Bei Verwendung des *Codon Bias* setzten wir die Grenze für ein niedrig abundantes Protein bei einem Wert unter -0,42.



„Ein Gen mit einem niedrigen **Codon Adaptation Index (CAI) < 0.21** oder **Cobias < - 0.42** codiert meistens ein low abundance Protein“

**Abbildung 5-20: Vorhersage der Proteinhäufigkeit (Abundance)**

Mit dem Programm JVirGel [71, 72] ist es möglich die Protein Abundance vorherzusagen. Das Volumen der Spots ist proportional zur theoretischen Menge des Proteins in der Zelle .

Es gelang uns nach isoelektrischer Vorfraktionierung in Sephadex-Gelen eine ganze Reihe bislang nicht nachweisbarer putativer niedrig abundanter *C. glutamicum* Proteine zu detektieren und zu identifizieren. Abbildung 5-20 zeigt ein theoretisch berechnetes 2DE Muster unter Angabe der Häufigkeit sowie die im pH-Bereich 5.5-6.7 tatsächlich detektierten und identifizierten Proteine (rot markiert).

Die erhaltenen Ergebnisse werden im Kapitel 5.4.3 eingehender erläutert und diskutiert. Im Folgenden soll zunächst die Optimierung der Methode näher beschrieben werden.

#### 5.4.1 Optimierung der isoelektrischen Vorfraktionierung in Sephadex-Gelen

##### Herstellung der Sephadex-Trenn-Matrix

2,5 ml des in 4.3.4.1 beschriebenen Quellpuffers werden mit 120  $\mu$ l Pharmalyte 3-10 bzw. 120  $\mu$ l Pharmalyte 8,5-10,5 (je nach gewünschtem pH-Gradienten) gemischt. Danach füllt man bis zu einem Volumen von 3 ml mit Quellpuffer auf. Die Pharmalytkonzentration sollte keinesfalls mehr als 4% (v/v) betragen. Diese Mischung vermennt man in einem (5ml) Rollrandglas vorsichtig mit 210 mg Sephadex G100 SF (bzw. 145 mg Sephadex G200 SF), so dass keine Luftblasen entstehen. Die erhaltene zähflüssige Mischung lässt man 12-48h bei 4° C quellen.

##### Mischen der Probe mit der gequollen Trennmatrix

Zu der aufzutrennenden Proteinprobe fügt man je 6  $\mu$ l eines farbigen *pI*-Markers hinzu. Anschließend wird mit dem in 4.2 beschriebenen Lysispuffers auf ein Volumen von 1,5 ml aufgefüllt. Man vermischt dies vorsichtig, um Luftblasen zu vermeiden, mit 3 ml der gequollenen Matrix. Die richtige Vermengung ist dann erreicht, wenn die farbliche Beschaffenheit gleichmäßig ist.

##### Verwendete farbige *pI*Marker

Bei der Sephadex-Vorfraktionierung wurden farbige, niedermolekulare *pI*-Marker von Dr. Karel Slais [105, 106] (Universität Brunn) zur pH-Identifikation und -Zuordnung verwendet. Diese Verbindungen besitzen wegen ihres zwitterionischen Aufbaus einen isoelektrischen Punkt und verhalten sich im elektrischen Feld wie Proteine und dienen somit als *pI*-Marker.

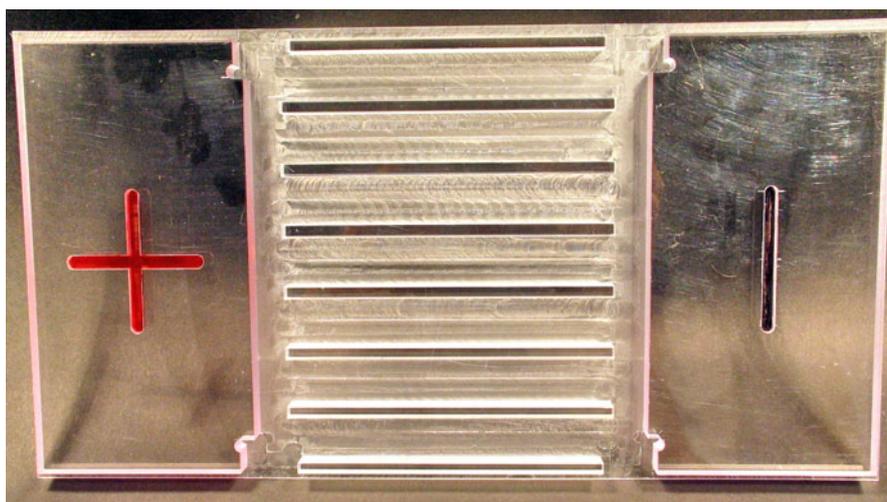
Verwendet wurden folgende *pI* Marker:

<b>pI-Wert</b>	<b>Farbe</b>
4,7	rot-orange
5,3	lila
5,6	gelb-orange
6,3	dunkelrot
7,5	ziegelrot
8,0	orange
8,6	braun

**Tabelle 5-3: Farbige pI-Marker [105, 106]**

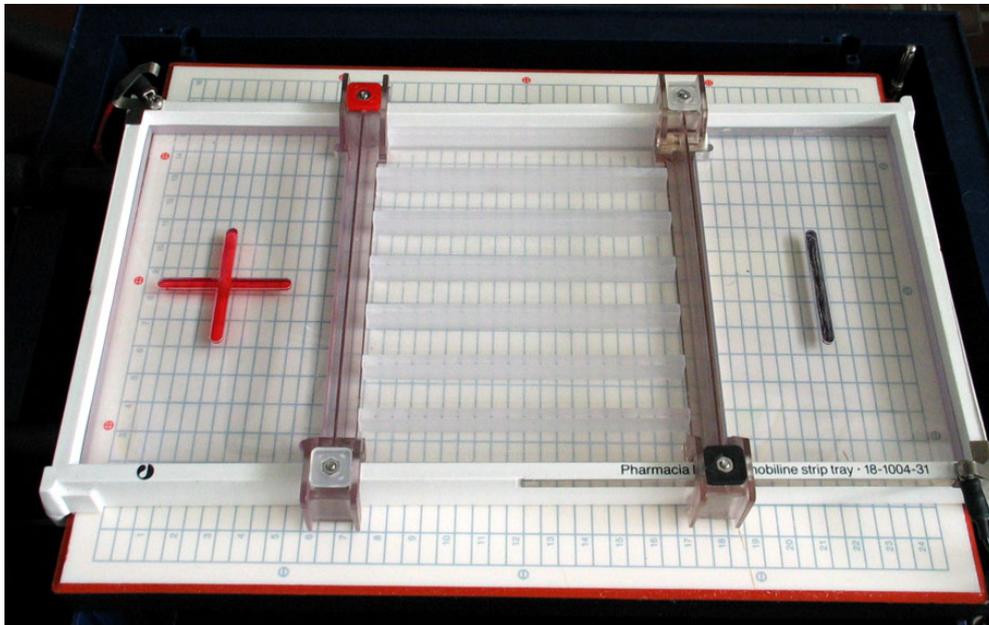
### **Auftragen der Probe und isoelektrische Fokussierung**

In Abb. 5-21 ist der selbst angefertigte Prototyp zur Vorfraktionierung abgebildet. Diese aus Polycarbonat bestehende Vorrichtung wurde nach Vorlage der Veröffentlichung von *Göryg et. al.* [46] hergestellt und entsprechend modifiziert, so dass sie in die Multiphorapparatur passt, siehe Abb 5-22.



**Abbildung 5-21: Sephadex-IEF-Tray (Prototyp) aus Polycarbonat**

Bevor man die Probe vorsichtig, um Luftblasen zu vermeiden, in eine Laufbahn einpipettiert, werden die Elektroden angebracht, unter denen sich je 2 Lagen mit destilliertem Wasser angefeuchtetes Elektrodenpapier befindet.



**Abbildung 5-22: Verbesserter Sephadex-IEF-Tray in der Multiphor-Apparatur**

Der Sephadex-Tray wurde an die Multiphoreinheit adaptiert.

Folgende Laufparameter wurden für die Sephadex-IEF verwendet:

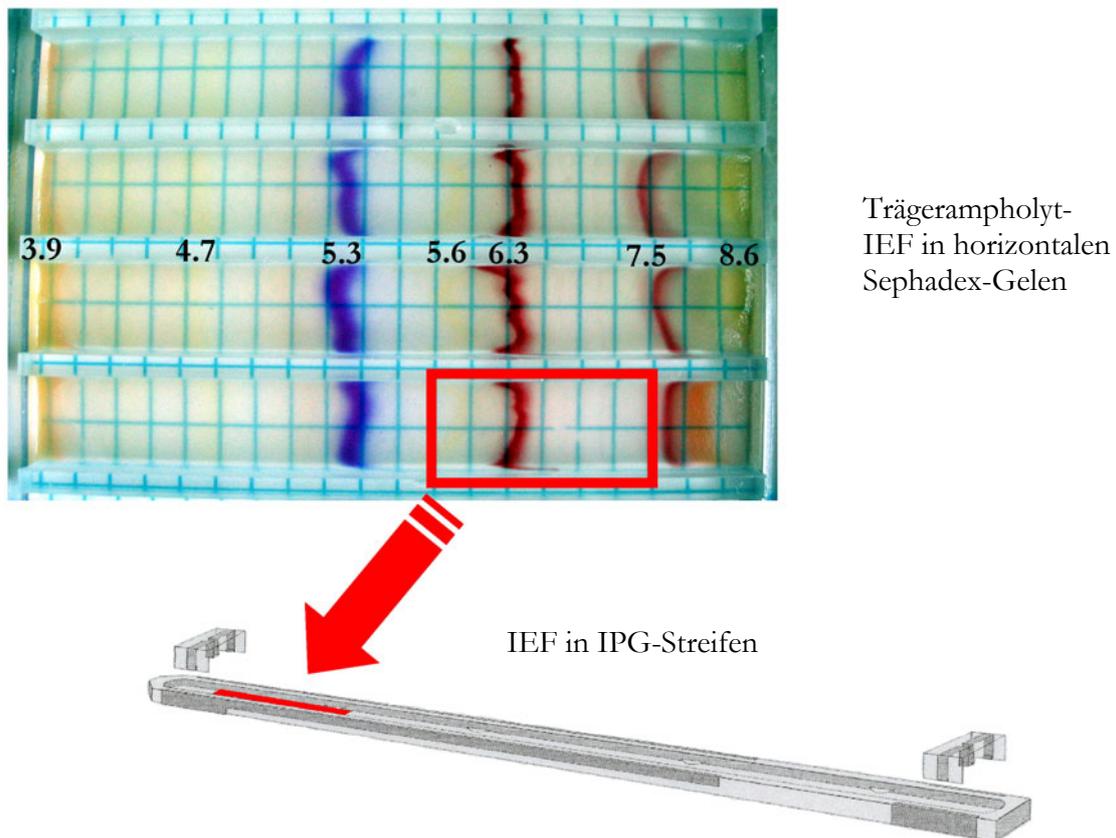
Laufzeit	angelegte Spannung	angelegter Strom
30 min	150 V	0,4 mA pro Bahn
30 min	300 V	0,4 mA pro Bahn
1 h	600 V	0,4 mA pro Bahn
1-3 h	1000 V	0,4 mA pro Bahn

**Tabelle 5-4: IEF Laufparameter in Sephadex-Gelen**

Die IEF wurde als beendet angesehen, sobald die  $pI$ -Marker als definierte scharfe Linie fokussierten. Ein weiteres Indiz der abgeschlossenen IEF ist das von der Trägerampholyt-fokussierung bekannte Phänomen der Kathodendrift, d.h., dass sich die  $pI$ -Marker in ihrer relative Lage zueinander nicht mehr ändern, sondern als Ganzes zu Kathode wandern.

### Entnahme der vorfraktionierten Probe

Die vorfraktionierte Probe wird mit der Sephadexmatrix, je nach gewünschtem pH-Bereich der folgenden IEF im IPG-Streifen, portionsweise (Abb. 5-23) mit einem Spatel entnommen. Die vorfraktionierte Probe kann nun direkt verwendet oder bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zum weiteren Gebrauch gelagert werden. Zur besseren Dosierung beim Aufbringen auf den IPG-Streifen bzw. zur Lagerung überführt man die Sephadexportionen in eine Klarsichthülle und verschweißt die einzelnen Portionen. Vor dem Start der IEF in IPG-Streifen verwendet man die Klarsichtfolie wie eine Tortengusshilfe, indem man eine Ecke der Klarsichtfolie abschneidet und an dieser Stelle die Sephadexmatrix, welche die vorfraktionierte Probe enthält, herausdrückt und vorsichtig auf das anodale Ende (siehe Abb. 5-23) des IPG-Streifens aufträgt.



**Abbildung 5-23: Sephadexentnahme nach IEF-Vorfraktionierung**

Entnahme des Sephadexbereiches, welcher die vorfraktionierten Proteine enthält und Auftrag auf den rehydratisierten IPG-Streifen

## Anpassung der IPG-IEF nach Vorfraktionierung

Durch die Vorfraktionierung erhält man Fraktionen mit einer sehr hohen Proteinkonzentration (bis zu zwei mg Protein pro IPG-Streifen). Da meistens enge pH-Gradienten mit 24 cm Trenndistanz verwendet wurden, wurde das Protokoll zur IEF entsprechend den in Tab. 5-5 aufgelisteten Parametern angepasst; dabei erwies sich die Verlängerung der Probeneintrittszeit als sehr vorteilhaft.

pH-Gradient	150V	300V	600V	Gradient auf 8000V	8000V	Voltstunden
Eine pH-Einheit	2 h	2 h	3 h	1 h	15 h	120000
Zwei pH-Einheiten	2 h	2 h	3 h	1 h	10 h	80000

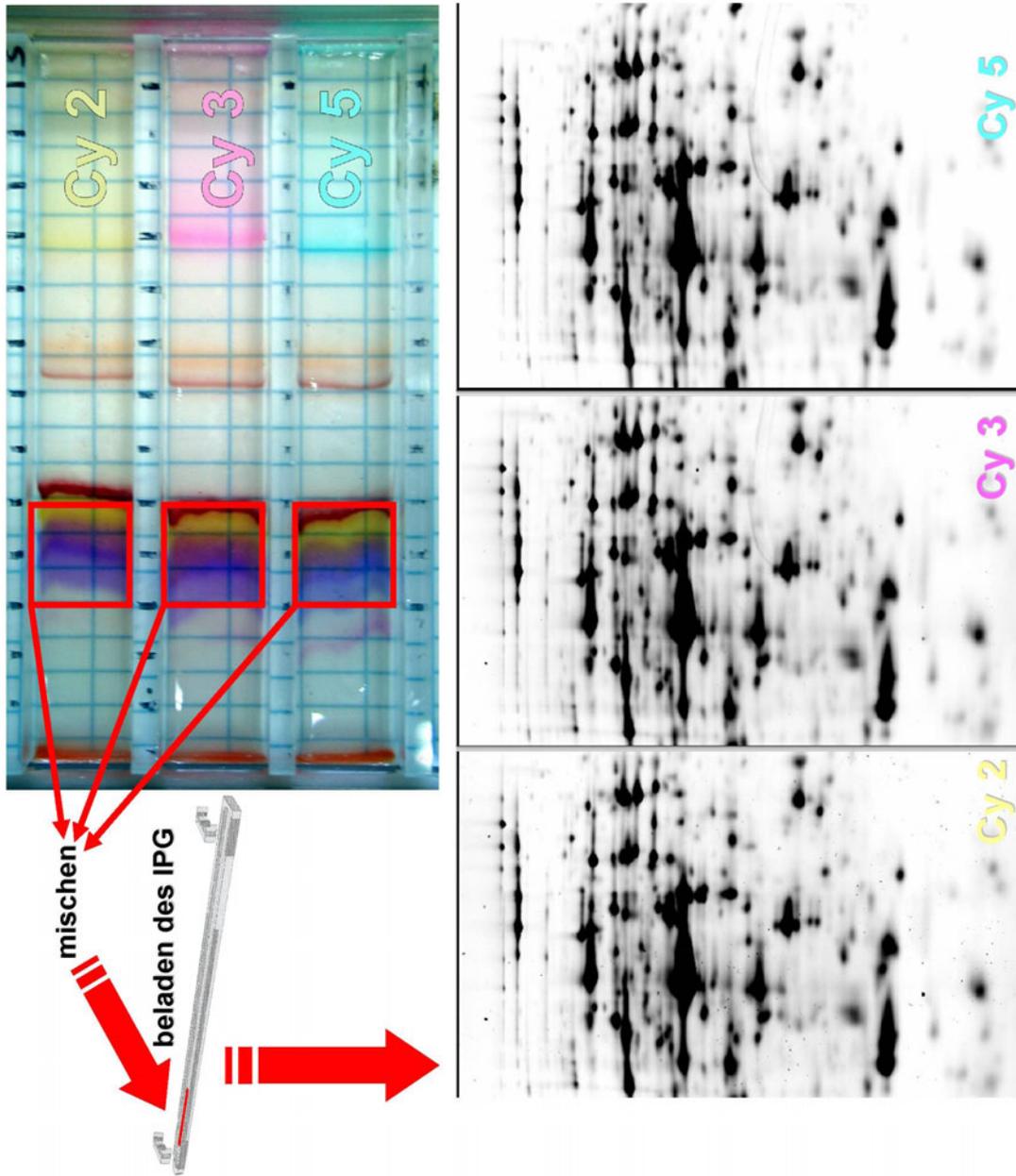
**Tabelle 5-5: IPG-IEF-Laufbedingungen**

Verlängerte Probeneintrittszeit im Vergleich zum Standardprotokoll

### 5.4.2 Reproduzierbarkeit der Sephadex-IEF

Bei der Verwendung des neuentwickelten Trays erfolgt in jeder einzelnen Bahn eine unabhängige IEF mit allen damit verbundenen Unwägbarkeiten. Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, d.h. um zu zeigen, ob in jeder Bahn eine identische Auftrennung erfolgt, wurde eine Sephadex-IEF mit CyDye markierten Proteinen durchgeführt. Wie in Abbildung 5-24 dargestellt, wurde jede Bahn des Sephadex-IEF-Trays mit *C. glutamicum* Proteinen beladen, welche vorher mit jeweils einem CyDye-Fluorophor markiert worden waren; die Eigenfarbe der CyDyes ist am rechten Ende des Trays gut zu erkennen. Nach Beendigung der Vorfraktionierung wurden die in der Abbildung 5-24 markierten Bereiche entnommen, gemischt und auf *einen einzigen* IPG-Streifen aufgebracht. Nach der 2D-Gelelektrophorese wurde das Gel eingescannt und mit einer entsprechenden Image-Analyse Software ausgewertet. Der untere Teil der Abbildung 5-29 zeigt die Ergebnisse der einzelnen zu den CyDyes korrespondierenden Farbkanäle. Wie unschwer zu erkennen ist, sind die Muster identisch.

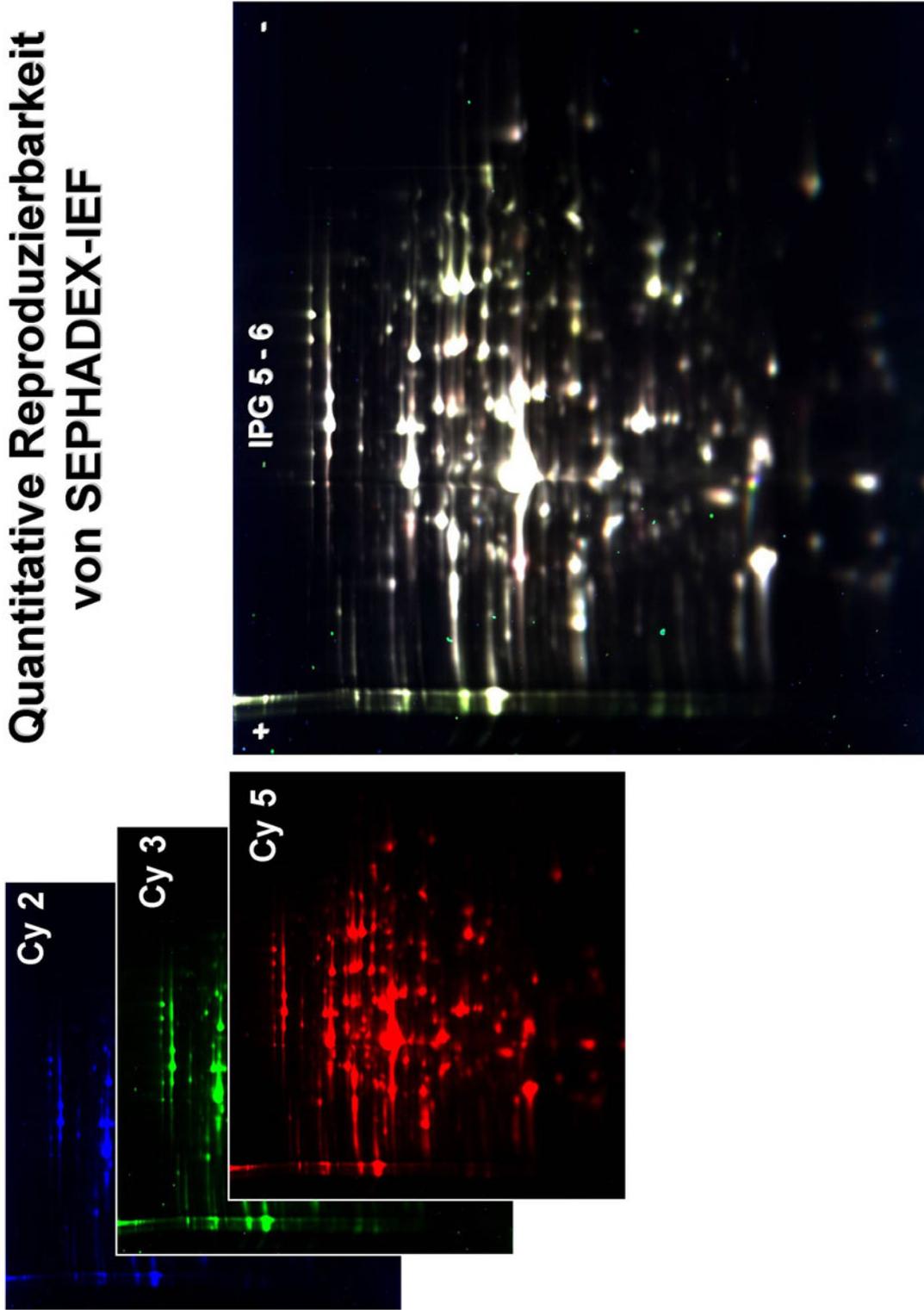
Ein weiterer Test, der nicht nur die qualitative sondern auch die quantitative Reproduzierbarkeit überprüfen sollte, zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Fokussierungsmustern (Abbildung 5-25). Falls ein Unterschied bestehen würde, müsste eine Farbe der Einzelgele dominieren, wenn man die drei Farbkanäle übereinander anzeigt. Dies ist aber offensichtlich nicht der Fall, da die Spots überwiegend weiß sind, es stellt die Mischfarbe der drei Einzelkanäle dar.



**Abbildung 5-24: Reproduzierbarkeit der Sephadex-IEF**

Drei Aliquots einer Probe wurden mit Cy2, Cy3 bzw. Cy5 markiert und parallel in drei Bahnen fokussiert. Nach beendeter Vorfraktionierung wurden drei korrespondierende pH-Intervalle entnommen, gemischt und auf einen IPG-Streifen für die 2D-Elektrophorese aufgetragen. Die resultierenden 2DE Muster sind nahezu identisch.

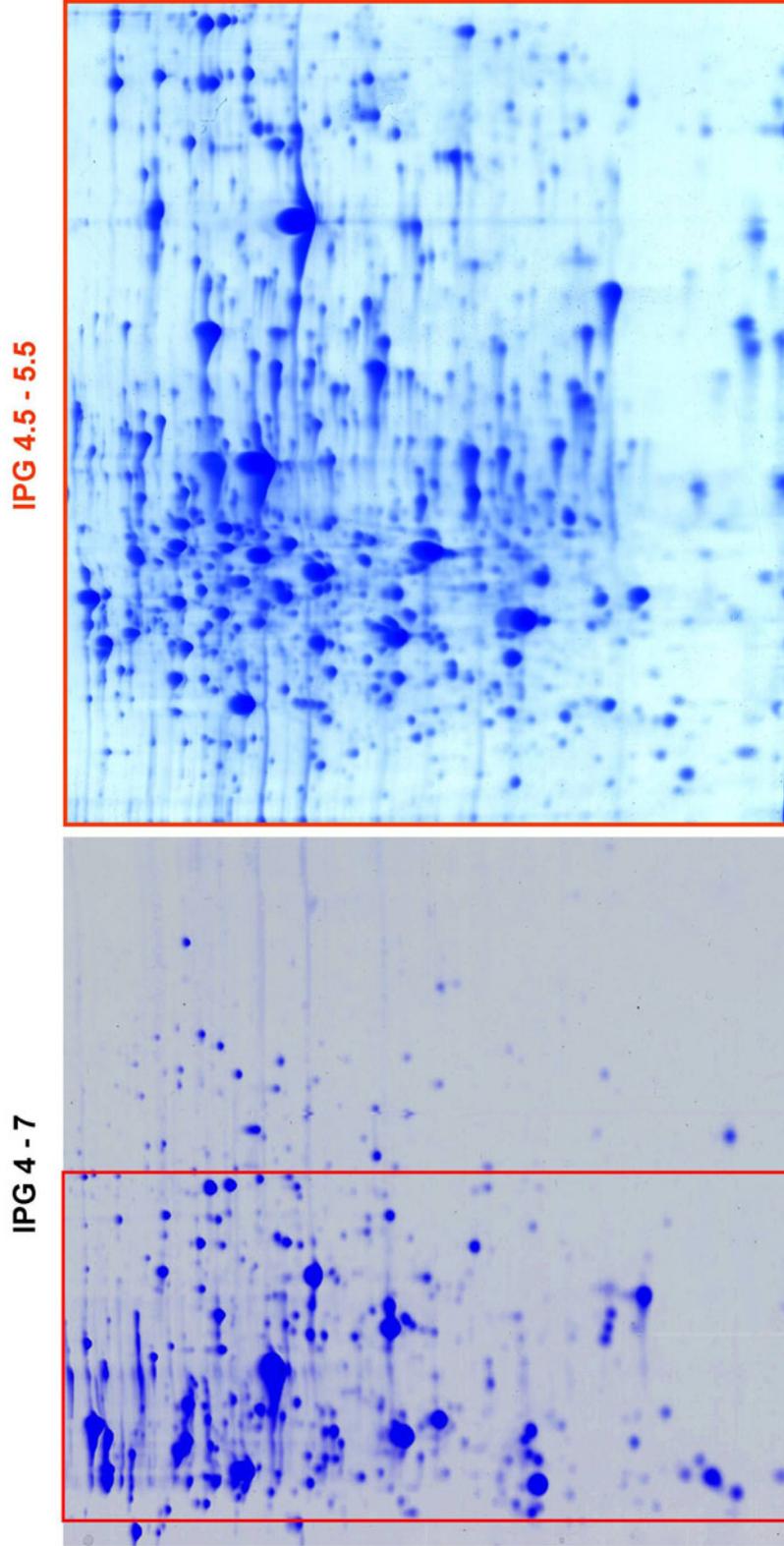
## Quantitative Reproduzierbarkeit von SEPHADEX-IEF



**Abbildung 5-25: Quantitative Reproduzierbarkeit der Sephadex-IEF**

Die Ergebnisse von Abb. 5-24 im quantitativen Farbvergleich, auch hier zeigten sich keinerlei Unterschiede.

**Erhöhte Anzahl von Spots nach Vorfraktionierung mit  
Sephadex-IEF, anschließende IEF in einem engen pH-Bereich  
IPG 4.5 - 5.5**

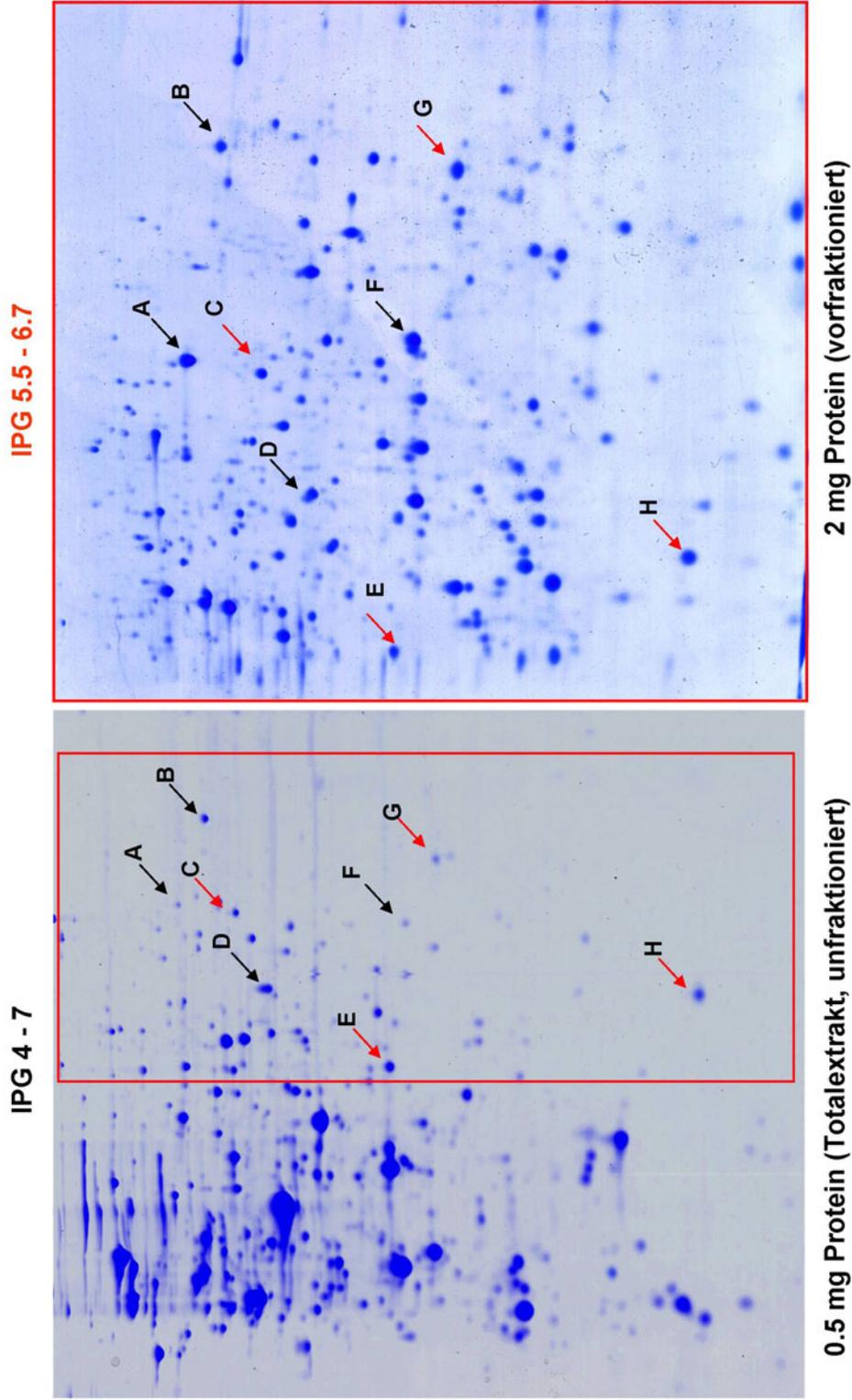


**0.5 mg Protein (Totalextrakt, unfraktioniert)**

**2 mg Protein (vorfraktioniert)**

**Abbildung 5-26: Erhöhte Spotanzahl nach Vorfraktionierung (Sephadex-IEF) in Kombination mit engen IPGs (I)**  
Links: IPG 4-7, Totalextrakt. Rechts: IPG 4.5-5.5, nach Vorfraktionierung mit Sephadex-IEF. Roter Rahmen im IPG 4-7 markiert den Bereich 4.5-5.5

**Erhöhte Anzahl von Spots nach Vorfraktionierung mit  
Sephadex-IEF, anschließende IEF in einem engen pH-Bereich  
IPG 5.5 - 6.7**



**Abbildung 5-27: Erhöhte Spotanzahl nach Vorfraktionierung (Sephadex-IEF) in Kombination mit engen IPGs (II)**  
Links: IPG 4-7, Totalextrakt. Rechts: IPG 5.5-6.7, nach Vorfraktionierung mit Sephadex-IEF. Roter Rahmen im IPG 4-7 markiert den Bereich 5.5-6.7

Die von *Görg et al.* [46] erstmals beschriebene Methode konnte in mehreren Punkten verbessert werden: Erstens wurde ein stabiler Tray mit einer geringen Proteinabsorptionskapazität entwickelt, der sich perfekt in die Multiphor-Apparatur integriert, und bei dem keine Randeﬀekte entstehen. Zweitens konnte durch die Verwendung von farbigen *pI*-Markern [105, 106] der zu entnehmende vorfraktionierte Probenbereich besser deﬁniert, und somit die Reproduzierbarkeit der Methode erheblich gesteigert werden.

#### 5.4.3 Erhöhte Anzahl von Spots nach Vorfraktionierung in Sephadex-IEF Gelen

Die in den Abbildungen 5-26 und 5-27 dargestellten Resultate verdeutlichen, dass die Zahl der detektierbaren Spots nach Vorfraktionierung mittels Sephadex-IEF in Kombination mit engen IPGs deutlich höher ausfällt als durch die alleinige Verwendung enger bzw. ultra-enger IPGs. Ähnliche Ergebnisse einer Vorfraktionierung von *C. glutamicum* Proteinen im pH-Bereich 5.0 bis 6.0 sind in Abbildung 5-28 und der dazugehörigen Tabelle 5-6 dargestellt.

Aus Abbildung 5-28 und Tabelle 5-6 ist ersichtlich, dass nach Vorfraktionierung nicht nur die Anzahl von *Isoformen* verschiedener Proteine höher ist, sondern auch die Gesamtzahl unterschiedlicher *Proteinspezies*.

Beispielsweise konnten in einem willkürlich ausgewählten Gelausschnitt im pH-Bereich 5.0-5.7 (Abb. 5-29) ohne Vorfraktionierung 46 Spots identifiziert werden, die insgesamt 28 unterschiedliche Proteinspezies enthielten. Die entsprechenden Zahlen nach isoelektrischer Vorfraktionierung im Sephadex Gel lauten: 96 identifizierte Proteine und insgesamt 60 unterschiedliche Proteinspezies (Tab. 5-7).

Diese Resultate stützen die von Westbrook *et al.* [88], die im Jahre 2001 durch Verwendung von *zoom-in* IPGs publizierten Ergebnisse und widerlegen somit die häufig vertretene These, dass durch Verbesserung der Auflösung lediglich mehr Isoformen der Proteine zu finden sind.

#### 5.4.4 Erhöhte Qualität der MS-Spektren nach Sephadex-IEF

Durch isoelektrische Vorfraktionierung in Sephadex-Gelen konnte bedeutend mehr Proteinmenge pro IPG-Streifen aufgetragen werden, ohne dass die Auftrennung durch Ausbildung von horizontalen Streifen bzw. Proteinenpräzipitation an den Elektroden beeinträchtigt wurde. Aufgrund dieser größeren Proteinmenge pro Spot konnten sowohl die Qualität der MS-Spektren verbessert, als auch die Sequenzabdeckung gesteigert, und somit die Proteinidentifikation mit dem Massenspektrometer wesentlich erleichtert werden.

Identifikation von *C. glutamicum* Proteinen nach Sephadex-IEF

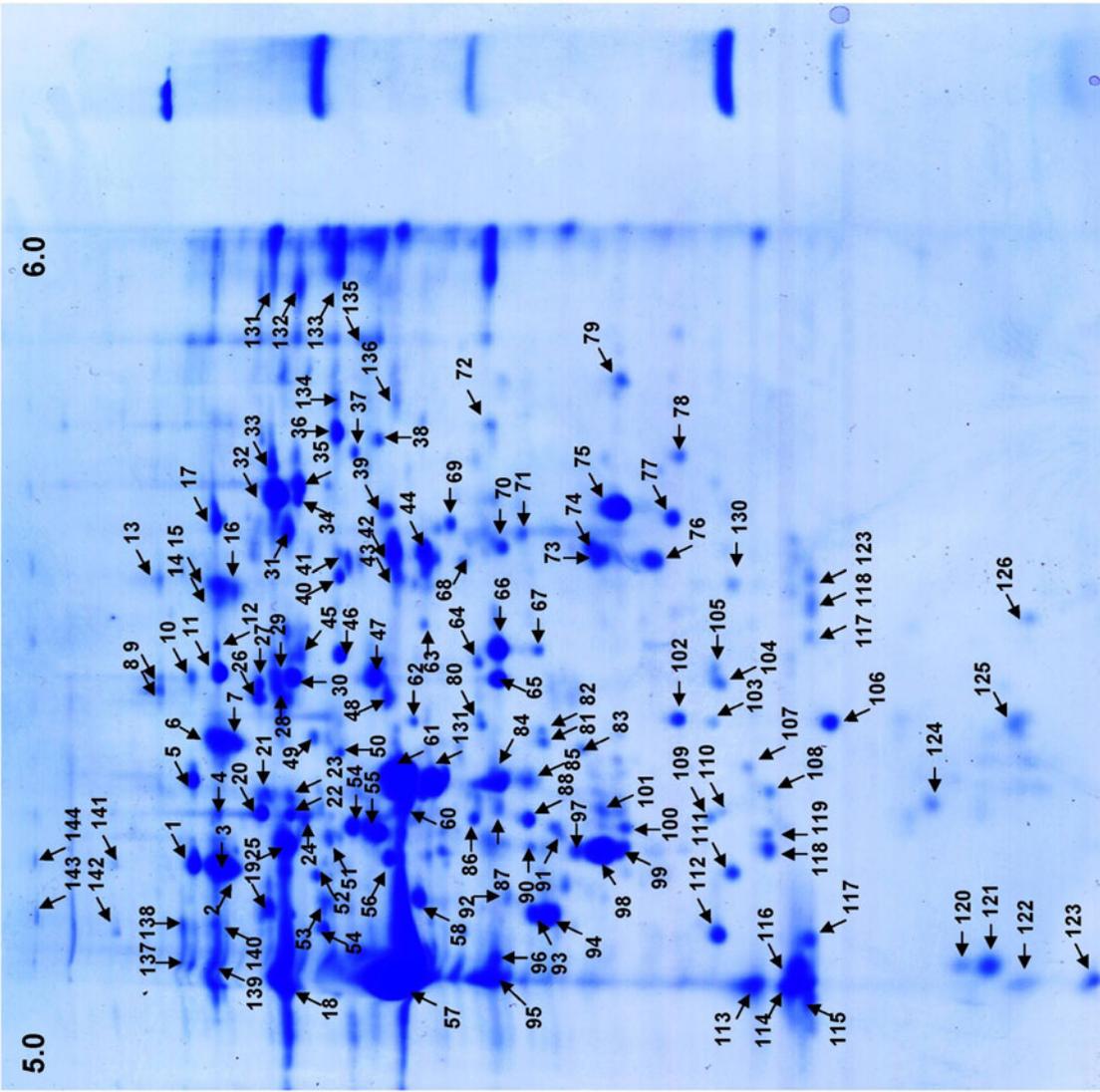


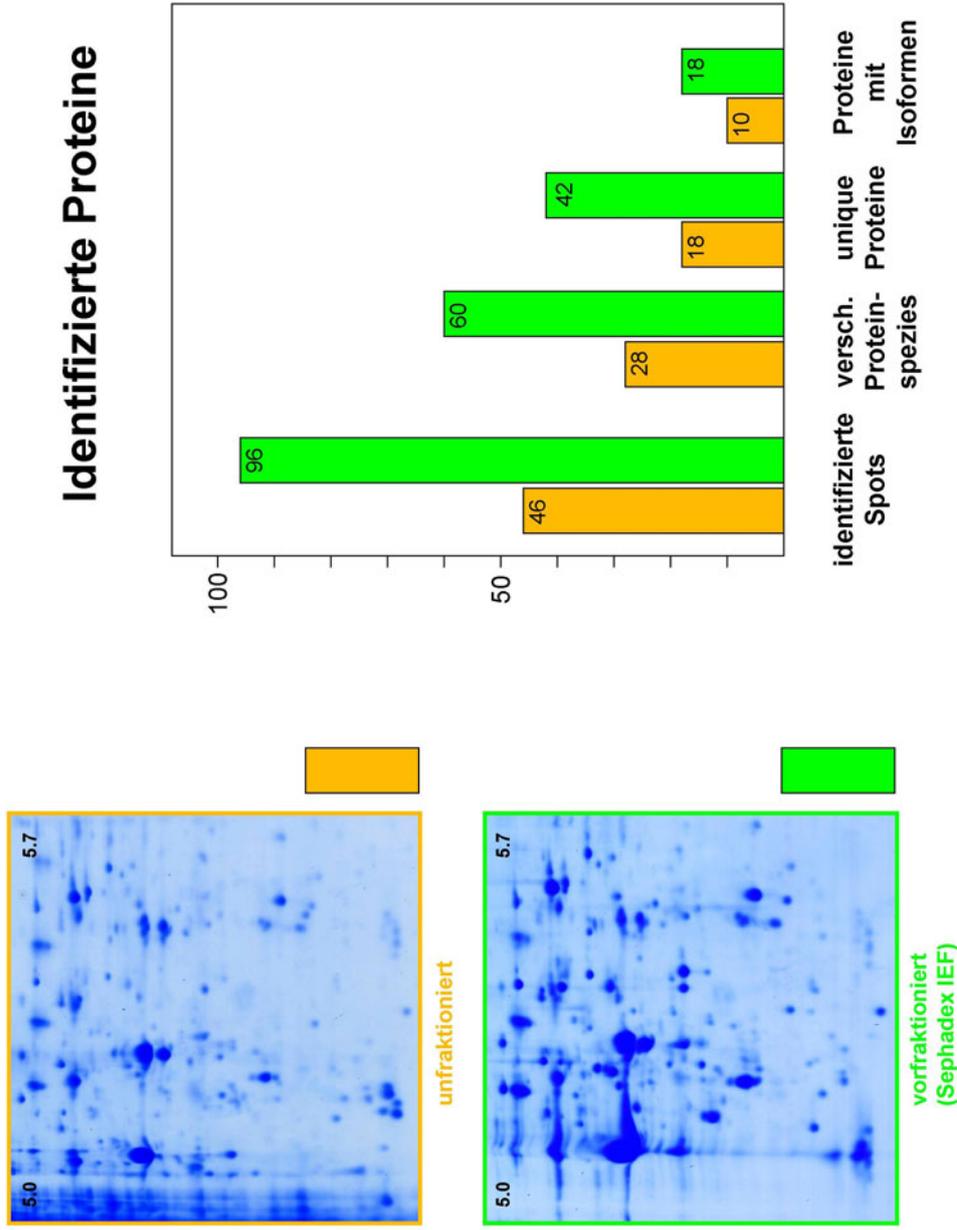
Abbildung 5-28: Identifizierte Proteine nach Vorfractionierung mit Sephadex-IEF und Verwendung eines IPG 5.0 – 6.0

IPG 5.0 – 6.0, beladen mit 2mg vorfractionierter Proteine, die Nummerierung entspricht den in Tabelle 5-6 aufgelisteten Proteinen.

Spot-No.	Protein information	Coverage	pl	Mass [kDa]	Spot-No.	Protein information	Coverage	pl	Mass [kDa]
1	Cg1432 - (IND) [C]: DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE (EC 4.2.1.9)   Ncgl1219 (	40.0	5.2	64.66	61	Cg1791 - (gpj) [C]: GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC	31.4	5.2	36.03
2	g119551506 g REF GENOME Ncgl0251 - catalase [Coynebacterium glutamicu	50.6	5.2	58.69	62	Cg2910 - [C]: Transcriptional regulator, LacI family   Ncgl2538 (COG1609) [K]; Trar	28.3	5.3	36.84
2	Cg0310 - (kba) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   Ncgl0251 (COG0753) [P]; Calais	31.8	5.2	58.69	64	Cg3007 - (pws) [C]: RNA POLYMERASE SIGMA FACTOR, PUTATIVE   Ncgl26	41.8	5.3	35.29
4	Cg2891 - (poxB) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.2.2)   Ncgl2521 (C	10.4	5.3	61.93	65	Cg2222 - (pwsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2   Ncgl1950 (COG0052) [J]; Ri	31.3	5.3	30.10
5	Cg1432 - (IND) [C]: DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE (EC 4.2.1.9)   Ncgl1219 (	16.2	5.2	64.66	66	Cg2222 - (pwsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2   Ncgl1950 (COG0052) [J]; Ri	46.3	5.3	30.10
6	Cg0310 - (kba) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   Ncgl0251 (COG0753) [P]; Calais	29.1	5.2	58.69	67	Cg2938 - (mef) [C]: SUCCINYL-COA SYNTHETASE ALPHA SUBUNIT (EC 6.2.1.	38.8	5.3	30.24
7	Cg0310 - (kba) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   Ncgl0251 (COG0753) [P]; Calais	9.8	5.2	58.69	68	Cg2938 - (mef) [C]: SUCCINYL-COA SYNTHETASE ALPHA SUBUNIT (EC 6.2.1.	36.6	5.3	30.24
10	Cg1432 - (IND) [C]: DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE (EC 4.2.1.9)   Ncgl1219 (	12.4	5.2	64.66	69	Cg2938 - (mef) [C]: SUCCINYL-COA SYNTHETASE ALPHA SUBUNIT (EC 6.2.1.	28.4	5.4	24.56
11	Cg2891 - (poxB) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.2.2)   Ncgl2521 (C	7.3	5.3	61.93	70	Cg2377 - (rmaW) [C]: S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase involved	49.3	5.4	36.79
12	Cg2891 - (poxB) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.2.2)   Ncgl2521 (C	14.4	5.3	61.93	71	Cg1766 - (rmaA) [C]: RRNA GUANINE-N1-METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.51)	24.0	5.3	30.69
14	Cg0310 - (kba) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   Ncgl0251 (COG0753) [P]; Calais	18.4	5.2	58.69	72	Cg2222 - (pwsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2   Ncgl1950 (COG0052) [J]; Ri	24.6	5.3	30.10
15	Cg0310 - (kba) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   Ncgl0251 (COG0753) [P]; Calais	11.6	5.2	58.69	73	Cg1067 - [C]: Ribosome-associated protein Y (P5ip-1)   Ncgl0725 (COG1544) [J];	43.4	5.4	24.56
16	Cg0310 - (kba) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   Ncgl0251 (COG0753) [P]; Calais	11.8	5.2	58.69	74	Cg1067 - [C]: Ribosome-associated protein Y (P5ip-1)   Ncgl0725 (COG1544) [J];	25.8	5.4	24.56
17	Cg2891 - (poxB) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.2.2)   Ncgl2521 (C	10.2	5.3	61.93	75	Cg1067 - [C]: Ribosome-associated protein Y (P5ip-1)   Ncgl0725 (COG1544) [J];	20.1	5.4	26.63
18	Cg2840 - (edaA) [C]: BUTYRYL-COA ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (E	14.9	5.1	54.50	76	Cg1067 - [C]: Ribosome-associated protein Y (P5ip-1)   Ncgl0725 (COG1544) [J];	47.1	5.4	24.56
19	Cg2192 - (mcp) [C]: MALATE QUINONE OXIDOREDUCTASE OXIDOREDUCTAS	19.6	5.2	54.81	77	Cg2685 - [C]: PUTATIVE SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE/REDUCTASE   Ncgl	39.4	5.4	25.27
20	Cg1984 - (puH) [C]: (Q8RH8) 5'-PHOSPHORIBOSYL-5'-AMINOIMIDAZOLE-4-C/	12.7	5.3	55.74	78	Cg2198 - (glaA) [C]: GLUTAMATE UPTAKE SYSTEM ATP-BINDING PROTEIN   N	15.7	5.7	26.52
21	Cg2192 - (mcp) [C]: MALATE QUINONE OXIDOREDUCTASE OXIDOREDUCTAS	9.8	5.2	54.81	80	Cg2393 - (mef) [C]: 5,10-Methylene tetrahydrofolate Reductase (EC 1.7.99.5)   NC	31.6	5.3	36.21
22	Cg1063 - (puA) [C]: ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE (EC 6.3.4.4)   Ncgl26	19.8	5.2	46.75	81	Cg2151 - [C]: Similar to phage shock protein A   Ncgl1886 (COG1842) [K]; Phage	41.7	5.3	30.41
23	Cg2489 - (gvs) [C]: GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE-TRNA LIGASE) (E	13.4	5.3	53.03	82	Cg2151 - [C]: Similar to phage shock protein A   Ncgl1886 (COG1842) [K]; Phage	35.5	5.3	30.41
24	Cg1024 - (amM) [C]: AMP NUCLEOSIDASE (EC 3.2.2.4)   Ncgl0094 (COG0775) [F	18.2	5.2	53.68	83	Cg2151 - [C]: Similar to phage shock protein A   Ncgl1886 (COG1842) [K]; Phage	33.0	5.3	30.41
25	Cg2840 - (edaA) [C]: BUTYRYL-COA ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (E	39.4	5.1	54.50	84	Cg2795 - [C]: NADPH quinone reductase or related Zn-dependent oxidoreductase	23.2	5.3	35.82
26	Cg1984 - (puH) [C]: (Q8RH8) 5'-PHOSPHORIBOSYL-5'-AMINOIMIDAZOLE-4-C/	12.5	5.3	55.74	85	Cg1283 - (iroE2) [C]: PUTATIVE SHIKIMATE / QUINATE 5-DEHYDROGENASE (E	36.9	5.1	28.85
30	Cg2489 - (gvs) [C]: GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE-TRNA LIGASE) (E	13.0	5.3	53.03	86	Cg1259 - (dapD2) [C]: similar to tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase   Ncgl	43.4	5.3	34.93
31	Cg2489 - (gvs) [C]: GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE-TRNA LIGASE) (E	22.3	5.3	53.03	87	Cg2222 - (pwsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2   Ncgl1950 (COG0052) [J]; Ri	21.3	5.3	30.10
32	Cg2291 - (pYK) [C]: PYRUVATE KINASE (EC 2.7.1.40)   Ncgl2008 (COG0469) [C]	30.2	5.4	51.61	88	Cg1766 - (rmaA) [C]: RRNA GUANINE-N1-METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.51)	51.7	5.3	30.69
33	Cg2291 - (pYK) [C]: PYRUVATE KINASE (EC 2.7.1.40)   Ncgl2008 (COG0469) [C]	30.2	5.4	51.61	89	Cg1482 - (hisG) [C]: ATP PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE (EC 2.4.2.17)   NC	60.1	5.2	30.21
34	Cg3428 - (parB) [C]: Predicted transcriptional regulator involved in chromosome pat	23.7	5.4	40.62	90	Cg1482 - (hisG) [C]: ATP PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE (EC 2.4.2.17)   NC	33.4	5.3	34.66
35	Cg0441 - (lpc) [C]: DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE (EC 1.8.1.4)   Ncgl	30.1	5.4	50.63	92	Cg0773 - [C]: PUTATIVE EXOEXYRIBONUCLEASE (EC 3.1.1.2)   Ncgl0641 (	27.6	5.1	35.52
36	Cg1133 - (glaA) [C]: Serine Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)   Ncgl0954 (CO	56.7	5.4	46.52	94	Cg2151 - (necC) [C]: Similar to phage shock protein A   Ncgl1886 (COG1842) [K]; Phage	32.6	5.2	29.36
37	Cg1807 - (dfr) [C]: DNAPPANTO THENATE METABOLISM FLAVOPROTEIN   Ncgl	33.5	5.2	40.96	95	g 11953392 g REF GENOME Ncgl0873 - fructose-bisphosphate aldolase [Cory	41.0	5.0	37.20
39	Cg2206 - (ispB) [C]: involved in the nonmevalonate pathway of terpenoid biosynthe	31.3	5.5	42.56	96	Cg2198 - (glaA) [C]: L-LACTATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.27)   Ncgl2810 (CO	24.2	5.1	34.39
40	Cg1226 - (poxB) [C]: 4-HYDROXYBENZOATE 3-MONOXYGENASE (EC 1.14.13	27.5	5.3	43.94	97	Cg1067 - [C]: Ribosome-associated protein Y (P5ip-1)   Ncgl0725 (COG1544) [J];	43.4	5.4	24.56
41	Cg2300 - (dnh) [C]: MESO-DIAMINOPIMELATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.1.16)	25.6	5.2	35.18	98	Cg1067 - [C]: Ribosome-associated protein Y (P5ip-1)   Ncgl0725 (COG1544) [J];	50.7	5.4	24.56
44	Cg1791 - (gpj) [C]: GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC	10.8	5.2	36.03	99	Cg1067 - [C]: Ribosome-associated protein Y (P5ip-1)   Ncgl0725 (COG1544) [J];	38.0	5.4	24.56
45	Cg1063 - (puA) [C]: ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE (EC 6.3.4.4)   Ncgl26	9.3	5.2	46.75	101	Cg1067 - [C]: Ribosome-associated protein Y (P5ip-1)   Ncgl0725 (COG1544) [J];	43.4	5.4	24.56
46	Cg1133 - (glaA) [C]: Serine Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)   Ncgl0954 (CO	53.2	5.3	46.52	102	Cg1368 - (lshH) [C]: H-ATPASE DELTA SUBUNIT   Ncgl1162 (COG0712) [C]; FO	29.9	5.4	26.86
47	Cg1949 - (glaA) [C]: CITRATE SYNTHASE (EC 4.1.3.7)   Ncgl0795 (COG0372) [C]	39.0	5.2	48.91	103	Cg2900 - (hisH) [C]: IMIDAZOLEGLYCEROL-PHOSPHATE SYNTHASE, AMIDOT	23.9	5.3	20.65
48	Cg1761 - (hisS2) [C]: CYSTEINE DESULFHYDRASE / SELENOCYSTEINE LYASE	31.1	5.3	45.78	104	Cg3224 - [C]: Bacterial regulatory proteins, GNR family   Ncgl2814 (COG2188) [K];	40.7	5.3	25.08
49	Cg1855 - (hisS) [C]: HISTIDYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.21)   Ncgl1585 (CO	29.8	5.2	47.11	106	Cg3071 - (pYF) [C]: OROTATE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (EC 2.4.2.10	59.2	5.4	19.43
50	Cg2588 - (poxB) [C]: GLUTAMATE 5-KINASE PROTEIN (EC 2.7.2.11)   Ncgl2274 (	20.8	5.4	42.61	108	Cg1722 - [C]: GCN5-related N-acetyltransferase   Ncgl1469 (COG0454) [KR]; His	49.3	5.3	21.94
51	Cg1829 - (iroC) [C]: PUTATIVE CHROMINATE SYNTHASE (EC 4.6.1.4)   Ncgl154	14.4	5.2	43.72	109	Cg2364 - [C]: pyridoxal-5-phosphate dependent enzyme   Ncgl2073 (COG0325) [R	40.6	5.3	25.62
52	Cg1855 - (hisS) [C]: HISTIDYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.21)   Ncgl1585 (CO	45.0	5.2	47.11	111	Cg2300 - (hisH) [C]: IMIDAZOLEGLYCEROL-PHOSPHATE SYNTHASE, AMIDOT	21.8	5.2	23.16
53	Cg2876 - (poxB) [C]: ADENYLOSUCCINATE LYASE (EC 4.3.2.2)   Ncgl2509 (CO	32.6	5.2	52.22	112	Cg2079 - [C]: conserved hypothetical protein   Ncgl1824 (COG3253) [S]; Uncharac	63.8	5.2	27.01
54	Cg2300 - (dnh) [C]: MESO-DIAMINOPIMELATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.1.16)	32.2	5.2	35.18	114	Cg2217 - (lfr) [C]: RIBOSOME RECYCLING FACTOR   Ncgl1947 (COG0233) [J]; f	20.5	5.1	20.73
55	Cg0949 - (glaA) [C]: CITRATE SYNTHASE (EC 4.1.3.7)   Ncgl0795 (COG0372) [C]	18.5	5.2	48.91	116	Cg3237 - (sed) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)   NC	46.0	5.1	22.08
56	Cg1761 - (hisS2) [C]: CYSTEINE DESULFHYDRASE / SELENOCYSTEINE LYASE	57.5	5.3	45.78	117	Cg1368 - (lshH) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)   NC	32.0	5.1	22.08
57	Cg1576 - (pntT) [C]: PHENYLALANYL-TRNA SYNTHETASE BETA CHAIN (EC 6.	8.0	4.7	89.42	118	Cg1368 - (lshH) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)   NC	19.4	5.3	22.61
58	Cg0047 - [M]: conserved hypothetical protein   Ncgl0032 (COG3064) [M]; Membran	29.5	5.1	29.40	123	Cg3028 - [C]: SENSOR HISTIDINE KINASE OF TWO-COMPONENT SYSTEM-FR	42.1	5.3	16.29
59	Cg3119 - (cysJ) [C]: Probable Sulfite Reductase (Flavoprotein) (EC 1.8.1.2)   Ncgl	9.4	4.9	50.11	125	Cg3331 - (gdh) [C]: METHYLATED-DNA--PROTEIN-CYSSTEINE METHYLTRANSFER	39.9	5.4	17.26
					143	Cg3398 - [M]: Glycosyl transferase   Ncgl0321 (COG1216) [R]; Predicted glycosylr	10.4	6.4	38.55

Tabelle 5-6: Identifizierte *C. glutamicum* Proteine im Bereich von pH 5.0 – 6.0

Liste der in Abbildung 5-28 gekennzeichneten Spots und mittels MALDI-TOF-PMF identifizierten Proteine.



**Abbildung 5-29: Identifizierte Proteine ohne bzw. nach Vorfraktionierung**

Durch Vorfraktionierung wird nicht nur die Gesamtzahl der detektierten/identifizierten Proteine, sondern auch die Zahl der individuellen Proteine/-spezies erhöht. Orange = unfraktionierte Probe, grün = Sephadex-IEF fraktionierte Probe.

unfraktioniert			vorfraktioniert			Protein information		pl	Mass [kDa]
Spot-No.	Identifikation	Coverage	Matched peptides	Identifikation	Coverage	Matched peptides			
1	no spectrum	—	—	Cg1432	40,0	23	Cg1432 - (ivD) [C]: DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE (EC 4.2.1.9)   NCgl11	5,2	64,66
58	no spectrum	—	—	Cg0047	28,5	4	Cg0047 - [M]: conserved hypothetical protein   NCgl0032 (COG3064) [M]   Meri	5,1	29,40
24	no spectrum	—	—	Cg0124	18,2	8	Cg0124 - (amn) [C]: AMP NUCLEOSIDASE (EC 3.2.2.4)   NCgl0094 (COG077	5,2	53,68
123	no spectrum	—	—	Cg0228	42,1	7	Cg0228 - [C]: SENSOR HISTIDINE KINASE OF TWO-COMPONENT SYSTEM	5,3	16,29
2	Cg0310	48,4	20	Cg0310	50,6	22	Cg0310 - (katA) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   NCgl0251 (COG0753) [P]   Ca	5,2	58,69
3	Cg0310	51,2	23	Cg0310	31,6	13	Cg0310 - (katA) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   NCgl0251 (COG0753) [P]   Ca	5,2	58,69
6	Cg0310	34,5	16	Cg0310	29,1	12	Cg0310 - (katA) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   NCgl0251 (COG0753) [P]   Ca	5,2	58,69
7	Cg0310	34,8	12	Cg0310	9,9	5	Cg0310 - (katA) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   NCgl0251 (COG0753) [P]   Ca	5,2	58,69
14	Cg0310	14,9	6	Cg0310	18,4	6	Cg0310 - (katA) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   NCgl0251 (COG0753) [P]   Ca	5,2	58,69
15	Cg0310	11,4	5	Cg0310	11,6	6	Cg0310 - (katA) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   NCgl0251 (COG0753) [P]   Ca	5,2	58,69
16	Cg0310	13,2	6	Cg0310	11,8	6	Cg0310 - (katA) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   NCgl0251 (COG0753) [P]   Ca	5,2	58,69
134	no spectrum	—	—	Cg0396	10,4	4	Cg0396 - [M]: Glycosyl transferase   NCgl0321 (COG1216) [R]: Predicted glyco	6,4	38,55
35	Cg0441	20,5	10	Cg0441	30,1	12	Cg0441 - (lpd) [C]: DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE (EC 1.8.1.4)   I	5,4	50,63
75	Cg0447	10,0	4	Cg0447	20,1	8	Cg0447 - (sdhB) [C]: succinate dehydrogenase B   NCgl0361 (COG0479) [C]:	5,4	26,63
103	no spectrum	—	—	Cg0696	23,9	4	Cg0696 - (sigD) [C]: PUTATIVE RNA POLYMERASE SIGMA FACTOR, ECF fi	5,3	20,65
92	no spectrum	—	—	Cg0773	27,6	8	Cg0773 - [C]: PUTATIVE EXODEOXYRIBONUCLEASE (EC 3.1.11.2)   NCgl0	5,1	35,52
73	Cg0867	34,4	5	Cg0867	43,4	4	Cg0867 - [C]: Ribosome-associated protein Y (Psrp-1)   NCgl0725 (COG1544)	5,4	24,56
74	Cg0867	31,7	4	Cg0867	25,8	5	Cg0867 - [C]: Ribosome-associated protein Y (Psrp-1)   NCgl0725 (COG1544)	5,4	24,56
76	Cg0867	34,4	5	Cg0867	47,1	8	Cg0867 - [C]: Ribosome-associated protein Y (Psrp-1)   NCgl0725 (COG1544)	5,4	24,56
97	Cg0867	43,3	6	Cg0867	43,4	7	Cg0867 - [C]: Ribosome-associated protein Y (Psrp-1)   NCgl0725 (COG1544)	5,4	24,56
98	Cg0867	48,9	9	Cg0867	50,7	9	Cg0867 - [C]: Ribosome-associated protein Y (Psrp-1)   NCgl0725 (COG1544)	5,4	24,56
99	no spectrum	—	—	Cg0867	38,0	7	Cg0867 - [C]: Ribosome-associated protein Y (Psrp-1)   NCgl0725 (COG1544)	5,4	24,56
101	no spectrum	—	—	Cg0867	43,4	6	Cg0867 - [C]: Ribosome-associated protein Y (Psrp-1)   NCgl0725 (COG1544)	5,4	24,56
47	Cg0949	8,9	4	Cg0949	38,0	17	Cg0949 - (glia) [C]: CITRATE SYNTHASE (EC 4.1.3.7)   NCgl0795 (COG0372	5,2	48,91
20	Cg0984	6,2	3	Cg0984	12,7	7	Cg0984 - (purH) [C]: (QSRHX6) 5'-PHOSPHORIBOSYL-5-AMINOIMIDAZOLE	5,3	55,74
26	Cg0984	28,7	11	Cg0984	12,5	6	Cg0984 - (purH) [C]: (QSRHX6) 5'-PHOSPHORIBOSYL-5-AMINOIMIDAZOLE	5,3	55,74
36	Cg1133	13,4	7	Cg1133	56,7	24	Cg1133 - (glyA) [C]: Serine Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)   NCgl0954	5,4	46,52
46	Cg1133	8,3	4	Cg1133	53,2	20	Cg1133 - (glyA) [C]: Serine Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)   NCgl0954	5,4	46,52
93	Cg1215	26,9	6	Cg1215	32,6	7	Cg1215 - (nadC) [C]: PUTATIVE NICOTINATE-NUCLEOTIDE PYROPHOSP	5,2	29,36
40	Cg1228	7,1	3	Cg1228	37,5	14	Cg1228 - (pohB) [C]: 4-HYDROXYBENZOATE 3-MONOXYGENASE (EC 1.1	5,3	43,94
86	Cg1259	12,3	4	Cg1259	43,4	12	Cg1259 - (padD) [C]: similar to tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase	5,3	34,93
71	no spectrum	—	—	Cg1266	24,0	7	Cg1266 - (rmaA) [C]: RRNA GUANINE-N1-METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1	5,3	30,69
88	Cg1266	20,5	5	Cg1266	51,7	15	Cg1266 - (rmaA) [C]: RRNA GUANINE-N1-METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1	5,3	30,69
85	no spectrum	—	—	Cg1283	36,9	6	Cg1283 - (aroE2) [C]: PUTATIVE SHIKIMATE / QUINATE 5-DEHYDROGENA	5,1	28,85
102	Cg1365	33,9	8	Cg1365	29,9	6	Cg1365 - (atpH) [C]: H+ATPASE DELTA SUBUNIT   NCgl1162 (COG0712) [C	5,4	28,86
5	Cg1432	31,8	17	Cg1432	16,2	8	Cg1432 - (ivD) [C]: DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE (EC 4.2.1.9)   NCgl11	5,2	64,66
10	no spectrum	—	—	Cg1432	12,4	5	Cg1432 - (ivD) [C]: DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE (EC 4.2.1.9)   NCgl11	5,2	64,66
90	no spectrum	—	—	Cg1492	33,4	8	Cg1492 - (gpsA) [C]: GLYCEROL-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (NAD	5,3	34,66
57	no spectrum	—	—	Cg1575	8,0	12	Cg1575 - (pheT) [C]: PHENYLALANYL-TRNA SYNTHETASE BETA CHAIN (E	4,7	89,42
89	no spectrum	—	—	Cg1698	60,1	12	Cg1698 - (hisG) [C]: ATP PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (EC 2.4.2.17)	5,2	30,21
108	no spectrum	—	—	Cg1722	49,3	8	Cg1722 - [C]: GCNS-related N-acetyltransferase   NCgl1469 (COG0454) [KR]	5,3	21,94
48	no spectrum	—	—	Cg1761	31,1	9	Cg1761 - [C]: CYSTEINE DESULFHYDRASE / SELENOCYSTEINE LY	5,3	45,78
56	no spectrum	—	—	Cg1761	67,5	16	Cg1761 - (nisS2) [C]: CYSTEINE DESULFHYDRASE / SELENOCYSTEINE LY	5,3	45,78
44	Cg1791	18,3	4	Cg1791	10,8	5	Cg1791 - (gap) [C]: GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENAS	5,2	36,03
60	Cg1791	8,7	5	Cg1791	9,0	5	Cg1791 - (gap) [C]: GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENAS	5,2	36,03
61	no spectrum	—	—	Cg1791	31,4	11	Cg1791 - (gap) [C]: GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENAS	5,2	36,03
37	Cg1807	25,6	8	Cg1807	33,5	9	Cg1807 - (dtp) [C]: DNA/PANTOTHENATE METABOLISM FLAVOPROTEIN	5,2	40,99
118	no spectrum	—	—	Cg1825	31,6	6	Cg1825 - (efp) [C]: Translation elongation factor P/translation initiation factor eI	5,1	20,62
51	no spectrum	—	—	Cg1829	14,4	5	Cg1829 - (aroC) [C]: PUTATIVE CHORISMATE SYNTHASE (EC 4.6.1.4)   NC	5,2	43,72
49	no spectrum	—	—	Cg1855	29,8	11	Cg1855 - (hisS) [C]: HISTIDYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.21)   NCgl158	5,2	47,11
52	no spectrum	—	—	Cg1855	45,0	16	Cg1855 - (hisS) [C]: HISTIDYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.21)   NCgl158	5,2	47,11
112	Cg2079	20,3	5	Cg2079	63,8	13	Cg2079 - [C]: conserved hypothetical protein   NCgl1824 (COG3253) [S]   Unch	5,2	27,01
78	no spectrum	—	—	Cg2136	35,7	4	Cg2136 - (gluA) [C]: GLUTAMATE UPTAKE SYSTEM A-BINDING PROTEIN	5,7	25,52
81	no spectrum	—	—	Cg2151	41,7	10	Cg2151 - [C]: Similar to phage shock protein A   NCgl1886 (COG1842) [KT]	5,3	30,41
82	no spectrum	—	—	Cg2151	35,5	7	Cg2151 - [C]: Similar to phage shock protein A   NCgl1886 (COG1842) [KT]	5,3	30,41
83	no spectrum	—	—	Cg2151	33,0	6	Cg2151 - [C]: Similar to phage shock protein A   NCgl1886 (COG1842) [KT]	5,3	30,41
19	no spectrum	—	—	Cg2192	19,6	6	Cg2192 - (mqo) [C]: MALATE:QUINONE OXIDOREDUCTASE OXIDOREDUC	5,2	54,81
39	Cg2206	38,2	10	Cg2206	31,3	10	Cg2206 - (ispG) [C]: involved in the nonmevalonate pathway of terpenoid biosy	5,5	42,56
113	no spectrum	—	—	Cg2217	20,5	4	Cg2217 - (frr) [C]: RIBOSOME RECYCLING FACTOR   NCgl1947 (COG0233)	5,1	20,73
65	Cg2222	14,0	7	Cg2222	31,3	18	Cg2222 - (rpsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2   NCgl1950 (COG0052) [	5,3	30,10
66	no spectrum	—	—	Cg2222	46,3	9	Cg2222 - (rpsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2   NCgl1950 (COG0052) [	5,3	30,10
72	no spectrum	—	—	Cg2222	24,6	6	Cg2222 - (rpsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2   NCgl1950 (COG0052) [	5,3	30,10
87	no spectrum	—	—	Cg2222	21,3	8	Cg2222 - (rpsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2   NCgl1950 (COG0052) [	5,3	30,10
32	Cg2291	30,6	11	Cg2291	51,2	19	Cg2291 - (pyk) [C]: PYRUVATE KINASE (EC 2.7.1.40)   NCgl2008 (COG0489	5,4	51,61
33	Cg2291	22,6	9	Cg2291	30,2	12	Cg2291 - (pyk) [C]: PYRUVATE KINASE (EC 2.7.1.40)   NCgl2008 (COG0489	5,4	51,61
111	Cg2300	21,8	4	Cg2300	21,8	5	Cg2300 - (hisH) [C]: IMIDAZOLEGLYCEROL-PHOSPHATE SYNTHASE, AMII	5,2	23,16
109	no spectrum	—	—	Cg2364	40,6	7	Cg2364 - [C]: pyridoxal-5'-phosphate dependent enzyme   NCgl2073 (COG032	5,3	25,62
70	no spectrum	—	—	Cg2377	49,3	5	Cg2377 - (mraW) [C]: S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase invv	5,1	36,79
80	no spectrum	—	—	Cg2383	31,6	8	Cg2383 - (metF) [C]: 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (EC 1.7.99.5)	5,3	36,21
23	no spectrum	—	—	Cg2499	13,4	5	Cg2499 - (glyS) [C]: GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE-TRNA LIGAS	5,3	53,03
30	Cg2499	19,3	8	Cg2499	13,0	6	Cg2499 - (glyS) [C]: GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE-TRNA LIGAS	5,3	53,03
31	Cg2499	26,7	9	Cg2499	22,3	7	Cg2499 - (glyS) [C]: GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE-TRNA LIGAS	5,3	53,03
69	no spectrum	—	—	Cg2538	26,4	15	Cg2538 - [C]: ALKANAL MONOOXYGENASE ALPHA CHAIN (EC 1.14.14.3)	5,4	35,66
50	no spectrum	—	—	Cg2588	20,8	5	Cg2588 - (proB) [C]: GLUTAMATE 5-KINASE PROTEIN (EC 2.7.2.11)   NCgl2	5,4	42,61
77	Cg2685	31,4	5	Cg2685	39,4	8	Cg2685 - [C]: PUTATIVE SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE/REDUCTASE	5,4	25,27
84	Cg2795	23,2	5	Cg2795	23,2	5	Cg2795 - [C]: NADPH quinone reductase or related Zn-dependent oxidoreduct	5,3	35,82
67	no spectrum	—	—	Cg2836	38,8	8	Cg2836 - (sucD) [C]: SUCCINYL-COA SYNTHETASE ALPHA SUBUNIT (EC 6	5,3	30,24
18	Cg2840	33,8	18	Cg2840	14,9	7	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERAS	5,1	54,50
25	Cg2840	22,9	6	Cg2840	39,4	20	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERAS	5,1	54,50
4	no spectrum	—	—	Cg2891	10,4	5	Cg2891 - (poxB) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.2.2)   NCgl252	5,3	61,93
11	Cg2891	18,3	12	Cg2891	18,3	10	Cg2891 - (poxB) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.2.2)   NCgl252	5,3	61,93
12	no spectrum	—	—	Cg2891	7,4	4	Cg2891 - (poxB) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.2.2)   NCgl252	5,3	61,93
17	Cg2891	21,8	10	Cg2891	10,2	6	Cg2891 - (poxB) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.2.2)   NCgl252	5,3	61,93
41	Cg2900	20,3	5	Cg2900	25,6	8	Cg2900 - (ddh) [C]: MESO-DIAMINOPIMELATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.	5,2	35,18
62	no spectrum	—	—	Cg2910	28,3	13	Cg2910 - [C]: Transcriptional regulator, LacI family   NCgl2538 (COG1609) [K]	5,3	38,84
64	no spectrum	—	—	Cg3007	41,8	13	Cg3007 - (pvdS2) [C]: RNA POLYMERASE SIGMA FACTOR, PUTATIVE   NC	5,2	35,29
22	no spectrum	—	—	Cg3063	19,8	7	Cg3063 - (purA) [C]: ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE (EC 6.3.4.4)   NC	5,2	46,75
45	no spectrum	—	—	Cg3063	9,3	4	Cg3063 - (purA) [C]: ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE (EC 6.3.4.4)   NC	5,2	46,75
106	Cg3071	16,8	5	Cg3071	59,2	10	Cg3071 - (pyrE) [C]: OROTATE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (EC 2.4	5,4	19,43
59	no spectrum	—	—	Cg3119	9,4	5	Cg3119 - (cysJ) [C]: Probable Sulfite Reductase (Flavoprotein) (EC 1.8.1.2)   N	4,9	50,11
96	no spectrum	—	—	Cg3219	24,2	8	Cg3219 - (ldh) [C]: L-LACTATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.27)   NCgl2810	5,1	34,39
104	no spectrum	—	—	Cg3224	40,7	7	Cg3224 - [C]: Bacterial regulatory proteins, GntR family   NCgl2814 (COG2186	5,3	26,08
114	Cg3237	37,0	5	Cg3237	46,0	6	Cg3237 - (sod) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)	5,1	22,08
115	Cg3237	40,5	5	Cg3237	32,0	5	Cg3237 - (sod) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)	5,1	22,08
125	no spectrum	—	—	Cg3331	39,9	5	Cg3331 - (ogt) [C]: METHYLATED-DNA-PROTEIN-CYSTEINE METHYLTRAI	5,4	17,26
34	no spectrum	—	—	Cg3426	23,7	10	Cg3426 - (parB) [C]: Predicted transcriptional regulator involved in chromosom	5,4	40,62

unfraktioniert

- identifizierte Spots: 46
  - verschied. Proteinspezies: 28
  - unique Proteine: 18
  - Proteine mit Isoformen: 10
- 8 (2)  
1 (5)  
1 (7)

vorfraktioniert (Sephadex-IEF)

- identifizierte Spots: 96
  - verschied. Proteinspezies: 60
  - unique Proteine: 42
  - Proteine mit Isoformen: 18
- 10 (2)  
4 (3)  
2 (4)  
2 (7)

Tabelle 5-7: Identifizierte Proteine im Bereich pH 5.0 – 5.7

Liste 100 gepickter und identifizierter Proteine des in Abbildung 5-29 gezeigten pH-Bereiches. Parameter für MALDI-TOF-PMF: Zahl der gematchten Peptide > 5; Abweichung vom theoretischen pI: < 0,5; Abweichung von der theoretischen Molmasse < 20%

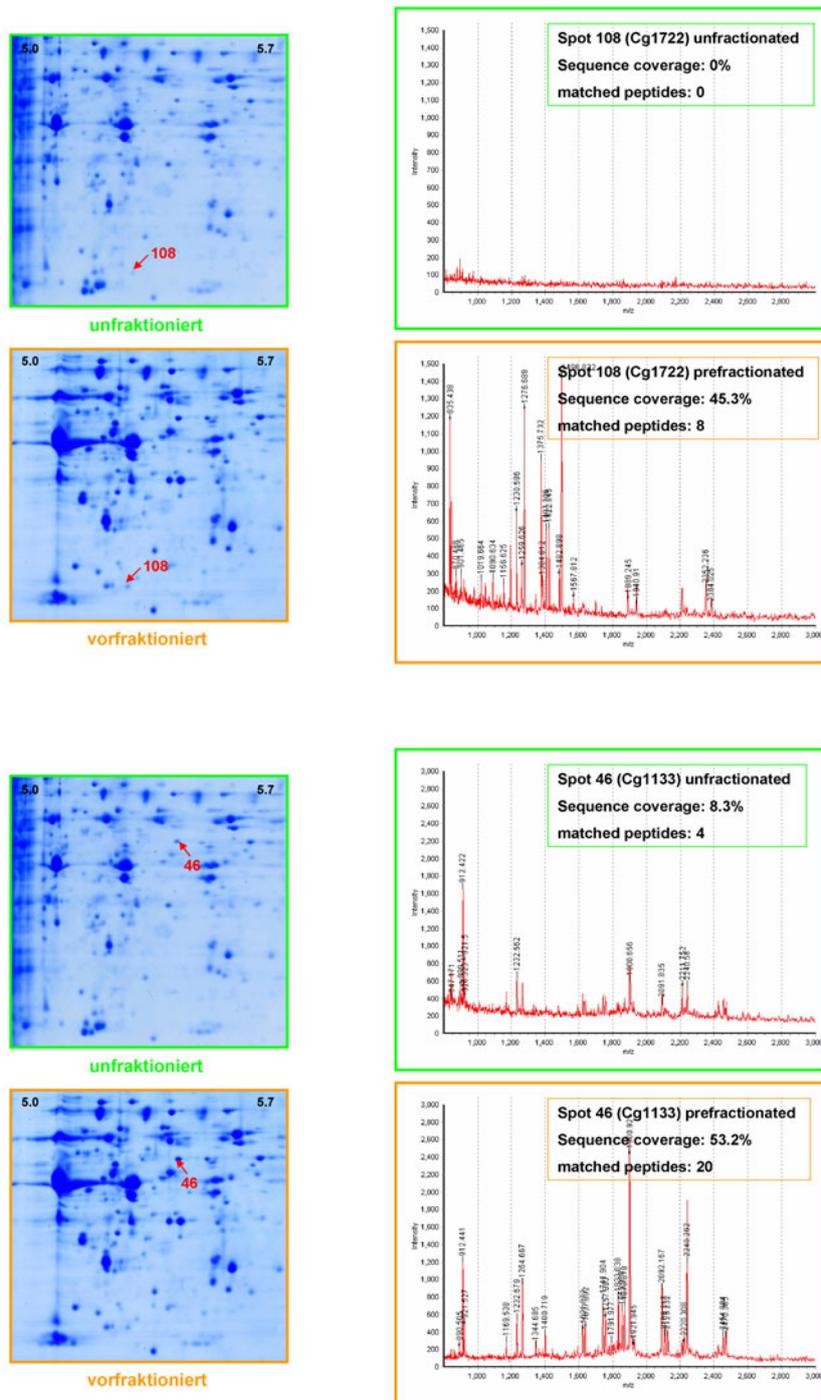
Dies verdeutlichen die beiden Abbildungen 5-30 und 5-31. Die Unterschiede zeigen sich auf zwei Arten. Erstens konnte eine Reihe von Proteinen, welche ohne Vorfraktionierung in zu geringer Konzentration in dem 2DE-Gel vorhanden waren, um sie identifizieren zu können, aufgrund des besseren Signal-Rausch-Verhältnisses nach isoelektrischer Vorfraktionierung in Sephadex-Gelen problemlos identifiziert werden. Zweitens wurden diejenigen Proteine, die in beiden 2D-Gelen identifiziert werden konnten, in der vorfraktionierten Probe mit einer viel höheren Sequenzabdeckung und somit einer größeren statistischen Sicherheit identifiziert.

#### 5.4.5 Nachweis und Identifikation von niedrig-abundanten Proteinen

Nach der Etablierung der Methode war das nächste Ziel die Detektion und Identifizierung niedrig abundanter *C. glutamicum* Proteine nach isoelektrischer Vorfraktionierung in Sephadex-Gelen.

Anhand der theoretischen Gesamtproteinverteilung und unter Zuhilfenahme des Programmes JVirGel [71, 72] zur Vorhersage des Vorkommens von *low abundance* Proteinen (Abbildung 5-20) entschieden wir uns in einer Pilotstudie für einen IPG 5.5 -6.7 mit 24cm Trenndistanz, da in diesem pH-Bereich vergleichsweise erheblich mehr niedrig exprimierte als stark exprimierte Proteine, welche ebenfalls mit angereichert werden und somit die Analyse der niedrig-abundanten Proteine stören könnten, vorausgesetzt wurden.

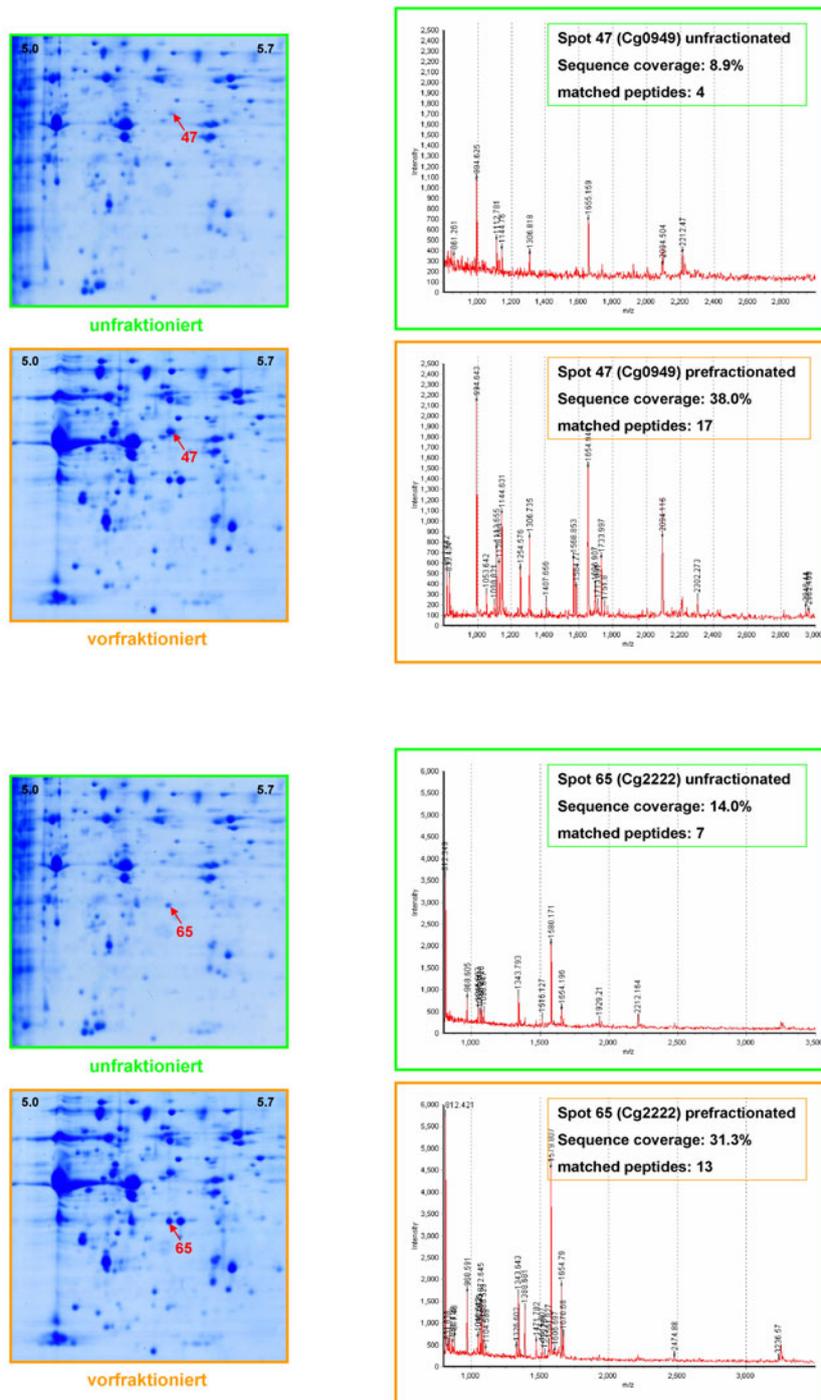
Es wurden 10 mg unfraktionierter Probe pro Trennbahn in den Sephadex-IEF-Tray geladen. Der im oberen Teil der Abbildung 5-32 rot markierte Bereich wurde entnommen und direkt auf einen IPG 5.5 -6.7 Streifen aufgebracht. Der untere Teil der Abbildung 5-32 zeigt das Ergebnis der darauffolgenden zweidimensionalen, elektrophoretischen Trennung. Die mit Pfeilen markierten Spots wurden gepickt und mit MALDI-Analyse identifiziert und sind laut Algorithmus von Alice McHardy *et. al.* [102] als niedrig-exprimierte Proteine anzusehen. Die Tabelle 5-8 zeigt eine Liste der 37 gefundenen niedrig-exprimierten Proteine, geordnet nach Proteinfamilien, dazu gehören Proteine aus verschiedenen Metabolismus-Stoffwechselwegen, Proteine der Transkription, der Replikation, der Proteinmodifikation und Proteine die noch nicht weiter charakterisiert sind.



**Abbildung 5-30: Erhöhte Sequenzabdeckung durch Vorfractionierung I**

Links: die gepickten Spots / Rechts: das jeweils zugehörige MS-Spektrum.

Deutlich zu erkennen ist die enorm verbesserte Qualität der MS-Spektren sowohl in Bezug auf die Sequenzabdeckung als auch hinsichtlich des Signal-Rausch-Verhältnisses nach Sephadex-IEF.



**Abbildung 5-31: Erhöhte Sequenzabdeckung durch Vorfraktionierung II**

Links: die gepickten Spots / Rechts: das jeweils zugehörige MS-Spektrum.

Deutlich zu erkennen ist die enorm verbesserte Qualität der MS-Spektren sowohl in Bezug auf die Sequenzabdeckung als auch hinsichtlich des Signal-Rausch-Verhältnisses nach Sephadex-IEF.

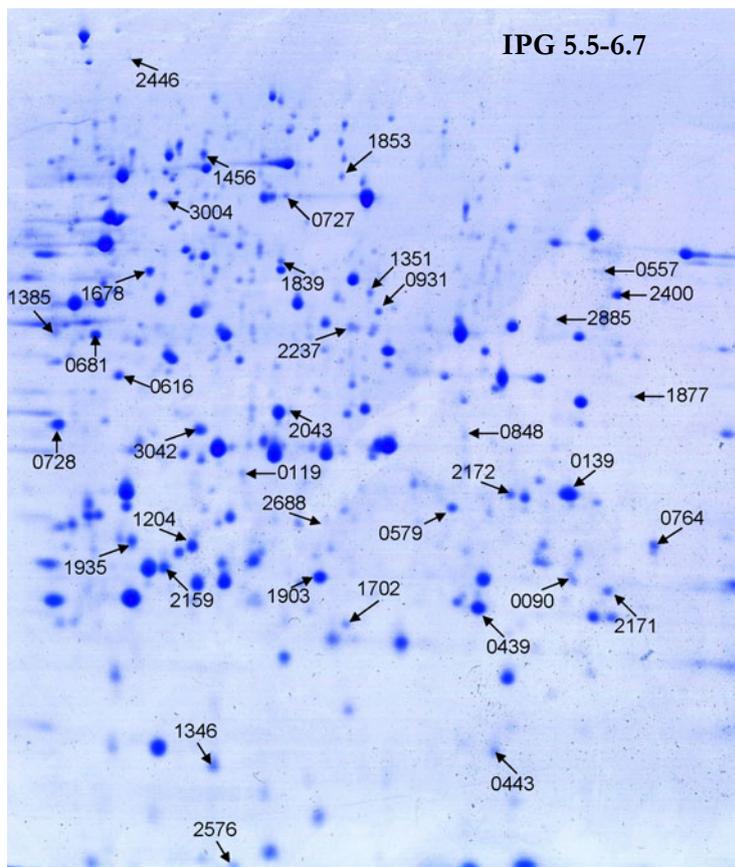
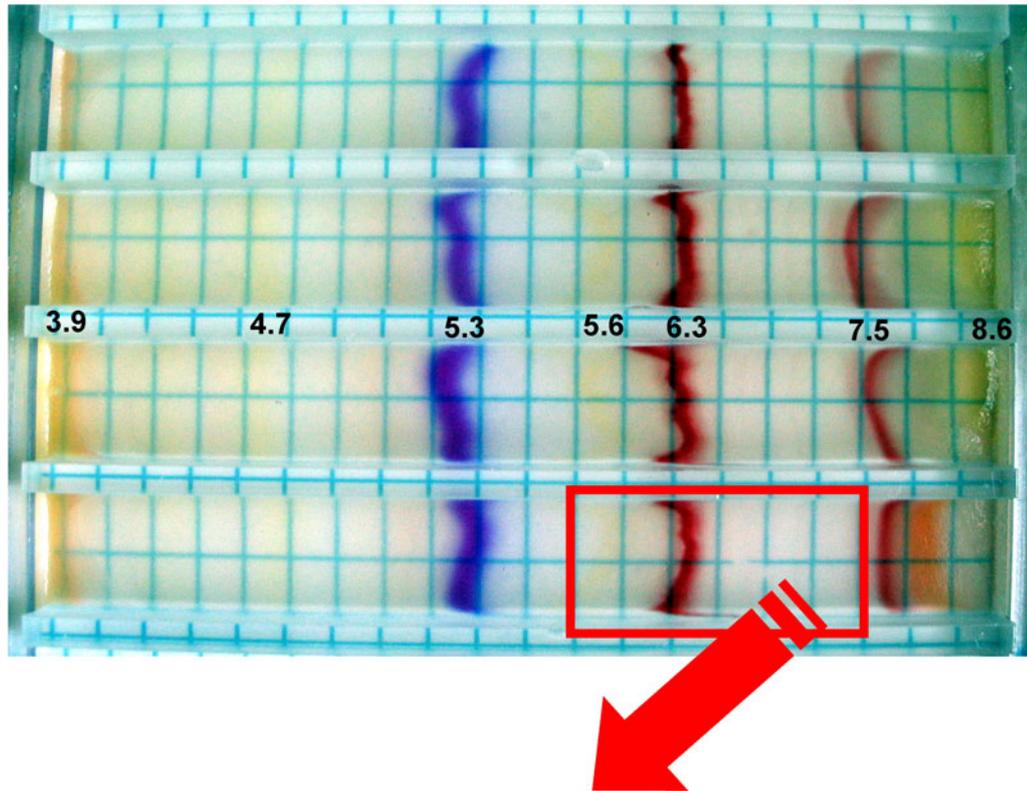


Abbildung 5-32: 2D-Elektrophorese von *C. glutamicum* Proteinen im Bereich 5.5 – 6.7 nach Vorfaktionierung mit Sephadex-IEF

<b>Metabolism</b>		<b>Cobias &lt; - 0.42</b>
<b>Energy production and conversion</b>		
Cg0557	[C] Dehydrogenases (flavoproteins)	- 0.50
Cg0616	[C] Uncharacterized protein required for formate dehydrogenase activity	- 0.47
<b>Amino acid transport and metabolism</b>		
Cg0931	[E] Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	- 0.64
Cg2237	[E] Glycine/D-amino acid oxidases (deaminating)	- 0.47
<b>Carbohydrate transport and metabolism</b>		
Cg1204	[G] similarity similarity to 2,3-PDG dependent phosphoglycerate mutase pgm	- 0.48
<b>Coenzyme transport and metabolism</b>		
Cg1346	[H] Molybdopterin biosynthesis enzymes	- 0.50
Cg1351	[H] Molybdopterin biosynthesis enzyme	- 0.54
Cg1678	[H] Precorrin-6B methylase 1	- 0.49
Cg2885	[H] Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	- 0.43
<b>Lipid transport and metabolism</b>		
<b>Information storage and processing</b>		
<b>Transcription</b>		
Cg0579	[K] Predicted transcriptional regulators	- 0.52
Cg0764	[K] Transcriptional regulators	- 0.52
Cg1935	[K] Transcriptional regulators	- 0.45
Cg0139	[KG] Transcriptional regulators of sugar metabolism	- 0.42
Cg0090	[KT] Response regulator of citrate/malate metabolism	- 0.42
<b>Replication, recombination and repair</b>		
Cg0728	[L] Deoxyribodipyrimidine photolyase	- 0.67
Cg1839	[L] Uncharacterized ATPase related to the helicase subunit of the Holliday junction	- 0.49
Cg2576	[L] DNA polymerase III delta subunit	- 0.43
<b>Inorganic ion transport and metabolism</b>		
Cg2688	[P] ABC-type molybdenum transport system, ATPase component/photorepair protein	- 0.46
<b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>		
Cg2171	[Q] Phosphopantetheinyl transferase component of siderophore synthetase	- 0.55
Cg1385	[QR] SAM-dependent methyltransferases	- 0.43
<b>Cellular processes and signaling</b>		
<b>Cell wall/membrane/envelope biogenesis</b>		
Cg0681	[M] Alanine racemase	- 0.46
Cg1877	[M] Lauroyl/myristoyl acyltransferase	- 0.51
Cg2400	[M] Predicted glycosyltransferases	- 0.50
Cg0727	[MG] Predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerases	- 0.62
<b>Posttranslational modification, protein turnover, chaperones</b>		
Cg0119	[O] Urease accessory protein UreH	- 0.54
Cg2446	[OT] Glutamine synthetase adenylyltransferase	- 0.47
Cg2043	[OU] Periplasmic serine proteases (ClpP class)	- 0.62
<b>Signal transduction mechanisms</b>		
Cg1456	[T] Predicted signal-transduction protein containing cAMP-binding and CBS domains	- 0.49
<b>Defense mechanisms</b>		
Cg1903	[V] ABC-type multidrug transport system, ATPase component	- 0.80
Cg3042	[V] ABC-type multidrug transport system, ATPase component	- 0.43
<b>Poorly characterized</b>		
<b>General function prediction only</b>		
Cg0439	[R] Acetyltransferase (isoleucine patch superfamily)	- 0.60
Cg0848	[R] Predicted glycosyltransferases	- 0.47
Cg2172	[R] Predicted phosphohydrolases	- 0.43
<b>Function unknown</b>		
Cg0443	[S] Uncharacterized conserved protein	- 0.42
Cg1702	hypothetical protein	- 0.43
Cg2159	hypothetical protein	- 0.46
Cg3004	hypothetical protein	- 0.46

Tabelle 5-8: Gering exprimierte Proteine im Bereich pH 5.5 – 6.7 (s. Abb. 5-32)

Die Abbildung 5-33 verdeutlicht noch einmal den Vorteil der Sephadex-IEF-Vorfraktionierung. In dem gewählten Gelausschnitt konnten ohne Vorfraktionierung nur sieben Proteine identifiziert werden, von denen lediglich zwei als niedrig exprimiert anzusehen waren, während nach Vorfraktionierung insgesamt 29 Proteine, davon sieben niedrig-exprimierte, identifiziert wurden.

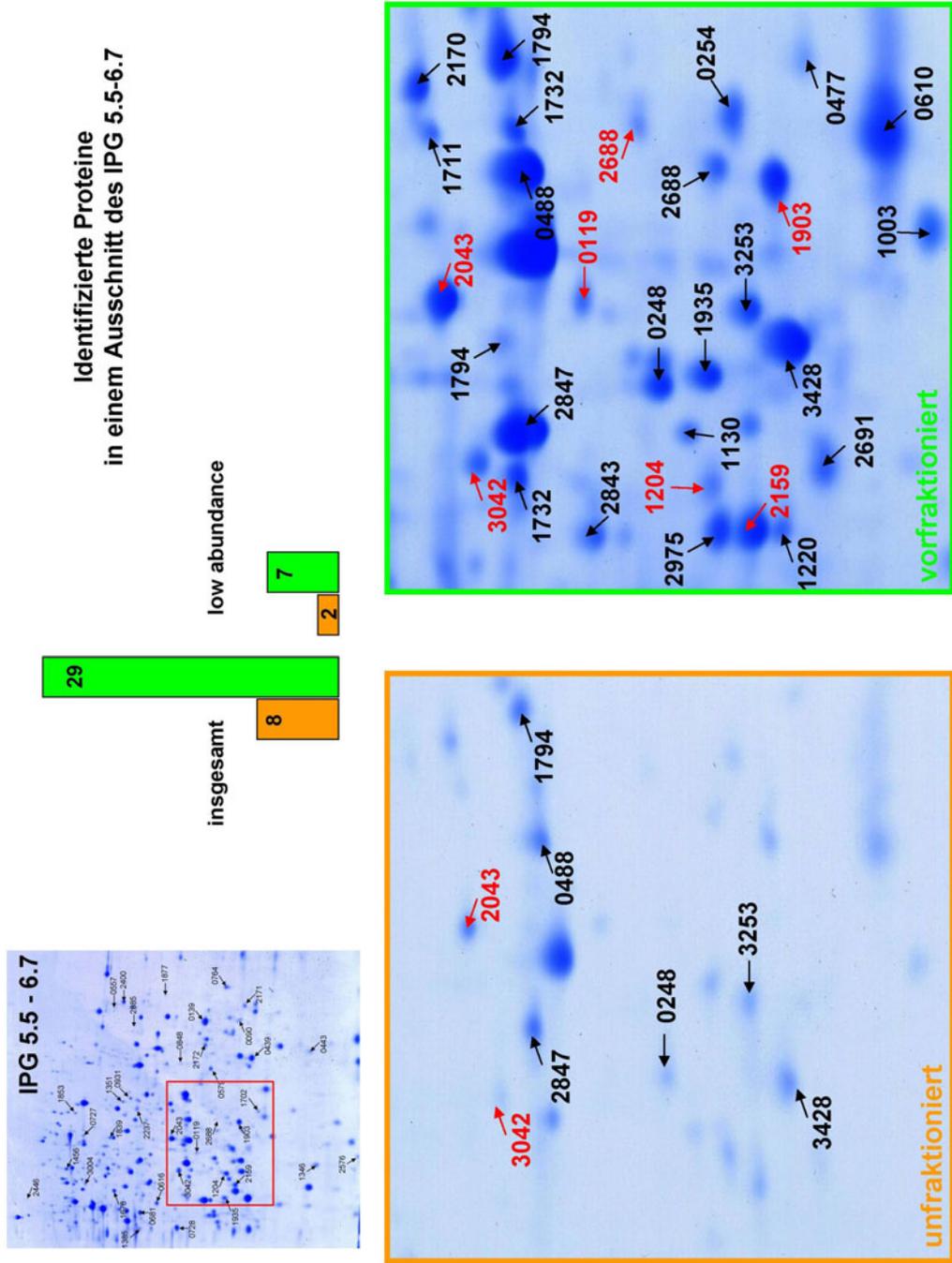


Abbildung 5-33: Identifizierte Proteine ohne bzw. nach Vorfraktionierung (Ausschnittsvergrößerung von Abb. 5-32)

Zahl der identifizierten Proteine nach Vorfraktionierung im Vergleich zum Totalextrakt. Schwarz: Proteine allgemein. Rot: gering exprimierte Proteine

Spot	Cg Nummer	UniProt KB	Cobias	Coverage	mached peptides	Spot	Cg Nummer	UniProt KB	Cobias	Coverage	mached peptides
1	Cg1903	Q8NPX4	-0,8	82,4	13 v. 36	42	Cg0616	Q8NSY8	-0,47	46,1	10 v. 28
2	Cg0728	Q6M7D4	-0,67	30,7	12 v. 25	43	Cg0797	Q8NSH8	-0,47	36,1	8 v. 22
3	Cg1327	Q8NR79	-0,65	31,2	7 v. 41	44	Cg0848	Q6M739	-0,47	25,4	7 v. 31
4	Cg0931	Q842J5	-0,64	39,3	16 v. 45	45	Cg2237	Q6M417	-0,47	30,7	12 v. 32
5	Cg0727	Q6M7D5	-0,62	29,2	13 v. 34	46	Cg2446	Q79VE2	-0,47	56	14 v. 41
6	Cg2043	Q8NPI9	-0,62	53,8	16 v. 39	47	Cg0418	Q8NTE9	-0,46	14,3	5 v. 17
7	Cg3129	Q6M230	-0,62	22,9	5 v. 12	48	Cg0681	Q8RSU9	-0,46	29,9	8 v. 44
8	Cg2343	Q6M3U1	-0,61	34,6	18 v. 40	49	Cg1294	Q6M628	-0,46	23,5	9 v. 62
9	Cg0439	Q8NTE3	-0,6	46,5	6 v. 26	50	Cg2063	Q8NPH0	-0,46	46,1	10 v. 28
10	Cg0362	Q6M862	-0,59	28,5	6 v. 31	51	Cg2159	Q8NP52	-0,46	65,9	14 v. 41
11	Cg1239	Q8NRG0	-0,55	39,7	9 v. 23	52	Cg2688	Q6M317	-0,46	46,2	8 v. 30
12	Cg2016	Q8NPL6	-0,55	24,5	5 v. 11	53	Cg3004	Q8NM66	-0,46	19,6	8 v. 28
13	Cg2171	Q8NP45	-0,55	64,1	11 v. 56	54	Cg3370	Q6M1H5	-0,46	52,9	13 v. 34
14	Cg0119	Q79VJ0	-0,54	43,3	11 v. 32	55	Cg0662	Q8NSU5	-0,45	43,1	20 v. 31
15	Cg1351	Q6M5Y1	-0,54	33,7	10 v. 45	56	Cg1935	Q8NPU3	-0,45	52,4	9 v. 14
16	Cg0422	Q8NTE5	-0,53	43,8	14 v. 49	57	Cg2116	Q8NP84	-0,45	32,6	9 v. 34
17	Cg1510	Q8NQT6	-0,53	65	9 v. 24	58	Cg0861	Q8NSC3	-0,44	34	5 v. 17
18	Cg0579	Q8NT23	-0,52	62,3	15 v. 37	59	Cg1284	Q6M637	-0,44	12,3	5 v. 20
19	Cg0764	Q8NSK8	-0,52	53,8	12 v. 36	60	Cg2236	Q8NNY9	-0,44	67,4	9 v. 39
20	Cg0884	Q8NSA5	-0,52	44,7	8 v. 55	61	Cg2621	Q8NN25	-0,44	53,6	12 v. 46
21	Cg1877	Q8NPZ3	-0,51	34,9	11 v. 71	62	Cg3328	Q6M1K8	-0,44	48,5	7 v. 16
22	Cg2342	Q6M3U2	-0,51	37,3	6 v. 31	63	Cg3331	Q8NLD9	-0,44	38,6	5 v. 25
23	Cg3040	Q8NM35	-0,51	53	16 v. 41	64	Cg0250	Q6M8F2	-0,43	18,7	5 v. 12
24	Cg0557	Q8NT38	-0,5	30,9	10 v. 36	65	Cg1385	Q6M5V5	-0,43	52,2	18 v. 48
25	Cg1346	Q6M5Y6	-0,5	42,6	6 v. 38	66	Cg1702	Q8NQD0	-0,43	42,1	9 v. 24
26	Cg2400	Q8NNK8	-0,5	44,6	12 v. 36	67	Cg2005	Q8NPM6	-0,43	32,7	16 v. 31
27	Cg0788	Q6M788	-0,49	39,8	16 v. 42	68	Cg2172	Q8NP44	-0,43	34	9 v. 32
28	Cg0796	Q8NSH9	-0,49	44,8	16 v. 32	69	Cg2364	Q24748	-0,43	70,1	12 v. 24
29	Cg0889	Q8NSA0	-0,49	42,1	8 v. 26	70	Cg2576	Q6M3A3	-0,43	39,1	7 v. 29
30	Cg1018	Q8NRZ3	-0,49	23,6	13 v. 29	71	Cg2885	P46395	-0,43	27	8 v. 35
31	Cg1456	Q8NQY4	-0,49	45,3	23 v. 56	72	Cg3042	Q6M2A3	-0,43	46,5	11 v. 41
32	Cg1678	Q6M598	-0,49	30,1	11 v. 29	73	Cg0139	Q8NU41	-0,42	44,6	8 v. 28
33	Cg1839	Q6M4Y4	-0,49	50,8	18 v. 31	74	Cg0443	Q6M7Z4	-0,42	50,3	8 v. 20
34	Cg2452	Q8NNH0	-0,49	34,8	11 v. 40	75	Cg1228	Q8NRH0	-0,42	50,2	16 v. 38
35	Cg3093	Q8NLZ3	-0,49	58,3	14 v. 30	76	Cg1711	Q6M571	-0,42	39,7	10 v. 29
36	Cg0481	Q6M7W1	-0,48	31,2	9 v. 28	77	Cg1770	Q6M522	-0,42	16,9	12 v. 54
37	Cg1204	Q6M6A8	-0,48	69,1	14 v. 27	78	Cg2189	Q8NP27	-0,42	23,9	12 v. 32
38	Cg1318	Q8NR87	-0,48	54,9	11 v. 39	79	Cg3014	Q8NM61	-0,42	33,6	8 v. 36
39	Cg1722	Q8NQB1	-0,48	45,3	7 v. 26	80	Cg0090	Q8NU70	-0,42	56	8 v. 35
40	Cg3159	Q8NLT4	-0,48	65,5	7 v. 24	81	Cg1853	Q6M4X2	-0,42	51,2	14 v. 27
41	Cg0370	Q6M855	-0,47	11,2	7 v. 39	82	Cg2579	Q8NN60	-0,42	49,3	10 v. 36
						83	Cg3329	Q8NLE1	-0,42	63,2	20 v. 41

**Tabelle 5-9: Identifizierte gering exprimierte Proteine im Bereich pH 5.0 – 6.7**

Liste aller identifizierten low-abundance Proteine im pH-Bereich 5.0 – 6.7 mit der Vorgabe von mind. 5 gematchten Peptiden, Abweichung des theoretischen pI vom gefundenen pI < 0.5 pH-Einheiten, und Abweichung der theoretischen Masse zur gefundenen Masse < 20%.

## Fazit

Unter der Annahme, dass unter normalen Wachstumsbedingungen maximal  $\frac{2}{3}$  aller *C. glutamicum* Proteine exprimiert sind (verifiziert durch Genexpressionsanalysen auf Transkriptomebene; persönliche Mitteilung von Dr. Jörn Kalinowski, Universität Bielefeld) konnten aus den erhaltenen Daten folgende Zahlen abgeschätzt werden:

- für den pH-Bereich 5.5-6.7
  - theoretisch maximal mögliche Proteinanzahl in diesem Bereich: 512
  - abzüglich der stark und mittelstark exprimierten Proteine: 136
  - abzüglich sehr hydrophober Proteine (nicht darstellbar mit 2DE): 132
  - abzüglich  $\frac{1}{3}$  nicht exprimierter Proteine (s.o.) -> zu erwarten ca. 88
  - tatsächlich gefundene, niedrig exprimierte Proteine (Tab. 5-8): 37

D.h., es konnten in dem untersuchten pH-Bereich 5.5-6.7 ca. **42 %** der theoretisch zu erwartenden niedrig-abundanten Proteine mit Hilfe der 2D-Elektrophorese unter Verwendung enger IPGs in Kombination mit einer Proteinvorfractionierung durch IEF in Sephadex-Gelen gefunden werden.

Die entsprechenden Zahlen für den pH-Bereich 5.0-6.7 lauten:

- theoretisch maximal mögliche Proteinanzahl in diesem Bereich: 2194
- abzüglich der stark und mittelstark exprimierten Proteine: 388
- abzüglich sehr hydrophober Proteine (nicht darstellbar mit 2DE): 365
- abzüglich  $\frac{1}{3}$  nicht exprimierter Proteine (s.o.) -> zu erwarten 244
- tatsächlich gefundene, niedrig exprimierte Proteine (Tab. 5-9): 83

—————> d.h. **35 %** der erwarteten niedrig-abundanten Proteine

Insgesamt konnten im pH-Bereich 5.5-6.7 mehr als 40%, und im pH-Bereich 5.0-6.7 immerhin 35% der theoretisch zu erwartenden und auf 2DE Gelen darstellbaren niedrig-exprimierten Proteine mit einem Codonbias kleiner -0,42 mit Hilfe der 2D-Elektrophorese unter Verwendung enger IPGs in

Kombination mit einer Proteinvorfraktionierung durch IEF in Sephadex-Gelen detektiert und identifiziert werden, während in bisher publizierten Proteomstudien von *C. glutamicum* [68-70] unter Verwendung von engen IPG-Gradienten, jedoch ohne Vorfraktionierung, maximal  $\frac{1}{5}$  der von uns gefundenen niedrig-abundanten Proteine detektiert wurden.

Mit der präparativen IEF in Sephadex-Gelen steht somit eine Technik zur Verfügung, mit deren Hilfe man hochkomplexe Proteingemische auf einfache Weise für die anschließende 2DE-Trennung reproduzierbar vorfraktionieren kann. Durch die Verwendung von farbigen *pI*-Markern zur Ermittlung des Verlaufs des pH-Gradienten [105, 106] (siehe 5.4.1) wurde diese Technik weiter verbessert. Eine entsprechende Publikation unserer Ergebnisse ist in Vorbereitung. Die Methode selbst wurde kürzlich veröffentlicht (Görg, A., Lück, C., Weiss, W.: Sample prefractionation in granulated Sephadex IEF gels. *Meth. Mol. Biol.* 2008, 424, 277-286). Eine weitere Verwendung fand die Sephadex-IEF-Vorfraktionierung bei der Vorreinigung von nativen Proteinen. In einem Gemeinschaftsprojekt mit Michael Helm (Lehrstuhl für Botanik TUM, WZW) konnte eine Glyoxysomale/peroxisomale Protease nativ aufgereinigt und identifiziert werden. Die Ergebnisse wurden in PNAS publiziert (Helm M, Lück C, *et al.* Dual specificities of the glyoxysomal/peroxisomal processing protease Deg15 in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104, 11501-6.).

## 5.5 Vergleichende Proteomanalyse des Wildtyps *ATCC13032* und des Produktionsstamms *DM1730 (C. glutamicum)* nach Anzucht auf MM1-Medium

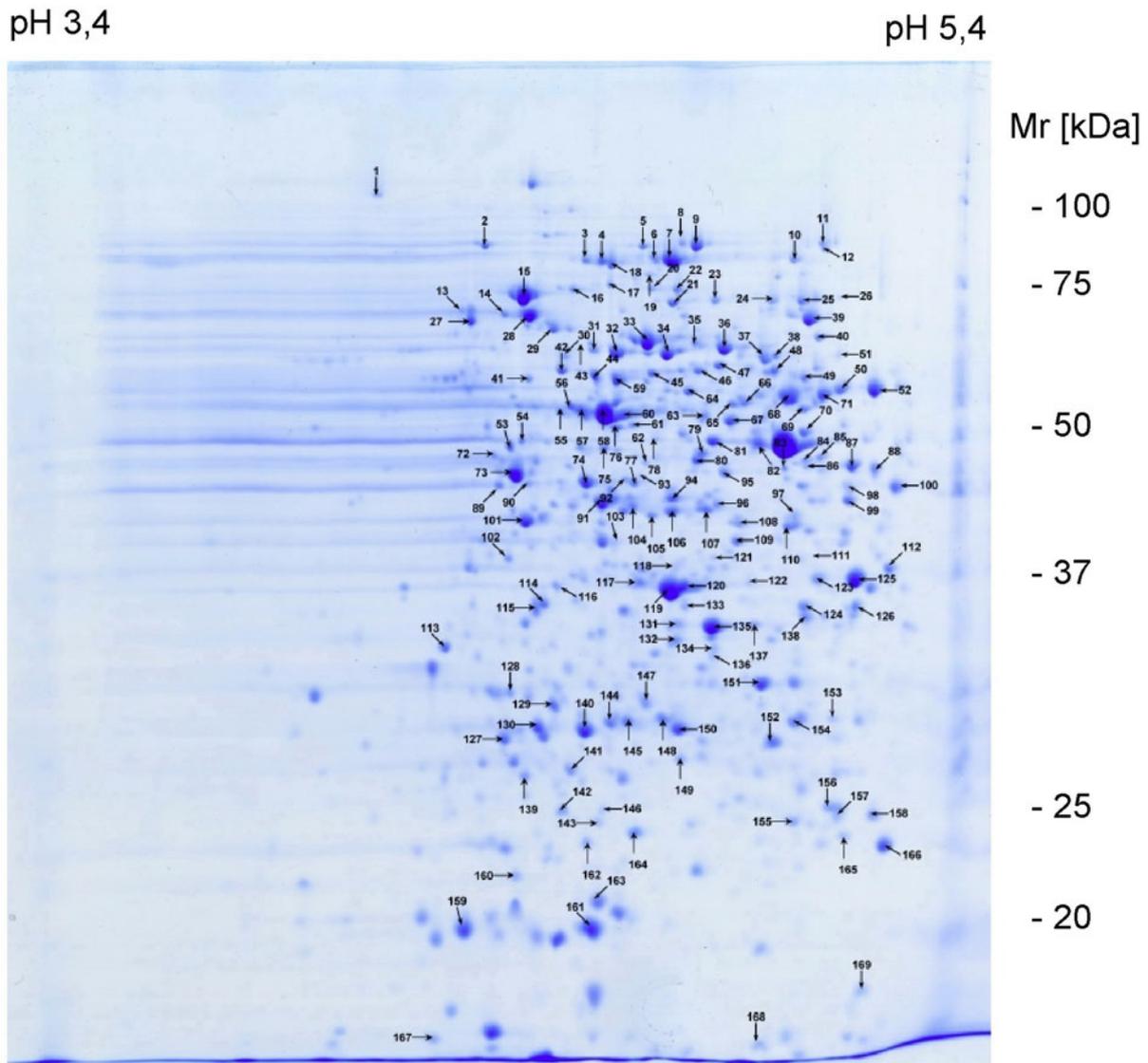
Vergleichende Proteomanalysen von *C. glutamicum*, z.B. zwischen Wildtyp und Lysin-Produktionsstamm können Aufschlüsse über mögliche Engpässe in den Stoffwechselwegen geben, und Hinweise für weitere Strategien zur Stammoptimierung liefern. Ziel solcher Untersuchungen war der Nachweis differentiell exprimierter Proteine beim Vergleich zwischen Wildtyp- und Produktionsstamm. Im Folgenden wurde das cytosolische Proteom des *C. glutamicum* Wildtypstamms ATCC13032 mit dem des Produktionsstamms DM1730 verglichen, der vier Punktmutationen in Enzymen des Zentralstoffwechsels sowie des Lysin-Biosynthesewegs aufweist. Die direkten Effekte, die diese Mutationen auf die davon betroffenen Proteine haben, werden als „primäre“ bezeichnet, während die indirekten Effekte als „sekundäre“ betrachtet werden. Da die von *Onishi et al.* durchgeführten Punktmutationen [59] keine Veränderung der isoelektrischen Punkte der betroffenen Proteine bewirken, ist ihr Nachweis auf Proteomebene nicht zu erwarten. Infolgedessen lag das Hauptinteresse der differentiellen Proteomanalyse an den sekundären Effekten, die diese Mutationen auslösen, diese können sehr vielschichtig sein.

### 5.5.1 Referenzkarte identifizierter Proteine im pH-Bereich 3.4-6.9

Im Folgenden wurden zunächst Referenzkarten aller bei ATCC13032 und DM 1730 nachweisbaren Proteine erstellt, die die beiden Proteome, d.h., die Gesamtheit aller Proteine der beiden Stämme erfasst, um in späteren Analysen die unter bestimmten physiologischen Bedingungen differentiell exprimierten Proteine schneller identifizieren zu können.

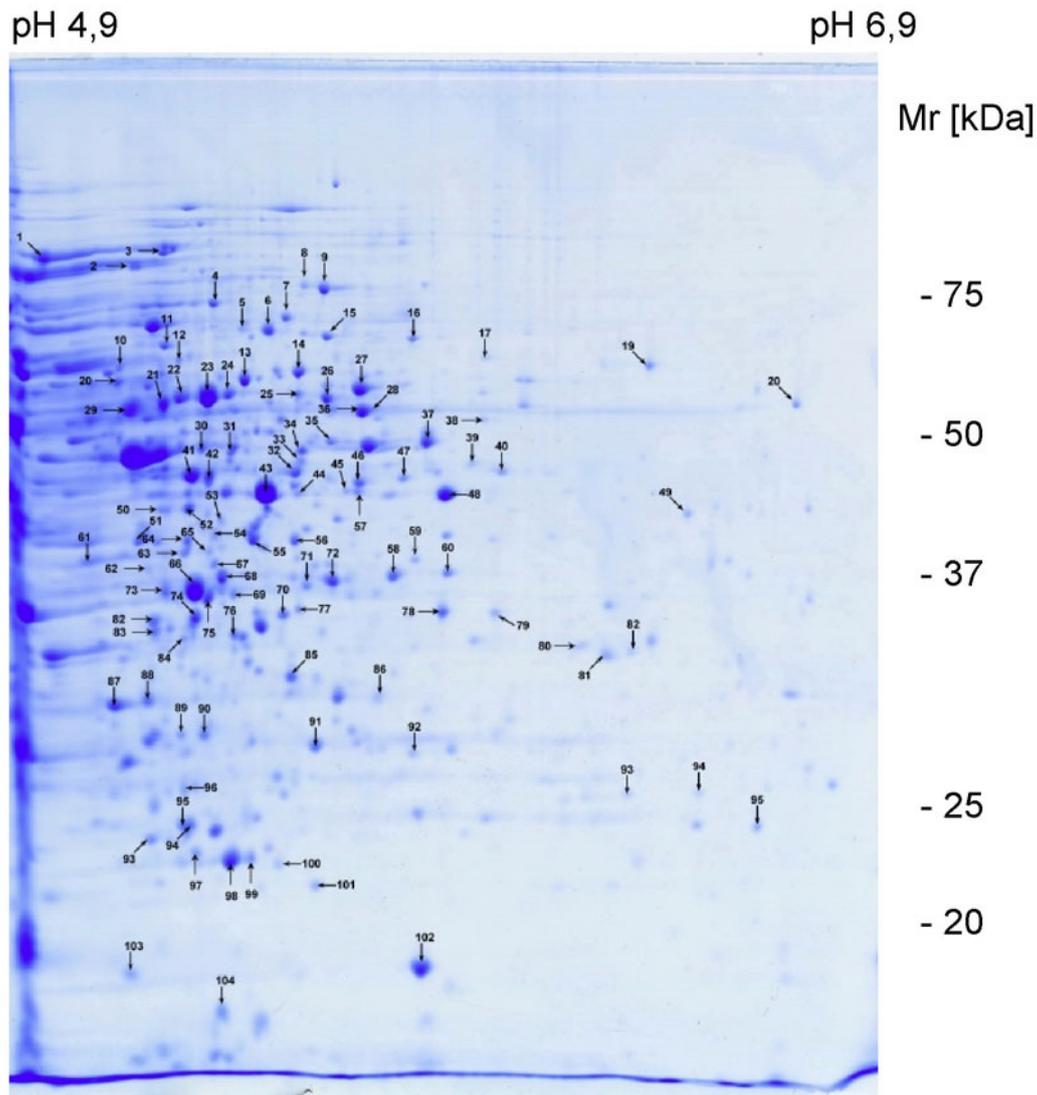
Da schätzungsweise 2/3 aller *C. glutamicum* Proteine isoelektrische Punkte im pH-Bereich von 3.4 bis 6.9 (siehe Abbildung 5.5, hypothetisches Proteom von *C. glutamicum*) aufweisen, haben wir bevorzugt diesen Bereich im 2D-Gel untersucht. Zur Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC13032 und DM1730 wurden die zwei von uns für die Routineanalytik optimierten IPGs benutzt (Abb. 5-10), nämlich der IPG 3.4 - pH 5.4 sowie der IPG 4.9-6.9. Mit Hilfe dieser beiden IPGs lässt sich eine zufriedenstellende Auflösung des sauren bis neutralen pH-Bereichs bei vertretbarem Arbeitsaufwand erzielen. Abbildung 5-10 zeigt, dass die Überschneidung der beiden pH-Gradienten groß genug ist, um den gesamten Bereich zwischen pH 3.4 und pH 6.9 abzudecken, und keine Lücke zwischen den beiden pH-Gradienten vorhanden ist.

Zur Proteinidentifikation wurden jeweils zwei Gele von *C. glutamicum* ATCC13032 und DM 1730 mit einer Proteinbeladung von 700µg im pH-Bereich 3.4-5.4 und 4.9-6.9 angefertigt. Diese Gele wurden mit Coomassie-Blau gefärbt, die Spots gepickt, tryptisch verdaut und mit MALDI-MS analysiert. Die identifizierten Proteine sind in den Abbildungen 5-34 und 5-35 mit Pfeilen und Nummern kenntlich gemacht.



**Abbildung 5-34: Referenzkarte von *C. glutamicum* im pH-Bereich 3.4-5.4 (Fermenteranzucht)**

Die Zahlen kennzeichnen die identifizierten Proteine. Eine vollständige Auflistung aller identifizierten Proteine befindet sich im Anhang I.



**Abbildung 5-35: Referenzkarte *C. glutamicum* im pH-Bereich 4.9-6.9 (Fermenteranzucht)**

Die Nummern kennzeichnen die identifizierten Proteine. Eine vollständige Auflistung aller identifizierten Proteine befindet sich im Anhang I.

Im Rahmen dieser Referenzkartierung im pH-Bereich von 3.4–6.9 konnten insgesamt 265 individuelle Proteine, insbesondere sehr viele Enzyme des Zentralstoffwechsels, als auch des L-Lysin Produktionsweges identifiziert werden (Abb. 5-36 und 5-37): von letzteren weiß man, dass die verantwortlichen Gene (*hom*, *pyc*, *zwf* [59], [60]) eine Schlüsselrolle in diesem Stoffwechselweg innehaben. Eine vollständige Auflistung aller in diesem Projekt identifizierten Proteine findet sich im Anhang I. Durch die Erstellung der Referenzkarten wurden mehr Proteine identifiziert als in den bisher publizierten Arbeiten anderer Arbeitsgruppen [68-70]. Somit wurde eine Ausgangsbasis für die folgenden Projekte geschaffen, bei denen unter anderem die beiden *C. glutamicum* Stämme ATCC13032 und DM 1730 verglichen wurden.

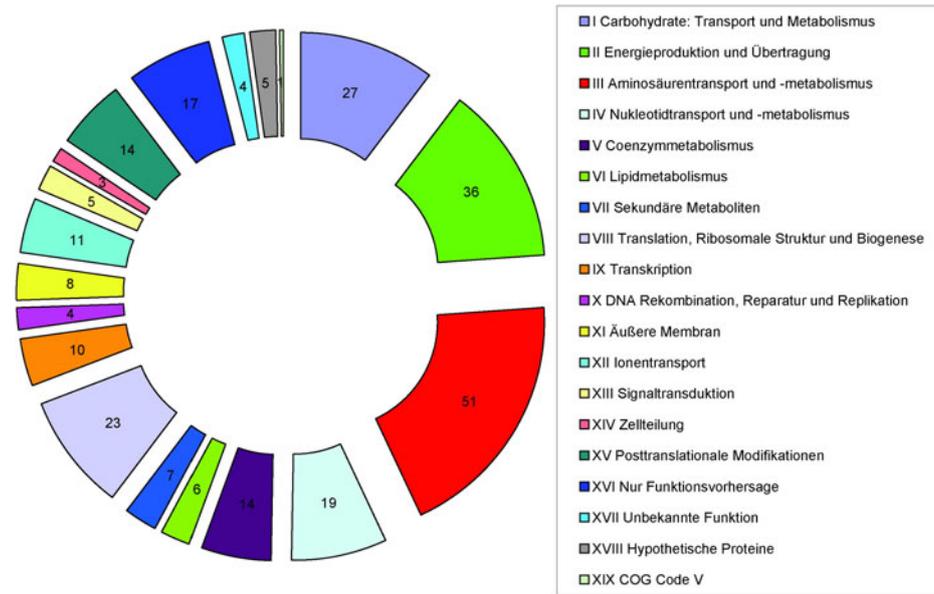
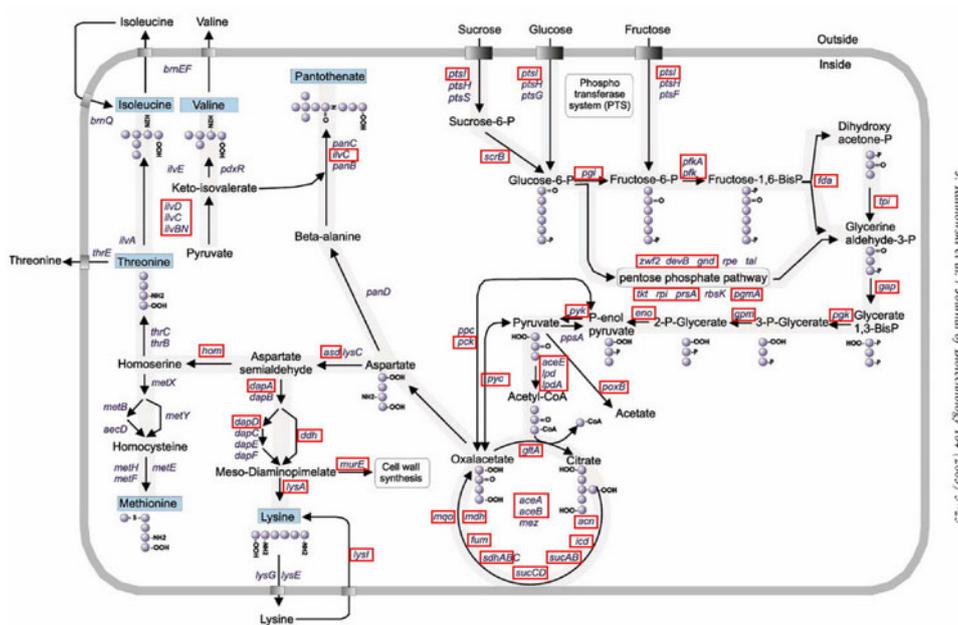


Abbildung 5-36: Identifizierte *C. glutamicum* Proteine im Bereich von pH 3.4-6.9



J. Kalinowski et al. / Journal of Biotechnology 104 (2003) 5–25

Abbildung 5-37: L-Lysin Produktionsweg

Die von uns im Bereich von pH 3.4-6.9 identifizierten Proteine (Abb. 5-34 – 5.36) sind in dem Schema nach J. Kalinowski rot eingezeichnet.

### 5.5.2 DIGE-Vergleich von *C. glutamicum* ATCC13032 und DM1730 auf MM1-Medium

Wie zu erwarten ließ die vergleichende Analyse der silbergefärbten 2DE-Gele der beiden *C. glutamicum* Stämme, die sich in vier pH-neutralen Punktmutationen unterscheiden, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spotmustern des Wildtypstamms ATCC13032 und des Produktionsstamms DM1730 erkennen. Da Silberfärbungen aufgrund ihres relativ engen linearen Messbereichs für die quantitative Gelauswertung nur mit Einschränkungen anwendbar sind, wurde zum Nachweis und zur Quantifizierung unterschiedlich exprimierter Proteine die DIGE-Technik (vgl. 4.7) angewendet. Hierzu werden die zu vergleichenden Proteinproben vor der IEF mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gelabelt, gemischt und gemeinsam in einem einzigen Gel aufgetrennt. Die Detektion der gelabelten Proben erfolgt bei verschiedenen Wellenlängen. Aufgrund der hohen Sensitivität und des großen linearen Messbereichs bietet diese Technologie die Möglichkeit, Unterschiede in den 2D-Mustern sehr zuverlässig zu quantifizieren. Da man zwei unterschiedliche Proben sowie zusätzlich einen internen Standard auf einem einzigen 2DE-Gel analysieren kann, ist die Reproduzierbarkeit deutlich erhöht, und außerdem muss man weniger 2D-Gele zur statistischen Absicherung der Ergebnisse anfertigen.

Ursprünglich war geplant, in diesem Experiment die im Rahmen des BMBF-Projektes von der Firma *Degussa* zur Verfügung gestellten Proben aus der Fermenteranzucht zu vergleichen. Leider waren bei der Probenahme unterschiedliche Entnahmezeitpunkte gewählt worden und damit die Proben nicht direkt vergleichbar. Aus diesem Grund wurden selbstangezogene Proben aus der Anzucht im MM1-Medium verwendet, welches dem in der industriellen Großanzucht eingesetzten Medium ähnelt.

Zur Bestimmung der differentiell exprimierten Proteine von *C. glutamicum* ATCC13032 und DM1730 bei der Anzucht in MM1-Medium wurden 50 µg (Proteinmasse) des Wildtyps mit dem Fluorophor Cy3 und 50 µg (Proteinmasse) des Produktionsstammes mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gelabelt. Der interne gepoolte Standard (IPS) (50µg Proteinmasse) wurde mit dem Fluorophor Cy2 gelabelt. Es wurde eine Dreifachbestimmung mit biologischen Replikaten durchgeführt und die erhaltenen 2D-Gele mit der Decyder 5.0 Software analysiert. Da bei den üblicherweise verwendeten Regulationsfaktoren >2.0 keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden *C. glutamicum* Stämmen zu Tage traten, erniedrigten wir den Regulationsfaktor auf 1.3, damit ein Protein als differentiell exprimiert angesehen wurde. Diese Änderung war insofern vertretbar, als bei einer Dreifachbestimmung die erhaltenen Werte unter der Annahme, dass der Wert des t-Tests kleiner/gleich 0,005 (= 0,5 % falsch positive Werte) war, ausreichende Aussagekraft hatte. Unter zugrunde legen dieser Kriterien wurden im pH-Bereich von 3.4-5.4 vier differentiell exprimierte Proteinspots gefunden: (2x Cg0583 (fusA); Cg1337 - (hom); und Cg2560 - (aceA)). Im pH-Bereich 4.9-6.9 waren hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden

*C. glutamicum* Stämmen erkennbar. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5-38 und 5-39 und der Tabelle 5-10 dargestellt und werden im Folgenden näher beschrieben und diskutiert.

Nummer des Spots	Regulationsfaktor	Name des Proteins / Gens	pI	Masse [kDa]	Nummer des Spots auf Mastergel 3.4-5.4
1	1,32	Cg0583 - ( <i>fusA</i> )	4.8	77.87	8
2	1,46	Cg0583 - ( <i>fusA</i> )	4.8	77.87	9
3	1,34	Cg1337 - ( <i>hom</i> )	4.8	46.42	64
4	- 1,57	Cg2560 - ( <i>accA</i> )	4.9	47.21	67

**Tabelle 5-10: Differenziell exprimierte Proteine von DM1730 im Vergleich zu ATCC13032**

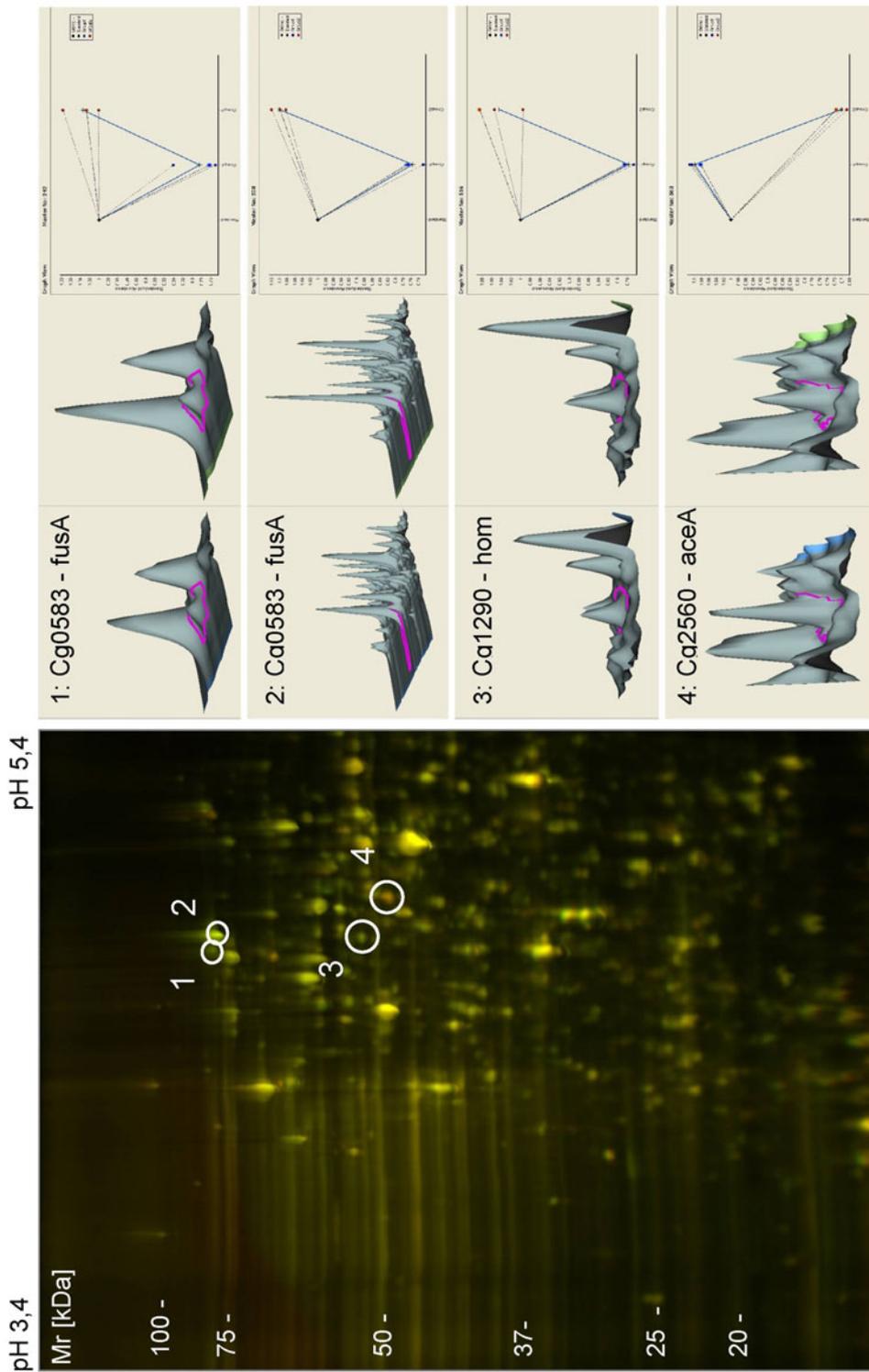
Differenziell exprimierte Proteine im pH-Bereich 3.4-6.9. Ein positives oder negatives Vorzeichen bezeichnet eine Hoch- bzw. Herunterregulierung des Proteins im Stamm DM1730 im Vergleich zu ATCC13032. Identifikation mit der Vorgabe von mind. 5 gematchten Peptiden, Abweichung des theoretischen pIs zum gefundenen pI < 0.5 pH-Einheiten und Abweichung der theoretischen Masse zur gefundenen Masse < 20%

#### 5.5.2.1 Cg0583 - (*fusA*) Elongations Faktor G

Der Elongationsfaktor G ist ein essentielles Protein, das die Translokation des Ribosoms von einem Codon zum nächsten unter GTP-Hydrolyse katalysiert [107]. Des Weiteren spielt er eine Rolle im Ribosomenabbau und dessen Recycling [108]. Laut Analyse mittels der DeCyder Software ist dieses Protein im Produktionsstamm DM1730 hochreguliert.

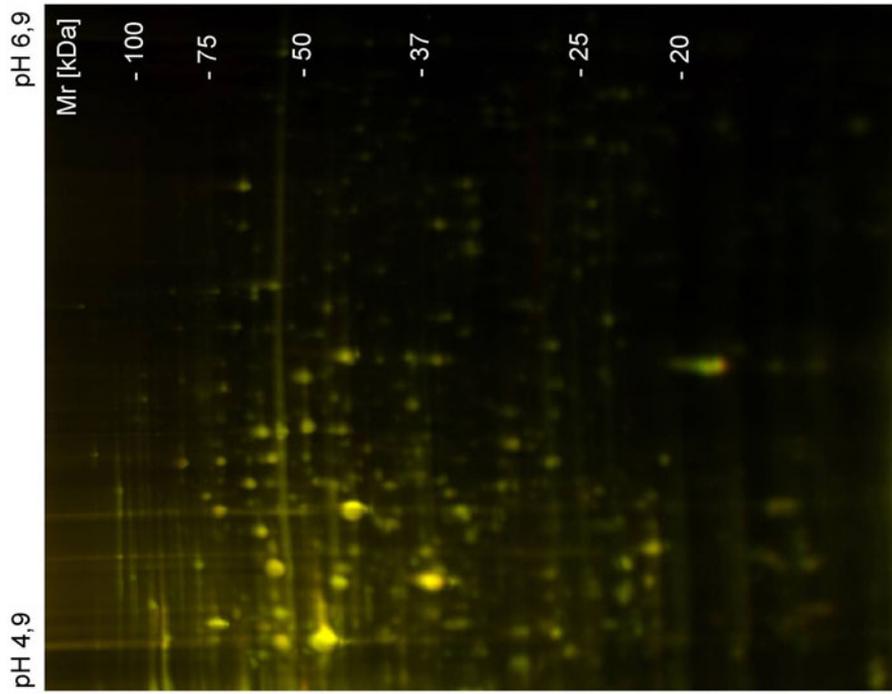
Eine mögliche Erklärung der Hochregulierung dieses Proteins beim Stamm DM1730 wäre die Punktmutation in *lysC*, bei der Threonin an Position 311 durch Isoleucin ausgetauscht wurde. Dieses Protein katalysiert den ersten Schritt der L-Lysin Biosynthese die Phosphorylierung von L-Aspartat. Eine hohe Konzentration von L-Lysin wirkt hemmend auf die Expression von *lysC*, was für eine gesteigerte L-Lysinproduktion negativ wäre. Durch den durch die Punktmutation hervorgerufenen Wegfall der Regulation von *lysC* würde dieses im Produktionsstamm verstärkt synthetisiert werden. Dies sollte eine verstärkte Expression des Elongationsfaktors G mit sich bringen.

Zur verstärkten Expression des Elongationsfaktors G können aber auch die anderen Punktmutationen beitragen, die die Funktion anderer Proteine herabsetzen. Damit müssten diese Proteine verstärkt exprimiert werden, um eine ausreichende Versorgung der Zelle mit ihren jeweiligen Produkten zu gewährleisten.



**Abbildung 5-38: 2D-DIGE Gel (IPG 3,4-5,4) von in MM1-Medium angezüchteten *C. glutamicum* Stämmen**

Die Proteine der Stämme ATCC13032 und DM1730 wurden mit einem IPG 3,4-5,4 aufgetrennt. Die Abbildung zeigt links ein Imageoverlay der erhaltenen Gele (3 biologische Replikate) und rechts die differentiell regulierten Proteine in einer 3D-Ansicht zuzüglich der erhaltenen Regulationswerte. Die Zahlen 1 bis 4 (siehe Tabelle 5-1) geben die differentiell exprimierten und mittels MALDI-MS identifizierten Proteine an.



**Abbildung 5-39: 2D-DIGE Gel (IPG 4,9-6,9) von in MM1-Medium angezüchteten *C. glutamicum* Stämmen**

Die Proteine der Stämme ATCC13032 und DM1730 wurden mit einem IPG 4,9-6,9 aufgetrennt. Es konnten in diesem pI-Bereich keine differentiell exprimierte Proteine gefunden werden.

### 5.5.2.2 Cg1337 - (hom) Homoserin-Dehydrogenase (EC 1.1.1.3)

Das Enzym Homoserin-Dehydrogenase katalysiert die Umwandlung von L-Aspartat-Semi-Aldehyd zu L-Homoserin. Dieses Enzym ist im Produktionsstamm DM1730 im Gegensatz zum Wildtyp hochreguliert. Das könnte folgendermaßen erklärt werden: Die eingefügte Punktmutation an Position 59, bei der Valin durch Alanin ausgetauscht wurde und somit dieses Enzym funktionsunfähig machen sollte, ist möglicherweise eine *leaky* Mutation, also eine Mutation, die nicht ganz den erwarteten Resultaten entspricht. Infolgedessen ist das Enzym in seiner Funktion nicht vollständig eingeschränkt [59]. Dies ist auch wahrscheinlich, da für die Zelle eine vollständige Funktionsuntüchtigkeit von *hom* letal wäre, wenn wichtige Aminosäuren wie z.B. L-Methionin und L-Threonin nicht mehr synthetisiert werden könnten. Die Regulation der Homoserin-Dehydrogenase erfolgt durch Methionin und Threonin, wobei ein hoher Gehalt dieser Aminosäuren eine Suppressorwirkung auf die Expression der Homoserin-Dehydrogenase ausübt. Da im Produktionsstamm L-Methionin und L-Threonin nur eingeschränkt synthetisiert werden können, müsste dieses Enzym entsprechend hochreguliert werden, damit genügend L-Methionin und L-Threonin bereitgestellt werden können. Die beobachtete Hochregulierung stützt somit die These, dass es sich bei der Punktmutation in der Homoserin Dehydrogenase in der Tat um eine *leaky* Mutation handelt.

### 5.5.2.3 Cg2560 - (aceA) Isocitrat Lyase (EC 4.1.3.1)

Die Isocitrat Lyase stellt das zweite Enzym des Glyoxylat-Bypasses im Citratzyklus dar. Es katalysiert die Umwandlung von Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat. Die Regulation dieses Enzyms erfolgt unter anderem durch Phosphoenolpyruvat und Fructose-1,6-Bisphosphat [109]. Eine hohe Konzentration von z.B. Phosphoenolpyruvat bewirkt eine Dephosphorylierung von *aceA* [110]. Die Herunterregulierung dieses Enzyms im Produktionsstamm DM1730 lässt sich durch die dortige Forcierung der Glykolyse erklären, bei der mehr Fructose-1,6-Bisphosphat und Phosphoenolpyruvat gebildet werden, da die Punktmutation im Protein Glukose-6-phosphat-1-dehydrogenase (*zwf*) die Bildung dieser Moleküle unterstützt.

### 5.5.3 Sub-Proteome-DIGE

Trotz des Einsatzes der speziell im Rahmen dieser Arbeit entwickelten IPGs mit einem optimal angepassten pH-Gradientenverlauf zur Erzielung einer hohen Auflösung wurden nur drei differentiell exprimierte Proteine detektiert (*fusA*, *hom*, *aceA*). Um weitere Unterschiede zu finden, führten wir zusätzliche Experimente mit Hilfe der *Sub-Proteom-DIGE* Technik durch. Diese von uns neu entwickelte Methode ist eine Verbindung der DIGE-Methode und der Vorfraktionierung mit Sephadex-IEF (siehe Kapitel 5.4) zur quantitativen Analyse differentiell exprimierter Proteine. Sie ermöglicht eine höhere Proteinauftragsmenge zur Detektion gering-exprimierter Proteine ohne das Gel-Image zu „überladen“. Die Bezeichnung "Sub-Proteome" rührt daher, dass mit der Sephadex-IEF jeweils nur ein Teil des Gesamtproteomes analysiert wird. Hierzu werden jeweils 150 µg mit CyDyes markierte Proben mit bis zu 10 mg unmarkierter Probe vermischt, danach eine Sephadex-IEF durchgeführt und die einzelnen Fraktionen anschließend mittels hochauflösender 2D DIGE unter Verwendung enger IPGs analysiert. Differentiell exprimierte Proteine werden anschließend direkt aus den 2DE Gelen gepickt und nach tryptischem Verdau massenspektrometrisch identifiziert. Der Arbeitsablauf ist in Abbildung 5-40 schematisch dargestellt.

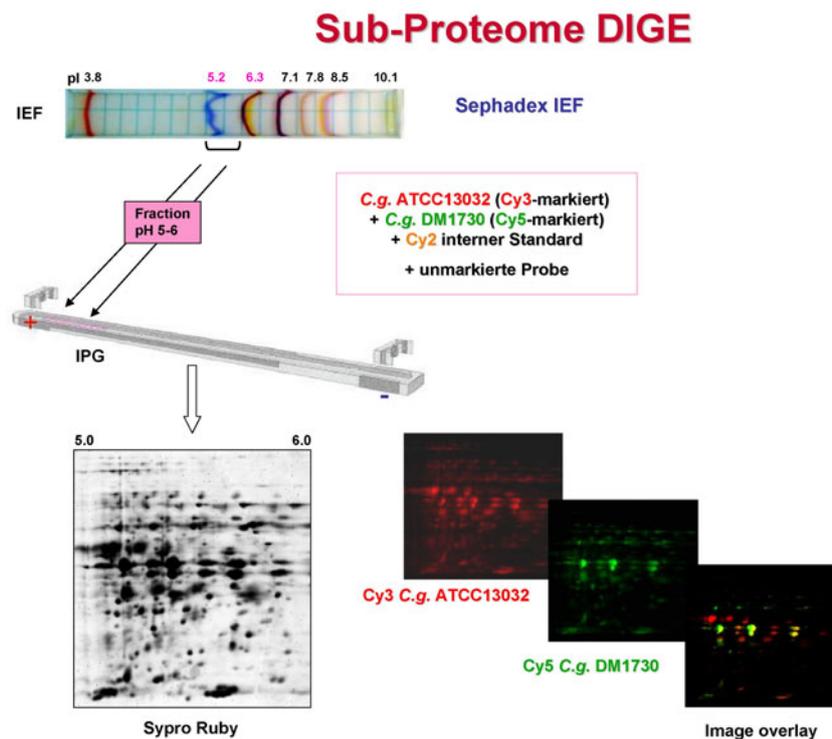
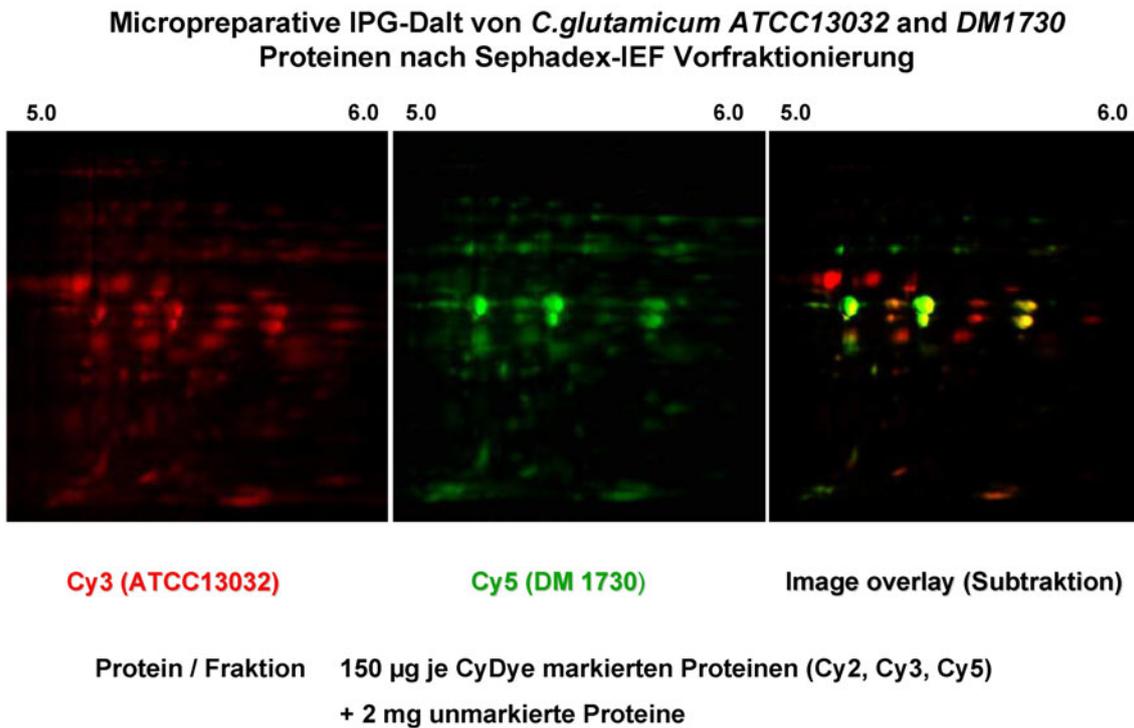


Abbildung 5-40: Prinzip der Sub-Proteome DIGE Technologie zur präparativen Vorfraktionierung nach pI.

Bei den hier gezeigten Ergebnissen handelt es sich um einen Sub-Proteome-DIGE Versuch, bei dem zwei *Corybacterium glutamicum* Stämme verglichen wurden.



**Abbildung 5-41: Mikropreparative 2D-DIGE von zwei *C. glutamicum* Stämmen im pH-Bereich von 5.0 – 6.0**

Die Abbildung 5-41 zeigt die Resultate aus dem Vergleich der beiden *Corybacterium glutamicum* Stämme. Zu sehen ist links der Scan des Cy3-Kanals, in der Mitte der Scan des Cy5-Kanals, und rechts das Resultat des Übereinanderlegens der beiden Einzelkanäle. Gut zu erkennen sind eine ganze Reihe von Unterschieden, die in der Legende zu Abbildung 5-42 näher beschrieben sind. Differentiell exprimiert wurden vor allem Proteine bzw. (Iso-) Enzyme, die in die Aminosäureproduktion und Zellteilung involviert sind, aber auch stressbezogene Proteine (z.B. Superoxid-Dismutase), letztere vermutlich aufgrund des bei der Anzucht auftretenden oxidativen Stresses.

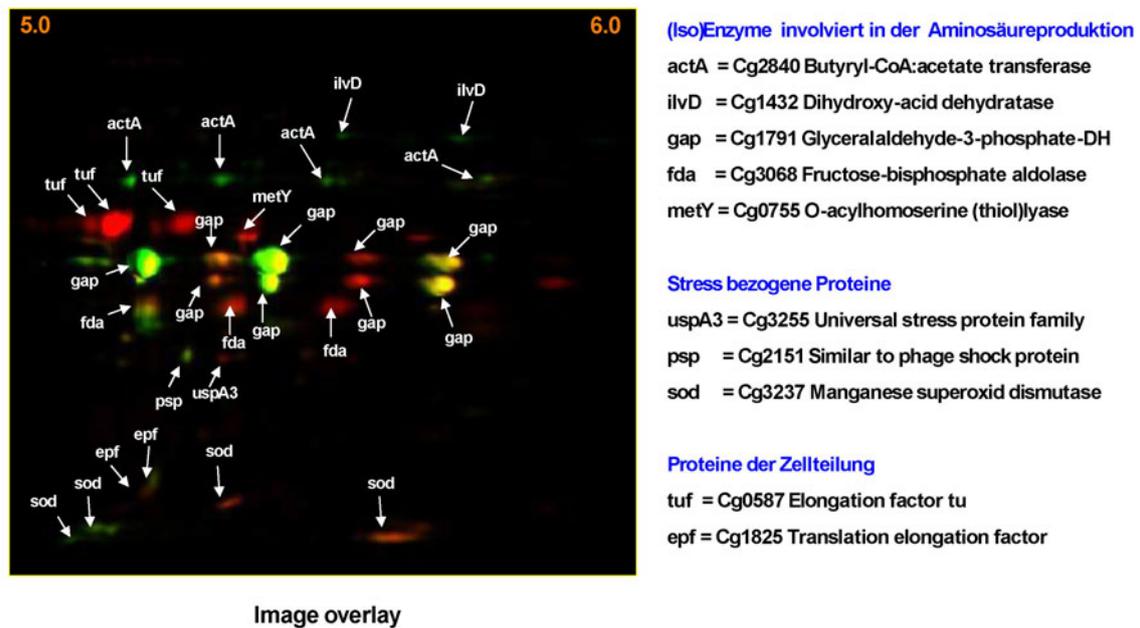
MALDI-MS Identifikation von unterschiedlich exprimierten *C. glutamicum* Proteinen**C.g. ATCC13032 (Cy3-markiert) und C.g. DM1730 (Cy5-markiert)**

Abbildung 5-42: Identifizierte Proteine nach Sub-Proteome-DIGE von zwei *C. glutamicum* Stämmen im pH-Bereich von 5.0 – 6.0

## Fazit

Trotz des Einsatzes speziell entwickelter, auf die Fragestellung zugeschnittener IPGs wurden zunächst nur drei differentiell exprimierte Proteine (fus A, hom, aceA) zwischen den beiden *C. glutamicum* Stämmen bei Wachstum auf MM1-Medium detektiert. Da mehr Unterschiede erwartet worden waren, führten wir detailliertere Untersuchungen mit Hilfe der Sub-Proteom-DIGE Technik durch. Hierbei konnten in einer Pilotstudie im pH-Bereich von 5-6 erheblich mehr unterschiedlich exprimierte Proteine bzw. Proteinisoformen gefunden werden (siehe Abbildung 5-42). Leider war es aus Zeitgründen nicht möglich, weitere Untersuchungen zu dieser Thematik durchzuführen. Die neu entwickelte Methode der Sub-Proteom-DIGE ermöglicht die Durchführung einer differentiellen Proteomanalyse unter Kombination der Vorteile der Sephadex-IEF (d.h. höheres Auflösungsvermögen, Nachweis niedrig-abundanter Proteine sowie bessere MALDI-MS Identifikationen durch Vorfraktionierung) mit den Vorteilen der DIGE-Technologie (d.h. bessere Quantifizierbarkeit und höhere Reproduzierbarkeit).

## 5.6 Vergleichende Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC13032 nach Anzucht in Vollmedium und Minimalmedium

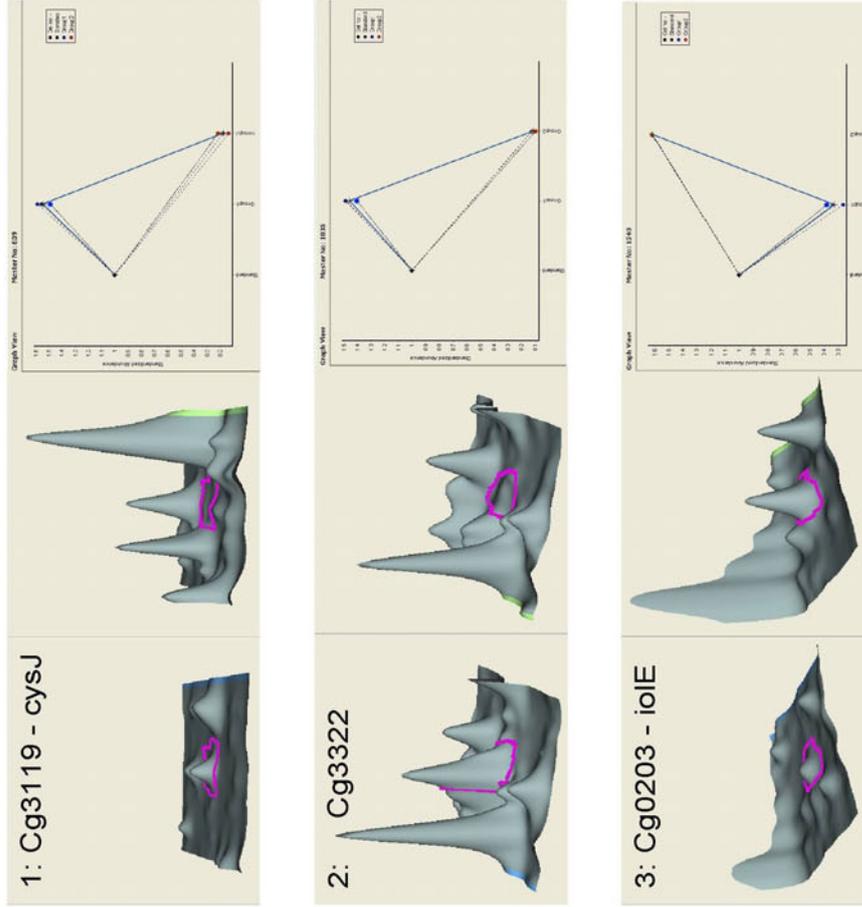
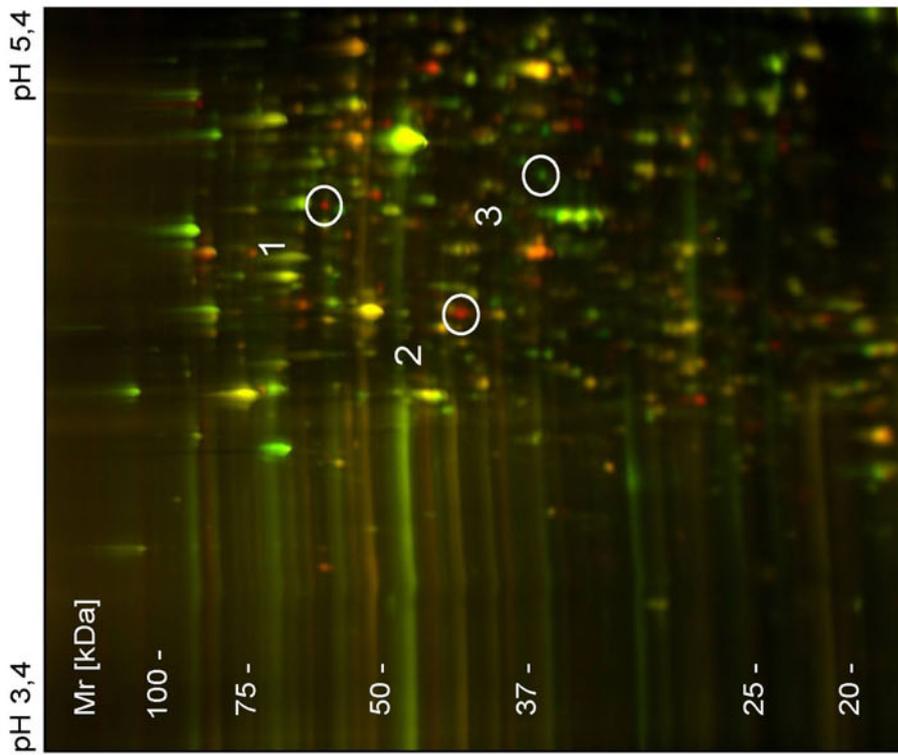
Da es bis *dato* noch keine differentielle Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC13032 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gab, wurde ein Mediumsvergleich durchgeführt. Durch Anzucht von *C. glutamicum* ATCC13032 in Vollmedium (BHI-Medium) bzw. einem Minimalmedium (MM1) müssten sehr viele Proteine differentiell exprimiert werden.

Zur Bestimmung der unterschiedlich exprimierten Proteine von *C. glutamicum* ATCC13032 bei der vergleichenden Anzucht in BHI- und MM1-Medium wurden 50 µg (Proteinmasse) der Anzucht im BHI-Medium mit Cy3 und 50 µg (Proteinmasse) der Anzucht in MM1-Medium mit Cy5 gelabelt. Der IPS (50µg Proteinmasse) wurde Cy2 gelabelt. Es wurde wiederum eine Dreifachbestimmung mit biologischen Replikaten durchgeführt, und die erhaltenen Spotmuster mit der Decyder 5.0 Software analysiert. Ein Protein wurde als differentiell exprimiert angesehen, wenn der Regulationsfaktor einen Betrag von 2.0 überschritt und der Wert des t-Tests kleiner/gleich 0.005 war. Da bei einer ersten Analyse der Daten, wie erwartet, sehr viele Unterschiede zu erkennen waren (mehr als 35% aller Proteine), wurde der Schwellenwert der Regulation auf 2.5 hochgesetzt. Da es, wie bereits erwähnt, primär darum ging, das Potential der Methode auszutesten, wurden in dieser Pilotstudie nur die am stärksten regulierten Proteine zur Verifizierung des methodischen Ansatzes betrachtet. In dem analysierten pH-Bereich 3.4 -6.9 erfüllten insgesamt 11 Spots die o.g. Kriterien. Die in den Abbildungen 5-43 bis 5-46 und den Tabellen 5-11 und 5-12 dargestellten Ergebnisse zeigen die am stärksten regulierten Proteine.

Nummer des Spots	Regulationsfaktor	Name des Proteins / Gens	pI	Masse [kDa]	Nummer des Spots auf Mastergel 3.4-5.4
1	-8,67	Cg3119 - (cysJ)- Probable Sulfite Reductase	4.9	50.11	47
2	-12,64	Cg3323 - Myo-inositol-1-phosphate synthase	4.7	39.21	91
3	4,96	Cg0203 - (iolE)-phosphate isomerases/epimerase	5.0	35.51	122

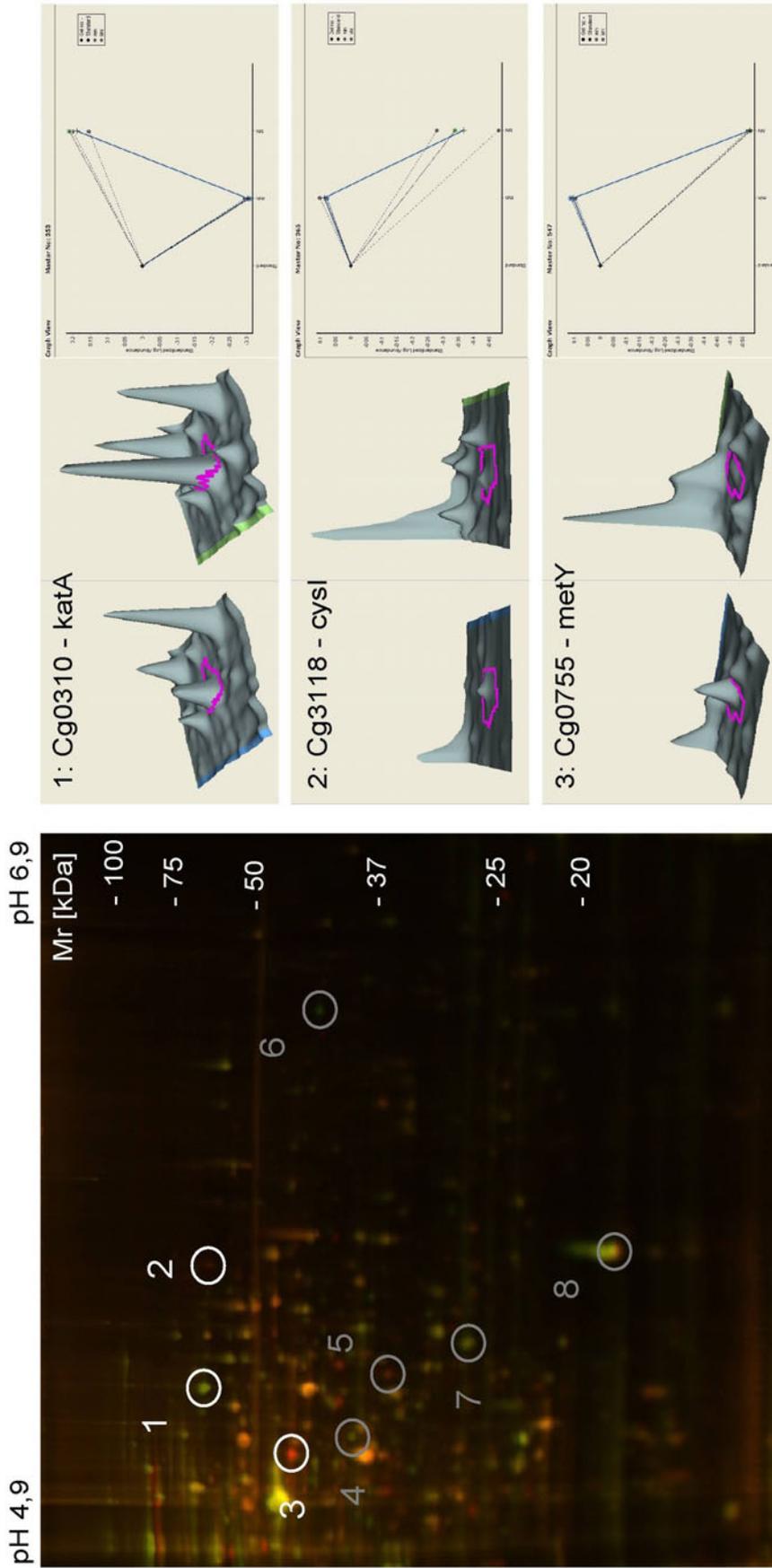
**Tabelle 5-11: Differentiell exprimierte *C. glutamicum* Proteine im pH-Bereich 3.4 - 5.4 nach Anzucht im Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1)**

Differentiell exprimierte Proteine im pH-Bereich 3,4 - 5,4. Ein positives oder negatives Vorzeichen bezeichnet eine Hoch- bzw. Herunterregulierung des Proteins im BHI-Medium im Vergleich zum MM1-Medium mit der Vorgabe von mind. 5 gematchten Peptiden, Abweichung des theoretischen pIs zum gefundenen pI < 0.5 pH-Einheiten und Abweichung der theoretischen Masse zur gefundenen Masse < 20%.

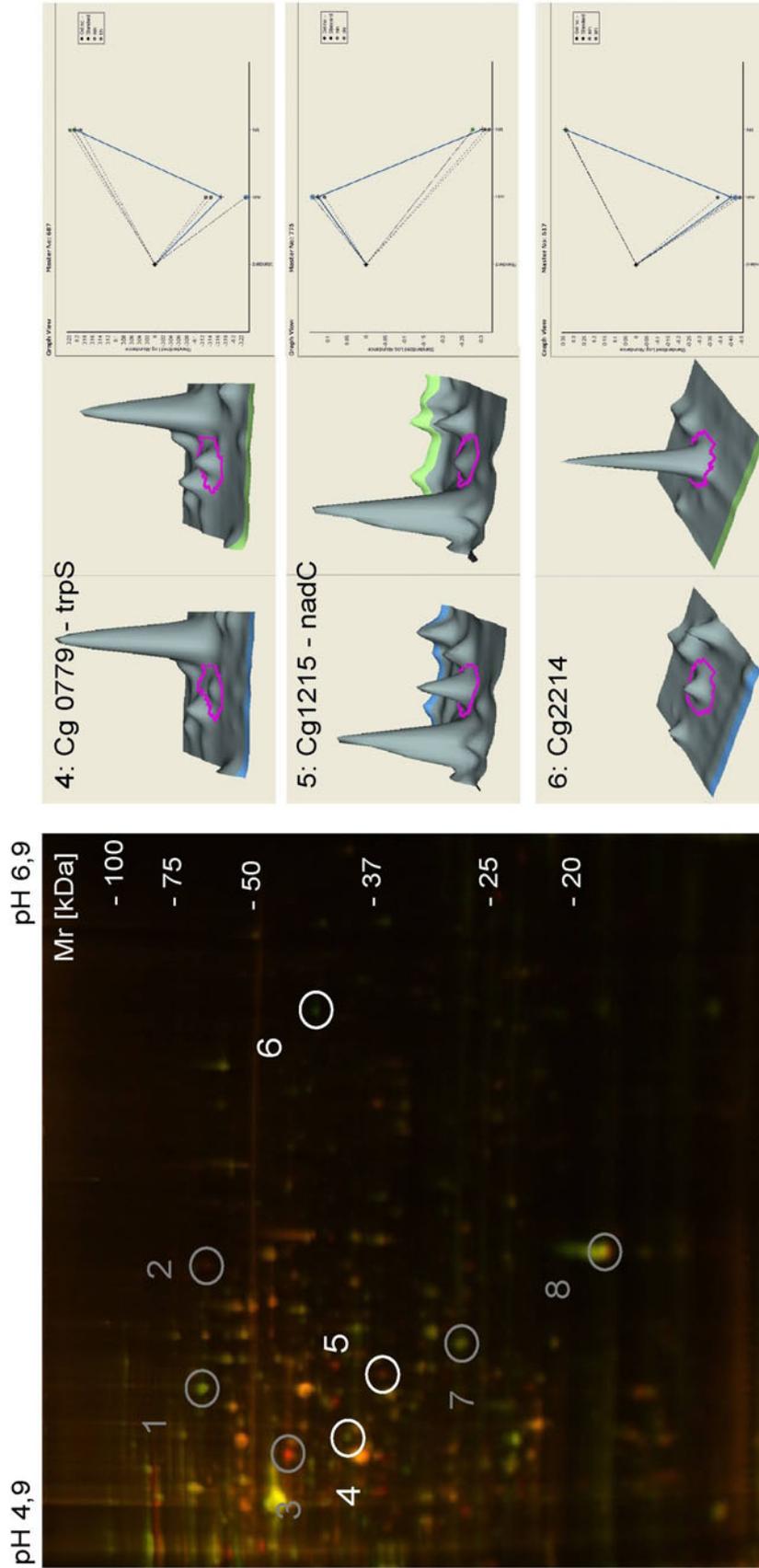


**Abbildung 5-43: Differenziell exprimierte *C. glutamicum* (ATCC13032) Proteine im pH-Bereich 3.4 - 5.4 nach Anzucht in Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1). 2D-DIGE**

Links: Imageoverlay der erhaltenen 2D-Gele (Voll- vs. Minimalmedium). Dreifachbestimmung (biologische Replikate). Rechts: 3D-Ansicht der differenziell regulierten Proteine. Ziffern 1, 2, 3 entsprechen den Ziffern 47, 91 und 122 auf der Referenzkarte Abb. 5-34 (s. Tab. 5-11)

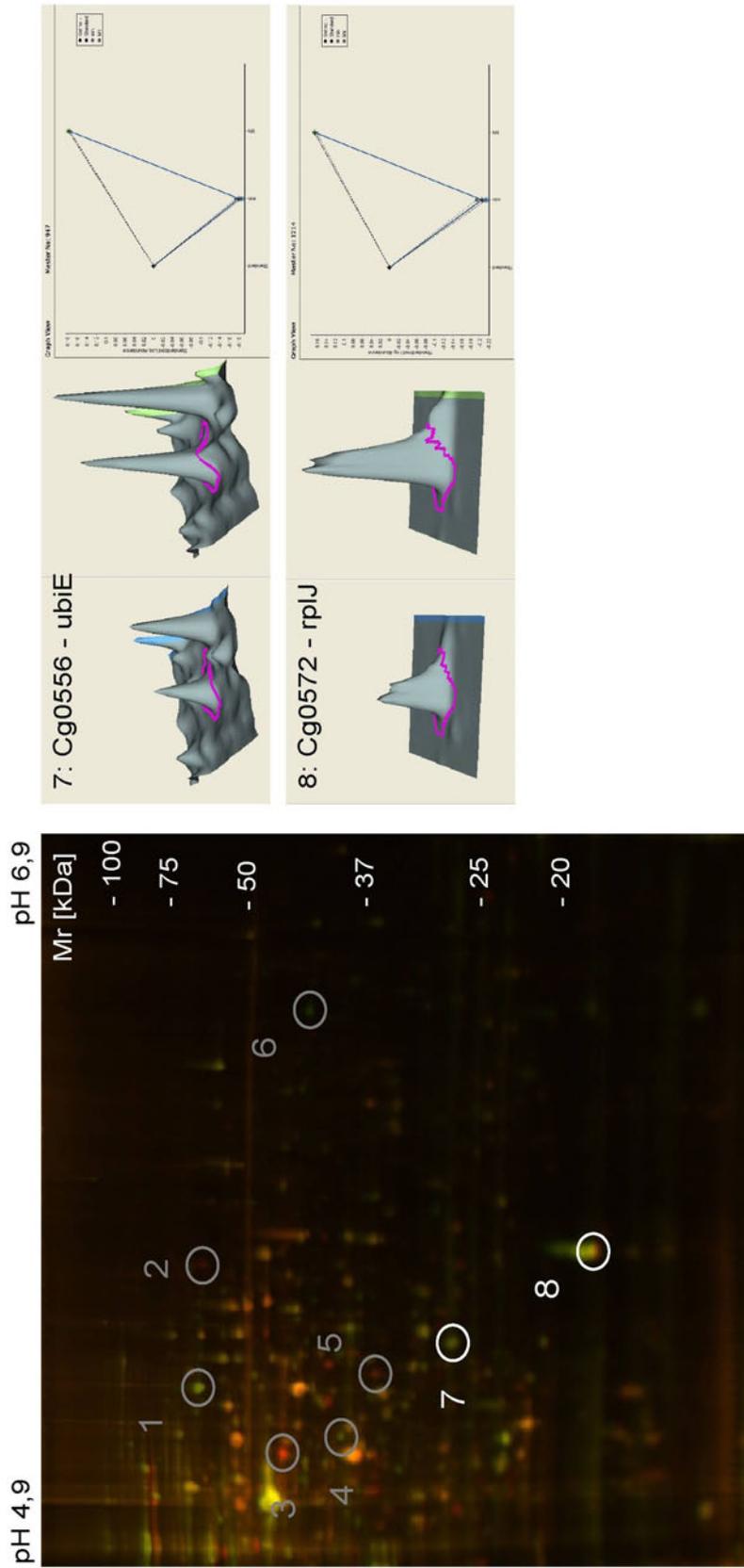


**Abbildung 5-44: Differenziell exprimierte *C. glutamicum* (ATCC13032) Proteine im pH-Bereich 4.9 – 6.9 nach Anzucht in Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1). 2D-DIGE**  
 Links: Imageoverlay der erhaltenen 2D-Gele (Voll- vs. Minimalmedium). Dreifachbestimmung (biologische Replikate). Rechts: 3D-Ansicht der differenziell regulierten Proteine. Ziffern 1, 2, 3 entsprechen den Ziffern 6, 16 und 41 auf der Referenzkarte Abb. 5-35 (s. Tab. 5-12).



**Abbildung 5-45: Differenziell exprimierte *C. glutamicum* (ATCC13032) Proteine im pH-Bereich 4.9 – 6.9 nach Anzucht in Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1). 2D-DIGE**

Links: Imageoverlay der erhaltenen 2D-Gele (Voll- vs. Minimalmedium). Dreifachbestimmung (biologische Replikate). Rechts: 3D-Ansicht der differenziell regulierten Proteine. Ziffern 4, 5, 6 entsprechen den Ziffern 67, 70 und 49 auf der Referenzkarte Abb. 5-35 (s. Tab. 5-12).



**Abbildung 5-46: Differenziell exprimierte *C. glutamicum* (ATCC13032) Proteine im pH-Bereich 4.9 – 6.9 nach Anzucht in Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1). 2D-DIGE**

Links: Imageoverlay der erhaltenen 2D-Gele (Voll- vs. Minimalmedium). Dreifachbestimmung (biologische Replikate). Rechts: 3D-Ansicht der differenziell regulierten Proteine. Ziffern 7,8 entsprechen den Ziffern 91 und 102 auf der Referenzkarte Abb. 5-35 (s. Tab. 5-12).

Nummer des Spots	Regulationsfaktor	Name des Proteins / Gens	pI	Masse [kDa]	Nummer des Spots auf Mastergel 4.9-6.9
1	3,08	Cg0310 - (katA) -Catalase	5,2	58,69	6
2	-2,82	Cg3118 - (cysI) - Sulfite Reductase	5,5	62,98	16
3	-4,82	Cg0755 - (metY) - O-Acetylhomoserine (Thiol)-Lyase	5,1	46,73	41
4	2,85	Cg0779 - (trpS) - Tryptophanyl-tRNA synthetase	5,1	37,81	67
5	-2,7	Cg1215 - (nadC) - Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	5,2	29,36	70
6	6,07	Cg2214 - Predicted Fe-S-cluster redox enzyme	6,1	40,01	49
7	2,67	Cg0556 - (ubiE) - Methylase involved in ubiquinone/menaquinone biosynthesis	6,2	25,23	91
8	2,54	Cg0572 - (rplJ) - 50S Ribosomal protein L10	5,6	17,94	102

**Tabelle 5-12: Differenziell exprimierte *C. glutamicum* Proteine im pH-Bereich 4.9 – 6.9 nach Anzucht im Voll- (BHI) bzw. Minimalmedium (MM1).**

Differenziell exprimierte Proteine im pH-Bereich 4.9 – 6.9. Ein positives oder negatives Vorzeichen bezeichnet eine Hoch- bzw. Herunterregulierung des Proteins im BHI-Medium im Vergleich zum MM1-Medium mit der Vorgabe von mind. 5 gematchten Peptiden, Abweichung des theoretischen pIs zum gefundenen pI < 0.5 pH-Einheiten und Abweichung der theoretischen Masse zur gefundenen Masse < 20%.

### 5.6.1 Cg3119 - (cysJ) Probable Sulfite Reductase (Flavoprotein) (EC 1.8.1.2)

Das Protein cysJ stellt die  $\alpha$ -Untereinheit einer Sulfite-Reduktase dar. Diese Untereinheit bindet je ein FAD und FMN. Das FAD erhält von NADPH die benötigten Elektronen, während diese dann von FAD auf FMN übertragen werden. Schließlich werden diese Elektronen auf cysI übertragen. Allerdings können diese Elektronen auch auf freie Flavine übertragen werden [111-116]. Dieses Protein ist an der Biosynthese von Selenaminoacidsäuren und im Schwefelmetabolismus beteiligt (Abbildung 5-47 und 5-48). Die Herunterregulierung dieses Proteins im BHI-Medium lässt sich dadurch erklären, dass in diesem Vollmedium L-Methionin zur Verfügung steht, welches den Transkriptionsrepressor McbR aktiviert [117]. Die  $\alpha$ -Untereinheit von cysJ wird dreimal so stark herunterreguliert wie die  $\beta$ -Untereinheit (cysI), obwohl durch die  $\alpha$ -8, $\beta$ -4 Struktur [111] nur eine doppelt so starke Herunterregulierung zu erwarten gewesen wäre.





### 5.6.4 Cg0310 - (katA) Katalase (EC 1.11.1.6)

Die Katalase katA katalysiert die Umwandlung von 3-Hydroxy-anthranilat (3-HAA) zu Cinnavalininat (CI) (Abbildung 5-50). Eine weitere von diesem Protein katalysierte Reaktion ist die Umwandlung von Methanol zu Formaldehyd im Methanmetabolismus (Abbildung 5-51). Es wird vermutet, dass sich die Zelle durch die Umwandlung von 3-HAA zu CI vor oxidativem Stress schützt, da 3-HAA als Radikalfänger (*scavenger*) von oxidativ wirkenden Substanzen fungiert. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass oxidativer Stress durch im BHI-Medium enthaltene Substanzen ausgelöst wird, bzw. durch während des Wachstums in BHI-Medium auftretende Radikale, möglicherweise aufgrund des schnelleren Wachstums von *C. glutamicum* im Vergleich zum Wachstum auf MM1-Minimalmedium.

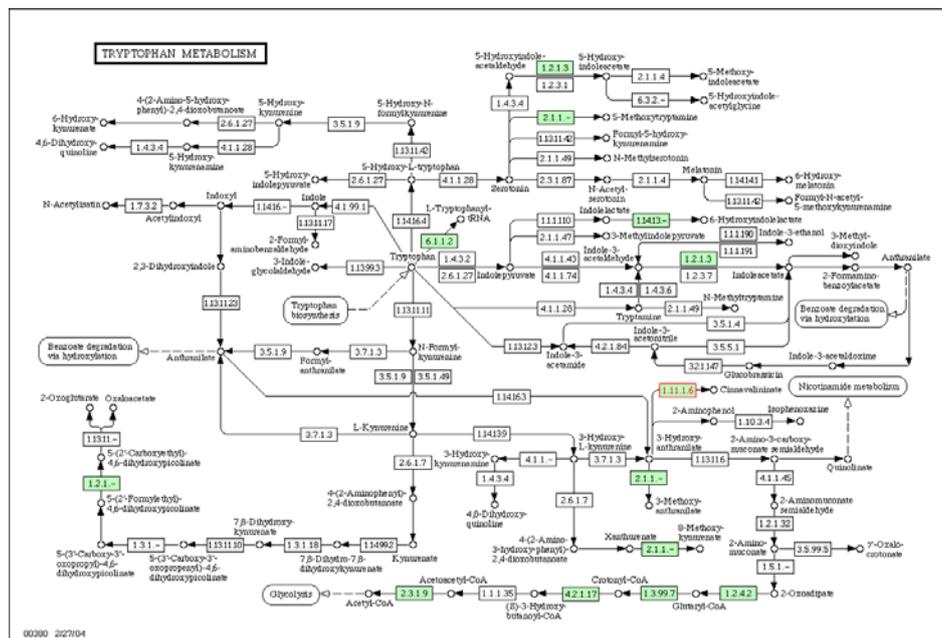
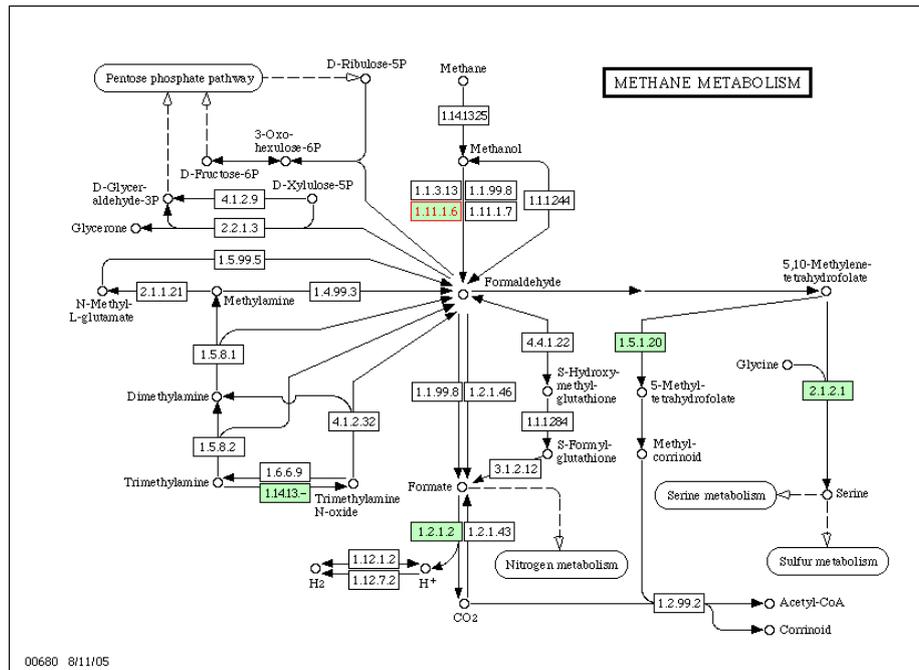


Abbildung 5-50: Tryptophanmetabolismus

Abbildung aus der „KEGG PATHWAY Database“ [118] unter Beteiligung von katA (rot markiert). [118]



**Abbildung 5-51: Methanmetabolismus**

Abbildung aus der „KEGG PATHWAY Database“ [118] unter Beteiligung von katA (rot markiert). [118]

### 5.6.5 Cg3118 - (cysI) Sulfit-Reduktase (Hämoprotein) (EC 1.8.1.2)

CysI ist die  $\beta$ -Untereinheit einer NADPH abhängigen Sulfit-Reduktase, die die Reduktion von  $\text{SO}_3^{2-}$  zu  $\text{S}^{2-}$  katalysiert. Dies stellt einen Zwischenschritt in der L-Cystein Biosynthese dar. Das gesamte Enzym hat die Struktur  $\alpha$ -8,  $\beta$ -4 und ist ein Hämoflavoprotein, wobei cysI die  $\alpha$ -Untereinheit darstellt [111].

$\text{SO}_3^{2-}$  wird auch von metY verwendet, welches ein Protein im L-Methionin Anabolismus darstellt. Wie in 5.6.6 aufgezeigt, ist auch metY in der BHI-Anzucht stark herunterreguliert. Durch das in BHI-Medium enthaltene L-Methionin werden sowohl der L-Cystein- als auch der L-Methionin-Anabolismus herunterreguliert, da eine hohe L-Methionin Konzentration die Expression des Transkriptionsrepressors McbR proliferiert, der eine Expression dieser Enzyme verhindert.

### 5.6.6 Cg0755 - (metY) O-Acetylhomoserin (Thiol)-Lyase (EC 4.2.99.10)

Dieses Enzym ist an der Methioninbiosynthese beteiligt und katalysiert die Umwandlung von O-Acetyl-L-Homoserin zu L-Homocystein unter Verwendung von  $\text{S}^{2-}$  [117]. Aufgrund der in 5.6.5 schon erwähnten Regulation dieses Proteins durch den Transkriptionsrepressor McbR, der wiederum durch L-Methionin reguliert wird, könnte dies die Herunterregulierung dieses Proteins bei der Anzucht in BHI-Medium erklären.

### 5.6.7 Cg0779 – (trpS) Tryptophan tRNA-Synthetase

Das Enzym trpS katalysiert die Reaktion von Tryptophan zu L-Tryptophanyl-tRNA. Diese tRNA bindet an spezifischen Stellen an den Ribosomen und wird bei der Synthese von Proteinen benötigt. Die Hochregulation dieses Proteins deutet auf eine erhöhte Proteinbiosynthese von *C. glutamicum* ATCC13032 bei der Anzucht in BHI-Medium, im Vergleich zur Anzucht in MM1-Medium, hin. Diese Hypothese wird durch die erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit in BHI-Medium erhärtet (vgl. Wachstumskurven in Abb. 4-2 und 4-3).

### 5.6.8 Cg1215 - (nadC) Putative Nicotinat-Nucleotid-Pyrophosphorylase

Dieses Protein, katalysiert die Reaktion von Nicotinat-D-Ribonucleotid, Diphosphat und CO<sub>2</sub> zu Pyridin-2,3-dicarboxylat und 5-phospho- $\alpha$ -D-Ribose 1-Diphosphat (Abbildung 5-52). Diese Reaktion ist ein alternativer Weg zu Synthese von NADH, falls nicht genügend Nicotinamid zur Verfügung steht. Dieses Protein ist bei der Anzucht in BHI-Medium im Vergleich zum MM1 Medium herunterreguliert. Daraus lässt sich schließen, dass im BHI-Medium genügend Nicotinamid zur Verfügung steht, da das Molekül ein Repressor für die Expression von nadC ist [121]. Es ist jedoch zu beachten, dass dies ein *putatives* Protein ist und deshalb dessen Funktion nicht sicher ist.

### 5.6.9 Cg2214 - Predicted Fe-S-Cluster Redoxenzym

Fe-S-Cluster Enzyme sind Schlüsselenzyme der Atmungskette und gehören zu der Gruppe der *non-heme-iron-proteins*. Diese Cluster bestehen aus Eisenatomen, wobei jedes Eisenatom eine Bindung mit vier Schwefelatomen eingeht. Der Schwefel ist sowohl anorganischer Schwefel als auch Schwefel von vier Cysteinresten des Proteins. Das Protein kann als Dimer (Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) sowie als Tetramer (Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) vorliegen und fungiert als 1-Elektronen Überträger [122].

Laut Decyder-Software ist dieses Protein bei der Anzucht in BHI-Medium um den Faktor 6,07 gegenüber der in MM1-Medium erhöht. Dies lässt dadurch erklären, dass durch die Vielzahl der Metaboliten im BHI-Medium, welches ein Vollmedium ist, die Atmungskette stärker genutzt wird. Der Stoffwechsel muss, im Gegensatz zum Minimalmedium, benötigte Metaboliten nicht selbst synthetisieren und entnimmt damit dem Citratzyklus keine Zwischenprodukte, die zur Synthese der Metaboliten benötigt werden. Allerdings ist dies ein *predicted* Protein, somit besteht die Möglichkeit, dass das Protein auch andere, noch unbekannt Aufgaben hat.

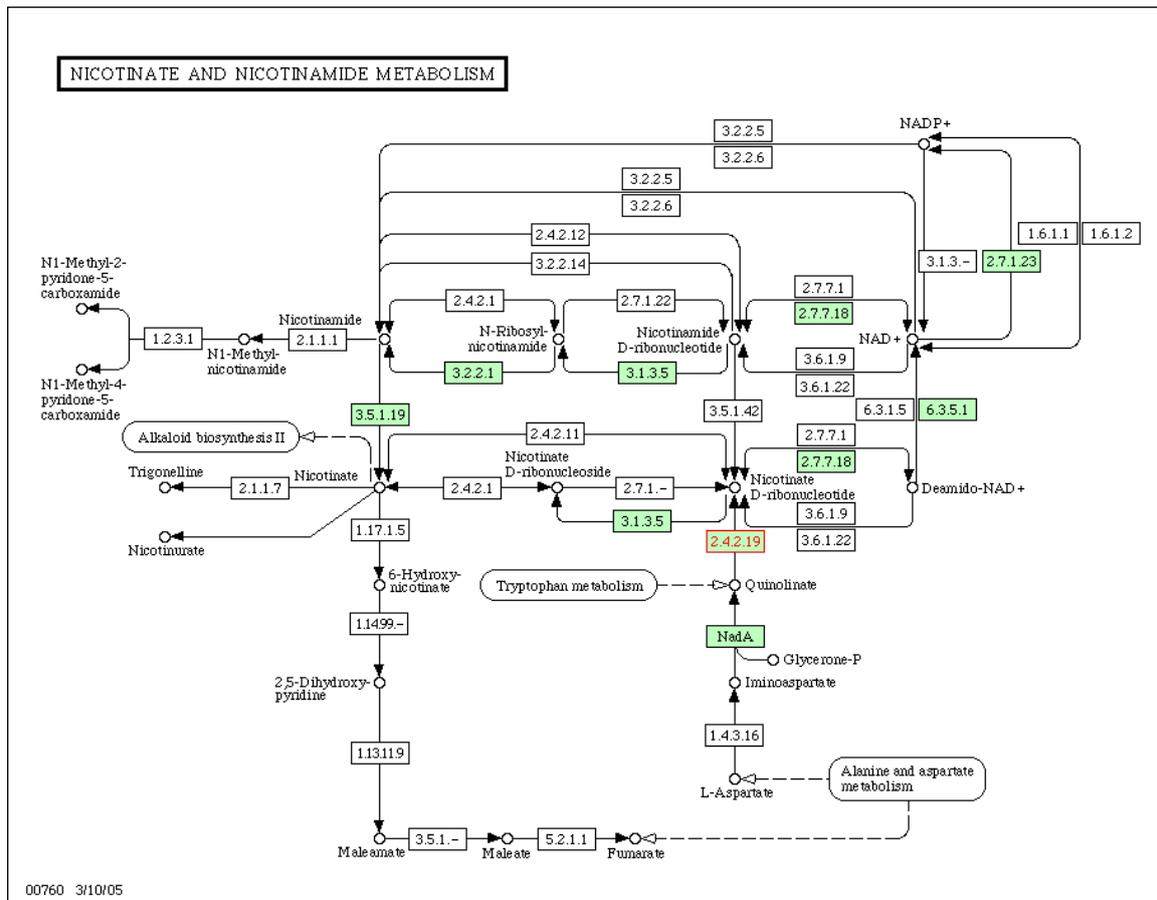


Abbildung 5-52: Nicotinat und Nicotinamid Metabolismus

Abbildung aus der „KEGG PATHWAY Database“ [118] unter Beteiligung von nadC (rot markiert) [118]

### 5.6.10 Cg0556 – (ubiE) Ubiquinon/Menaquinon- Biosynthese Methyltransferase (EC 2.1.1.-)

Das Protein ubiE ist am Metabolismus von Ubichinon beteiligt. Ubichinon ist ein Molekül zum Elektronentransfer innerhalb der Atmungskette. Die Hochregulierung dieses Proteins deutet, in Einklang mit 5.6.9, auf die bei der Anzucht in BHI-Medium, im Vergleich zur Anzucht in MM1-Medium, verstärkte Nutzung der Atmungskette hin.

### 5.6.11 Cg0672 – (rplJ) – 50S Ribosomal Protein L10

RplJ ist die L10 Untereinheit der Ribosomen [123]. In Einklang mit 5.6.7 deutet die Hochregulierung dieses Proteins bei Wachstum in BHI-Medium auf eine verstärkte Translation von mRNA zur Proteinbiosynthese hin.

## Fazit

Die vergleichende Proteomanalyse des *C. glutamicum* Wildtypstamms ATCC 13032 nach Anzucht in BHI-Vollmedium bzw. MM1-Minimalmedium ergab, dass bei Wachstum im BHI-Medium v.a. Proteine des Zentralstoffwechsels und der Atmungskette sowie des Proteinbiosyntheseapparates (z.B. ribosomale Proteine) überexprimiert wurden. Dies korreliert gut mit dem beobachteten schnelleren Wachstum der Zellen in BHI-Medium, da aufgrund der größeren Wachstumsgeschwindigkeit auch eine höhere Konzentration dieser Enzyme bzw. Proteine zu erwarten ist. Außerdem hat es den Anschein, dass beim Wachstum in BHI-Medium ein erhöhter, oxidativer Stress vorliegt, da beispielsweise die Katalase überexprimiert wurde. Andererseits wurden (im Vergleich zum Wachstum auf Minimalmedium) Enzyme, die für die Synthese von Aminosäuren, Nucleotiden oder anderen Metaboliten nötig sind, schwächer exprimiert, vermutlich deshalb, weil der Organismus diese Metabolite aufgrund ihres Vorhandenseins in Vollmedium nicht selbst synthetisieren muss.

Interessanterweise waren auch einige Enzyme des Inositolstoffwechsels differentiell exprimiert. Da die genaue Zusammensetzung des BHI-Vollmediums jedoch nicht in Erfahrung gebracht werden konnte, und somit konkrete Aussagen zu bestimmten Proteinregulierungen schwierig waren, verfolgten wir im Folgenden einen leicht veränderten Versuchsansatz, bei dem das Wachstum bei verschiedenen, aber genau definierten Umweltbedingungen wiederholt wurde. Um detailliertere bzw. konkrete Aussagen zu bestimmten Proteinregulierungen in Abhängigkeit des Nährmediums machen zu können, wurden nachfolgend anstelle des wenig definierten Vollmediums einzelne C-Quellen (Glucose, Fructose, Lactat, Acetat bzw. Glutamin) als Nährmedium in Minimalmedium verwendet.

## 5.7 Vergleichende Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC13032 nach Anzucht auf verschiedenen C-Quellen

In ihrer natürlichen Umgebung sind Mikroorganismen oft wechselnden Bedingungen ausgesetzt, z.B. Temperatur, pH-Wert, O<sub>2</sub>-Konzentration, Nährstoffversorgung usw. Um sich an diese Veränderungen anpassen zu können, haben sie eine Reihe von koordinierten und adaptiven Mechanismen entwickelt, um ihr Wachstum schnellst- und bestmöglich auf die neue Situation einzustellen. Dies ist besonders wichtig bei der Anpassung an verschiedene Kohlenstoffquellen zur Energieversorgung.

Mikroorganismen können im Allgemeinen eine große Anzahl von Kohlenstoffquellen und andere energieliefernde Substrate durch Anpassung ihrer Enzymaktivitäten und ihres Metabolismus verwerten. Diese Anpassung geht oft mit substratspezifischem An- bzw. Ausschalten von Genen bzw. Expression der entsprechenden Proteine einher. Wird eine Mischung von verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen verwendet, benutzen die Mikroorganismen meistens nur eine dieser Quellen, außer sie benötigen eine weitere, wenn z.B. der interne Pool dieser Quelle verbraucht ist.

Viele dieser Mikroorganismen besitzen eine so genannte „catabolic repression“ [124, 125] d.h. bei Anzucht in Medien mit verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen können manche Gene durch die Anwesenheit bestimmter Kohlenstoff- und Energiequellen blockiert werden. Auf der anderen Seite gibt es wiederum Mikroorganismen, die mehrere Kohlenstoff- und Energie-Quellen zusammen nutzen können, wobei keine „catabolic repression“ existiert. *C.glutamicum* gehört zur letzteren Gruppe und kann eine Reihe von Kohlehydraten, Alkoholen und organischen Säuren als Energiequellen nutzen [126]. Bis heute gibt es keinen Hinweis auf „catabolic repression“ in *C.glutamicum* [65, 127]. Damit unterscheidet sich *C.glutamicum* mit seiner Anpassung des Metabolismus bei Verwendung mehrerer C-Quellen von anderen gut untersuchten Mikroorganismen wie z.B. *E.coli* und *Bacillus subtilis*.

Im Folgenden wurde ein Proteom-Vergleich von *C. glutamicum* bei Anzucht auf verschiedenen C-Quellen durchgeführt. Durch parallel zu unseren Experimenten geplante Genom-, Transkriptom- und Metabolom-Analysen derselben Proben, die von anderen Arbeitsgruppen des BMBF-finanzierten *C.glutamicum* Konsortiums durchgeführt werden sollten, erhofften wir uns mit diesem globalen Ansatz ein besseres Verständnis von Stoffwechselwegen und regulatorischen Netzwerken [128] beim Wachstum auf den o.g. Substraten.

Die Bakterien wurden in fünf Fermentern (je 5 Liter) angezogen, wobei in jedem Fermenter nur eine einzige Kohlenstoffquelle (+ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> als N-Quelle) zur Verfügung stand. Als C-Quellen dienten Glucose, Fructose, Lactat, Acetat bzw. Glutamin. Die Etablierung der kontinuierlichen Fermentation erlaubte die Gewinnung von Zellmaterial aus einem definierten und gut reproduzierbaren Wachstumsstadium.

Alle Bakterienzellen wurden in ihrer exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Proben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Sebastian Horstmann (Universität Köln) zur Verfügung gestellt.

Da es sich hier um einen komplexen Vergleich von fünf verschiedenen Proteomen in Abhängigkeit unterschiedlicher C-Quellen handelte, kam erneut die DIGE-Technologie zum Einsatz, bei der es durch Verwendung eines gemeinsamen internen Standards (IPS) unter anderem möglich war, diese verschiedenen Proteome direkt miteinander zu vergleichen [129]. Das Labelschema ist in Tabelle 5-13 dargestellt. Des Weiteren wurde ein so genanntes *vice versa* Labelling durchgeführt [129], d.h. dass bei viermaligem Vorkommen eines Zustandes dieser zweimal mit Cy3 und zweimal mit Cy5 markiert wurde, um eventuelle Unterschiede bedingt durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe statistisch korrigieren zu können.

Gelnummer	Cy3	Cy5	Cy2
Gel 01	A	B	IPS
Gel 02	C	B	IPS
Gel 03	C	D	IPS
Gel 04	D	E	IPS
Gel 05	A	C	IPS
Gel 06	B	D	IPS
Gel 07	E	C	IPS
Gel 08	D	A	IPS
Gel 09	B	E	IPS
Gel 10	E	A	IPS
<b>Tabelle 5-13: Labelschema</b>			
A=Glucose, B=Acetat, C=Lactat, D=Glutamin, E=Fructose			

Wie üblich wurden 50 µg (Proteinmasse) der jeweiligen Probe mit Cy3 und 50 µg (Proteinmasse) der zu vergleichenden Probe mit Cy5 markiert (siehe Tabelle 5-12). Der IPS (50µg Proteinmasse, d.h. 10µg jeder Probe) wurde Cy2 gelabelt. Es wurden jeweils 10 2D-Gele pro verwendetem IPG-Gradienten angefertigt (d.h., 10x IPG 3.4-5.4 und 10x IPG 4.6-6.9) und die erhaltenen Spotmuster mit der Decyder 5.0 Software analysiert. Ein Protein wurde als differentiell exprimiert angesehen, wenn der Regulationsfaktor einen Betrag von 2.0 überschritt und der t-Test kleiner/gleich einem Wert von 0.005 war.

### 5.7.1 Image-Overlays (DIGE) der *C. glutamicum* ATCC13032 Proteome nach Anzucht in Glucose-, Fructose-, Acetat-, Lactat- bzw. Glutamin-Medium

Die Abbildungen 5-53 bis 5-57 zeigen die Ergebnisse eines Vergleiches der verschiedenen Kohlenstoffquellen, dargestellt mit einem Imageoverlay. Auf nahezu allen Abbildungen ist zu erkennen, dass sich die Proteinexpression bei Anzucht auf den verschiedenen C-Quellen stark unterscheidet. Einzige Ausnahme stellt der Vergleich Glucoseanzucht *vs.* Fructoseanzucht dar, bei dem keine signifikanten Unterschiede auffallen (Abb.5-57), was sich aber leicht damit erklären lässt, dass der Metabolismus bei der Anzüchtungen nahezu 100% identisch ist. Dieses Ergebnis zeigt unter anderem auch die methodische Stabilität und die Robustheit der Methode, d.h. es werden keine Unterschiede durch Verwenden der 2D-DIGE-Technologie generiert und es spiegelt daher die hohe Reproduzierbarkeit dieser Methode wider.

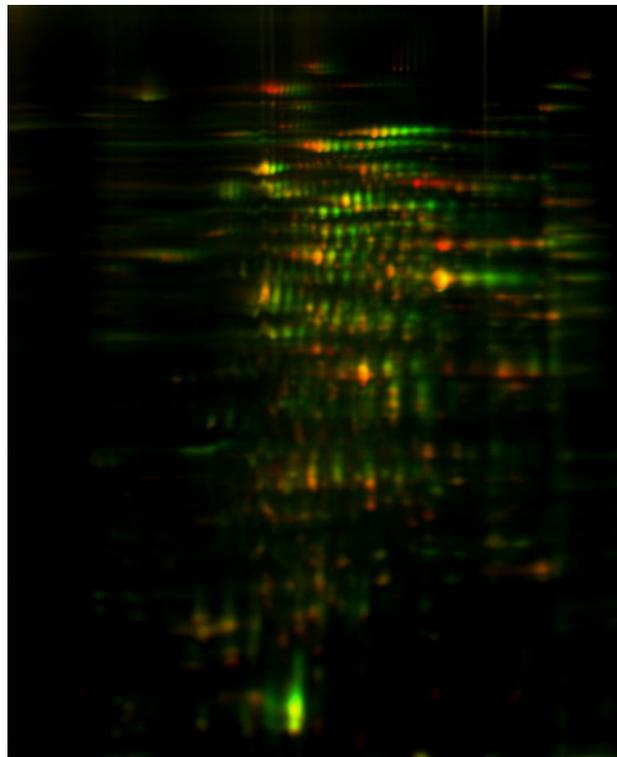
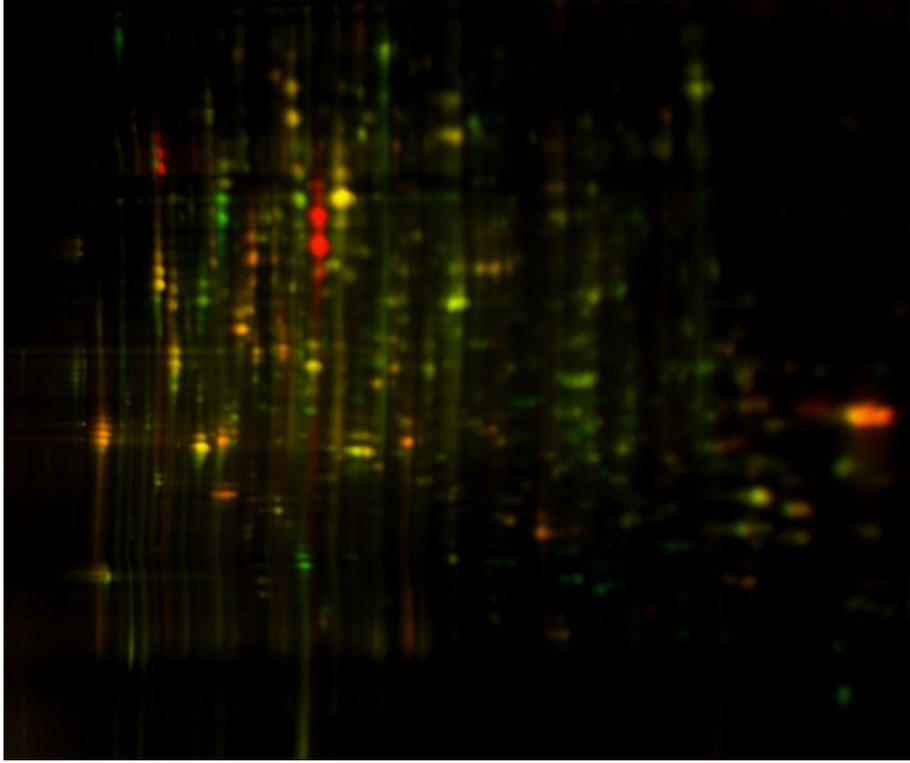


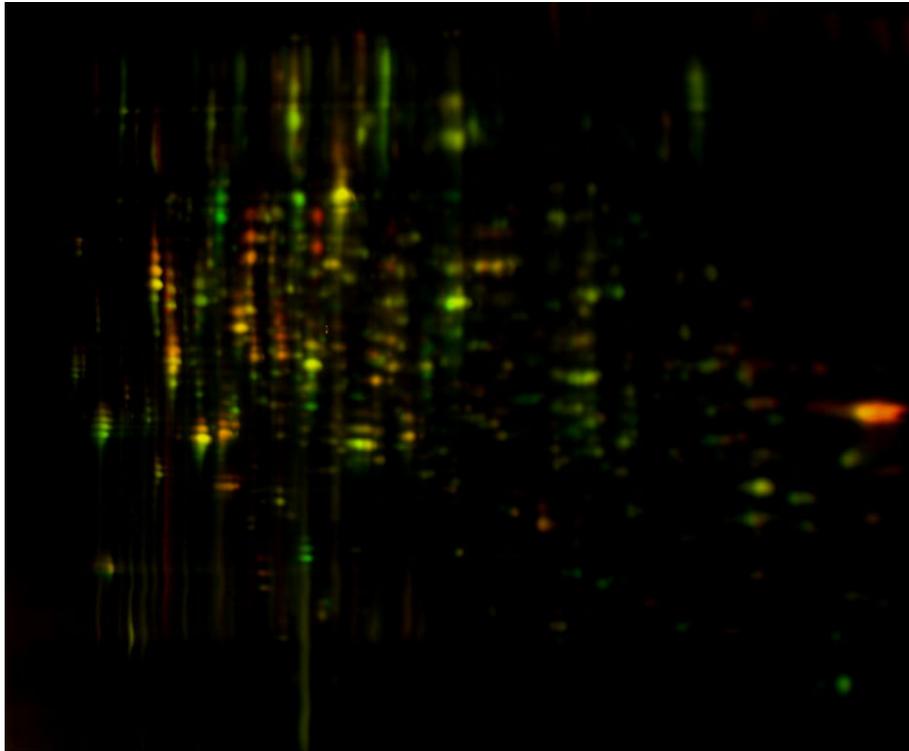
Abbildung 5-53: Vergleichende Proteinexpression von *C. glutamicum* nach Anzucht in Glucose- bzw. Glutamin-Medium. 2D-DIGE, IPG 3.4-5.4

Grün: Proteinexpression nach Anzucht in Glucosemedium. Rot: Proteinexpression nach Anzucht in Glutaminmedium.



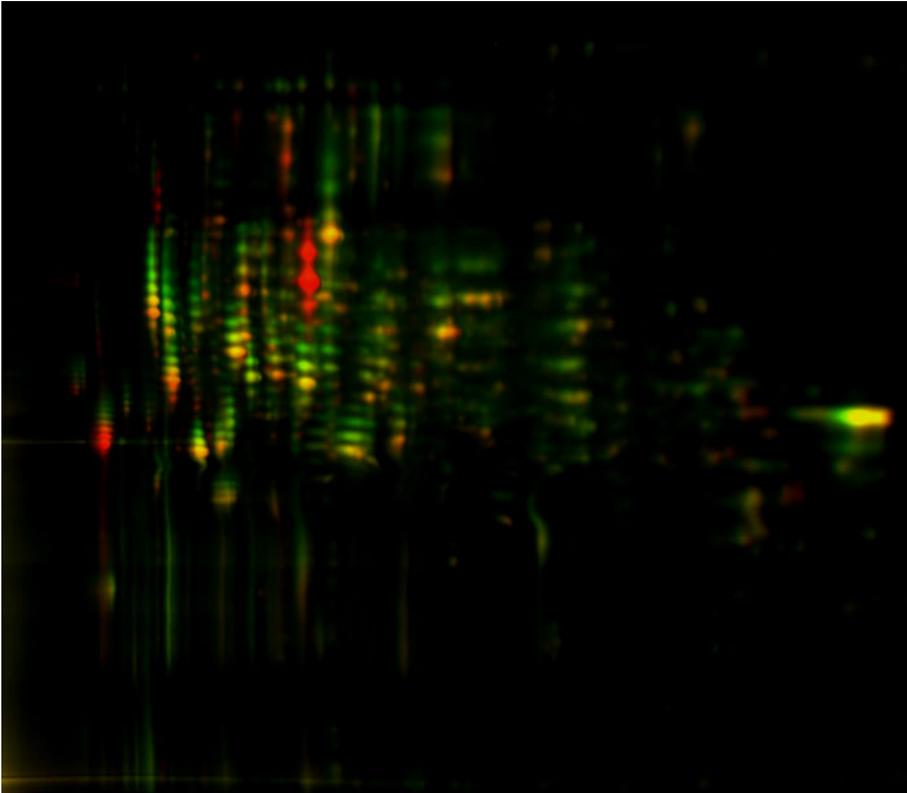
**Abbildung 5-54: Glutamin vs. Acetatmedium**

Grün: Proteinexpression nach Anzucht in Glutaminmedium. Rot: Proteinexpression nach Anzucht in Acetatmedium. 2D-DIGE, IPG 3.4-5.4



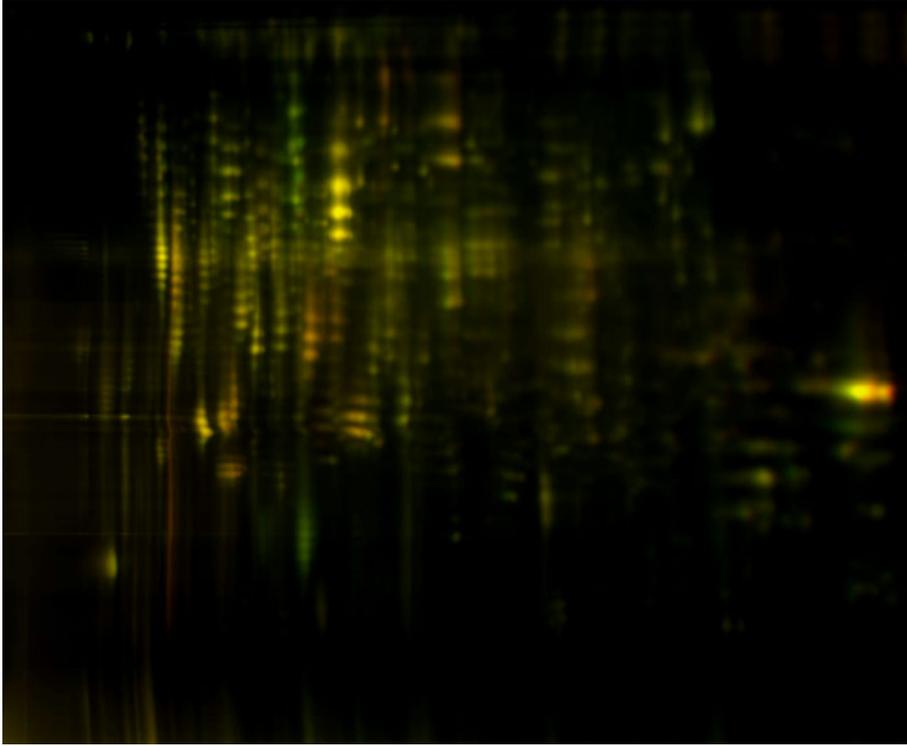
**Abbildung 5-55: Glutamin- vs. Lactatmedium**

Grün: Proteinexpression nach Anzucht in Glutaminmedium. Rot: Proteinexpression nach Anzucht in Lactatmedium. 2D-DIGE, IPG 3.4-5.4.



**Abbildung 5-57: Glucose- vs. Acetatmedium**

Grün: Proteinexpression nach Anzucht in Glucosemedium. Rot: Proteinexpression nach Anzucht in Acetatmedium. 2D-DIGE, IPG 3.4-5.4



**Abbildung 5-56: Glucose- vs. Fructosemedium**

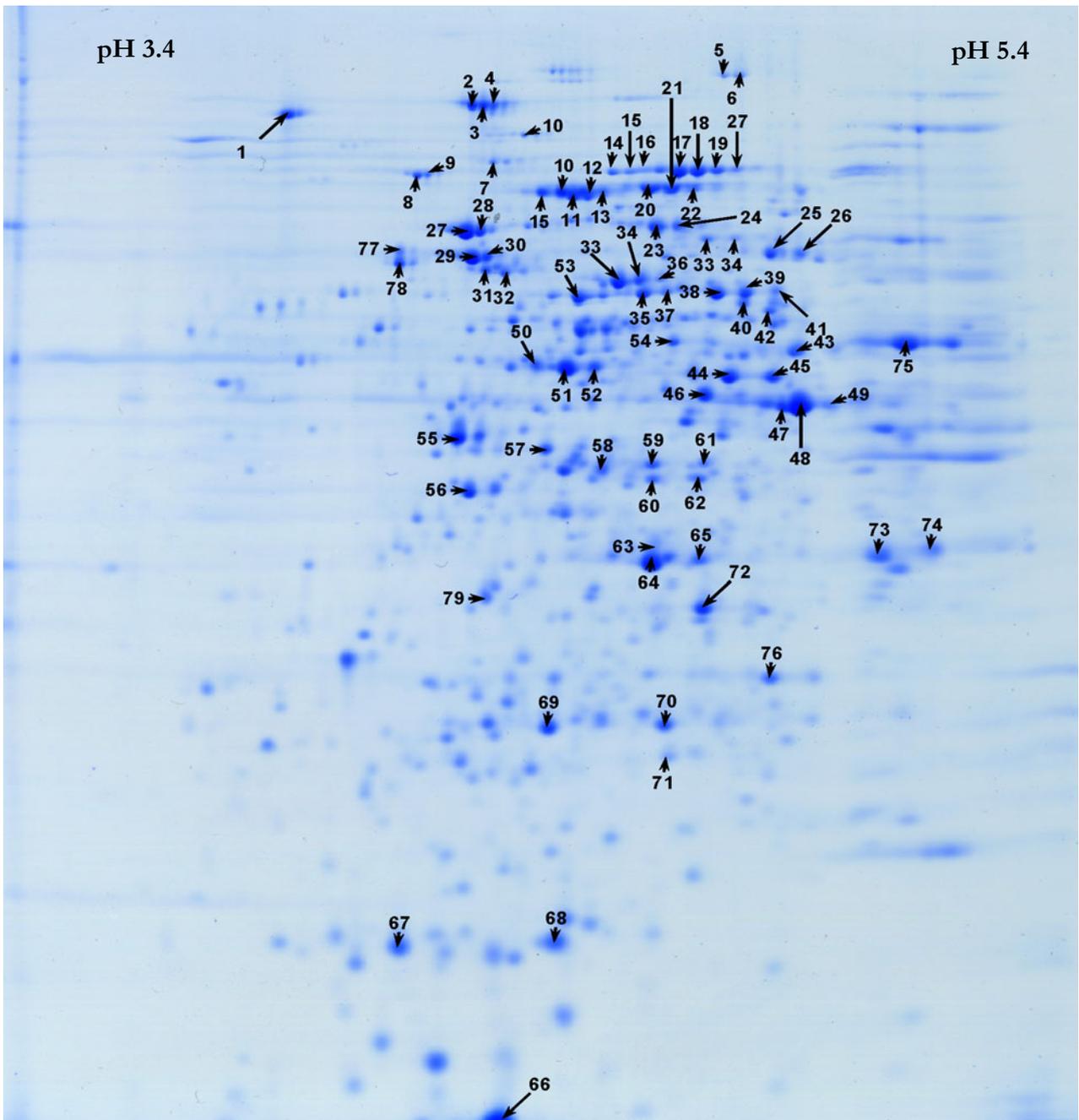
Grün: Proteinexpression nach Anzucht in Glucosemedium. Rot: Proteinexpression nach Anzucht in Fructosemedium. 2D-DIGE, IPG 3.4-5.4

### 5.7.2 2D-Referenzkarte zur Identifizierung differentiell exprimierter Proteine bei Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen

Zur Untersuchung der differentiell exprimierten Proteine in *C. glutamicum* in Abhängigkeit von unterschiedlichen Nährmedien wurde eine eigene Referenzkarte erstellt (vgl. Kapitel 5.5.1). Leider konnte zur Identifizierung differentiell exprimierter Proteine bei Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen nicht auf diese Referenzkarte zurückgegriffen werden, da sich die Anzuchtbedingungen zu stark unterschieden (andere Anzuchtmedien, Fermenter- vs. Schüttelkolbenprobe etc.). Infolgedessen wurde eine neue Referenzkarte erstellt. Da die von der AG Horstmann zur Verfügung gestellte Probe -bedingt durch die Vielzahl der beteiligten Arbeitsgruppen- limitiert war, konnte keine zusätzliche mikropräparative 2D Elektrophorese mit nachfolgender Coomassie-Blau-Färbung für die MS-Analyse durchgeführt werden. Daher wurden die DIGE-Gele verwendet, um mit deren Hilfe differentiell exprimierte Proteine später auf einfache Weise zuordnen zu können. Diese Gele wurden nach dem Scannen über Nacht in einem Alkohol/Essigsäure-Gemisch fixiert. Nach Anfärbung mit Coomassie-Blau wurden alle detektierten Spots von den Gelen gepickt, und anschließend mit MALDI-ToF-MS analysiert, wobei jedoch aufgrund der verringerten Probeauftragsmenge für DIGE Gele und dem zur Verfügung stehenden MALDI-MS Gerät, das nur eine relativ niedrige Nachweisempfindlichkeit besitzt, nur eine begrenzte Anzahl von Proteinspots identifiziert werden konnte. Die Abbildungen 5-58 und 5-59 sowie die Tabellen im Anhang II zeigen die entsprechenden 2D Referenzkarten, sowie die Resultate der MALDI-MS Analyse.

Bei der Analyse der MALDI-MS Daten zeigte sich, dass die Spots, die horizontale Ketten bilden (Abb. 5-59, Spots 3-7 bzw. Abb. 5-58, Spots 14-19) meist ein und dasselbe Protein enthalten. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hier um Phosphorylierungen, evtl. auch um Glycosylierungen oder andere posttranslationale Modifikationen handelt. Zur näheren Charakterisierung wären Blots mit Lektinen [130] oder Phosphoaminosäure-spezifischen Antikörpern, oder andere spezielle Färbetechniken zur Sichtbarmachung von Glykosylierungen und Phosphorylierungen notwendig gewesen, was aber aufgrund der limitierten Probemenge nicht durchführbar war.

Im Folgenden werden nur die Ergebnisse des Glucose-Acetat Vergleichs exemplarisch diskutiert, da aufgrund des Umfangs der erhaltenen Daten eine ausführliche Darstellung und Diskussion der Ergebnisse des Vergleichs *aller* C-Quellen über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgegangen wäre.



**Abbildung 5-58: Referenzkarte im pH-Bereich 3.4 – 5.4 (Schüttelkolbenanzucht)**

Die Ziffern kennzeichnen die identifizierten Proteine. Eine vollständige Auflistung aller identifizierten Proteine befindet sich im Anhang II.

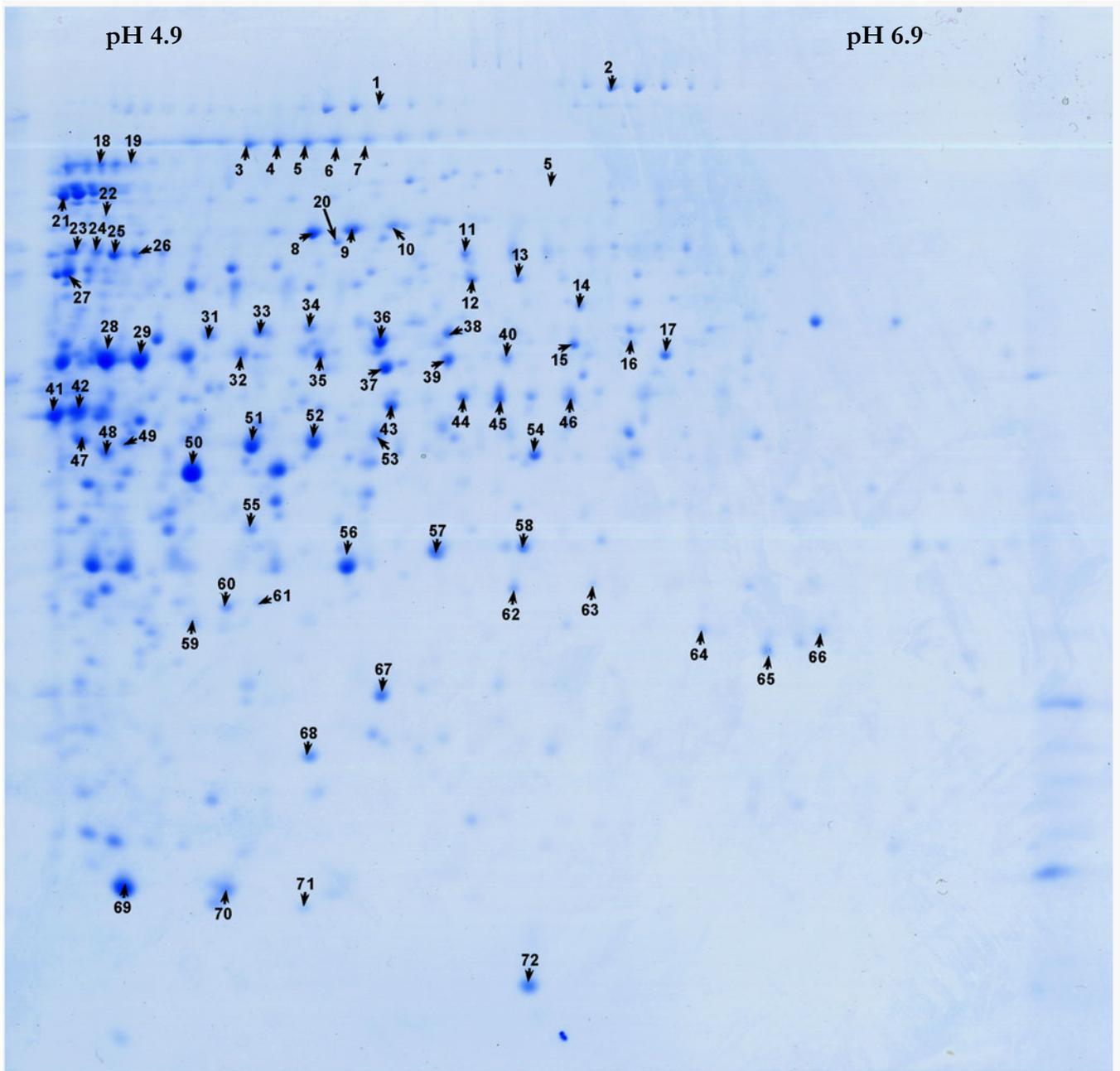
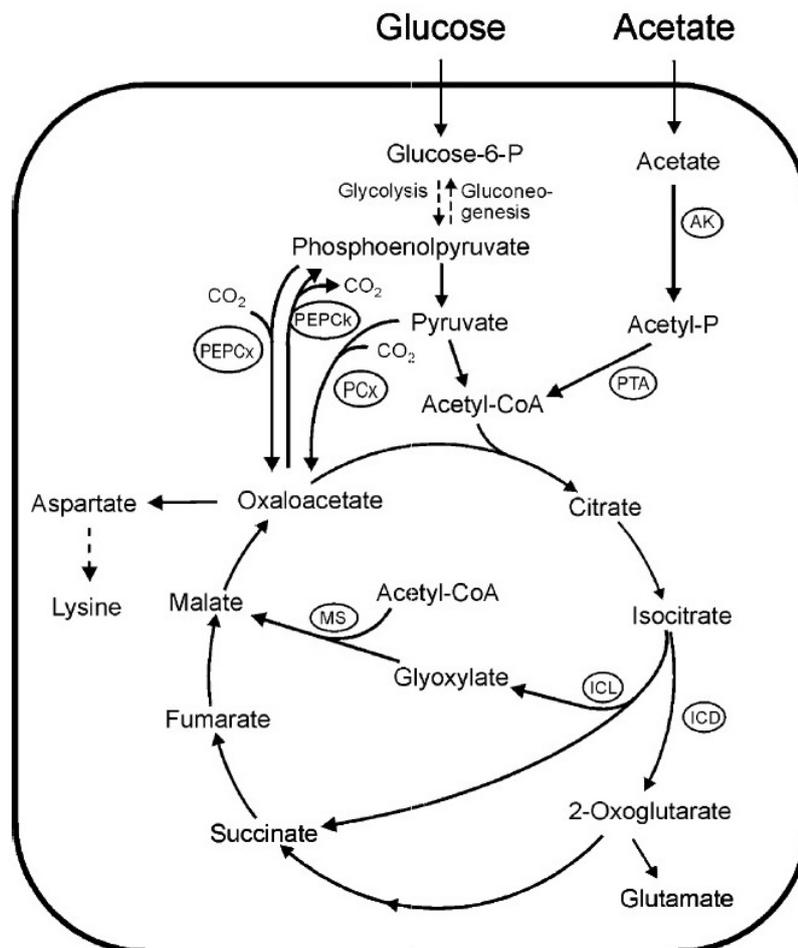


Abbildung 5-59: Referenzkarte im pH-Bereich 4.9 – 6.9 (Schüttelkolbenanzucht)

Die Ziffern kennzeichnen die identifizierten Proteine. Eine vollständige Auflistung aller identifizierten Proteine befindet sich im Anhang II.

### 5.8 Vergleichende Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Anzucht in Acetat- und Glucosemedium

Unabhängig von den verwendeten Kohlenstoff- und Energiequellen ist der Hauptstoffwechselweg in *C. glutamicum* (ebenso wie in anderen aeroben Mikroorganismen) der Zitronensäurezyklus, welcher für die komplette Verwertung von Acetyl-CoA und die Herstellung von vielen Intermediaten zur Synthese von Aminosäuren und anderen Metaboliten verantwortlich zeichnet.



**Abbildung 5-60: Zentralstoffwechselwege von *C. glutamicum* während des Wachstums auf Glucose bzw. Acetat**

AK, acetate kinase; PTA, phosphotransacetylase; ICD, isocitrate dehydrogenase; ICL, isocitratelase; MS, malate synthase; PEPCK, phosphoenolpyruvate; carboxykinase; PCx, pyruvate carboxylase; PEPCx, phosphoenolpyruvatecarboxylase. [128]

Während des Wachstums, vor allem aber bei der Produktion der Aminosäure Lysin muss der Zitronensäurezyklus immer wieder aufgestockt werden, um der Zelle das Hauptprodukt Oxalacetat in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen, damit der Zitronensäurezyklus am Laufen gehalten wird. Aus diesem Grund verfügt *C. glutamicum* über die sogenannten *anaplerotischen Reaktionen*.

Während der Zitronensäurezyklus beim Wachstum auf Kohlenhydraten durch die Carboxylierung von PEP oder Pyruvat zu Oxalacetat aufgefüllt wird (PEP und Pyruvat werden hierbei von der Glykolyse zur Verfügung gestellt), erfüllt beim Wachstum auf Substraten (z.B. Acetat), bei denen eine Einspeisung von Acetyl-CoA in den Zentralstoffwechsel erfolgt, der Glyoxylatkreislauf mit seinen Hauptenzymen ICL und MS diese anaplerotische Funktion und sorgt somit für die Bereitstellung von Oxalacetat (s. Abb. 5-60).

Diese Überbrückung des Zitronensäurezyklus vermeidet die oxidative Decarboxylierung von ICD und 2-Oxoglutarat und führt letztendlich zur Ausbildung von einem Molekül Malat ausgehend von 2 Molekülen Acetyl-CoA. Malat wird dann mit Hilfe der Malatedehydrogenase (mdh) bzw. (wie für *C. glutamicum* schon gezeigt) mit der membranassoziierten Malat/Chinone Oxidoreductase (mqo) weiter verstoffwechselt [131].

Organismen, welche auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, benötigen unbedingt die Gluconeogenese, um die Zelle mit Zuckern und Zuckerphosphaten zu versorgen, welche aus Metaboliten des Zitronensäurezyklus hergestellt werden.

Aufgrund der bereits vor einigen Jahren erfolgten vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Corynebacterium glutamicum* [57], wurde mittlerweile eine Anzahl von Analysen auf der Genom- und Transkriptom-Ebene durchgeführt. Auf Transkriptomebene wurde die DNA-Microarray Technik [132, 133] angewandt und für *C. glutamicum* etabliert [134] und damit z.B. von Muffler *et al.* [135] Transkriptomprofile von *C. glutamicum* unter verschiedensten Konditionen ermittelt. Hayashi *et al.* [136] analysierten mit einem „Metabolischen Microarray“ 120 ausgesuchte Gene, welche dem Zentralstoffwechsel und der Aminosäureproduktion angehören. Gerstmeir *et al.* [128] verglichen das Wachstum von *C. glutamicum* auf Glucose und Acetat mittels Transkriptomanalyse, metabolischen Flussanalysen und – ansatzweise – mit der 2D-Elektrophorese. Ihre erhaltenen Transkriptomdaten stimmen im Wesentlichen mit denen von Muffler [135] und Hayashi [136] überein. Die am stärksten hochregulierten Gene bei Wachstum auf Acetat im Vergleich zu Glucose gehören der Acetataktivierung, dem Glyoxylatzyklus und dem Zitronensäurezyklus an. Die am stärksten herunterregulierten Gene bzw. die bei anschließendem Glucosewachstum hochregulierten Gene gehören zu den Proteinen/Enzymen des Kohlenhydratmetabolismus.

Entsprechende Proteomanalysen von *C. glutamicum* sind hingegen vergleichsweise selten. Dies gilt insbesondere für vergleichende Proteomanalysen nach Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen. In der einzigen bisher publizierten Studie von Gerstmeier *et al.* [128] wurden allerdings nur vergleichsweise niedrig auflösende pH-Gradienten (z.B. IPG 4-7) in Kombination mit Silber- bzw. Coomassiefärbungen eingesetzt, die nur über einen engen linearen Messbereich verfügen, weshalb quantitative Aussagen

nur mit Einschränkungen möglich waren. Die Autoren der erwähnten Studie konnten mit ihrem 2D-Gelsystem ca. 500 Proteine detektieren, von denen bei Wachstum auf Acetat  $54 \geq 2$ -fach reguliert und  $26 \leq 0.5$ -fach reguliert gegenüber Wachstum auf Glucose gefunden wurden. Es gelang ihnen, 10 der 54 differentiell exprimierten Proteine zu identifizieren, namentlich ICL (55-fach höher), MS (18-fach), Citratsynthase (2.7-fach), Fumarase (2.5-fach), Malate:Chinone Oxidoreductase (3.7-fach), einen putativen ABC Transporter (2.3-fach), Cysteinsynthase (2.2-fach), Glycin-/tRNA-Ligase (3.3-fach), Butyryl-CoA Transferase (2.6-fach) und eine Amino-transferase (5.4-fach). Für die Regulation der fünf zuletzt genannten Proteine konnte keine plausible Erklärung angegeben werden, weswegen diese reguliert sind. Für ICL, MS, Citratsynthase und Fumarase stimmen die Proteom-Daten sehr gut mit den Microarray-Daten überein, welche eine höhere Aktivität des Zitronensäurezyklus und des Glyoxylatzyklus zeigen.

### 5.8.1 Quantifizierung und Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine im pH-Bereich 3.4-5.4 und pH 4.9-6.9

Wie aus Abb. 5-61 und Abb. 5-62 sowie aus den Tabellen 5-14 und 5-15 ersichtlich, wurden mit Hilfe der vergleichenden Proteomanalyse unter Verwendung enger überlappender IPGs für die 2D Elektrophorese sowie der DIGE-Technologie zum sensitiven Nachweis und zur Quantifizierung beim Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* auf Glucose mit Acetat insgesamt 151 differentiell regulierte Proteine gefunden; hiervon waren 55 verschiedene Proteine mehr als 2-fach reguliert. Für einen ersten Überblick der differentiell exprimierten Proteine wurde die von Hayashi *et.al.* [136] publizierte Metabolomkarte als Referenz verwendet und mit den von uns erhaltenen Ergebnissen erweitert (vgl. Abb. 5-63). Die wichtigsten differentiell exprimierten Proteine werden im Abschnitt 5.8.2 unter Einordnung in die entsprechenden Stoffwechselwege näher diskutiert.

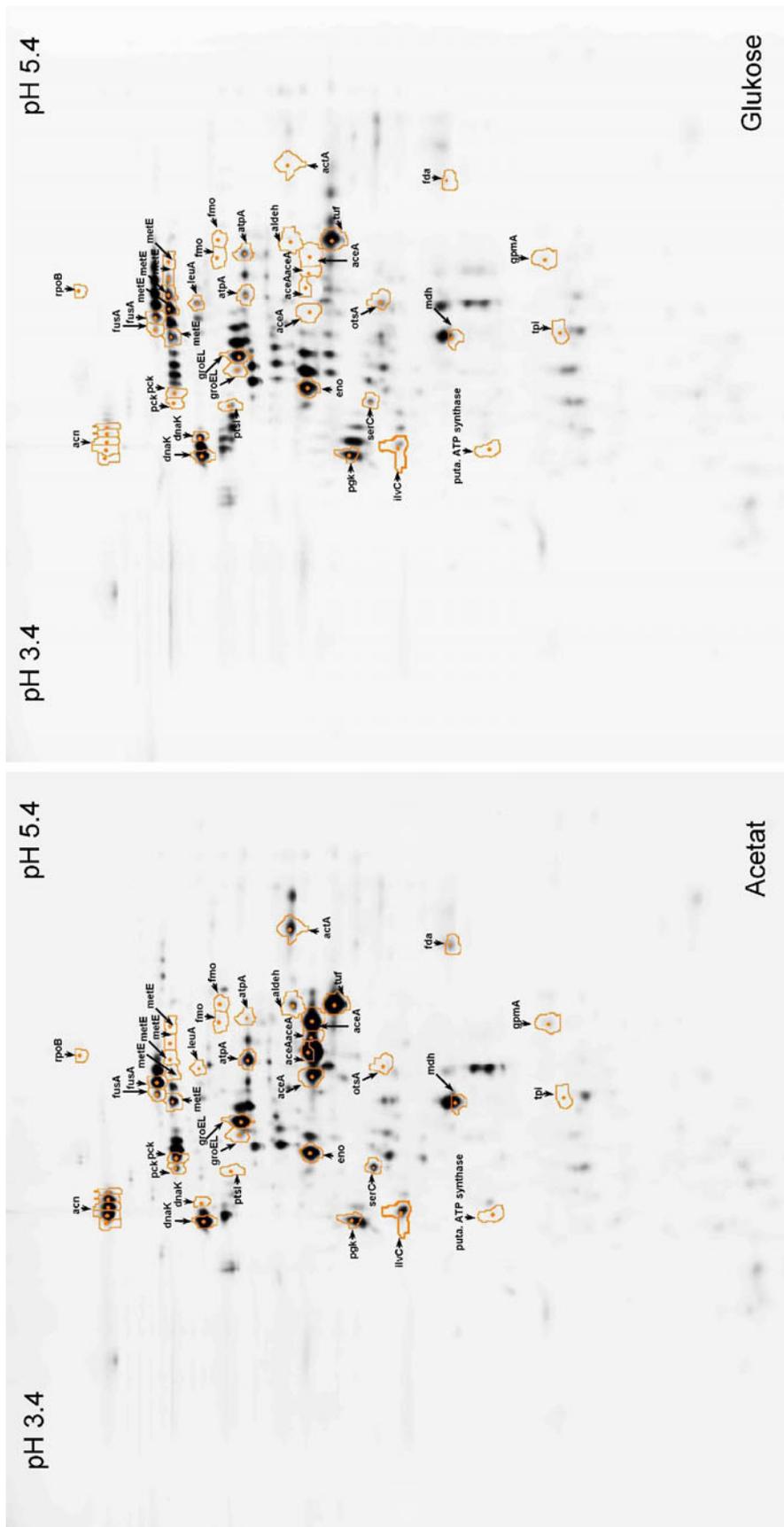


Abbildung 5-61: Identifizierung und Quantifizierung differentiell exprimierter Proteine von *C. glutamicum* nach Anzucht in Acetat- bzw. Glucosemedium. 2D DIGE, IPG 3.4-5.4

Links: Acetatmedium, Rechts: Glucosemedium. Orange markiert sind mit MALDI-ToF-MS PMF identifizierte Proteine, die mindestens einer Regulation > 2 unterliegen.

Spotnummer auf Referenzgel 5-58	T-test	Av. Ratio	Protein ID	Genname	Protein
2	9,00E-06	<b>18,26</b>	Q8NQ98	acn	Aconitase A
3	0,00025	<b>21,21</b>	Q8NQ98	acn	Aconitase A
4	0,00059	<b>2,28</b>	Q8NQ98	acn	Aconitase A
4	0,0047	<b>4,46</b>	Q8NQ98	acn	Aconitase A
4	0,00066	<b>9,65</b>	Q8NQ98	acn	Aconitase A
5	0,00045	<b>3,17</b>	Q8NT26	rpoB	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit/
11	0,0016	<b>2,87</b>	Q9AEM1	pck	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
12	2,60E-05	<b>3,01</b>	Q9AEM1	pck	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
17	0,0006	<b>2,09</b>	Q8NT19	fusA	Elongation factor G
18	2,80E-07	<b>3,79</b>	Q8NT19	fusA	Elongation factor G
20	8,40E-06	<b>5,59</b>	Q8NRB3	metE	Homocysteine methyltransferase
20	1,70E-05	<b>4,98</b>	Q8NRB3	metE	Homocysteine methyltransferase
21	0,00045	<b>3,37</b>	Q8NRB3	metE	Homocysteine methyltransferase
21	3,30E-05	<b>2,18</b>	Q8NRB3	metE	Homocysteine methyltransferase
22	2,00E-05	<b>2,01</b>	Q8NRB3	metE	Homocysteine methyltransferase
24	7,60E-06	<b>3,55</b>	P42455	leuA	Isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthases
25	0,0002	<b>2,35</b>	Q6M1X4	fmo	Flavin-containing monooxygenase
26	0,003	<b>3,46</b>	Q6M1X4	fmo	Flavin-containing monooxygenase
27	1,10E-05	<b>2,08</b>	Q8NLY6	dnaK	Chaperone protein dnaK
28	0,00017	<b>3,55</b>	Q8NLY6	dnaK	Chaperone protein dnaK
32	0,00018	<b>2,09</b>	Q8NP83	ptsI	Phosphoenolpyruvate-protein kinase
34	1,90E-06	<b>2,69</b>	Q8NSS0	groEL	GroEL_like type I chaperonin
38	1,50E-07	<b>3,59</b>	Q79VG7	atpA	H <sup>+</sup> -ATPase alpha subunit
41	1,60E-05	<b>2,01</b>	Q79VG7	atpA	H <sup>+</sup> -ATPase alpha subunit
43	7,80E-05	<b>4,01</b>	Q8NLZ0	aldehy	aldehyde dehydrogenase
44	2,90E-07	<b>21,23</b>	P42449	AceA/Icl	Isocitrate lyase
44	6,20E-06	<b>113,75</b>	P42449	AceA/Icl	Isocitrate lyase
45	0,00064	<b>26,19</b>	P42449	AceA/Icl	Isocitrate lyase
45	2,30E-07	<b>42,41</b>	P42449	AceA/Icl	Isocitrate lyase
48	4,50E-06	<b>2,94</b>	P42439	tuf	GTPases - translation elongation factors
51	3,20E-07	<b>2,73</b>	Q8NRS1	eno	Enolase
55	2,00E-05	<b>2,09</b>	Q01655	pgk	Phosphoglycerate kinase
56	2,50E-05	<b>2,87</b>	Q57179	IlvC	Ketol-acid reductoisomerase
57	2,70E-05	<b>2,02</b>	Q8NS51	serC	Phosphoserine aminotransferase
64	7,70E-05	<b>2,23</b>	Q8NN33	mdh	Malate/lactate dehydrogenases
69	0,00023	<b>2,26</b>	Q8NMF3	otsA	Trehalose-6-phosphate synthase
70	0,00045	<b>2,13</b>	P19583	tpi	Triosephosphate isomerase
73	0,00013	<b>3,61</b>	P19537	fda	Fructose-bisphosphate aldolase
75	1,20E-06	<b>4,68</b>	Q6M2R3	actA	Acetate coenzyme A transferase
76	1,70E-05	<b>2,35</b>	Q8NTA5	gpma	2,3-bisphosphoglycerate phosphoglycerate
79	0,00013	<b>2,33</b>			putative ATP synthase
33	0,00032	<b>2,34</b>	Q8NSS0	groEL	GroEL_like type I chaperonin

**Tabelle 5-14: Differenziell exprimierte Proteine im Acetat/Glucose Vergleich, IPG 3.4-5.4**

**Rot:** Proteine, die beim Wachstum auf **Acetatmedium** im Vergleich zum Wachstum auf **Glucosemedium** hochreguliert wurden.

**Grün:** Proteine, die beim Wachstum auf **Glucosemedium** im Vergleich zum Wachstum auf **Acetatmedium** hochreguliert wurden.



Spotnummer auf Referenzgel 5-59	T-test	Av. Ratio	Protein ID	Genname	Protein
1	1,20E-05	4,64	O54587	pyc	Pyruvate carboxylase
2	0,00031	8,37	Q8NRC3	odhA/SucA	2-oxoglutarate dehydrogenase complex
3	2,90E-05	4,5	Q2XUQ6	AceE/ pdh	Pyruvate dehydrogenase, decarboxylase component
5	0,0052	1,84	Q2XUQ6	AceE/ pdh	Pyruvate dehydrogenase, decarboxylase component
6	0,0012	4,74	Q2XUQ6	AceE/ pdh	Pyruvate dehydrogenase, decarboxylase component
7	0,013	3,37	Q2XUQ6	AceE/ pdh	Pyruvate dehydrogenase, decarboxylase component
8	2,20E-08	21,97	Q6M7Z1	sdhA	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase
9	1,30E-08	20,45	Q6M7Z1	sdhA	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase
10	4,20E-09	10,01	Q6M7Z1	sdhA	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase
12	4,70E-05	5,73	Q8NLW9	cysI	Sulfite reductase hemoprotein beta-component
13	9,20E-07	3,83	Q8NLW9	cysI	Sulfite reductase hemoprotein beta-component
14	4,00E-08	4,94	Q59200	aspA	Aspartate ammonia-lyase
15	0,0012	5,14	Q6M6L3	gapX	Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase
18	0,019	2,14	Q8NQ22	alaS	Alanyl-tRNA synthetase
19	0,015	2,01	Q8NQ22	alaS	Alanyl-tRNA synthetase
20	4,70E-05	4,94	Q6M5V8	glgE	Putative alpha-amylase
21	0,00043	4,07	P42450	AceB	Malate Synthase
21	0,0017	6,98	P42450	AceB	Malate Synthase
21	4,70E-07	15,9	P42450	AceB	Malate Synthase
25	0,00025	2,00	Q8NMW0		ABC-type transport system, ATPase component
28	0,00097	4,62	Q6M2R3	actA	Acetate coenzyme A transferase
29	2,00E-07	3,59	Q6M2R3	actA	Acetate coenzyme A transferase
31	2,70E-06	2,01	O69282	mgo	Malate:quinone oxidoreductase
32	0,00033	2,31	Q6M2R3	actA	Acetate coenzyme A transferase
35	0,041	3,34	Q8NNC6	glyS	Glycyl-tRNA synthetase
37	1,30E-07	3,00	Q8NTE1	lpd	Dihydrolipoamide dehydrogenase/glutathione
38	1,40E-07	2,51	Q46078	pyk	Pyruvate kinase
40	0,00024	4,31	Q8NTE1	Lpd	Dihydrolipoamide dehydroge./glutathione oxidoreductase
40	4,10E-06	3,02	Q8NTE1	Lpd	Dihydrolipoamide dehydroge./glutathione oxidoreductase
41	0,00074	3,36	P42439	tuf	GTPases - translation elongation factors
42	5,40E-06	2,81	P42439	tuf	GTPases - translation elongation factors
43	1,60E-08	2,97	Q93PM7	glyA	Glycine/serine hydroxymethyltransferase
45	2,50E-06	3,11	P31026	gdh	NADP-specific glutamate dehydrogenase
46	2,50E-06	3,11	P31026	gdh	NADP-specific glutamate dehydrogenase
47	8,60E-06	2,33	Q79VI4	metY	O-acetylhomoserine sulfhydrylase
48	2,80E-06	2,48	Q6M6E7	glpX	Bacterial fructose-1,6-bisphosphatase
50	4,40E-08	2,73	Q01651	Gap	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
51	3,10E-07	9,71	P42457	gltA	Citrate synthase
52	3,10E-07	9,71	P42457	gltA	Citrate synthase
55	5,60E-05	2,94	Q8NLX9	adhA	Zn-dependent alcohol dehydrogenases
56	0,0034	2,46	Q8NP01	rpsB	Ribosomal protein S2
58	0,0013	2,26	Q8NRU9	prsA	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase
65	0,00041	2,01	Q8NTW3		Putative oxidoreductase
67	1,50E-08	12,31	Q6M7Z0	sdhB	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase
68	0,00068	2,03	Q7DIC8	atpH	ATP synthase delta chain
69	3,40E-07	2,83	Q9APY3	sod	Iron/manganese superoxide dismutases
71	2,60E-08	4,19	Q8NM11	pyre	Orotate phosphoribosyltransferase
72	0,0099	2,18	Q8NT29	rplJ	Ribosomal protein L10

**Tabelle 5-15: Differentiell exprimierte Proteine im Acetat/Glucose Vergleich, IPG 4.9-6.9**

**Rot:** Proteine, die beim Wachstum auf Acetatmedium im Vergleich zum Wachstum auf Glucosemedium hochreguliert wurden.

**Grün:** Proteine, die beim Wachstum auf Glucosemedium im Vergleich zum Wachstum auf Acetatmedium hochreguliert wurden.

## 5.8.2 Übersicht der Acetat- induzierten bzw. co-regulierten Proteine im pH-Bereich 3.4-6.9

Die am stärksten betroffenen Stoffwechselwege bei der Verwendung von Acetat als einziger Kohlenstoffquelle sind vor allem der *Acetattransport* und die *Acetataktivierung*, der *Glyoxylat-* und der *Zitronensäurezyklus*, sowie die *Gluconeogenese*.

### 5.8.2.1 Acetataktivierung

Die Acetataktivierung zu AcetylCoA erfolgt in *C.glutamicum* mit der kombinierten Aktivität von Acetatskinase (*acka*) und der Phosphotransacetylase (*pta*). *Acka* aktiviert Acetat in einer ATP-abhängigen Reaktion zu Acetylphosphat, welches dann von der *pta* in AcetylCoA umgewandelt wird. Mit Geninaktivierungsstudien konnte gezeigt werden, dass *acka* und *pta* essentiell sind für das Wachstum auf reinem Acetatmedium bei *C.glutamicum* [137]. Obwohl *acka*- und *pta*-Deletionsmutanten nicht in der Lage sind, auf reinem Acetatmedium zu wachsen, ist es ihnen möglich, auf einem Glucose-/Acetat-Mischmedium zu wachsen. Bei diesen Mutanten konnte man weiterhin einen Acetatverbrauch messen, welcher auf einen bis *dato* nicht bekannten Acetataktivierungsweg hinweist. Diese alternative Route zur Acetataktivierung über eine bisher unbekannte CoA-Transferase Reaktion müsste noch genauer untersucht werden. Bis heute konnte in *C.glutamicum* weder eine AcetylCoA-Synthaseaktivität gemessen, noch ein homologes Gen gefunden werden [137, 138]. Zu erwähnen in diesem Kontext ist, dass das *C. glutamicum* Genom zwei Gene als AcetylCoA Hydrolase annotiert hat (NP\_601767, NP\_601784), wovon beiden auch eine AcetylCoAtransferase Aktivität zuannotiert wurde.

Die in der Literatur beschriebenen Enzyme AK (Acetatskinase) und PTA (Phosphotransacetylase), welche auf der Transkriptomebene bei Wachstum auf Acetat hochreguliert sind, konnten in der vorliegenden Studie nicht als differentiell exprimierte Proteine auffindig gemacht werden. Eine Erklärung dafür könnte an der schlechten Auflösung des verwendeten pH-Gradienten im pH-Bereich um 4.7 (siehe Abbildung 5-61) liegen, denn hier neigte der verwendete IPG zur Streifenbildung und somit konnten diese beiden Proteine, deren pI in der Literatur mit 4.7 angegeben wird, nicht detektiert und identifiziert werden.

***Hingegen konnte die bis dato auf der Transkriptomebene nicht gefundene CoA-Transferase von uns detektiert und identifiziert werden. Sie wird bei der Anzucht in Acetat um den Faktor 10,6 hochreguliert. Damit konnten die Spekulationen hinsichtlich eines zweiten Acetataktivierungsweges [128] erhärtet werden.***

### 5.8.2.2 Glyoxylatzyklus

Wenn Acetat als einzige C-Quelle genutzt wird, wird der Zitronensäurezyklus auch als Aufbaustoffwechsel genutzt, um die Zelle mit C<sub>4</sub>- und C<sub>3</sub>-Intermediaten, welche essenziell für das Wachstum der Zelle sind, zu versorgen. Des Weiteren benötigt der Mikroorganismus unter diesen Wachstumsbedingungen den Glyoxylatzyklus als anaplerotischen Stoffwechselweg. Dieser Stoffwechselweg besteht aus fünf der acht Enzyme des Zitronensäurezyklus und umgeht zwei Decarboxylierungsschritte durch die Verwendung von AceA/icl (Isocitratlyase) und AceB/ms (Malatsynthase). Icl katalisiert die Verarbeitung von Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat, während die Malatsynthase Glyoxylat mit Acetyl-CoA zur Herstellung von Malat verbindet.

Jede Runde dieses Zyklus resultiert in der Bildung von einem Molekül Malat aus zwei Molekülen Acetyl-CoA. Malat wird dann in Oxalacetat umgewandelt, welches wiederum als Vorläuferprodukt zur Aminosäuresynthese bzw. zur Gluconeogenese dient. Es konnte gezeigt werden, dass die Gene von icl und ms herunterreguliert werden, falls eine leichter zu verwertende C-Quelle als Acetat zur Verfügung steht [139]. Eine Überexpression der Icl- (Faktor 100) und ms -(Faktor 30) *Gene* bei Wachstum auf Acetat konnte von verschiedenen Gruppen nachgewiesen werden [65, 128, 136, 140]. ***Mit Hilfe der von uns durchgeführten Proteomanalyse konnten die beiden Proteine bei Wachstum auf Acetat als einziger C-Quelle als sehr stark hochreguliert nachgewiesen werden: AceA/icl um den Faktor bis zu 113 und AceB/ms um den Faktor 15. Somit wurden diese Ergebnisse von Gen- und Transkriptomanalysen auf Proteomebene vollauf bestätigt.***

### 5.8.2.3 Zitronensäurezyklus

Wenn *C. glutamicum* auf Acetat wächst, dient -wie bereits erwähnt- der Zitronensäurezyklus als Hauptstoffwechselweg. Von ihm aus werden alle anderen Stoffwechselwege mit Metaboliten versorgt. Eine Hochregulierung des Zitronensäurezyklus konnte anhand mehrerer Proteine (Enzyme) nachgewiesen werden (siehe Abb. 5-62). So sind bei Wachstum auf Acetat z.B. die Proteine sdhA (20-fach) und sdhB (10-fach) hochreguliert, was ein direktes Indiz für einen sehr aktiven Zitronensäurezyklus ist. Auch sind Eingangsenzyme des Zitronensäurezyklus, z.B. gltA und acn bei Wachstum auf Acetat sehr stark (10-fach bzw. 20-fach) überexprimiert. Die Ergebnisse bestätigen sehr deutlich die von Transkriptomdaten bekannte starke Hochregulierung des Zitronensäurezyklus. ***Des Weiteren konnten bei Wachstum auf Acetat die bisher nur spekulierte Hochregulation der Aspartate-Ammonia-Lyase (aspA) und MalateQuinone Oxidoreductase (mqo) zum ersten Mal nachgewiesen werden.***

#### 5.8.2.4 Gluconeogenese

Wenn Acetat als einzige C-Quelle genutzt wird, startet der Zentralmetabolismus auf der Ebene von AcetylCoA; somit wird die Glyconeogenese benötigt, um die Zelle mit 3-Phosphoglyceraten und mit Hexose- und Pentosezucker zu versorgen.

Der Eingangsschritt in die Gluconeogenese ist die Umwandlung von Zitronensäurezyklusprodukten zu PEP. In den meisten Organismen wird diese Reaktion durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP/pck) durchgeführt. Diese katalysiert die Decarboxylierung und die simultane ATP/GTP-abhängige Phosphorylierung von Oxalacetat. PEP wird dann zu Glucose-6-Phosphat über die Reaktionen der Glykolyse weiterverarbeitet.

Auf Proteomebene konnte eine Hochregulierung der Phosphoenolpyruvatecarboxykinase (pck) um den Faktor 5 nachgewiesen werden. Diese Daten korrelieren sehr genau mit den bisher gefundenen Transkriptomdaten [128, 136].

Die irreversiblen Schritte der Glykolyse, z.B. von Glucose-6-Phosphat zu PEP, werden durch verschiedene Enzyme umgangen, z.B. die Phosphofruktokinase mit der Fructose-1,6-bisphosphatase. Außer der Funktion in der Gluconeogenese konnte von Becker *et. al.* [141] gezeigt werden, dass dies ein sehr wichtiges Enzym für die Lysinproduktion ist, denn die Fructose-1,6-bisphosphatase erhöht den NADPH-Spiegel der Zelle und ermöglicht damit die bessere Lysinproduktion. Die hierzu nötige Hochregulierung dieses Enzymes bei Wachstum auf Acetat konnte mit Gen- und Transkriptomanalysen noch nicht nachgewiesen werden.

***Durch die von uns durchgeführte Proteomanalyse konnte das Protein glpX (Fructose-1,6-bisphosphatase) bei Wachstum auf Acetat als um den Faktor 2,5 differentiell hochreguliert nachgewiesen werden. Somit wurde die postulierte, mit Transkriptomanalyse jedoch noch nicht gefundene Hochregulation, erstmals aufgezeigt.***

Nicht unwichtig zu erwähnen ist außerdem, dass *C.glutamicum* ein zweites Gen für die Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase besitzt. Hayashi *et.al.* [136] vermuteten, dass dieses zweite Gen (gap B=gapX) bei Verwendung von Acetat als einzige C-Quelle hochreguliert wird, konnten diese Hochregulation bis dato jedoch nicht nachweisen. Die Autoren diskutierten, dass gap A eventuell in der Glykolyse, und gap B in der Glukoneogenese involviert sind. ***Interessanterweise konnte mit der von uns durchgeführten Proteomanalyse das Protein gapX (Fructose-1,6-bisphosphatase) bei Wachstum auf Acetat um den Faktor 5 hochreguliert nachgewiesen werden.***

Das Protein *gapA* wurde von uns bei Wachstum auf Acetat ebenfalls als hochreguliert (Faktor 2,7) gefunden. Dies steht in einem gewissen Widerspruch zu den vorliegenden Transkriptomdaten, obwohl anzunehmen ist, dass es für die Zelle von Nutzen ist, *gap* in jedweder Form hochzuregulieren, da sie ein Schlüsselenzym in der Gluconeogenese darstellt und die Zelle unbedingt mit 3-Phosphoglycerat, Hexose- und Pentosezucker versorgt werden muss.

Schließlich ist die Hochregulation der 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängigen Phosphoglyceratmutase (*gpma/gpm*) um den Faktor 2,35 ein weiterer Beleg für die Hochregulierung der Gluconeogenese bei Wachstum auf Acetat.

#### 5.8.2.5 „Allgemeine Proteine“

Da die Zelle beim Wachstum auf Acetat mehr ATP/ADP (z.B. zur Acetataktivierung) und NAD(P)H benötigt, liegt die Vermutung nahe, dass Proteine, welche mit der Herstellung und Verwertung dieser Produkte in Zusammenhang stehen, auch stärker exprimiert sein müssten. Durch Proteomanalyse konnten wir vier Proteine als differentiell hochreguliert detektieren und identifizieren, welche direkt bzw. indirekt mit der ATP- bzw. NAD(P)H-Produktion in Zusammenhang stehen (H<sup>+</sup>-ATPase alpha Untereinheit, eine putative ATP-Synthase, ATP-Synthase-delta-Kette und eine Aldehyddehydrogenase).

Des Weiteren konnten bei Wachstum auf Acetat zwei ribosomale Proteine als hochreguliert gefunden werden (*rplJ*, *rpsB*). Auch diese Hochregulierung ist schlüssig, da die Zelle z.B. *AceA* und *AceB* in sehr großen Mengen neu synthetisieren musste. Diese hohe Neuproduktion zeigt sich auch durch die Hochregulierung von *fusA*, einem Protein, welches mit der Proteinbiosynthese in Zusammenhang steht.

Daneben konnten *dnaK* und *GroEL* als differentiell reguliert gefunden werden. Diese beiden Proteine sind dafür bekannt, dass sie unter Stresssituationen angeschaltet werden [142]; sie spielen aber auch bei der Proteinbiosynthese eine unterstützende Rolle.

Die zwei mit am stärksten hochregulierten Proteine auf *Glucosewachstum* gegenüber Acetatwachstum sind die Pyruvatkinase (*pyk*/Faktor 2.5) und die Pyruvatcarboxylase (*pyc*/Faktor 4.6), welche die Zelle bei Wachstum auf Glukose mit Pyruvat und Oxalacetat versorgen. Beim Wachstum auf Acetat steht der Zelle hingegen genügend Oxalacetat aus dem Zitronensäurezyklus zur Verfügung. Ein weiteres Enzym, welches sowohl bei der Transkriptomanalyse als auch bei der Proteomanalyse bei Wachstum auf Glukose als hochreguliert gefunden wurde, ist die Triosephosphateisomerase (*tpi*/Faktor 2.11). Die Regulation dieses Proteins ergibt nur bei Wachstum auf Glukose Sinn, da nur hier genügend Glycerol-3-Phosphat für die Umsetzung mit dem Enzym zur Verfügung steht.

### 5.8.3 Vergleich von Proteom und Transkriptom

Der Vergleich der differentiell exprimierten Proteine mit den Acetat-induzierbaren bzw. co-regulierten Genen des Acetatmetabolismus ist in Abb. 5-63 zusammengefasst. Die von uns erhaltenen Proteomdaten (vgl. 5.8.1) stimmen in wesentlichen Punkten mit den Transkriptomdaten von Hayashi überein, gehen aber z.T. auch darüber hinaus. *Beispielsweise konnten die Proteine **glpX**, **mgo** und **aspA**, für welche von Hayashi zwar eine differentielle Regulation postuliert, aber nicht nachgewiesen werden konnte, mit Hilfe der Proteomanalyse als differentiell exprimiert erkannt und identifiziert werden.*

Des Weiteren untersuchten wir auch den Aminosäureproduktionsweg. Durch unsere Proteomstudien konnten wir sieben Proteine mit derselben Regulation finden, welche übereinstimmend mit Hayashi bei DNA Microarray-Experimenten [136] als differentiell reguliert gefunden worden waren (vgl. Tabelle 5-16).

Gefundene Proteine	Genname	Trankriptom	Proteom
Glycine/serine hydroxymethyltransferase	glyA	+	+
Ketol-acid reductoisomerase	ilvC	+	+
O-acetylhomoserine sulphydrylase	metY	+	+
Phosphoribosylpyrophosphate synthetase	prsA	-	-
NADP-specific glutamate dehydrogenase	gdh	-	-
Homocitrate/citramalate synthases	leuA	-	-
Homocysteine methyltransferase	metE	-	-

**Tabelle 5-16: Vergleich Transkriptom-Proteom: Differentiell exprimierte, in Aminosäureproduktionswege involvierte Gene bzw. Proteine**

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Ergebnisse der Transkriptom- und Proteomanalyse in vielen Fällen übereinstimmen, jedoch die DNA Microarray Technologie ausschließlich die Menge an neu gebildeter mRNA und somit nur die Neusynthese von Proteinen widerspiegelt -weshalb nur teilweise eine enge Korrelation zwischen mRNA und Proteinmenge besteht-. Das Proteom reflektiert aber die tatsächlich vorhandene Proteinzusammensetzung und –menge innerhalb einer Zelle einschließlich eventueller posttranslationaler Modifikationen und ist deshalb hervorragend für eine vergleichende Betrachtung von Stoffwechselwegen durch qualitativen und quantitativen Vergleich von Proteinexpressionsmustern unter verschiedenen Wachstums-, Nährstoff- und Umwelteinflüssen geeignet.

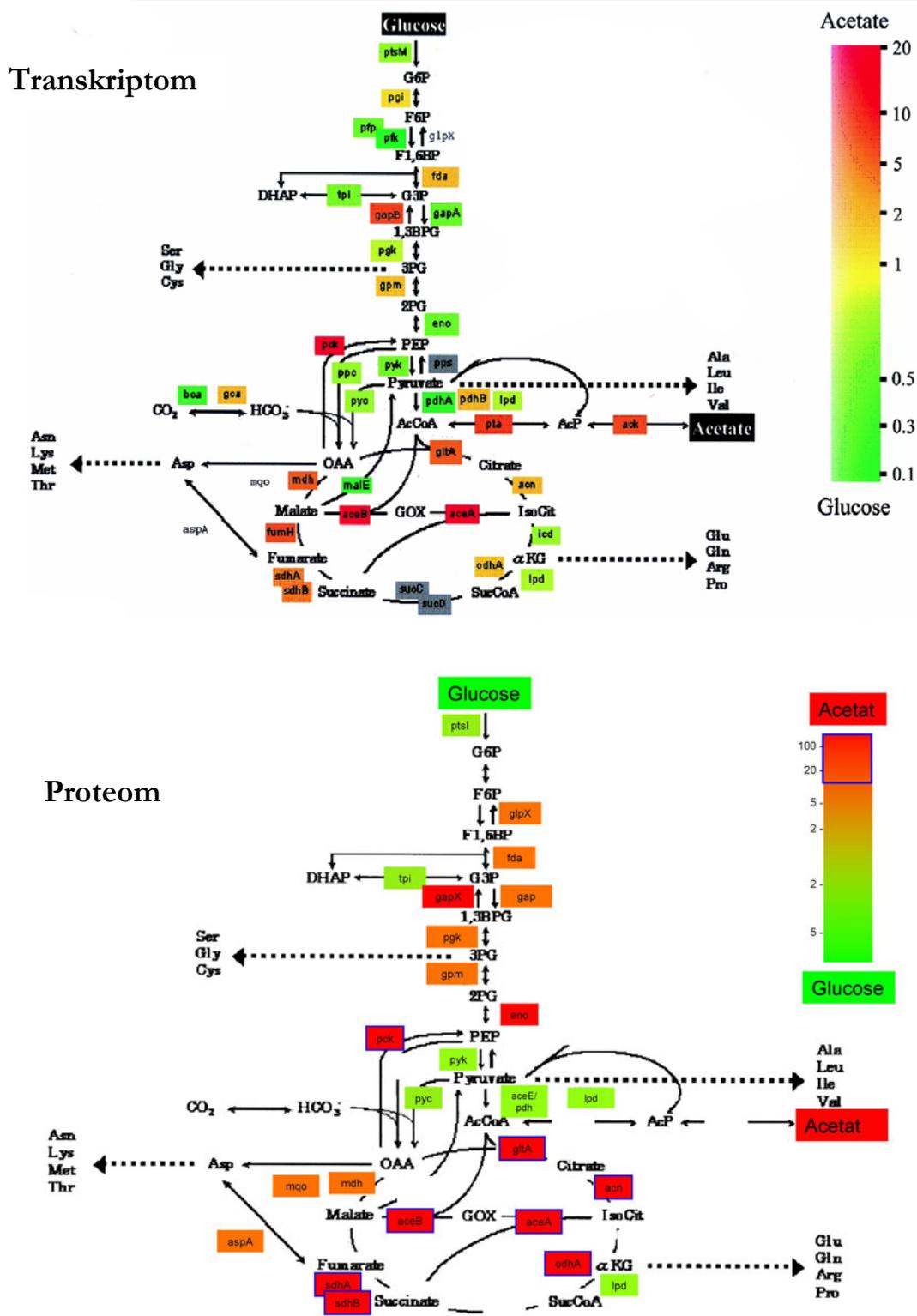


Abbildung 5-63: Vergleich Transkriptomanalyse - Proteomanalyse

Differenziell exprimierte *C. glutamicum* Proteine beim Wachstum auf Acetatmedium im Vergleich zum Wachstum auf Glucosemedium. Oben: Ergebnisse der Transkriptomanalyse von Hayashi *et. al.* [136]. Unten: Resultate der von uns durchgeführten Proteomanalyse.

## Fazit und Ausblick

Der Metabolismus der *Corynebacterium glutamicum* Zellen bei Wachstum in einem *Acetatmedium* wird charakterisiert durch eine relativ hohe *in vivo* Aktivität des Zitronensäurezyklus, einer hohen Aktivität des Glyoxylatzyklus als Folge seiner anaplerotischen Funktion, sowie einer hohen Bildungsrate von PEP und Pyruvat ausgehend von Oxaleacetat/Malat und der Gluconeogenese. Im Vergleich dazu zeigen *C. glutamicum* Zellen bei Wachstum auf *Glukose* zum Wachstum auf Acetat (i) eine geringere Aktivität des Zitronensäurezyklus, (ii) eine Abwesenheit des Glyoxylatzyklus und einen hohen glycolytischen Fluss, sowie (iii) die Carboxylierung von PEP und Pyruvat als anaplerotischen Reaktionen. Die höhere Citratzyklusaktivität der auf Acetat wachsenden Zellen (verglichen mit Glukosewachstum) kompensiert teilweise den geringeren Anteil der pro mol Acetat zur Verfügung gestellten Energie.

Die auf der Proteomebene gefundenen Daten stimmen sehr genau mit publizierten DNA-Microarray-Daten überein, welche eine höhere Aktivität des Zitronensäurezyklus, des Glyoxylatzyklus und der Gluconeogenese zeigen, gehen aber insofern auch darüber hinaus, als einige bisher lediglich postulierte Regulationen experimentell bestätigt werden konnten. Mit Hilfe der 2D-DIGE wurden im pH-Bereich 3.5 - 6.9 insgesamt 151 differentiell exprimierte Proteine gefunden, hiervon 55 mehr als zweifach reguliert. Des Weiteren wurden erstmals vier Proteine (AspA, mqo, CoA-transferase, glpX) identifiziert, deren differentielle Expression zwar vermutet worden war, jedoch bis *dato* nicht experimentell nachgewiesen werden konnte.

Wie weiter oben beschrieben sind viele Enzyme und ihre Regulation des Acetatmetabolismus verschieden von den Modellorganismen *E.coli* und *B.subtilis*. Erfahrungen mit einem weiteren Modellorganismus sind aus unterschiedlichen Gründen von großem Interesse:

- Sie geben uns die Chance, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die bei diesem industriell sehr wichtigen Organismus für die Anpassung an extra- und intrazelluläre Ernährungsvorgaben verantwortlich sind.
- Sie liefern uns Informationen über die zentralen Stoffwechselwege (z.B. Glycolyse, Zitronensäurezyklus, Glyoxylatzyklus und der Gluconeogenese) und deren Regulation bei diesem Organismus.
- Da die globalen Regulationskreisläufe des Metabolismus unter vielen Mitgliedern der *Corynebacteriae* konserviert sind, ist die Analyse des Metabolismus und seiner Regulation in *Corynebacterim glutamicum* sehr hilfreich zum Verständnis des Glyoxylatzyklus und anderer Stoffwechselwege in der nahe verwandten, aber pathogenen Spezies *M.Tuberculosis*.

## 6 Zusammenfassung

Da es sich bei dem Gram-positiven Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* um einen biotechnologisch bedeutsamen L-Lysin- und L-Glutamat-Produzenten (Jahresproduktion: ca. 1,8 Millionen Tonnen Glutamat) handelt, sind genetisch verbesserte Produktionsstämme zur Steigerung der Ausbeute bei der biotechnologischen Gewinnung dieser Aminosäuren im großtechnischen Maßstab von erheblichem wirtschaftlichen Interesse. Obwohl bei *C. glutamicum* bereits zahlreiche Untersuchungen auf der Genom- und Transkriptomebene durchgeführt wurden, sind für ein verbessertes Verständnis der Stoffwechselwege zur Produktionssteigerung grundlegende Daten aus *allen* „-omics“ Technologien (Genom, Transkriptom, Proteom und Metabolom) erforderlich. In diesem Zusammenhang fällt insbesondere der Proteomanalyse eine Schlüsselrolle zur Optimierung von Produktionsstämmen zu, beispielsweise zur Identifikation metabolischer „Flaschenhälse“ im Hinblick auf eine gezielte Verbesserung der Syntheseleistungen durch „Protein design“ und „Metabolic engineering“, oder zur Steigerung der Ausbeute von Fermentationsprozessen durch Optimierung der Fermentationsparameter.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit im Rahmen des BMBF Verbundprojektes „Neue Methoden zur Proteomanalyse am Beispiel von *Corynebacterium glutamicum*“ lag in der Optimierung der 2D-Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG's) zur qualitativen und quantitativen Analyse des Gesamtproteoms von *Corynebacterium glutamicum*, d.h. möglichst aller exprimierten Proteine über den gesamten pH-Bereich von 2.5-12 bei maximaler Auflösung, Nachweisempfindlichkeit und Reproduzierbarkeit, sowie differentiell exprimierter Proteine in Abhängigkeit genetischer und physiologischer Bedingungen.

Zunächst wurden zum Erzielen einer optimalen Auflösung enge, überlappende IPGs für die 2D Elektrophorese generiert, die Trennbedingungen für stark basische (> pH 10) Proteine optimiert und der Nachweis gering exprimierter Proteine durch entsprechende Anreicherungs- bzw. Vorfraktionierungsverfahren in Kombination mit hochauflösenden ultraengen pH-Gradienten geführt. Protokolle/ Detergenzien für die maximale Proteinsolubilisierung, einschließlich hydrophober Proteine, wurden geprüft und angewendet. Mit diesem breit angelegten Ansatz gelang es, das *C. glutamicum* Proteom wesentlich detaillierter zu analysieren als bislang. Schließlich diente u.a. ein Wachstumsvergleich von *C. glutamicum* in Glucose- bzw. Acetatmedium als Anwendungsbeispiel für die genannten Optimierungen.

### 6.1 Optimierungsstrategien

Ein Großteil dieser Arbeiten konzentrierte sich auf den sauren und neutralen pH-Bereich des *C. glutamicum* Proteoms, da hier die größte Zahl an Proteinen bzw. Proteinclustern zu finden ist. Zur möglichst umfassenden Darstellung des *C. glutamicum* Proteoms wurden zunächst die Proteinextraktion, und auch die elektrophoretische Auftrennung (Trennparameter, IPGs etc.) optimiert. Anschließend wurde systematisch untersucht, durch eine Kombination unterschiedlich enger, überlappender IPGs, welche in ihrer Summe einen nichtlinearen pH-Gradientenverlauf ergeben, eine verbesserte Trennung und Sicht-

barmachung des sauren und neutralen *C. glutamicum* Proteoms zu erzielen. Diese „maßgeschneiderten“ IPGs wurden optimal an die aus der Genom-Sequenz abgeleitete hypothetische Proteinverteilung des *C. glutamicum* Proteoms angepasst, wodurch es gelang, Bereiche mit hoher Proteinanzahl zu „spreizen“, und Bereiche mit geringer Proteinanzahl ohne erkennbare Einbuße an Auflösungsvermögen zu komprimieren. Durch die Konstruktion unterschiedlich weiter IPGs wurde zudem erreicht, dass für die Abdeckung des Bereichs von pH 3.5 bis 7 nur zwei IPGs benötigt werden. Dies ist vor allem in der Routineanalytik und für physiologische Studien mit hohem Probenaufkommen von großem Vorteil.

## 6.2 Analyse des alkalischen *C. glutamicum* Proteoms

Ein weiterer Teil dieser Arbeit konzentrierte sich auf das basische Proteom von *C. glutamicum*, welches nahezu ein Drittel des Gesamtproteoms ausmacht und von dem bis *dato* noch keine detaillierten Analysen vorlagen. Da das *C. glutamicum* Genom komplett sequenziert ist, war es möglich, das alkalische Proteom durch *in silico* Studien darzustellen. Aufbauend auf diesen Informationen wurde die 2D-Elektrophorese entsprechend angepasst und optimiert, um reproduzierbare 2DE-Muster in diesem Bereich zu erhalten durch Verwendung von IPGs 6-12, Probenauftrag mit anodalem Cup-Loading, isoelektrische Fokussierung (IEF) bei einer maximalen Spannung von 8000V, sowie Erhöhung des Stromflusses pro IPG-Streifen von 50 $\mu$ A auf 75  $\mu$ A, um eine schnellere IEF (bis zu 28000 Vh) zu erzielen. Da im basischen pH-Bereich von *C. glutamicum* sehr viele hydrophobe Proteine vorkommen, wurde zudem eine Reihe unterschiedlicher Detergenzien zur besseren Solubilisierung dieser Proteine getestet. Nach erfolgreicher Optimierung der 2D-Elektrophoreseparameter wurden die aufgetrennten Proteine anschließend mit MALDI-TOF-MS/PMF identifiziert, wobei es erstmals gelang, eine 2D Proteindatenbank alkalischer *C. glutamicum* Proteine zu erstellen. Insgesamt wurden 120 Proteinspots aus einem mit Coomassie-Blau gefärbten 2DE-Gel (pH-Bereich 6-12) mit MALDI-ToF-MS Peptidmassen-Fingerprinting analysiert, wobei 96 Spots identifiziert und 64 unterschiedlichen Proteinen zugeordnet werden konnten. Die größte Einzelgruppe der identifizierten Proteine stellten die ribosomalen Proteine dar. Daneben gelang aber auch die Identifizierung einer Reihe von Enzymen (Dehydrogenasen, Hydrolasen, Transferasen, Oxidasen, Reduktasen, Methylasen), sowie einiger hypothetischer Proteine.

## 6.3 Nachweis und Identifizierung gering-exprimierter *C. glutamicum* Proteine

Für eine komplette Analyse komplexer pro- und insbesondere eukaryotischer Proteome reicht ein einzelnes Trennverfahren (z.B. 2D Elektrophorese oder multidimensionale Chromatographie) allein in aller Regel nicht aus, da Proteine, die in der Zelle nur in sehr geringer Kopienzahl vorkommen (sog. „gering-exprimierte“ Proteine) nicht oder nur unzureichend erfasst werden. Da diesen Proteinen in der Signaltransduktion und der Regulation von Stoffwechselwegen eine herausragende Rolle zukommt, ist deren Nachweis momentan eines der Hauptziele der Proteomanalyse. Eine Möglichkeit der Darstellung

gering-exprimierter Proteine ist der Einsatz von Vorfraktionierungsverfahren. Der Schwerpunkt des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit lag infolgedessen auf dem Nachweis niedrig-abundanter Proteine durch Kombination maßgeschneiderter IPGs (und der dadurch bestehenden Möglichkeit einer genau auf das *C. glutamicum* Proteom abgestimmten „Zoom-In“-Funktion) in Verbindung mit einer Vorfraktionierung auf Basis der Sephadex-IEF. Hierzu wurde die von Görg *et al.* entwickelte Methode eines ursprünglich zur analytischen Trennung und Charakterisierung technischer Enzyme eingesetzten Protein-trennverfahrens angewendet bzw. optimiert. Je nach verwendetem pH-Gradienten wurden bis zu 10 Milligramm eines komplexen Proteingemischs auf einem Sephadex-IEF Gel in 5-10 Fraktionen aufgetrennt, und die gewonnenen Fraktionen anschließend 2D elektrophoretisch in IPG-Streifen des entsprechenden pH-Bereichs näher analysiert. Durch isoelektrische Vorfraktionierung in Sephadex-Gelen konnte bedeutend mehr Proteinmenge pro IPG-Streifen aufgetragen werden, ohne dass die Auftrennung durch Ausbildung von horizontalen Streifen bzw. Proteinenpräzipitation an den Elektroden beeinträchtigt wurde. Es zeigte sich, dass nach Vorfraktionierung nicht nur die Anzahl von *Isoformen* verschiedener Proteine höher war, sondern v.a. auch die Gesamtzahl unterschiedlicher *Proteinspezies*. Insgesamt konnten im pH-Bereich 5.5-6.7 mehr als 40%, und im pH-Bereich 4.0-6.7 immerhin noch 35% der theoretisch zu erwartenden und auf 2DE-Gelen darstellbaren niedrig-exprimierten Proteine mit einem Codonbias  $< -0,42$  mit Hilfe der 2D-Elektrophorese unter Verwendung enger IPGs in Kombination mit einer Proteinvorfraktionierung durch IEF in Sephadex-Gelen detektiert und identifiziert werden. Im Vergleich dazu wurden in bisher publizierten Proteomstudien von *C. glutamicum* unter Verwendung enger IPG-Gradienten, jedoch ohne Vorfraktionierung, nur ca. 20% der von uns gefundenen niedrig-abundanten Proteine detektiert. Aufgrund der größeren Proteinmenge pro Spot wurde sowohl die Qualität der MS-Spektren verbessert als auch die Sequenzabdeckung gesteigert, und somit die Proteinidentifikation mit dem Massenspektrometer erheblich erleichtert. Mit der präparativen IEF in Sephadex-Gelen steht eine Vorfraktionierungsmethode zur Verfügung, mit deren Hilfe man hochkomplexe Proteingemische auf einfache Weise für die anschließende 2DE-Trennung reproduzierbar vorfraktionieren kann. Durch die Verwendung von farbigen *pI*-Markern zur Ermittlung des Verlaufs des pH-Gradienten wurde diese Technik weiter verbessert. Diese Methode sowie eine Anwendung wurden mittlerweile in Fachzeitschriften (*PNAS* bzw. *Meth. Mol. Biol.*) publiziert.

#### 6.4 Anwendungen

Vergleichende Proteomanalysen von *C. glutamicum*, z.B. zwischen Wildtyp und Lysin-Produktionsstamm, können Aufschlüsse über mögliche Engpässe in den Stoffwechselwegen geben, und Hinweise für weitere Strategien zur Stammoptimierung liefern. Im letzten Teil dieser Arbeit wurden daher modernste Analysenverfahren (2D DIGE) zur vergleichenden Proteomanalyse des Wildtyps und eines Produktionsstamms von *C. glutamicum*, sowie zum Vergleich der Proteinexpressionsmuster nach An-

zucht auf unterschiedlichen Nährmedien und C-Quellen eingesetzt, um eventuell neue potentielle Zielproteine („Targets“) zur Verbesserung der Produzenten-Stämme aufzufinden.

#### **6.4.1 Vergleichende Proteomanalyse des Wildtyps *ATCC13032* und Produktionsstamms *DM1730 (C. glutamicum)* nach Anzucht auf MM1 Medium**

Ziel dieser Untersuchungen war der Nachweis differentiell exprimierter Proteine beim Vergleich zwischen Wildtyp- und Produktionsstamm. In Folgenden wurde das cytosolische Proteom des *C. glutamicum* Wildtypstamms ATCC13032 nach Anzucht auf MM1-Medium mit dem des Produktionsstamms DM1730 verglichen, der vier pH-neutrale Punktmutationen in Enzymen des Zentralstoffwechsels sowie des Lysin-Biosynthesewegs aufweist. Im Rahmen einer Referenzkartierung im pH-Bereich von 3.4–6.9 wurden zunächst insgesamt 265 individuelle Proteine, insbesondere sehr viele Enzyme des Zentralstoffwechsels, als auch des L-Lysin Produktionsweges identifiziert. Die vergleichende Analyse der silbergefärbten 2DE-Gele der beiden *C. glutamicum* Stämme ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spotmustern des Wildtypstamms ATCC13032 und des Produktionsstamms DM1730 erkennen. Da Silberfärbungen aufgrund ihres relativ engen, linearen Messbereichs für die quantitative Gelauswertung nur mit Einschränkungen anwendbar sind, wurde deshalb die DIGE Technik zum Nachweis und zur Quantifizierung unterschiedlich exprimierter Proteine eingesetzt. Hierzu wurden die zu vergleichenden Proteinproben vor der IEF mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (*CyDyes*) markiert, gemischt und in einem einzigen 2D-Gel aufgetrennt. Die Detektion der markierten Proben erfolgte anschließend durch Anregung bei verschiedenen Wellenlängen. Aufgrund der hohen Sensitivität und des großen linearen Messbereichs bietet diese Technologie die Möglichkeit, Unterschiede in den 2D-Mustern sehr zuverlässig zu quantifizieren. Im pH-Bereich von 3.4-5.4 wurden drei differentiell exprimierte Proteine gefunden (Cg0583 (*fusA*); Cg1337 - (*hom*); und Cg2560 - (*aceA*)). Im pH-Bereich 4.9-6.9 waren hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden *C. glutamicum* Stämmen nachweisbar.

Da trotz des Einsatzes spezieller, auf die Fragestellung zugeschnittener IPGs nur drei differentiell exprimierte Proteine zwischen den beiden *C. glutamicum* Stämmen bei Wachstum auf MM1-Medium detektiert wurden, führten wir detailliertere Untersuchungen mit Hilfe der *Sub-Proteom-DIGE* Technik durch. Diese von uns neu entwickelte Methode ist eine Verbindung der DIGE-Methode und der Vorfraktionierung mit Sephadex-IEF zur quantitativen Analyse differentiell exprimierter Proteine. Sie ermöglicht eine höhere Proteinauftragsmenge zur Detektion niedrig-exprimierter Proteine. Es wurden jeweils 150 µg mit CyDyes markierte Proben mit bis zu 10 mg unmarkierter Probe vermischt, danach eine Sephadex-IEF durchgeführt und die einzelnen Fraktionen anschließend mittels hochauflösender 2D-DIGE unter Verwendung enger IPGs analysiert. Differentiell exprimierte Proteine werden anschließend direkt aus den 2DE-Gelen gepickt und nach tryptischem Verdau massenspektrometrisch identifiziert. In einer Pilotstudie im pH-Bereich von 5-6 konnten erheblich mehr differentiell exprimier-

te Proteine gefunden werden. Es handelte sich vor allem um (Iso-)Enzyme, die in die Aminosäureproduktion und Zellteilung involviert sind, aber auch stressbezogene Proteine (z.B. Superoxid-Dismutase), letztere vermutlich aufgrund des bei der Anzucht auftretenden oxidativen Stresses. Die Sub-Proteom-DIGE ermöglicht die Durchführung einer differentiellen Proteomanalyse unter Kombination der Vorteile der Sephadex-IEF (d.h. höheres Auflösungsvermögen, Nachweis gering-exprimierter Proteine sowie bessere MALDI-MS Identifikationen durch Vorfraktionierung) mit den Vorteilen der DIGE-Technologie (d.h. bessere Quantifizierbarkeit und höhere Reproduzierbarkeit).

#### **6.4.2 Vergleichende Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC13032 nach Anzucht in Vollmedium und Minimalmedium**

Da es bis *dato* noch keine differentielle Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC13032 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gab, wurde ein Mediumsvergleich durchgeführt. Es war zu erwarten, dass bei Anzucht von *C. glutamicum* in einem Vollmedium (BHI) bzw. einem Minimalmedium (MM1) sehr viele Proteine differentiell exprimiert werden. In der Tat ergab die vergleichende Proteomanalyse des *C. glutamicum* Wildtypstamms ATCC13032 nach Anzucht in Voll- bzw. Minimalmedium, dass in BHI-Medium v.a. Proteine des Zentralstoffwechsels und der Atmungskette sowie des Proteinbiosyntheseapparates überexprimiert wurden. Dies korreliert gut mit dem beobachteten schnelleren Wachstum der Zellen in BHI Medium. Außerdem hat es den Anschein, dass beim Wachstum in diesem Medium ein erhöhter oxidativer Stress vorliegt, da z.B. Katalase überexprimiert wurde. Andererseits wurden (im Gegensatz zum Wachstum auf Minimalmedium) Enzyme, die für die Synthese von Aminosäuren, Nucleotiden oder anderen Metaboliten nötig sind, schwächer exprimiert, vermutlich deshalb, weil der Organismus diese Metabolite aufgrund ihres Vorhandenseins in Vollmedium nicht selbst synthetisieren muss.

Interessanterweise wurden auch einige Enzyme des Inositolstoffwechsels differentiell exprimiert. Da die genaue Zusammensetzung des BHI-Vollmediums nicht in Erfahrung gebracht werden konnte und somit konkrete Aussagen zu bestimmten Proteinregulierungen schwierig waren, verfolgten wir im Folgenden einen veränderten Versuchsansatz, bei dem die Proteinexpression beim Wachstum unter genau definierten Bedingungen in Abhängigkeit des Nährmediums unter Verwendung einzelner, exakt definierter C-Quellen (z.B. Glucose, Acetat u.a.) in Minimalmedium anstelle des unzureichend definierten Vollmediums analysiert wurde.

#### **6.4.3 Vergleichende Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC13032 nach Anzucht auf verschiedenen C-Quellen am Beispiel von Glucose vs. Acetat**

Mikroorganismen sind in ihrer natürlichen Umgebung oft wechselnden Bedingungen ausgesetzt, z.B. Temperatur, pH-Wert, O<sub>2</sub>-Konzentration, Nährstoffversorgung usw. Um sich an diese Veränderungen anpassen zu können, haben sie eine Reihe von koordinierten und adaptiven Mechanismen entwickelt, um ihr Wachstum schnellst- und bestmöglich auf die neue Situation einzustellen. Diese Anpassung geht

oft mit substratspezifischem An- bzw. Ausschalten von Genen bzw. Expression der entsprechenden Proteine einher. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Proteom-Vergleich von *C. glutamicum* bei Anzucht auf verschiedenen C-Quellen (Glucose, Fructose, Lactat, Acetat, Glutamin) durchgeführt, und die Ergebnisse des Glucose-Acetat-Vergleichs eingehender diskutiert. Durch diese Untersuchungen erhofften wir uns ein besseres Verständnis von Stoffwechselwegen und regulatorischen Netzwerken beim Wachstum auf den o.g. Substraten.

Der Metabolismus von *Corynebacterium glutamicum* bei Wachstum in einem Acetatmedium ist charakterisiert durch eine relativ hohe *in vivo* Aktivität des Zitronensäurezyklus, einer hohen Aktivität des Glyoxylatzyklus als Folge seiner anaplerotischen Funktion, sowie einer hohen Bildungsrate von PEP und Pyruvat ausgehend von Oxalacetat/Malat und der Gluconeogenese. Die von uns auf der Proteomebene gefundenen Daten stimmen sehr gut mit publizierten DNA-Microarray-Daten überein, welche eine erhöhte Expression einzelner Schlüsselenzyme des Zitronensäurezyklus, des Glyoxylatzyklus und der Gluconeogenese zeigen, gehen aber insofern auch darüber hinaus, als einige bisher lediglich postulierte Regulationen experimentell mit der Proteomanalyse bestätigt werden konnten. Mit Hilfe der 2D-DIGE wurden im pH-Bereich 3.5 - 6.9 insgesamt 151 differentiell exprimierte Proteine gefunden, hiervon 55 mehr als zweifach reguliert. Des Weiteren wurden erstmals vier Proteine (AspA, mqo, CoA-transferase, glpX) identifiziert, deren differentielle Expression zwar postuliert worden war, jedoch bis *dato* nicht experimentell –weder auf der Transkriptom- noch auf der Proteomebene- nachgewiesen werden konnte.

## 7 Abstract

In the “post-genomic era” the systematic analysis of gene function by means of proteome analysis has raised great expectations in biological and medical research to gain new insights into the function and control of biological processes and disease. Yet these expectations will be difficult to accomplish unless today’s proteomic technologies are improved in many ways to facilitate the separation, detection and quantitation of *all* proteins expressed in the cell. The aim of this work was the development of advanced methods to facilitate the separation and identification of proteins that are “critical” to analyse (*i.e.*, low abundant, very hydrophobic, and/or highly basic proteins), by two-dimensional electrophoresis (2DE) with immobilized pH gradients (IPG), exemplified by proteome analysis of the biotechnologically important amino acid-overproducing microorganism *Corynebacterium glutamicum*.

By developing and/or improving alkaline IPG strips up to pH 12, the separation and identification of extremely basic *C. glutamicum* proteins (*e.g.*, rpsD, rplD, rpsG) on 2DE-Gels was enabled for the first time. Moreover, by combining customised IPG strips with increased resolving power through a protein prefractionation method based on Sephadex-IEF, a number of low abundance *C. glutamicum* proteins could be detected and identified (*e.g.* cg0439, cg1903, cg0764). Subsequently, these optimized analysis techniques were successfully applied in combination with 2D-DIGE, to perform quantitative proteome analyses of the wildtype *versus* the production strain of *C. glutamicum*, as well as for the comparison of protein expression profiles after cultivating *C. glutamicum* cells in different growth media and on different carbon sources. Comparison of the differential protein expression profiles of *C. glutamicum* cells grown on glucose- or acetate-medium fully confirmed results previously reported at the transcriptome level (*e.g.* icl, ms, pyc). In addition the overexpression of several postulated, but not yet identified, co-regulated genes (*e.g.* glpX, gapX, actA, mqo) was verified.

## Anhang I

Folgende Tabellen stellen eine vollständige Auflistung aller mittels MALDI-ToF identifizierten Proteine dar.

Die Nummern entsprechen denen auf Seite 117 Abbildung 5-34 (Referenzkarte im pH-Bereich 3.4 – 5.4, Fermenteranzucht) und Seite 118 Abbildung 5-35 (Referenzkarte im pH-Bereich 4.9 – 6.9, Fermenteranzucht) gekennzeichneten Proteine.

Identifikation mit der Vorgabe von mind. 5 gematchten Peptiden, Abweichung des theoretischen pIs zum gefundenen pI  $< 0.5$  pH-Einheiten und Abweichung der theoretischen Masse zur gefundenen Masse  $< 20\%$

## Liste aller identifizierten Proteine im pH-Bereich 3,4-5,4

Proben Nr.	Proteininformation	Coverage	pI	Masse [kDa]
1	Cg2421 - (sucB) [C]: DIHYDROLIPOAMIDE SUCCINYLTRANSFERASE (EC 2.3.1.61)   NCg2126 (COG0508) [C]: Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide acyltransferase (E2) component, and related enzymes	10.2	4.3	70.89
2	Cg2862 - (purL) [C]: PHOSPHORIBOSYLFORMYLGLYCINAMIDINE SYNTHASE (EC 6.3.5.3)   NCg2499 (COG0046) [F]: Phosphoribosylformylglycinamide (FGAM) synthase, synthetase domain	25.5	4.5	80.82
3	Cg3169 - (pck) [C]: PROBABLE PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE PROTEIN (EC 4.1.1.32)   NCg2765 (COG1274) [C]: Phosphoenolpyruvate carboxylase (GTP)	8.2	4.6	66.86
4	Cg3169 - (pck) [C]: PROBABLE PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE PROTEIN (EC 4.1.1.32)   NCg2765 (COG1274) [C]: Phosphoenolpyruvate carboxylase (GTP)	16.9	4.6	66.86
5	Cg2523 - (malQ) [C]: 4-ALPHA-GLUCANOTRANSFERASE (EC 2.4.1.25)   NCg2217 (COG1640) [G]: 4-alpha-glucanotransferase	15.6	4.7	78.51
6	Cg1290 - (metE) [C]: Homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)   NCg11094 (COG0620) [E]: Methionine synthase II (cobalamin-independent)	33.2	4.8	81.30
7	Cg1290 - (metE) [C]: Homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)   NCg11094 (COG0620) [E]: Methionine synthase II (cobalamin-independent)	34.4	4.8	81.30
8	Cg0583 - (fusA) [C]: ELONGATION FACTOR G   NCg0478 (COG0480) [J]: Translation elongation factors (GTPases)	15.9	4.8	77.87
9	Cg0583 - (fusA) [C]: ELONGATION FACTOR G   NCg0478 (COG0480) [J]: Translation elongation factors (GTPases)	35.1	4.8	77.87
10	Cg1248 - [C]: GTPase involved in stress response   NCg11053 (COG1217) [T]: Predicted membrane GTPase involved in stress response	15.0	4.9	68.98
11	Cg3079 - (clpB) [C]: PROBABLE ATP-DEPENDENT PROTEINASE (HEAT SHOCK PROTEIN) (EC 3.-.-)   NCg2682 (COG0542) [O]: ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit	10.0	5.0	93.21
12	Cg2559 - (aceB) [C]: MALATE SYNTHASE (EC 4.1.3.2)   NCg2247 (COG2225) [C]: Malate synthase	17.1	5.0	82.34
13	Cg2647 - (tig) [C]: TRIGGER FACTOR, PFIASE INVOLVED INTO CELL DIVISION, MOLECULAR CHAPERONE (EC 5.2.1.8)   NCg2329 (COG0544) [O]: FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (trigger factor)	26.5	4.4	49.68
14	Cg1531 - (rpsA) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S1   NCg11304 (COG0539) [J]: Ribosomal protein S1	18.3	4.6	54.01
15	Cg3100 - (dnaK) [C]: Heat shock protein hsp70   NCg2702 (COG0443) [O]: Molecular chaperone	57.3	4.6	66.27
16	Cg0193 - (pepO) [C]: ENDOPEPTIDASE O (EC 3.4.24)   NCg0151 (COG3590) [O]: Predicted metalloendopeptidase	22.7	4.7	71.32
17	Cg3179 - (fadD2) [C]: PUTATIVE ACYL-COA SYNTHETASE (EC 6.2.1.3)   NCg2774 (COG0318) [I]: Acyl-CoA synthetases (AMP-forming) / AMP-acid ligases II	28.7	4.7	67.90
18	Cg0766 - (icd) [C]: ISOCITRATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.42)   NCg10634 (COG2838) [C]: Monomeric isocitrate dehydrogenase	20.9	4.7	80.06
19	Cg2185 - (proS) [C]: PROBABLE PROLYL-TRNA SYNTHETASE PROTEIN (EC 6.1.1.15)   NCg1919 (COG0442) [J]: Prolyl-tRNA synthetase	28.1	4.7	64.31
20	Cg2185 - (proS) [C]: PROBABLE PROLYL-TRNA SYNTHETASE PROTEIN (EC 6.1.1.15)   NCg1919 (COG0442) [J]: Prolyl-tRNA synthetase	21.8	4.7	64.31
21	Cg0583 - (fusA) [C]: ELONGATION FACTOR G   NCg0478 (COG0480) [J]: Translation elongation factors (GTPases)	21.9	4.8	77.87
22	Cg0303 - (leuA) [C]: 2-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE (EC 4.1.3.12)   NCg0245 (COG0119) [E]: Isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthases	26.1	4.8	68.17
23	Cg1435 - (hwb) [C]: ACETOLACTATE SYNTHASE (EC 4.1.3.18)   NCg1222 (COG0028) [EH]: Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboxylase, phosphoenolpyruvate decarboxylase]	14.1	4.8	66.83
24	Cg0811 - (disR2) [M]: ACETYL/PROPIONYL COA CARBOXYLASE, BETA SUBUNIT (EC 6.4.1.2,6.3.1.3)   NCg10677 (COG4799) [I]: Acetyl-CoA carboxylase, carboxyltransferase component (subunits alpha and beta)	21.6	4.9	57.98
25	Cg0811 - (disR2) [M]: ACETYL/PROPIONYL COA CARBOXYLASE, BETA SUBUNIT (EC 6.4.1.2,6.3.1.3)   NCg10677 (COG4799) [I]: Acetyl-CoA carboxylase, carboxyltransferase component (subunits alpha and beta)	29.1	4.9	57.98
26	Cg0655 - (rpoA) [C]: DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE ALPHA SUBUNIT (EC 2.7.7.6)   NCg10540 (COG0202) [K]: DNA-directed RNA polymerase alpha subunit/40 kD subunit	29.3	4.5	36.65
27	Cg2647 - (tig) [C]: TRIGGER FACTOR, PFIASE INVOLVED INTO CELL DIVISION, MOLECULAR CHAPERONE (EC 5.2.1.8)   NCg2329 (COG0544) [O]: FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (trigger factor)	34.3	4.4	49.68
28	Cg1531 - (rpsA) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S1   NCg11304 (COG0539) [J]: Ribosomal protein S1	39.9	4.6	54.01
29	Cg2117 - (ptsI) [C]: PHOSPHOENOLPYRUVATE:SUGAR PHOSPHOTRANSFERASE SYSTEM ENZYMBI (EC 2.7.3.9)   NCg1858 (COG1080) [G]: Phosphoenolpyruvate-protein kinase (PTS system EI component in bacteria)	15.3	4.6	59.65
30	Cg0067 - (gabD3) [C]: SUCCINATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (NADP+) (EC 1.2.1.16)   NCg10049 (COG1012) [C]: NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	10.6	4.6	51.76
31	Cg1451 - (serA) [C]: Phosphoglycerate Dehydrogenase (EC 1.1.1.95)   NCg1235 (COG0111) [E]: Phosphoglycerate dehydrogenase and related dehydrogenases	47.4	4.7	55.28
32	Cg1451 - (serA) [C]: Phosphoglycerate Dehydrogenase (EC 1.1.1.95)   NCg1235 (COG0111) [E]: Phosphoglycerate dehydrogenase and related dehydrogenases	56.8	4.7	55.28
33	Cg3011 - (groEL) [C]: Chaperonin cpn60 (60kD subunit)   NCg2621 (COG0459) [O]: Chaperonin GroEL (HSP60 family)	36.9	4.7	57.34
34	Cg0693 - (groEL) [C]: 60 KDA CHAPERONIN (PROTEIN CPN60) (GROEL PROTEIN) C-terminal fragment   NCg0573 (COG0459) [O]: Chaperonin GroEL (HSP60 family)	42.3	4.8	45.24

35	Cg1764 - (suFB) [C]: component of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter   NCgl1503 (COG0719) [O]: ABC-type transport system involved in Fe-S cluster assembly, permease component	20.8	4.9	53.48
36	Cg1366 - (atpA) [C]: PROBABLE ATP SYNTHASE ALPHA CHAIN PROTEIN (EC 3.6.1.34)   NCgl1163 (COG0056) [C]: F0F1-type ATP synthase, alpha subunit	46.8	4.9	58.73
37	Cg2429 - (glnA) [C]: GLUTAMINE SYNTHETASE I (EC 6.3.1.2)   NCgl2133 (COG0174) [E]: Glutamine synthetase	39.2	4.9	53.28
38	Cg1333 - (argS) [C]: ARGINYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.19)   NCgl1132 (COG0018) [J]: Arginyl-tRNA synthetase	29.6	4.9	59.71
39	Cg0802 - (accB) [C]: (Q54119) BIOTIN CARBOXYLASE AND BIOTIN CARBOXYL CA (EC 6.3.4.1,6.4.1.2,6.4.1.4)   NCgl0670 (COG4770) [I]: Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit	37.1	5.0	63.40
40	Cg2333 - (treZ) [C]: MALTO-OLIGOSYLTRANSFERASE (EC 3.2.1.141)   NCgl2045 (COG0296) [G]: 1,4-alpha-glucan branching enzyme	11.3	5.0	62.71
41	Cg2437 - (thrC) [C]: THREONINE SYNTHASE (EC 4.2.99.2)   NCgl2139 (COG0498) [E]: Threonine synthase	21.0	4.6	52.91
42	Cg2366 - (ftsZ) [C]: Cell division GTPase   NCgl2075 (COG0206) [D]: Cell division GTPase	9.3	4.7	47.20
43	Cg1420 - (gatB) [C]: PROBABLE GLU-TRNAGLN AMIDOTRANSFERASE SUBUNIT B PR (EC 6.3.5.-)   NCgl1211 (COG0064) [J]: Asp-tRNAAsn/Glu-tRNAArgin amidotransferase B subunit (PBT112 homolog)	32.5	4.8	54.45
44	Cg2800 - (pgm) [C]: PHOSPHOGLUCOMUTASE (EC 5.4.2.2)   NCgl2453 (COG0033) [G]: Phosphoglucomutase	23.5	4.8	59.19
45	Cg3049 - (fprA) [S]: PUTATIVE FERREDOXIN/FERREDOXIN-NADP REDUCTASE (EC 1.18.1.2)   NCgl2658 (COG0493) [ER]: NADPH-dependent glutamate synthase beta chain and related oxidoreductases	23.1	4.8	50.05
46	Cg1404 - (gatA) [C]: PROBABLE GLU-TRNA (GLN) AMIDOTRANSFERASE (SUBUNIT A) (EC 6.3.5.-)   NCgl1199 (COG0154) [J]: Asp-tRNAAsn/Glu-tRNAArgin amidotransferase A subunit and related amidases	46.3	4.9	52.52
47	Cg3119 - (cys) [C]: Probable Sulfite Reductase (Flavoprotein) (EC 1.8.1.2)   NCgl2719 (COG0493) [ER]: NADPH-dependent glutamate synthase beta chain and related oxidoreductases	32.8	4.9	50.11
48	Cg2391 - (aroG) [C]: PHOSPHO-2-DEHYDRO-3-DBOXYHEPTONATE ALDOLASE (EC 4.1.2.15)   NCgl2098 (COG3200) [E]: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase	34.6	4.9	50.88
49	Cg0802 - (accB) [C]: (Q54119) BIOTIN CARBOXYLASE AND BIOTIN CARBOXYL CA (EC 6.3.4.1,6.4.1.2,6.4.1.4)   NCgl0670 (COG4770) [I]: Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit	18.3	5.0	63.40
50	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)   NCgl2480 (COG0427) [C]: Acetyl-CoA hydrolase	47.2	5.1	54.50
51	Cg2586 - (proA) [C]: GAMMA-GLUTAMYL PHOSPHATE REDUCTASE (EC 1.2.1.41)   NCgl2272 (COG0014) [E]: Gamma-glutamyl phosphate reductase	21.3	4.8	45.65
52	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)   NCgl2480 (COG0427) [C]: Acetyl-CoA hydrolase	70.3	5.1	54.50
53	Cg2878 - (putD) [C]: PHOSPHORIBOSYLAMINE-GLYCINE LIGASE (EC 6.3.4.13)   NCgl2511 (COG0151) [F]: Phosphoribosylamine-glycine ligase	39.7	4.5	43.53
54	Cg0783 - [C]: conserved hypothetical protein   NCgl0651	25.4	4.5	45.34
55	Cg1111 - (eno) [C]: ENOLASE (EC 4.2.1.11)   NCgl0935 (COG0148) [G]: Enolase	21.9	4.7	44.93
56	Cg2305 - (hisD) [C]: HISTIDINOL DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.23)   NCgl2021 (COG0141) [E]: Histidinol dehydrogenase	36.7	4.7	46.75
57	Cg1111 - (eno) [C]: ENOLASE (EC 4.2.1.11)   NCgl0935 (COG0148) [G]: Enolase	32.5	4.7	44.93
58	Cg1111 - (eno) [C]: ENOLASE (EC 4.2.1.11)   NCgl0935 (COG0148) [G]: Enolase	44.0	4.7	44.93
59	Cg1368 - (atpD) [C]: ATP SYNTHASE ALPHA SUBUNIT (EC 3.6.1.34)   NCgl1165 (COG0055) [C]: F0F1-type ATP synthase, beta subunit	43.7	4.7	52.53
60	Cg1111 - (eno) [C]: ENOLASE (EC 4.2.1.11)   NCgl0935 (COG0148) [G]: Enolase	25.4	4.7	44.93
61	Cg2796 - [C]: MIMGE/PRPD FAMILY PROTEIN   NCgl2450 (COG2079) [R]: Uncharacterized protein involved in propionate catabolism	22.8	4.8	49.26
62	Cg0587 - (tuF) [C]: ELONGATION FACTOR TU   NCgl0480 (COG0050) [I]: GTPases - translation elongation factors	22.0	4.9	43.83
63	Cg1268 - (glgA) [C]: GLYCOSYL TRANSFERASE   NCgl1072 (COG0438) [M]: Predicted glycosyltransferases	18.5	4.8	42.49
64	Cg1337 - (hom) [C]: Homoserine Dehydrogenase (EC 1.1.1.3)   NCgl1136 (COG0460) [E]: Homoserine dehydrogenase	42.0	4.8	46.42
65	Cg2201 - (serS) [C]: SERYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.11)   NCgl2793 (COG0379) [H]: Seryl-tRNA synthetase	19.7	4.9	47.65
66	Cg1216 - (nadA) [C]: QUINOLINATE SYNTHETASE   NCgl1024 (COG0379) [H]: Quinolinate synthase	15.4	4.9	46.49
67	Cg2560 - (aceA) [C]: ISOCITRATE LYASE (EC 4.1.3.1)   NCgl2248 (COG2224) [C]: Isocitrate lyase	37.7	4.9	47.21
68	Cg3096 - [C]: ALDEHYDE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.3)   NCgl2698 (COG1012) [C]: NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	43.3	5.0	55.09
69	Cg2953 - (xyfC) [C]: BENZALDEHYDE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.28)   NCgl2578	22.4	5.0	52.37
70	Cg1128 - [C]: ABC-type cobalt transport system, ATPase component   NCgl1034 (COG1122) [E]: ABC-type cobalt transport system, ATPase component	51.8	5.0	47.78
71	Cg1145 - (fum) [C]: FUMARATE HYDRATASE (EC 4.2.1.2)   NCgl0967 (COG0114) [C]: Fumarate	47.5	5.1	49.75
72	Cg1681 - (pepE) [C]: PROLINE DIPEPTIDASE (EC 3.4.13.9)   NCgl1430 (COG0006) [E]: Xaa-Pro aminopeptidase	29.6	4.5	40.16
73	Cg0655 - (rpoA) [C]: DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE ALPHA SUBUNIT (EC 2.7.7.6)   NCgl0540 (COG0202) [K]: DNA-directed RNA polymerase alpha subunit/40 kD subunit	43.8	4.5	36.65
74	Cg0948 - (serC) [C]: Phosphoserine Transaminase (EC 2.6.1.52)   NCgl0794 (COG1932) [HE]: Phosphoserine aminotransferase	10.1	4.7	40.03
75	Cg1334 - (lysA) [C]: DIAMINOPIMELATE DECARBOXYLASE (EC 4.1.1.20)   NCgl1133 (COG0019) [E]: Diaminopimelate decarboxylase	39.6	4.7	47.39
76	Cg1806 - (metK) [C]: S-Adenosylmethionine Synthetase (EC 2.5.1.6)   NCgl1541 (COG0192) [H]: S-adenosylmethionine synthetase	61.9	4.7	44.16

77	Cg2299 - (hisA) [C]; PHOSPHORIBOSYLFORMIMINO-5-AMINOIMIDAZOLE CARBOXAMIDE RIBOTIDEISOMERASE (EC 5.3.1.16)   NCg2015 COG0106) [E]; Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (ProFAR) isomerase	21.1	4.5	26.59
78	Cg1290 - (metE) [C]; Homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)   NCg1094 (COG0620) [E]; Methionine synthase II (cobalamin-independent)	15.7	4.8	81.30
79	Cg1355 - (prfA) [C]; PEPTIDE CHAIN RELEASE FACTOR 1 (RF-1)   NCg1153 (COG0216) [J]; Protein chain release factor A	24.0	4.8	39.66
80	Cg2337 - [C]; similar to methionine synthase II (cobalamin-independent)   NCg2048 (COG0620) [E]; Methionine synthase II (cobalamin-independent)	55.8	4.8	44.36
81	Cg2361 - [C]; Cell division initiation protein - Antigen 84 homolog   NCg2070 (COG3599) [D]; Cell division initiation protein	16.4	4.9	38.67
82	Cg0587 - (tuF) [C]; ELONGATION FACTOR TU   NCg0480 (COG0050) [J]; GTPases - translation elongation factors	25.5	4.9	43.83
83	Cg0587 - (tuF) [C]; ELONGATION FACTOR TU   NCg0480 (COG0050) [J]; GTPases - translation elongation factors	37.9	4.9	43.83
84	Cg0435 - (udgA1) [C]; UDP-GLUCOSE 6-DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.22)   NCg10351 (COG1004) [M]; Predicted UDP-glucose 6-dehydrogenase	50.6	4.9	42.92
85	Cg0587 - (tuF) [C]; ELONGATION FACTOR TU   NCg0480 (COG0050) [J]; GTPases - translation elongation factors	35.4	4.9	43.83
86	Cg0755 - (metY) [C]; O-Acetylhomoserine (Thiol)-Lyase (EC 4.2.99.10)   NCg10625 (COG2873) [E]; O-acetylhomoserine sulphydrylase	38.7	5.1	46.73
87	Cg0755 - (metY) [C]; O-Acetylhomoserine (Thiol)-Lyase (EC 4.2.99.10)   NCg10625 (COG2873) [E]; O-acetylhomoserine sulphydrylase	63.2	5.1	46.73
88	Cg1157 - (glpX) [C]; GLPX-LIKE PROTEIN   NCg10976 (COG1494) [G]; Fructose-1,6-bisphosphatase/sedoheptulose 1,7-bisphosphatase and related proteins	23.0	5.1	35.35
89	Cg1171 - [C]; Predicted GTPase   NCg10988 (COG0012) [J]; Predicted GTPase, probable translation factor	36.0	4.5	38.94
90	Cg2781 - (nrdF) [C]; RIBONUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE REDUCTASE 2 BETA CHAIN (EC 1.17.4.1)   NCg12438 (COG0208) [F]; Ribonucleotide reductase, beta subunit	15.0	4.5	38.04
91	Cg3323 - [C]; Myo-inositol-1-phosphate synthase   NCg12894 (COG1260) [J]; Myo-inositol-1-phosphate synthase	36.1	4.7	39.21
92	Cg1451 - (serA) [C]; Phosphoglycerate Dehydrogenase (EC 1.1.1.95)   NCg11235 (COG0111) [E]; Phosphoglycerate dehydrogenase and related dehydrogenases	25.8	4.7	55.28
93	Cg0004 - (dnaN) [C]; DNA POLYMERASE III, BETA SUBUNIT (EC 2.7.7.7)   NCg10002 (COG0592) [L]; DNA polymerase sliding clamp subunit (PCNA homolog)	27.7	4.7	42.45
94	Cg0307 - (asd) [C]; ASPARTATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.11)   NCg10248 (COG0130) [E]; Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	43.9	4.8	36.19
95	Cg1814 - (carA) [C]; CARBAMOYL PHOSPHATE SYNTHASE SMALL SUBUNIT (EC 6.3.5.5)   NCg11548 (COG0505) [EF]; Carbamoylphosphate synthase small subunit	46.6	4.9	42.12
96	Cg1453 - (leuB) [C]; 3-ISOPROPYLMALATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.85)   NCg11237 (COG0473) [E]; Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase	49.4	4.9	36.13
97	Cg2687 - (metB) [C]; Cystathionine gamma-Synthase (EC 4.2.99.9)   NCg12360 (COG0626) [E]; Cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthases	15.0	5.0	41.64
98	Cg1791 - (gap) [C]; GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.12)   NCg11526 (COG0057) [G]; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/erythrose-4-phosphate dehydrogenase	15.9	5.2	36.03
99	Cg1367 - (atpG) [C]; ATP SYNTHASE GAMMA SUBUNIT (EC 3.6.1.34)   NCg11164 (COG0224) [C]; F0F1-type ATP synthase, gamma subunit	38.2	5.0	35.72
100	Cg1791 - (gap) [C]; GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.12)   NCg11526 (COG0057) [G]; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/erythrose-4-phosphate dehydrogenase	34.4	5.2	36.03
101	Cg0655 - (tpoA) [C]; DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE ALPHA SUBUNIT (EC 2.7.7.6)   NCg10540 (COG0202) [C]; DNA-directed RNA polymerase alpha subunit / 40 kD subunit	49.1	4.5	36.65
102	Cg0267 - (pat) [C]; phenylalanine aminotransferase   NCg10215 (COG0079) [E]; Histidinol-phosphate/aromatic aminotransferase and cobyric acid decarboxylase	24.9	4.5	36.43
103	Cg2856 - (purM) [C]; PHOSPHORIBOSYL AMINOIMIDAZOLE SYNTHETASE (EC 6.3.3.1)   NCg12494 (COG0150) [F]; Phosphoribosylaminoimidazole (AIR) synthetase	19.0	4.8	37.83
104	Cg2418 - (livE) [C]; BRANCHED-CHAIN AMINO ACID AMINOTRANSFERASE (EC 2.6.1.42)   NCg12123 (COG0115) [EH]; Branched-chain amino acid aminotransferase/4-amino-4-deoxychoinismate lyase	33.2	4.8	41.67
105	Cg2536 - (aecD) [C]; Cystathionine beta-Lyase (EC 4.4.1.8, 4.4.1.-)   NCg12227 (COG1168) [E]; Bifunctional PLP-dependent enzyme with beta-cystathionase and maltose regulon repressor activities	23.9	4.8	40.71
106	Cg0387 - (adhE) [C]; PUTATIVE ZINC-TYPE ALCOHOL DEHYDROGENASE TRANSMEMB (EC 1.1.1.)   NCg10313 (COG1062) [C]; Zn-dependent alcohol dehydrogenases, class III	24.2	4.8	38.85
107	Cg0387 - (adhE) [C]; PUTATIVE ZINC-TYPE ALCOHOL DEHYDROGENASE TRANSMEMB (EC 1.1.1.)   NCg10313 (COG1062) [C]; Zn-dependent alcohol dehydrogenases, class III	24.2	4.8	38.85
108	Cg0400 - (adhG) [C]; ALCOHOL DEHYDROGENASE, CLASS C (EC 1.1.1.2)   NCg10324 (COG1064) [R]; Zn-dependent alcohol dehydrogenases	8.8	4.9	37.27
109	Cg0587 - (tuF) [C]; ELONGATION FACTOR TU   NCg0480 (COG0050) [J]; GTPases - translation elongation factors	30.1	4.9	43.83
110	Cg0700 - (guaB3) [C]; IMP dehydrogenase / GMP reductase C terminus   NCg10579 (COG0516) [F]; IMP dehydrogenase/GMP reductase	34.2	5.0	39.75
111	Cg2342 - [C]; Dehydrogenase   NCg2053	39.7	4.9	31.15
112	Cg3219 - (ldh) [C]; L-LACTATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.27)   NCg12810 (COG0039) [C]; Malate/lactate dehydrogenases	24.5	5.1	34.39
113	Cg1387 - (hxb) [C]; PUTATIVE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN, ALPHA SUBUNIT   NCg11183 (COG2025) [C]; Electron transfer flavoprotein, alpha subunit	31.2	4.4	32.13
114	Cg3422 - (trxB) [C]; THIOREDOXIN REDUCTASE (EC 1.6.4.5)   NCg12984 (COG0492) [O]; Thioredoxin reductase	52.4	4.6	34.24
115	Cg2275 - (purC) [C]; putative F0F1-type ATP synthase b subunit   NCg11996 (COG3599) [D]; Cell division initiation protein	23.2	4.6	29.45
116	Cg2874 - (purO) [C]; PHOSPHORIBOSYLAMINOIMIDAZOLE-SUCCINOCARBOXAMIDE SYNTHASE (EC 6.3.2.6)   NCg12508 (COG0152) [F];	39.1	4.6	32.97

117	Cg2613 - (mch) [C]: MALATE DEHYDROGENASE OXIDOREDUCTASE PROTEIN (EC 1.1.1.37)   Ncgl2297 (COG0039) [C]: Malate/lactate dehydrogenases	45.1	4.8	34.89
118	Cg2119 - (pftB) [C]: 1-PHOSPHOFRUCTOKINASE PROTEIN (EC 2.7.1.56)   Ncgl1860 (COG1105) [G]: Fructose-1-phosphate kinase and related fructose-6-phosphate kinase (PftB)	16.4	4.8	33.99
119	Cg2221 - (tsf) [C]: TRANSLATION ELONGATION FACTOR TS   Ncgl1949 (COG0264) [J]: Translation elongation factor Ts	38.2	4.9	29.26
120	Cg3179 - (fadD2) [C]: PUTATIVE ACYL-COA SYNTHETASE (EC 6.2.1.3)   Ncgl2774 (COG0318) [I][Q]: Acyl-CoA synthetases (AMP-forming)/AMP-acid ligases II	28.7	4.7	67.90
121	Cg0220 - [C]: Acetyltransferase, GNAT family   Ncgl0175 (COG0454) [KR]: Histone acetyltransferase HPA2 and related acetyltransferases	8.5	4.7	16.16
122	Cg0203 - (iolE) [C]: phosphate isomerases/epimerase   Ncgl0160 (COG1082) [G]: Sugar phosphate isomerases/epimerases	16.0	5.0	35.51
123	Cg3068 - (fda) [C]: fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)   Ncgl2673 (COG0191) [G]: Fructose/tagatose bisphosphate aldolase	35.8	5.0	37.20
124	Cg0898 - [C]: Pyridoxine biosynthesis enzyme   Ncgl0754 (COG0214) [H]: Pyridoxine biosynthesis enzyme	45.5	5.1	31.64
125	Cg3068 - (fda) [C]: fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)   Ncgl2673 (COG0191) [G]: Fructose/tagatose bisphosphate	66.9	5.0	37.20
126	Cg0898 - [C]: Pyridoxine biosynthesis enzyme   Ncgl0754 (COG0214) [H]: Pyridoxine biosynthesis enzyme	27.8	5.1	31.64
127	Cg1655 - (thiM) [C]: HYDROXYETHYLTHIAZOLE KINASE (EC 2.7.1.50)   Ncgl1408 (COG2145) [H]: Hydroxyethylthiazole kinase, sugar kinase family	32.8	4.5	26.89
128	Cg3364 - (trpA) [C]: TRYPTOPHAN SYNTHASE ALPHA CHAIN (EC 4.2.1.20)   Ncgl2932 (COG0159) [E]: Tryptophan synthase alpha chain	26.4	4.5	29.06
129	Cg2661 - [C]: putative dithiol-disulfide isomerase involved in polyketide biosynthesis   Ncgl2339	19.7	4.6	22.73
130	Cg2558 - [C]: related to aldose 1-epimerase   Ncgl2246 (COG0676) [G]: Uncharacterized enzymes related to aldose 1-epimerase	46.7	4.6	27.55
131	Cg2221 - (tsf) [C]: TRANSLATION ELONGATION FACTOR TS   Ncgl1949 (COG0264) [J]: Translation elongation factor Ts	24.4	4.9	29.26
132	Cg0349 - [C]: METALLO-BETA-LACTAMASE SUPERFAMILY PROTEIN   Ncgl0285 (COG0491) [R]: Zn-dependent hydrolases, including glyoxylases	32.4	4.9	30.97
133	Cg1779 - (opcA) [C]: putative subunit of glucose-6-P dehydrogenase   Ncgl1515 (COG3429) [G]: Glucose-6-P dehydrogenase subunit	25.7	4.9	34.78
134	Cg2221 - (tsf) [C]: TRANSLATION ELONGATION FACTOR TS   Ncgl1949 (COG0264) [J]: Translation elongation factor Ts	20.7	4.9	29.26
135	Cg2221 - (tsf) [C]: TRANSLATION ELONGATION FACTOR TS   Ncgl1949 (COG0264) [J]: Translation elongation factor Ts	51.6	4.9	29.26
136	Cg2161 - (dapA) [C]: DIHYDRODIPICOLINATE SYNTHASE (EC 4.2.1.52)   Ncgl1896 (COG0329) [EM]: Dihydrodipicolinate synthase/N-acetylneuraminase lyase	15.9	4.9	31.24
137	Cg2342 - [C]: Dehydrogenase   Ncgl2053	39.7	4.9	31.15
138	Cg3115 - (gysD) [C]: Sulfate Adenyltransferase Subunit 2 (EC 2.7.7.4)   Ncgl2716 (COG0175) [E][H]: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate sulfoltransferase (PAPS reductase)/FAD synthetase and related enzymes	41.4	5.1	34.33
139	Cg2734 - (pncA) [C]: NICOTINAMIDASE/PYRAZINAMIDASE (EC 3.5.1.-)   Ncgl2401 (COG1335) [Q]: Amidases related to nicotinamidase	28.5	4.6	20.10
140	Cg2958 - (butA) [C]: L-2,3-butanediol dehydrogenase/acetoin reductase (EC 1.1.1.5)   Ncgl2582 (COG1028) [QR]: Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	41.1	4.6	27.05
141	Cg2103 - (dtxR) [C]: IRON DEPENDENT REGULATORY PROTEIN - DTXR HOMOLOG   Ncgl1845 (COG1321) [K]: Mn-dependent transcriptional regulator	47.4	4.7	25.47
142	Cg2445 - (hmuO) [C]: PROBABLE HEME OXYGENASE (EC 1.14.99.3)   Ncgl2146 (COG5398) [F]: Heme oxygenase	73.0	4.7	24.11
143	Cg0999 - [C]: PUTATIVE MOLYBDENUM COFACTOR BIOSYNTHESIS PROTEIN   Ncgl0842 (COG0521) [H]: Molybdopterin biosynthesis enzymes	37.4	4.7	20.08
144	Cg2761 - [C]: Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily III   Ncgl2422 (COG1234) [R]: Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily III	23.1	4.7	27.47
145	Cg1386 - (fixA) [C]: PUTATIVE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN, BETA SUBUNIT   Ncgl1182 (COG2086) [C]: Electron transfer flavoprotein, beta subunit	40.8	4.7	27.20
146	Cg2445 - (hmuO) [C]: PROBABLE HEME OXYGENASE (EC 1.14.99.3)   Ncgl2146 (COG5398) [F]: Heme oxygenase	27.0	4.7	24.11
147	Cg0482 - (gpmA) [C]: PHOSPHOGLYCEROMUTASE 1 (EC 5.4.2.1)   Ncgl0390 (COG0588) [G]: Phosphoglycerate mutase 1	42.7	4.9	27.23
148	Cg2902 - [C]: Predicted hydrolases of the HAD superfamily   Ncgl2530 (COG0561) [R]: Predicted hydrolases of the HAD superfamily	30.6	4.8	29.63
149	Cg1206 - [C]: PEP phosphonmutase or related enzyme   Ncgl1015 (COG2513) [G]: PEP phosphonmutase and related	25.5	4.5	23.85
150	Cg1789 - (tpi) [C]: TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE (EC 5.3.1.1)   Ncgl1524 (COG0149) [G]: Triosephosphate	44.0	4.8	27.18
151	Cg0482 - (gpmA) [C]: PHOSPHOGLYCEROMUTASE 1 (EC 5.4.2.1)   Ncgl0390 (COG0588) [G]: Phosphoglycerate mutase 1	43.5	4.9	27.23
152	Cg0825 - [C]: short chain dehydrogenase, N-terminal fragment   Ncgl0689 (COG1028) [QR]: Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	34.2	5.0	27.85
153	Cg2297 - (hisF) [C]: PROBABLE CYCLASE (IMIDAZOLE GLYCEROL PHOSPHATE SYNTHASE-SUBUNIT) (EC 2.4.2.-)   Ncgl2013 (COG0107) [E]: Imidazoleglycerol-phosphate synthase	39.5	5.0	27.23
154	Cg2091 - (ppgK) [C]: POLYPHOSPHATE GLUCOKINASE (EC 2.7.1.2)   Ncgl1835 (COG1940) [K][G]: Transcriptional regulator/sugar kinase	27.6	5.0	26.67
155	Cg0404 - [C]: Nitroreductase family   Ncgl0328 (COG0778) [C]: Nitroreductase	43.0	4.9	21.20
156	Cg2863 - (purQ) [C]: PHOSPHORIBOSYLFORMYL GLYCINAMIDINE SYNTHASE (EC 6.3.5.3)   Ncgl2500 (COG0047) [F]: Phosphoribosylformylglycinamide (FGAM) synthase, glutamine amidotransferase domain	26.5	5.1	23.52
157	Cg2954 - (cynI) [C]: CARBONIC ANHYDRASE (EC 4.2.1.1)   Ncgl2579 (COG0288) [F]: Carbonic anhydrase	20.3	5.1	22.21

158	Cg1825 - (efp) [C]: Translation elongation factor P/translation initiation factor 5A (eIF-5A) [P]/translation initiation factor 5A (eIF-5A)   NCgl1557 (COG0231) [J]: Translation elongation factor P (EF-P)	32.1	5.1	20.62
159	Cg1236 - (tpx) [C]: THIOL PEROXIDASE (EC 1.1.1.1.-)   NCgl1041 (COG2077) [O]: Peroxiredoxin	47.0	4.4	17.79
160	Cg1718 - [C]: Phospholipid-binding protein   NCgl1466 (COG1881) [R]: Phospholipid-binding protein	42.9	4.5	18.92
161	Cg0048 - (ppiA) [C]: PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE B (EC 5.2.1.8)   NCgl0033 (COG0652) [O]: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase) - cyclophilin family	47.1	4.7	18.48
162	Cg3050 - [C]: acyltransferase   NCgl2659 (COG2153) [R]: Predicted acyltransferase	39.6	4.6	20.15
163	Cg1322 - [C]: conserved hypothetical protein   NCgl1123 (COG2353) [S]: Uncharacterized conserved protein	61.5	4.7	19.28
164	Cg2644 - (clpP2) [C]: ATP-DEPENDENT CLP PROTEASE PROTEOLYTIC SUBUNIT CLPP2 (EC 3.4.21.92)   NCgl2327 (COG0740) [OUJ]: Protease subunit of ATP-dependent Clp proteases	30.3	4.8	23.02
165	Cg2830 - (pduO) [C]: ADENOSYLCOBALAMIN-DEPENDENT DIOL DEHYDRATASE GAMMA (EC 4.2.1.28)   NCgl2471 (COG2096) [S]: Uncharacterized conserved protein	25.3	5.0	21.00
166	Cg3237 - (sod) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)   NCgl2826 (COG0605) [P]: Superoxide dismutase	32.0	5.1	22.08
167	Cg2782 - (ftn) [C]: Ferritin-like protein   NCgl2439 (COG1528) [P]: Ferritin-like protein	25.9	4.4	18.05
168	Cg3315 - [C]: Bacterial regulatory protein, MarR family   NCgl2886 (COG1846) [K]: Transcriptional regulators	44.6	4.9	17.95
169	Cg2658 - (tpi) [C]: POSSIBLE PHOSPHOPENTOSE ISOMERASE (EC 5.3.1.6)   NCgl2337 (COG0698) [G]: Ribose 5-phosphate isomerase RpiB	39.5	5.1	16.97

## Liste aller identifizierten Proteine im pH-Bereich 4,9-6,9

Proben Nr.	Proteininformation	Coverage	pI	Masse [kDa]
1	Cg0583 - (fusA) [C]: ELONGATION FACTOR G   NCg0478 (COG0480) [J]: Translation elongation factors (GTPases)	29.1	4.8	77.87
2	Cg1248 - [C]: GTPase involved in stress response   NCg1053 (COG1217) [T]: Predicted membrane GTPase involved in stress response	33.6	4.9	68.98
3	Cg2559 - (aceB) [C]: MALATE SYNTHASE (EC 4.1.3.2)   NCg2247 (COG2225) [C]: Malate synthase	20.6	5.0	82.34
4	Cg2695 - [C]: ABC-type transport system, ATPase component   NCg2368 (COG0488) [R]: ATPase components of ABC transporters with duplicated ATPase domains	17.6	5.0	62.12
5	Cg0310 - (katA) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   NCg10251 (COG0753) [F]: Catalase	23.3	5.2	58.69
6	Cg0310 - (katA) [C]: CATALASE (EC 1.11.1.6)   NCg10251 (COG0753) [F]: Catalase	27.9	5.2	58.69
7	Cg1432 - (livD) [C]: DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE (EC 4.2.1.9)   NCg1219 (COG0129) [EG]: Dihydroxyacid dehydratase/phosphogluconate dehydratase	24.5	5.2	64.66
8	Cg0446 - (sdhA) [C]: succinate dehydrogenase A (EC 1.3.99.1)   NCg0360 (COG1053) [C]: Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunits	22.9	5.4	74.66
9	Cg0446 - (sdhA) [C]: succinate dehydrogenase A (EC 1.3.99.1)   NCg0360 (COG1053) [C]: Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunits	43.1	5.4	74.66
10	Cg1333 - (argS) [C]: ARGINYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.19)   NCg1132 (COG0018) [J]: Arginyl-tRNA synthetase	24.4	4.9	59.71
11	Cg2333 - (treZ) [C]: MALTO-OLIGOSYL-TREHALOSE TREHALOHYDROLASE (EC 3.2.1.141)   NCg2045 (COG0296) [G]: 1,4-alpha-glucan branching enzyme	19.1	5.0	62.71
12	Cg1778 - (zwf) [C]: GLUCOSE-6-PHOSPHATE 1-DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.49)   NCg1514 (COG0364) [G]: Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	17.3	5.0	57.49
13	Cg2192 - (mqo) [C]: MALATE:QUINONE OXIDOREDUCTASE (EC 1.1.99.16)   NCg1926 (COG0579) [R]: Predicted dehydrogenase	21.2	5.2	54.81
14	Cg0984 - (putH) [C]: (Q9RHX6) 5'-PHOSPHORIBOSYL-5-AMINOIMIDAZOLE-4-CARB (EC 2.1.2.3)   NCg0827 (COG0138) [F]: AICAR transformylase/IMP cyclohydrolase PurH (only IMP cyclohydrolase domain in AflII)	34.8	5.3	55.74
15	Cg2891 - (poxB) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.2.2)   NCg2521 (COG0028) [EH]: Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboxylase, phosphopyruvate decarboxylase]	30.2	5.3	61.93
16	Cg3118 - (cys) [C]: Sulfite Reductase (Hemoprotein) (EC 1.8.1.2)   NCg2718 (COG0155) [F]: Sulfite reductase, beta subunit (hemoprotein)	41.5	5.5	62.98
17	Cg1697 - (aspA) [C]: ASPARTATE AMMONIA-LYASE (ASPARTASE) (EC 4.3.1.1)   NCg1446 (COG1027) [E]: Aspartate ammonia-lyase	18.8	5.7	57.55
18	Cg0699 - (guaB2) [C]: INOSITOL-MONOPHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.205)   NCg0578 (COG0516) [F]: IMP dehydrogenase/GMP reductase	20.6	6.0	53.34
19	Cg2964 - (guaB1) [C]: INOSITOL-MONOPHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.205)   NCg2586 (COG0516) [F]: IMP dehydrogenase/GMP reductase	24.1	6.4	50.80
20	Cg2391 - (aroG) [C]: PHOSPHO-2-DEHYDRO-3-DEOXYHEPTONATE ALDOLASE (EC 4.1.2.15)   NCg2098 (COG3200) [E]: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase	19.3	4.9	50.88
21	Cg1145 - (fum) [C]: FUMARATE HYDRATASE (EC 4.2.1.2)   NCg0967 (COG0114) [C]: Fumarate	23.5	5.1	49.75
22	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)   NCg2480 (COG0427) [C]: Acetyl-CoA hydrolase	33.7	5.1	54.50
23	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)   NCg2480 (COG0427) [C]: Acetyl-CoA hydrolase	17.9	5.1	54.50
24	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)   NCg2480 (COG0427) [C]: Acetyl-CoA hydrolase	40.8	5.1	54.50
25	Cg3063 - (purA) [C]: ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE (EC 6.3.4.4)   NCg2669 (COG0104) [F]: Adenylosuccinate synthase	22.8	5.2	46.75
26	Cg2499 - (glyS) [C]: GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE--TRNA LIGASE) (EC 6.1.1.14)   NCg2198 (COG0423) [J]: Glycyl-tRNA synthetase, class II	39.9	5.3	53.03
27	Cg2291 - (pyb) [C]: PYRUVATE KINASE (EC 2.7.1.40)   NCg2008 (COG0469) [G]: Pyruvate kinase	21.0	5.4	51.61
28	Cg3426 - (patB) [C]: Predicted transcriptional regulator involved in chromosome partitioning   NCg2988 (COG1475) [K]: Predicted transcriptional regulators	14.0	5.4	40.62
29	Cg3096 - [C]: ALDEHYDE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.3)   NCg2698 (COG1012) [C]: NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	40.1	5.0	55.09
30	Cg1763 - (sufD) [C]: components of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter   NCg1502 (COG0719) [O]: ABC-type transport system involved in Fe-S cluster assembly, permease component	48.2	5.2	42.26
31	Cg1763 - (sufD) [C]: components of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter   NCg1502 (COG0719) [O]: ABC-type transport system involved in Fe-S cluster assembly, permease component	30.9	5.2	42.26
32	Cg0949 - (gltA) [C]: CITRATE SYNTHASE (EC 4.1.3.7)   NCg0795 (COG0372) [C]: Citrate synthase	13.7	5.2	48.91
33	Cg2900 - (ddh) [C]: MESO-DIAMINOPIMELATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.1.16)   NCg2528	15.9	5.2	35.18
34	Cg2900 - (ddh) [C]: MESO-DIAMINOPIMELATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.1.16)   NCg2528	37.8	5.2	35.18
35	Cg1133 - (glyA) [C]: Serine Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)   NCg0954 (COG0112) [E]: Glycine/serine hydroxymethyltransferase	44.5	5.4	46.52
36	Cg0441 - (pzd) [C]: DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE (EC 1.8.1.4)   NCg0355 (COG1249) [C]: Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex,	21.1	5.4	50.63

37	Cg2280 - (gdh) [C]: NADP-SPECIFIC GLUTAMATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.1.4)   NCg11999 (COG0334) [E]: Glutamate dehydrogenase/leucine dehydrogenase	38.0	5.6	48.97
38	Cg0790 - (lpaA) [C]: DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE (EC 1.8.1.4)   NCg10658 (COG1249) [C]: Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) component, and related enzymes	18.6	5.6	49.52
39	Cg3149 - [C]: Aminotransferases class-I   NCg12747 (COG0436) [E]: Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	23.1	5.5	48.68
40	Cg3227 - (lldA) [C]: PUTATIVE L-LACTATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.2.3)   NCg22817 (COG1304) [C]: L-lactate dehydrogenase (FMN-dependent) and related alpha-hydroxy acid dehydrogenases	26.4	5.7	45.70
41	Cg0755 - (metY) [C]: O-Acetylthioserine (Thio)-Lyase (EC 4.2.99.10)   NCg10625 (COG2873) [E]: O-acetylthioserine sulphydrylase	56.1	5.1	46.73
42	Cg1157 - (glpX) [C]: GLFX-LIKE PROTEIN   NCg10976 (COG1494) [G]: Fructose-1,6-bisphosphatase/sedoheptulose 1,7-bisphosphatase and related proteins	30.4	5.1	35.35
43	Cg1791 - (gap) [C]: GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.12)   NCg11526 (COG0057) [G]: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/erythrose-4-phosphate dehydrogenase	36.2	5.2	36.03
44	Cg1761 - (nifS2) [C]: CYSTEINE DESULPHYDRASE / SELENOCYSTEINE LYASE (EC 4.4.1.)   NCg11500 (COG0520) [E]: Selenocysteine lyase	23.5	5.3	45.78
45	Cg0518 - (hemL) [C]: GLUTAMATE-1-SEMIALDEHYDE 2,1-AMINOMUTASE (EC 5.4.3.8)   NCg10422 (COG0001) [F]: Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	28.4	5.4	46.00
46	Cg2515 - (dnaJ2) [C]: Molecular chaperone (contain C-terminal Zn finger domain), putative transcriptional repressor   NCg12210 (COG0484) [O]: DnaJ-class molecular chaperone with C-terminal Zn finger domain	11.0	5.4	40.64
47	Cg3363 - (trpX) [C]: TRYPTOPHAN SYNTHASE BETA CHAIN (EC 4.2.1.20)   NCg12931 (COG0133) [E]: Tryptophan synthase beta chain	35.3	5.5	44.78
48	Cg2708 - (msiK1) [C]: ABC-type sugar transport system, ATPase component   NCg12377 (COG3839) [G]: ABC-type sugar transport systems, ATPase components	39.4	5.5	40.30
49	Cg2214 - [C]: Predicted Fe-S-cluster redox enzyme   NCg11944 (COG0820) [R]: Predicted Fe-S-cluster redox enzyme	16.7	6.1	40.01
50	Cg1432 - (ilvD) [C]: DIHYDROXY-ACID DEHYDRATASE (EC 4.2.1.9)   NCg11219 (COG0129) [E]: Dihydroxyacid dehydratase/phosphoglucuronate dehydratase	19.1	5.2	64.66
51	Cg2377 - (mraW) [C]: S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase involved in cell envelope biogenesis   NCg12086 (COG0275) [M]: Predicted S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase involved in cell envelope biogenesis	15.7	5.4	36.79
52	Cg1367 - (atpG) [C]: ATP SYNTHASE GAMMA SUBUNIT (EC 3.6.1.34)   NCg11164 (COG0224) [C]: F0F1-type ATP synthase, gamma subunit	27.4	5.0	35.72
53	Cg3374 - [C]: PUTATIVE NADH-DEPENDENT FLAVIN OXIDOREDUCTASE   NCg12942 (COG1902) [C]: NADH:flavin oxidoreductases, Old Yellow Enzyme family	17.5	5.1	38.60
54	Cg3107 - (adhA) [C]: Zn-dependent alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)   NCg12709 (COG1064) [R]: Zn-dependent alcohol dehydrogenases	16.2	5.2	36.79
55	Cg3014 - [C]: hypothetical protein predicted by Glimmer/Catlica   NCg12624	46.1	5.2	35.16
56	Cg3107 - (adhA) [C]: Zn-dependent alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)   NCg12709 (COG1064) [R]: Zn-dependent alcohol dehydrogenases	30.1	5.2	36.79
57	Cg2206 - (ispG) [C]: involved in the nonmevalonate pathway of terpenoid biosynthesis   NCg11938 (COG0821) [I]: Enzyme involved in the deoxyxylulose pathway of isoprenoid biosynthesis	14.9	5.5	42.56
58	Cg1409 - (pftA) [C]: 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE (EC 2.7.1.11)   NCg11202 (COG0205) [G]: 6-phosphofructokinase	56.9	5.5	37.07
59	Cg1409 - (pftA) [C]: 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE (EC 2.7.1.11)   NCg11202 (COG0205) [G]: 6-phosphofructokinase	26.8	5.5	37.07
60	Cg1075 - (prsA) [C]: PHOSPHORIBOSYL PYROPHOSPHATE SYNTHASE ISOZYME 2 PR (EC 2.7.6.1)   NCg10905 (COG0462) [FE]: Phosphoribosylpyrophosphate synthetase	35.7	5.6	35.53
61	Cg0700 - (guaB3) [C]: IMP dehydrogenase / GMP reductase C terminus   NCg10579 (COG0516) [F]: IMP dehydrogenase/GMP reductase	32.9	5.0	39.75
62	Cg3319 - [C]: Uncharacterized enzyme related to sulfrutransferases   NCg12890 (COG1054) [R]: Predicted sulfrutransferase	20.5	5.0	35.06
63	Cg2104 - (galE) [C]: UDP-GLUCOSE 4-EPIMERASE (EC 5.1.3.2)   NCg11846 (COG1087) [M]: UDP-glucose 4-epimerase	18.2	5.0	35.25
64	Cg3214 - [C]: conserved hypothetical protein   NCg12806	21.7	4.9	31.69
65	Cg2109 - (oxyR) [C]: HYDROGEN PEROXIDE SENSING REGULATOR   NCg11850 (COG0583) [K]: Transcriptional regulator	16.5	5.0	35.04
66	Cg3068 - (fda) [C]: fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)   NCg12673 (COG0191) [G]: Fructose/tagatose bisphosphate aldolase	33.4	5.0	37.20
67	Cg0779 - (trpS) [C]: TRYPTOPHAN TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.2)   NCg10647 (COG0180) [I]: Tryptophanyl-tRNA synthetase	21.4	5.1	37.81
68	Cg3219 - (ldh) [C]: L-LACTATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.27)   NCg12810 (COG0039) [C]: Malate/lactate dehydrogenases	41.7	5.1	34.39
69	Cg0773 - [C]: PUTATIVE EXODEOXYRIBONUCLEASE (EC 3.1.1.2)   NCg10641 (COG0708) [L]: Exonuclease III	21.9	5.1	35.52
70	Cg1215 - (nadQ) [C]: PUTATIVE NICOTINATE-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHORYLASE ( EC 2.4.2.19)   NCg11023 (COG0157) [H]: Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	49.1	5.2	29.36
71	Cg2795 - [C]: NADPH quinone reductase or related Zn-dependent oxidoreductase   NCg12449 (COG0604) [CR]: NADPH:quinone reductase and related Zn-dependent oxidoreductases	24.4	5.3	35.82
72	Cg2222 - (rpsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2   NCg11950 (COG0052) [I]: Ribosomal protein S2	61.4	5.3	30.10
73	Cg3068 - (fda) [C]: fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)   NCg12673 (COG0191) [G]: Fructose/tagatose bisphosphate aldolase	34.0	5.0	37.20
74	Cg1698 - (hisG) [C]: ATP PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (EC 2.4.2.17)   NCg11447 (COG0040) [E]: ATP phosphoribosyltransferase	50.2	5.2	30.21
75	Cg1266 - (trmA) [C]: RRNA GUANINE-N1-METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.51)   NCg11070 (COG0500) [CR]: SAIM-dependent methyltransferases	31.9	5.3	30.69

76	Cg0750 - (foI) [C]: METHYLENETETRAHYDROFOLATE DEHYDROGENASE (EC 1.5.1.5)   NCg0620 (COG0190) [FH]: 5,10-methylene-tetrahydro folate dehydrogenase/Methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase	26.8	5.5	30.13
77	Cg0457 - (purU) [C]: PROBABLE FORMYLTETRAHYDROFOLATE DEFORMYLASE PROTEIN (EC 3.5.1.10)   NCg0371 (COG0788) [F]: Formyltetrahydrofolate hydrolase	30.6	5.7	34.24
78	Cg2847 - [C]: GCN5-related N-acetyltransferase   NCg2487 (COG0456) [R]: Acetyltransferases	22.9	5.9	32.12
79	Cg0237 - [C]: PUTATIVE OXIDOREDUCTASE   NCg0186 (COG1028) [QR]: Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	27.3	5.8	26.70
80	Cg0488 - (ppx1) [C]: EXOPLYPHOSPHATASE (EC 3.6.1.)   NCg0396 (COG0248) [FP]: Exopolyphosphatase	23.9	5.9	33.02
81	Cg0898 - [C]: Pyridoxine biosynthesis enzyme   NCg0754 (COG0214) [H]: Pyridoxine biosynthesis enzyme	37.5	5.1	31.64
82	Cg3115 - (cysD) [C]: Sulfate Adenylyltransferase Subunit 2 (EC 2.7.7.4)   NCg2716 (COG0175) [EH]: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase (PAPS reductase)/FAD synthetase and related enzymes	46.1	5.1	34.33
83	Cg1338 - (thrB) [C]: Homoserine Kinase (EC 2.7.1.39)   NCg1137 (COG0083) [E]: Homoserine kinase	14.9	5.0	32.60
84	Cg0867 - [C]: Ribosome-associated protein Y (Fsrp-1)   NCg0725 (COG1544) [J]: Ribosome-associated protein Y (Fsrp-1)	45.2	5.4	24.56
85	Cg0482 - (gpmA) [C]: PHOSPHOGLYCEROMUTASE 1 (EC 5.4.2.1)   NCg0390 (COG0588) [GI]: Phosphoglycerate mutase 1	48.0	4.9	27.23
86	Cg1762 - (sucC) [C]: Iron-regulated ABC transporter ATPase subunit   NCg1501 (COG0396) [O]: ABC-type transport system involved in Fe-S cluster assembly, ATPase component	36.9	5.0	27.62
87	Cg2297 - (hisF) [C]: PROBABLE CYCLASE (IMIDAZOLE GLYCEROL PHOSPHATE SYNTHASE-SUBUNIT) (EC 2.4.2.-)   NCg2013 (COG0107) [E]: Imidazolglycerol-phosphate synthase	41.5	5.0	27.23
88	Cg1365 - (atpH) [C]: H+ATPASE DELTA SUBUNIT   NCg1162 (COG0712) [C]: F0F1-type ATP synthase, delta subunit (mitochondrial oligomycin sensitivity protein)	39.9	5.4	28.86
89	Cg0589 - [C]: ABC TRANSPORTER, NUCLEOTIDE BINDING/ATPASE PROTEIN   NCg0482 (COG1120) [FH]: ABC-type cobalamin/Fe <sup>3</sup> +siderophores transport systems, ATPase components	30.3	5.5	28.92
90	Cg1903 - [C]: ABC-type multidrug transport system, ATPase component   NCg1623 (COG1131) [V]: ABC-type multidrug transport system, ATPase component	43.7	5.9	22.28
91	Cg0556 - (ubiE) [C]: UBIQUINONE/MENAOQUINONE BIOSYNTHESIS METHYLTRANSFER (EC 2.1.1.-)   NCg0454 (COG2226) [H]: Methylase involved in ubiquinone/menaoquinone biosynthesis	29.1	6.2	25.23
92	Cg2983 - (foI) [C]: GTP CYCLOHYDROLASE (EC 3.5.4.16)   NCg2602 (COG0302) [FH]: GTP cyclohydrolase I	42.8	6.1	22.01
93	Cg0404 - [C]: Nitroreductase family   NCg0328 (COG0778) [C]: Nitroreductase	34.7	4.9	21.20
94	Cg1620 - [C]: SAM-dependent methyltransferase   NCg1376 (COG0500) [QR]: SAM-dependent methyltransferases	22.1	5.5	30.07
95	Cg2863 - (purQ) [C]: PHOSPHORIBOSYLFORMYL GLYCINAMIDINE SYNTHASE (EC 6.3.5.3)   NCg2500 (COG0047) [F]: Phosphoribosylformylglycinamide (FGAM) synthase, glutamine amidotransferase domain	47.5	5.1	23.52
96	Cg2218 - (pyrH) [C]: UMP-KINASE (EC 2.7.4.-)   NCg1948 (COG0528) [F]: Uridylate kinase	45.3	5.1	26.17
97	Cg2830 - (pduO) [C]: ADENOSYLCOBALAMIN-DEPENDENT DIOL DEHYDRATASE GAMMA (EC 4.2.1.28)   NCg2471 (COG2096) [S]: Uncharacterized conserved protein	48.9	5.0	21.00
98	Cg3237 - (sod) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)   NCg2826 (COG0605) [F]: Superoxide dismutase	38.5	5.1	22.08
99	Cg2237 - (sod) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)   NCg2826 (COG0605) [F]: Superoxide dismutase	46.0	5.1	22.08
100	Cg1358 - [C]: Putative translation factor (SUA5)   NCg1155 (COG0009) [J]: Putative translation factor (SUA5)	15.7	5.3	22.61
101	Cg3071 - (pyrE) [C]: OROTATE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (EC 2.4.2.10)   NCg2676 (COG0461) [F]: Orotate phosphoribosyltransferase	50.0	5.4	19.43
102	Cg0572 - (rplJ) [C]: 50S RIBOSOMAL PROTEIN L10   NCg0468 (COG0244) [J]: Ribosomal protein L10	71.9	5.6	17.94
103	Cg2692 - [C]: Predicted thioesterase   NCg2365 (COG0824) [R]: Predicted thioesterase	58.7	5.0	17.40
104	Cg2658 - (rpi) [C]: POSSIBLE PHOSPHOPENTOSE ISOMERASE (EC 5.3.1.6)   NCg2337 (COG0698) [G]: Ribose 5-phosphate isomerase RpiB	39.5	5.1	16.97

## Anhang II

Folgende Tabellen stellen eine vollständige Auflistung aller mittels MALDI-ToF identifizierten Proteine dar.

Die Nummern entsprechen denen auf Seite 147 Abbildung 5-58 (Referenzkarte im pH-Bereich 3.4 – 5.4, Schüttelkolbenanzucht) und Seite 148 Abbildung 5-59 (Referenzkarte im pH-Bereich 4.9 – 6.9, Schüttelkolbenanzucht) gekennzeichneten Proteine.

Identifikation mit der Vorgabe von mind. 5 gematchten Peptiden, Abweichung des theoretischen pIs zum gefundenen pI < 0.5 pH-Einheiten und Abweichung der theoretischen Masse zur gefundenen Masse < 20%

## Liste aller identifizierten Proteine im pH-Bereich 3,4-5,4

Sample	Protein information	Coverage	pI	Mass [kDa]
1	Cg2421 - (sucB) [C]: DIHYDROLIPOAMIDE SUCCINYLTRANSFERASE (EC 2.3.1.61)   NCg2126 (COG0508) [C]: Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydropolipoamide acyltransferase (E2) component, and related enzymes	15,9	4,3	70,89
2	Cg1737 - (acn) [C]: ACONITASE (EC 4.2.1.3)   NCg1482 (COG1048) [C]: Aconitase A	39,8	4,5	102,15
3	Cg1737 - (acn) [C]: ACONITASE (EC 4.2.1.3)   NCg1482 (COG1048) [C]: Aconitase A	33,2	4,5	102,15
4	Cg1737 - (acn) [C]: ACONITASE (EC 4.2.1.3)   NCg1482 (COG1048) [C]: Aconitase A	31	4,5	102,15
5	Cg0576 - (rpoB) [C]: DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE BETA CHAIN (EC 2.7.7.6)   NCg0471 (COG0085) [K]: DNA-directed RNA polymerase beta subunit/140 kD subunit (split gene in Mjan, Mthe, Aful)	14,3	4,9	128,77
6	Cg0576 - (rpoB) [C]: DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE BETA CHAIN (EC 2.7.7.6)   NCg0471 (COG0085) [K]: DNA-directed RNA polymerase beta subunit/140 kD subunit (split gene in Mjan, Mthe, Aful)	14,3	4,9	128,77
7	Cg2496 - [S]: putative secreted protein   NCg2195	14,5	4,6	72,27
8	Cg2862 - (purL) [C]: PHOSPHORIBOSYLFORMYLGLYCINAMIDINE SYNTHASE (EC 6.3.5.3)   NCg2499 (COG0046) [F]: Phosphoribosylformylglycinamide (FGAM) synthase, synthetase domain	30,3	4,5	80,82
9	Cg2862 - (purL) [C]: PHOSPHORIBOSYLFORMYLGLYCINAMIDINE SYNTHASE (EC 6.3.5.3)   NCg2499 (COG0046) [F]: Phosphoribosylformylglycinamide (FGAM) synthase, synthetase domain	24,1	4,5	80,82
10	Cg3169 - (pck) [C]: PROBABLE PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE PROTEIN (EC 4.1.1.32)   NCg2765 (COG1274) [C]: Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	37,5	4,6	66,86
11	Cg3169 - (pck) [C]: PROBABLE PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE PROTEIN (EC 4.1.1.32)   NCg2765 (COG1274) [C]: Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	35,9	4,6	66,86
12	Cg3169 - (pck) [C]: PROBABLE PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE PROTEIN (EC 4.1.1.32)   NCg2765 (COG1274) [C]: Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	38,6	4,6	66,86
13	Cg3169 - (pck) [C]: PROBABLE PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE PROTEIN (EC 4.1.1.32)   NCg2765 (COG1274) [C]: Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	22,1	4,6	66,86
14	Cg2523 - (malC) [C]: 4-ALPHA-GLUCANOTRANSFERASE (EC 2.4.1.25)   NCg2217 (COG1640) [C]: 4-alpha-glucanotransferase	23,7	4,7	78,51
15	Cg2523 - (malC) [C]: 4-ALPHA-GLUCANOTRANSFERASE (EC 2.4.1.25)   NCg2217 (COG1640) [C]: 4-alpha-glucanotransferase	19,3	4,7	78,51
16	Cg0583 - (fusA) [C]: ELONGATION FACTOR G   NCg0478 (COG0480) [J]: Translation elongation factors (GTPases)	12,3	4,8	77,87
17	Cg0583 - (fusA) [C]: ELONGATION FACTOR G   NCg0478 (COG0480) [J]: Translation elongation factors (GTPases)	31,7	4,8	77,87
18	Cg0583 - (fusA) [C]: ELONGATION FACTOR G   NCg0478 (COG0480) [J]: Translation elongation factors (GTPases)	29,6	4,8	77,87
19	Cg0583 - (fusA) [C]: ELONGATION FACTOR G   NCg0478 (COG0480) [J]: Translation elongation factors (GTPases)	20,6	4,8	77,87
20	Cg1290 - (metE) [C]: Homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)   NCg1094 (COG0620) [E]: Methionine synthase II (cobalamin-independent)	31,8	4,8	81,3
21	Cg1290 - (metE) [C]: Homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)   NCg1094 (COG0620) [E]: Methionine synthase II (cobalamin-independent)	39,9	4,8	81,3
22	Cg1290 - (metE) [C]: Homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)   NCg1094 (COG0620) [E]: Methionine synthase II (cobalamin-independent)	40,7	4,8	81,3
23	Cg0303 - (leuA) [C]: 2-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE (EC 4.1.3.12)   NCg0245 (COG0119) [E]: Isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthases	46,9	4,8	68,17
24	Cg0303 - (leuA) [C]: 2-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE (EC 4.1.3.12)   NCg0245 (COG0119) [E]: Isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthases	46,8	4,8	68,17
25	Cg3195 - [C]: Flavin-containing monooxygenase (FMO)   NCg2787 (COG2072) [F]: Predicted flavoprotein involved in K+ transport	22	4,9	66,68
26	Cg3195 - [C]: Flavin-containing monooxygenase (FMO)   NCg2787 (COG2072) [F]: Predicted flavoprotein involved in K+ transport	18,1	4,9	66,68
27	Cg3100 - (dnaK) [C]: Heat shock protein hsp70   NCg2702 (COG0443) [O]: Molecular chaperone	56,1	4,6	66,27
28	Cg3100 - (dnaK) [C]: Heat shock protein hsp70   NCg2702 (COG0443) [O]: Molecular chaperone	38,3	4,6	66,27

29	Cg1531 - (rpsA) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S1   NCg11304 (COG0539) [J]: Ribosomal protein S1	56,8	4,6	54,01
30	Cg1531 - (rpsA) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S1   NCg11304 (COG0539) [J]: Ribosomal protein S1	49,6	4,6	54,01
31	Cg1531 - (rpsA) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S1   NCg11304 (COG0539) [J]: Ribosomal protein S1	43,4	4,6	54,01
32	Cg2117 - (ptsI) [C]: PHOSPHOENOLPYRUVATE:SUGAR PHOSPHOTRANSFERASE SYSTEM ENZYME1 (EC 2.7.3.9)   NCg11858 (COG1080) [G]: Phosphoenolpyruvate-protein kinase (PTS system EI component in bacteria)	41,5	4,6	59,65
33	Cg3011 - (groEL) [C]: Chaperonin cpn60 (60Kd subunit)   NCg22621 (COG0459) [O]: Chaperonin GroEL (HSP60 family)	51,1	4,7	57,34
34	Cg3011 - (groEL) [C]: Chaperonin cpn60 (60Kd subunit)   NCg22621 (COG0459) [O]: Chaperonin GroEL (HSP60 family)	26,3	4,7	57,34
35	Cg0693 - (groEL) [C]: 60 KDA CHAPERONIN (PROTEIN CPN60) (GROEL PROTEIN) C-terminal fragment   NCg10573 (COG0459) [O]: Chaperonin GroEL (HSP60 family)	45,8	4,8	45,24
36	Cg3011 - (groEL) [C]: Chaperonin cpn60 (60Kd subunit)   NCg22621 (COG0459) [O]: Chaperonin GroEL (HSP60 family)	13,5	4,7	57,34
37	Cg0693 - (groEL) [C]: 60 KDA CHAPERONIN (PROTEIN CPN60) (GROEL PROTEIN) C-terminal fragment   NCg10573 (COG0459) [O]: Chaperonin GroEL (HSP60 family)	18,5	4,8	45,24
38	Cg1366 - (atpA) [C]: PROBABLE ATP SYNTHASE ALPHA CHAIN PROTEIN (EC 3.6.1.34)   NCg1163 (COG0056) [C]: F0F1-type ATP synthase, alpha subunit	45,7	4,9	58,73
39	Cg1366 - (atpA) [C]: PROBABLE ATP SYNTHASE ALPHA CHAIN PROTEIN (EC 3.6.1.34)   NCg1163 (COG0056) [C]: F0F1-type ATP synthase, alpha subunit	41,7	4,9	58,73
40	Cg2429 - (ginA) [C]: GLUTAMINE SYNTHETASE I (EC 6.3.1.2)   NCg21133 (COG0174) [E]: Glutamine synthetase	37,1	4,9	53,28
41	Cg1366 - (atpA) [C]: PROBABLE ATP SYNTHASE ALPHA CHAIN PROTEIN (EC 3.6.1.34)   NCg1163 (COG0056) [C]: F0F1-type ATP synthase, alpha subunit	22,1	4,9	58,73
42	Cg0703 - (guaA) [C]: PUTATIVE GMP SYNTHASE (EC 6.3.5.2)   NCg0582 (COG0519) [F]: GMP synthase, PP-ATPase domain/subunit	35,8	4,9	55,97
43	Cg3096 - [C]: ALDEHYDE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.3)   NCg22698 (COG1012) [C]: NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	49,2	5	55,09
44	Cg2560 - (aceA) [C]: ISOCITRATE LYASE (EC 4.1.3.1)   NCg22248 (COG2224) [C]: Isocitrate lyase	61,6	4,9	47,21
45	Cg2560 - (aceA) [C]: ISOCITRATE LYASE (EC 4.1.3.1)   NCg22248 (COG2224) [C]: Isocitrate lyase	61,6	4,9	47,21
46	Cg2361 - [C]: Cell division initiation protein - Antigen 84 homolog   NCg2070 (COG3599) [D]: Cell division initiation protein	47,1	4,9	38,67
47	Cg0587 - (tuf) [C]: ELONGATION FACTOR TU   NCg0480 (COG0050) [J]: GTPases - translation elongation factors	52,8	4,9	43,83
48	Cg0587 - (tuf) [C]: ELONGATION FACTOR TU   NCg0480 (COG0050) [J]: GTPases - translation elongation factors	21,5	4,9	43,83
49	Cg0587 - (tuf) [C]: ELONGATION FACTOR TU   NCg0480 (COG0050) [J]: GTPases - translation elongation factors	32,1	4,9	43,83
50	Cg1111 - (eno) [C]: ENOLASE (EC 4.2.1.11)   NCg0935 (COG0148) [C]: Enolase	47,1	4,7	44,93
51	Cg1111 - (eno) [C]: ENOLASE (EC 4.2.1.11)   NCg0935 (COG0148) [C]: Enolase	46,8	4,7	44,93
52	Cg1111 - (eno) [C]: ENOLASE (EC 4.2.1.11)   NCg0935 (COG0148) [C]: Enolase	24,7	4,7	44,93
53	Cg1451 - (serA) [C]: Phosphoglycerate Dehydrogenase (EC 1.1.1.95)   NCg11235 (COG0111) [E]: Phosphoglycerate dehydrogenase and related dehydrogenases	59,1	4,7	55,28
54	Cg2337 - [C]: similar to methionine synthase II (cobalamin-independent)   NCg2048 (COG0620) [E]: Methionine synthase II (cobalamin-independent)	49,6	4,8	44,36
55	Cg1790 - (pgt) [C]: PHOSPHOGLYCERATE KINASE (EC 2.7.2.3)   NCg1525 (COG0126) [G]: 3-phosphoglycerate kinase	26,4	4,5	42,68
56	Cg1437 - (tlvC) [C]: KETOL-ACID REDUCTOISOMERASE (EC 1.1.1.86)   NCg11224 (COG0059) [EH]: Ketol-acid reductoisomerase	28,4	4,5	36,14
57	Cg0948 - (serC) [C]: Phosphoserine Transaminase (EC 2.6.1.52)   NCg10794 (COG1932) [HE]: Phosphoserine aminotransferase	36,7	4,7	40,03
58	Cg3323 - [C]: Myo-inositol-1-phosphate synthase   NCg22894 (COG1260) [I]: Myo-inositol-1-phosphate synthase	34,7	4,7	39,21
59	Cg0307 - (asd) [C]: ASPARTATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.11)   NCg0248 (COG0136) [E]: Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	40,4	4,8	36,19
60	Cg0387 - (adhE) [C]: PUTATIVE ZINC-TYPE ALCOHOL DEHYDROGENASE TRANSMEMB (EC 1.1.1.)   NCg0313 (COG1062) [C]: Zn-dependent alcohol dehydrogenases, class III	43,5	4,8	38,85

61	Cg2907 - (otsA) [C]: TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE (EC 2.4.1.15)   Ncg2535 (COG0380) [G]: Trehalose-6-phosphate synthase	20	5,2	53,38
62	Cg1826 - (pepQ) [C]: XAA-PRO AMINOPEPTIDASE (EC 3.4.11.9)   Ncg1558 (COG0006) [E]: Xaa-Pro aminopeptidase	77,1	4,8	38,86
63	Cg2613 - (mdh) [C]: MALATE DEHYDROGENASE OXIDOREDUCTASE PROTEIN (EC 1.1.1.37)   Ncg2297 (COG0039) [C]: Malate/lactate dehydrogenases	56,3	4,8	32,77
64	Cg2613 - (mdh) [C]: MALATE DEHYDROGENASE OXIDOREDUCTASE PROTEIN (EC 1.1.1.37)   Ncg2297 (COG0039) [C]: Malate/lactate dehydrogenases	58,8	4,8	32,77
65	Cg2833 - (cysK) [C]: O-Acetylserine (Thiol)-Lyase (EC 4.2.99.8)   Ncg2473 (COG0031) [E]: Cysteine synthase	55	4,8	32,77
66	Cg0573 - (rplL) [C]: PROBABLE 50S RIBOSOMAL SUBUNIT PROTEIN L7/L12   Ncg0469 (COG0222) [J]: Ribosomal protein L7/L12	78,1	4,6	13,28
67	Cg1236 - (tpx) [C]: THIOL PEROXIDASE (EC 1.11.1.-)   Ncg1041 (COG2077) [O]: Peroxiredoxin	32,1	4,4	17,79
68	Cg0048 - (ppiA) [C]: PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE B (EC 5.2.1.8)   Ncg0033 (COG0652) [O]: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase) - cyclophilin family	71,3	4,7	18,48
69	Cg2938 - (butA) [C]: L-2,3-butanediol dehydrogenase/acetoin reductase (EC 1.1.1.5)   Ncg2582 (COG1028) [Q/R]: Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	65,1	4,6	27,05
70	Cg1789 - (tp) [C]: TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE (EC 5.3.1.1)   Ncg1524 (COG0149) [G]: Triosephosphate isomerase	65,6	4,8	27,18
71	Cg1206 - [C]: PEP phosphomutase or related enzyme   Ncg1015 (COG2513) [G]: PEP phosphomutase and related enzymes	29	4,5	23,85
72	Cg2221 - (tsf) [C]: TRANSLATION ELONGATION FACTOR TS   Ncg1949 (COG0264) [J]: Translation elongation factor Ts	27,6	4,9	29,26
73	Cg3068 - (fdx) [C]: fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)   Ncg2673 (COG0191) [G]: Fructose/tagatose bisphosphate aldolase	58,4	5	37,2
74	Cg3219 - (ldh) [C]: L-LACTATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.27)   Ncg2810 (COG0039) [C]: Malate/lactate dehydrogenases	28,3	5,1	34,39
75	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)   Ncg2480 (COG0427) [C]: Acetyl-CoA hydrolase	23,5	5,1	54,5
76	Cg0482 - (gpmA) [C]: PHOSPHOGLYCEROMUTASE 1 (EC 5.4.2.1)   Ncg0390 (COG0588) [G]: Phosphoglycerate mutase 1	51,6	4,9	27,23
77	Cg2647 - (tig) [C]: TRIGGER FACTOR, PPIASE INVOLVED INTO CELL DIVISION, MOLECULAR CHAPERONE (EC 5.2.1.8)   Ncg2329 (COG0544) [O]: FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (trigger factor)	34,5	4,4	49,68
78	Cg2647 - (tig) [C]: TRIGGER FACTOR, PPIASE INVOLVED INTO CELL DIVISION, MOLECULAR CHAPERONE (EC 5.2.1.8)   Ncg2329 (COG0544) [O]: FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (trigger factor)	37,2	4,4	49,68
79	Cg2275 - [C]: putative F0F1-type ATP synthase b subunit   Ncg1996 (COG3599) [D]: Cell division initiation protein	46,4	4,6	29,45

Liste aller identifizierten Proteine im pH-Bereich 4,9-6,9				
Sample	Protein information	Coverage	pI	Mass [kDa]
1	Cg0791 - (pyr) [C]: PYRUVATE CARBOXYLASE (EC 6.4.1.1)   NCg10659 (COG1038) [C]: Pyruvate carboxylase	16	5,4	123,09
2	Cg1280 - (odhA) [C]: 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.4.2)   NCg11084 (COG0567) [C]: 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1) component, and related enzymes	16,5	5,9	138,74
3	Cg2466 - (aceE) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT (EC 1.2.4.1)   NCg12167 (COG2609) [C]: Pyruvate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1) component	9,1	5,3	102,81
4	Cg2466 - (aceE) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT (EC 1.2.4.1)   NCg12167 (COG2609) [C]: Pyruvate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1) component	9,1	5,3	102,81
5	Cg2466 - (aceE) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT (EC 1.2.4.1)   NCg12167 (COG2609) [C]: Pyruvate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1) component	10	5,3	102,81
6	Cg2466 - (aceE) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT (EC 1.2.4.1)   NCg12167 (COG2609) [C]: Pyruvate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1) component	10,8	5,3	102,81
7	Cg2466 - (aceE) [C]: PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT (EC 1.2.4.1)   NCg12167 (COG2609) [C]: Pyruvate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1) component	10,4	5,3	102,81
8	Cg0446 - (sdhA) [C]: succinate dehydrogenase A (EC 1.3.99.1)   NCg03360 (COG1053) [C]: Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunits	33,9	5,4	74,66
9	Cg0446 - (sdhA) [C]: succinate dehydrogenase A (EC 1.3.99.1)   NCg03360 (COG1053) [C]: Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunits	16,8	5,4	74,66
10	Cg0446 - (sdhA) [C]: succinate dehydrogenase A (EC 1.3.99.1)   NCg03360 (COG1053) [C]: Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunits	11,6	5,4	74,66
11	Cg1476 - (thiC) [C]: THIAMINE BIOSYNTHESIS PROTEIN   NCg11253 (COG0422) [H]: Thiamine biosynthesis protein ThiC	19,3	5,5	64,8
12	Cg3118 - (cysI) [C]: Sulfite Reductase (Hemoprotein) (EC 1.8.1.2)   NCg2718 (COG0155) [E]: Sulfite reductase, beta subunit (hemoprotein)	26,7	5,5	62,98
13	Cg3118 - (cysI) [C]: Sulfite Reductase (Hemoprotein) (EC 1.8.1.2)   NCg2718 (COG0155) [E]: Sulfite reductase, beta subunit (hemoprotein)	22,6	5,5	62,98
14	Cg1697 - (aspA) [C]: ASPARTATE AMMONIA-LYASE (ASPARTASE) (EC 4.3.1.1)   NCg1446 (COG1027) [E]: Aspartate ammonia-lyase	27	5,7	57,55
15	Cg1069 - (gapX) [C]: similar to GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.12)   NCg0900 (COG0057) [G]: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/erythrose-4-phosphate dehydrogenase	16	5,7	53,19
16	Cg1069 - (gapX) [C]: similar to GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.12)   NCg0900 (COG0057) [G]: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/erythrose-4-phosphate dehydrogenase	12,3	5,7	53,19
17	Cg2132 - [C]: conserved hypothetical protein   NCg11871	47,2	5,8	50,51
18	Cg1838 - (alrS) [C]: ALANYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.7)   NCg11570 (COG0013) [J]: Alanyl-tRNA synthetase	8,8	5,1	96,21
19	Cg1838 - (alrS) [C]: ALANYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.7)   NCg11570 (COG0013) [J]: Alanyl-tRNA synthetase	7,3	5,1	96,21
20	Cg1382 - (glgE) [C]: PUTATIVE ALPHA-AMYLASE (EC 3.2.1.1)   NCg1178 (COG0366) [G]: Glycosidases	20	5,3	75,66
21	Cg2559 - (aceB) [C]: MALATE SYNTHASE (EC 4.1.3.2)   NCg12247 (COG2225) [C]: Malate synthase	7,4	5	82,34
22	Cg2166 - (gpsI) [C]: PUTATIVE POLYRIBONUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE / GUANOSINE PENTAPHOSPHATESYNTHETASE (EC 2.7.7.8)   NCg11900 (COG1185) [J]: Polynucleotide nucleotidyltransferase (polynucleotide phosphorylase)	13,7	5	81,25
23	Cg2492 - (gimS) [C]: PROBABLE GLUCOSAMINE--FRUCTOSE-6-PHOSPHATE AMINOTRANSFERASE (EC 2.6.1.16)   NCg12191 (COG0449) [M]: Glucosamine 6-phosphate synthetase, contains amidotransferase and phosphosugar isomerase domains	17,4	5,1	67,48
24	Cg2492 - (gimS) [C]: PROBABLE GLUCOSAMINE--FRUCTOSE-6-PHOSPHATE AMINOTRANSFERASE (EC 2.6.1.16)   NCg12191 (COG0449) [M]: Glucosamine 6-phosphate synthetase, contains amidotransferase and phosphosugar isomerase domains	19,8	5,1	67,48
25	Cg2695 - [C]: ABC-type transport system, ATPase component   NCg12368 (COG0488) [R]: ATPase components of ABC transporters with duplicated ATPase domains	24,5	5	62,12
26	Cg2695 - [C]: ABC-type transport system, ATPase component   NCg12368 (COG0488) [R]: ATPase components of ABC transporters with duplicated ATPase domains	15,3	5	62,12
27	Cg0802 - (accBC) [C]: (Q54119) BIOTIN CARBOXYLASE AND BIOTIN CARBOXYL CA (EC 6.3.4.14,6.4.1.2,6.4.1.4)   NCg10670 (COG4770) [J]: Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit	33,8	5	63,4
28	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)   NCg12480 (COG0427) [C]: Acetyl-CoA hydrolase	32,1	5,1	54,5
29	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)   NCg12480 (COG0427) [C]: Acetyl-CoA hydrolase	12,9	5,1	54,5
30	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)   NCg12480 (COG0427) [C]: Acetyl-CoA hydrolase	26,7	5,1	54,5

31	Cg2192 - (mqp) [C]: MALATE:QUINONE OXIDOREDUCTASE (EC 1.1.99.16)   Ncgl1926 (COG0579) [R]: Predicted dehydrogenase	37,9	5,3	54,81
32	Cg2840 - (actA) [C]: BUTYRYL-COA:ACETATE COENZYME A TRANSFERASE (EC 2.8.3.8)   Ncgl2480 (COG0427) [C]: Acetyl-CoA hydrolase	17,1	5,1	54,5
33	Cg0984 - (purH) [C]: (Q9RHX6) 5'-PHOSPHORIBOSYL-5'-AMINOIMIDAZOLE-4-CARB (EC 2.1.2.3)   Ncgl0827 (COG0138) [F]: AICAR transformylase/IMP cyclohydrolase PurH (only IMP cyclohydrolase domain in AfuI)	26,9	5,3	55,74
34	Cg0984 - (purH) [C]: (Q9RHX6) 5'-PHOSPHORIBOSYL-5'-AMINOIMIDAZOLE-4-CARB (EC 2.1.2.3)   Ncgl0827 (COG0138) [F]: AICAR transformylase/IMP cyclohydrolase PurH (only IMP cyclohydrolase domain in AfuI)	37,9	5,3	55,74
35	Cg2499 - (gys) [C]: GLYCYL-TRNA SYNTHETASE (GLYCINE--TRNA LIGASE) (EC 6.1.1.4)   Ncgl2198 (COG0423) [J]: Glycyl-tRNA synthetase, class II	32,3	5,3	53,03
36	Cg2291 - (pyrB) [C]: PYRUVATE KINASE (EC 2.7.1.40)   Ncgl2008 (COG0469) [G]: Pyruvate kinase	15,1	5,4	51,61
37	Cg0441 - (lpxB) [C]: DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE (EC 1.8.1.4)   Ncgl0355 (COG1249) [C]: Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) component, and related enzymes	17,7	5,4	50,63
38	Cg2291 - (pyrB) [C]: PYRUVATE KINASE (EC 2.7.1.40)   Ncgl2008 (COG0469) [G]: Pyruvate kinase	23,3	5,4	51,61
39	Cg0441 - (lpxB) [C]: DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE (EC 1.8.1.4)   Ncgl0355 (COG1249) [C]: Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) component, and related enzymes	19,8	5,4	50,63
40	Cg0441 - (lpxB) [C]: DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE (EC 1.8.1.4)   Ncgl0355 (COG1249) [C]: Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) component, and related enzymes	23,2	5,4	50,63
41	Cg0587 - (tuF) [C]: ELONGATION FACTOR TU   Ncgl0480 (COG0050) [J]: GTPases - translation elongation factors	16,7	4,9	43,83
42	Cg0587 - (tuF) [C]: ELONGATION FACTOR TU   Ncgl0480 (COG0050) [J]: GTPases - translation elongation factors	30,8	4,9	43,83
43	Cg1133 - (glyA) [C]: Serine Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)   Ncgl0954 (COG0112) [E]: Glycine/serine hydroxymethyltransferase	23,5	5,4	46,52
44	Cg1133 - (glyA) [C]: Serine Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)   Ncgl0954 (COG0112) [E]: Glycine/serine hydroxymethyltransferase	41	5,4	46,52
45	Cg2280 - (gdh) [C]: NADP-SPECIFIC GLUTAMATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.1.4)   Ncgl1999 (COG0334) [E]: Glutamate dehydrogenase/leucine dehydrogenase	26	5,6	48,97
46	Cg2280 - (gdh) [C]: NADP-SPECIFIC GLUTAMATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.1.4)   Ncgl1999 (COG0334) [E]: Glutamate dehydrogenase/leucine dehydrogenase	29,5	5,6	48,97
47	Cg0755 - (metY) [C]: O-Acetylhomoserine (Thiol)-Lyase (EC 4.2.99.10)   Ncgl0625 (COG2873) [E]: O-acetylhomoserine sulphydrylase	27,5	5,1	46,73
48	Cg1157 - (glpX) [C]: GLPX-LIKE PROTEIN   Ncgl0976 (COG1494) [C]: Fructose-1,6-bisphosphatase/sedoheptulose 1,7-bisphosphatase and related proteins	20,9	5,1	35,35
49	Cg0755 - (metY) [C]: O-Acetylhomoserine (Thiol)-Lyase (EC 4.2.99.10)   Ncgl0625 (COG2873) [E]: O-acetylhomoserine sulphydrylase	25,9	5,1	46,73
50	Cg1791 - (gap) [C]: GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.12)   Ncgl1526 (COG0057) [G]: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/erythrose-4-phosphate dehydrogenase	22,2	5,2	36,03
51	Cg0949 - (gltA) [C]: CITRATE SYNTHASE (EC 4.1.3.7)   Ncgl0795 (COG0372) [C]: Citrate synthase	20,1	5,2	48,91
52	Cg0949 - (gltA) [C]: CITRATE SYNTHASE (EC 4.1.3.7)   Ncgl0795 (COG0372) [C]: Citrate synthase	25,4	5,2	48,91
53	Cg0949 - (gltA) [C]: CITRATE SYNTHASE (EC 4.1.3.7)   Ncgl0795 (COG0372) [C]: Citrate synthase	35,9	5,2	48,91
54	Cg2708 - (msiK1) [C]: ABC-type sugar transport system, ATPase component   Ncgl2377 (COG3839) [G]: ABC-type sugar transport systems, ATPase components	33,5	5,5	40,3
55	Cg3107 - (adhA) [C]: Zn-dependent alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)   Ncgl2709 (COG1064) [R]: Zn-dependent alcohol dehydrogenases	20,6	5,2	36,79
56	Cg2222 - (tpsB) [C]: 30S RIBOSOMAL PROTEIN S2   Ncgl1950 (COG0052) [J]: Ribosomal protein S2	27,6	5,3	30,1
57	Cg1409 - (pfkA) [C]: 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE (EC 2.7.1.11)   Ncgl1202 (COG0205) [C]: 6-phosphofructokinase	26,8	5,5	37,07
58	Cg1075 - (prsA) [C]: PHOSPHORIBOSYL-PYROPHOSPHATE SYNTHASE ISOZYME 2 PR (EC 2.7.6.1)   Ncgl0905 (COG0462) [FE]: Phosphoribosylpyrophosphate synthetase	21,8	5,6	35,53
59	Cg2151 - [C]: Similar to phage shock protein A   Ncgl1886 (COG1842) [KT]: Phage shock protein A (PM30), suppresses sigma54-dependent transcription	33	5,3	30,41
60	Cg1215 - (nadC) [C]: PUTATIVE NICOTINATE-NUCLEOTIDE PYROPHOSPHORYLASE (EC 2.2.2.19)   Ncgl1023 (COG0157) [H]: Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	21,5	5,2	29,36
61	Cg1266 - (trmA) [C]: RRNA GUANINE-N1-METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.51)   Ncgl1070 (COG0500) [QR]: SAM-dependent methyltransferases	30,2	5,3	30,69
62	Cg0750 - (fold) [C]: METHYLENETETRAHYDROFOLATE DEHYDROGENASE (EC 1.5.1.5)   Ncgl0620 (COG0190) [H]: 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/Methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase	19,7	5,5	30,13
63	Cg0457 - (purU) [C]: PROBABLE FORMYL-TETRAHYDROFOLATE DEFORMYLASE PROTEIN (EC 3.5.1.10)   Ncgl0371 (COG0788) [F]: Formyltetrahydrofolate hydrolase	22	5,7	34,24
64	Cg2847 - [C]: GCN5-related N-acetyltransferase   Ncgl2487 (COG0456) [R]: Acetyltransferases	27,1	5,9	32,12
65	Cg0237 - [C]: PUTATIVE OXIDOREDUCTASE   Ncgl0186 (COG1028) [QR]: Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	37,2	5,8	26,7
66	Cg1794 - [C]: Uncharacterised P-loop ATPase protein   Ncgl1529 (COG1660) [R]: Predicted P-loop-containing kinase	44,3	6	34,69

67	Cg0447 - (schB) [C]: succinate dehydrogenase B   NCg0361 (COG0479) [C]: Succinate dehydrogenase/fumarate reductase Fe-S protein	26,8	5,4	26,63
68	Cg1365 - (atpH) [C]: H+-ATPase DELTA SUBUNIT   NCg1162 (COG0712) [C]: F0F1-type ATP synthase, delta subunit (mitochondrial oligomycin sensitivity protein)	35,1	5,4	28,86
69	Cg3237 - (scd) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)   NCg12826 (COG0605) [F]: Superoxide dismutase	38	5,1	22,08
70	Cg3237 - (scd) [C]: MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1)   NCg12826 (COG0605) [F]: Superoxide dismutase	34,5	5,1	22,08
71	Cg3071 - (pyrE) [C]: OROTATE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (EC 2.4.2.10)   NCg12676 (COG0461) [F]: Orotate phosphoribosyltransferase	55,4	5,4	19,43
72	Cg0572 - (rplJ) [C]: 50S RIBOSOMAL PROTEIN L10   NCg0468 (COG0244) [J]: Ribosomal protein L10	49,7	5,6	17,94

**Anhang III****Geräte**

Autoklav	Tuttnauer, New York, USA
Dry Strip Kit	GE, Freiburg, Deutschland
Durchlichtscanner Epson Expression Pro	Epson, Hong Kong, China
Eppendorf Tubes 1,5 und 2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcontubes 12 mL	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Fokussierungskammer 2117 Multiphor II	GE, Freiburg, Deutschland
Fokussierungskammer IPGphor	GE, Freiburg, Deutschland
GelBond PAGFilm (203 mm x 260 mm )	GE, Freiburg, Deutschland
Gießkammer IsoDalt	GE, Freiburg, Deutschland
Gießkammer EttanDalt II System	GE, Freiburg, Deutschland
Glasplatten mit Abstandshalter	GE, Freiburg, Deutschland
Glasplatten für IsoDalt	GE, Freiburg, Deutschland
Glasplatten für EttanDalt	GE, Freiburg, Deutschland
Gradientenmischer (2 x 15 ml)	Werkstatt, Proteomik Lehrstuhl, TU München,
Hartgummiwalze	Hama, Monheim, Deutschland
Hebebühne Laborboy	Grauer, Degersheim, Schweiz
IEF- Probenauftragsstreifen	GE, Freiburg, Deutschland
ImageMaster 2DE	GE, Freiburg, Deutschland
Klammern für Glasplatten	GE, Freiburg, Deutschland
Kühlschrank Bosch froster	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Kühltruhe Ultra Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific, Hertfordshire, Irland
Kühlzentrifuge Hermle ZK 401	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Laborwaagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer IKA Mini Mr	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Melanie Platinum Softwaresystem	Gebebio, Genf, Schweiz
Mikro-Gradientmischer	GE, Freiburg, Deutschland
Milli-Q System	Millipore, Bedford, MA

---

Papierschnidemaschine Dahle roll+schnitt	Dahle, Coburg, Deutschland
Parafilm (50 cm x 15 m)	ACN, Greenwich, CT, USA
pH-Meter pH 535 Multical	WTW, Weilheim, Deutschland
Reswellingtray	GE, Freiburg, Deutschland
Spektralphotometer	Beckman, Fullerton, USA
Stripholder	GE, Freiburg, Deutschland
Thermostat 2219 Multitemp II	LKB Bromma, Texas, USA
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Super RK 102 H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Ultraschallstab 60 W	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortexer Vf 2	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland

**Chemikalien**

Acrylamid	GE, Freiburg, Deutschland
Agarose	Sigma, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat APS	GE, Freiburg, Deutschland
ASB 14	Calbiochem, San Diego, USA
ASB 14-a	Calbiochem, San Diego, USA
β-DM	Calbiochem, San Diego, USA
Bromphenolblau	VWR, Darmstadt, Deutschland
2-Butanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
C8Ø	Calbiochem, San Diego, USA
CHAPS	Roche, Mannheim, Deutschland
CHAPS	Calbiochem, San Diego, USA
2,2'-Dithiodiethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol DTT	Sigma, München, Deutschland
Dry Strip Cover Fluid	GE, Freiburg, Deutschland
Essigsäure 100 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Filterkarton für Elektrodenstreifen MN 440	Macherey, Nagel & Co., Oensingen, Schweiz
Formaldehyd 37 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutardialdehyd 25 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Glycerol 100 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Harnstoff	VWR, Darmstadt, Deutschland
Immobiline II pK 1,0	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 3,1	Fluka, Buchs, Schweiz
Immobiline II pK 3,6	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 4,6	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 6,2	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 7,0	GE, Freiburg, Deutschland

---

Immobiline II pK 8,5	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 9,3	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 10,3	GE, Freiburg, Deutschland
Immobiline II pK 13	GE, Freiburg, Deutschland
Iodacetamid	Sigma, München, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kerosin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Flachbettionenaustauscher Serolit MB-1	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N <sup>-</sup> -Methylbisacrylamid 2x cryst.	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	VWR, Darmstadt, Deutschland
Natronlaugeplättchen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pefabloc SC PLUS	Roche, Mannheim, Deutschland
Pharmalyte, pH 3-10	GE, Freiburg, Deutschland
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2DE Quant Kit	GE, Freiburg, Deutschland
Repel-Silane	GE, Freiburg, Deutschland
Salpetersäure 65 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Sephadex G200 SF	GE, Freiburg, Deutschland
Salzsäure 25 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	VWR, Darmstadt, Deutschland
Siliconöl DC 200 fluid	Serva, Heidelberg, Deutschland
TEMED	BioRad, München, Deutschland
Thioharnstoff	VWR, Darmstadt, Deutschland
Trizma Base	Sigma, München, Deutschland

## Literaturverzeichnis

1. Wasinger, V.C., et al., *Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis, 1995. **16**(7): p. 1090-4.
2. Wilkins M. R., W.K.L., Appel R. D., Hochstrasser D. F., *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. 1997: Springer Verlag Berlin.
3. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
4. Anderson, N.G. and L. Anderson, *The Human Protein Index*. Clin Chem, 1982. **28**(4 Pt 2): p. 739-48.
5. Anderson, N.G. and N.L. Anderson, *Photo/essay. The human protein index*. Jama, 1981. **246**(22): p. 2620-1.
6. Clark, B.F., *Towards a total human protein map*. Nature, 1981. **292**(5823): p. 491-2.
7. Wade, N., *The complete index to man*. Science, 1981. **211**(4477): p. 33-5.
8. Görg, A., W. Postel, and S. Gunther, *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 1988. **9**(9): p. 531-46.
9. Görg, A., et al., *Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems*. Electrophoresis, 1995. **16**(7): p. 1079-86.
10. Görg, A., et al., *Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient*. Electrophoresis, 1998. **19**(8-9): p. 1516-9.
11. Görg, A., et al., *Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins*. Electrophoresis, 1997. **18**(3-4): p. 328-37.
12. Görg, A., et al., *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1037-53.
13. Görg, A., et al., *Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures*. Electrophoresis, 1999. **20**(4-5): p. 712-7.
14. Görg, A., W. Weiss, and M.J. Dunn, *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 3665-85.
15. Gorg A., W.W., *2-D electrophoresis with immobilized pH gradients*, in *Proteome Research: Two-Dimensional Electrophoresis and Identification Methods*, T. Rabilloud, Editor. 2000, Springer: Berlin. p. 57-106.
16. Görg, A., et al., *Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer*. Electrophoresis, 1987. **8**(2): p. 122-24.
17. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
18. Tanaka K., W.H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y. und Yoshida T., *Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1988. **2**(8): p. 151-153.
19. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
20. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
21. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
22. Jensen, O.N., *Interpreting the protein language using proteomics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(6): p. 391-403.
23. Dale, G. and A.L. Latner, *Isoelectric focusing of serum proteins in acrylamide gels followed by electrophoresis*. Clin Chim Acta, 1969. **24**(1): p. 61-8.
24. Macko, V. and H. Stegemann, *Mapping of potato proteins by combined electrofocusing and electrophoresis identification of varieties*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1969. **350**(7): p. 917-9.

25. Shapiro, A.L., E. Vinuela, and J.V. Maizel, Jr., *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967. **28**(5): p. 815-20.
26. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
27. Swank, R.T. and K.D. Munkres, *Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate*. *Anal Biochem*, 1971. **39**(2): p. 462-77.
28. O'Farrell, P.Z., H.M. Goodman, and P.H. O'Farrell, *High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins*. *Cell*, 1977. **12**(4): p. 1133-41.
29. Bjellqvist, B., et al., *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. *J Biochem Biophys Methods*, 1982. **6**(4): p. 317-39.
30. Righetti, P.G., *The Alpher, Bethe and Gamow of IEF, the alpha-Centauri of electrokinetic methodologies. Part II: immobilized pH gradients*. *Electrophoresis*, 2007. **28**(4): p. 545-55.
31. Altland, K., *IPGMAKER: a program for IBM-compatible personal computers to create and test recipes for immobilized pH gradients*. *Electrophoresis*, 1990. **11**(2): p. 140-7.
32. Tonani, C., M. Faupel, and P.G. Righetti, *Isoelectric membrane simulator: a computational approach for isoelectric immobilized membranes*. *Electrophoresis*, 1991. **12**(9): p. 631-6.
33. Altland, K. and A. Altland, *Pouring reproducible gradients in gels under computer control: new devices for simultaneous delivery of two independent gradients, for more flexible slope and pH range of immobilized pH gradients*. *Clin Chem*, 1984. **30**(12 Pt 1): p. 2098-103.
34. Görg, A., *Two-dimensional electrophoresis Recent developments in the first- and second-dimension steps of two-dimensional electrophoresis have improved pattern reproducibility*. *Nature*, 1991. **349**: p. 546-6.
35. Wildgruber, R., et al., *Web-based two-dimensional database of Saccharomyces cerevisiae proteins using immobilized pH gradients from pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry*. *Proteomics*, 2002. **2**(6): p. 727-32.
36. Wildgruber, R., et al., *Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of Saccharomyces cerevisiae proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(13): p. 2610-6.
37. Drews, O., et al., *Setting up standards and a reference map for the alkaline proteome of the Gram-positive bacterium Lactococcus lactis*. *Proteomics*, 2004. **4**(5): p. 1293-304.
38. Drews, O., et al., *High pressure effects step-wise altered protein expression in Lactobacillus sanfranciscensis*. *Proteomics*, 2002. **2**(6): p. 765-74.
39. Gygi, S.P., et al., *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(3): p. 1720-30.
40. Molloy, M.P., et al., *Profiling the alkaline membrane proteome of Caulobacter crescentus with two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry*. *Proteomics*, 2002. **2**(7): p. 899-910.
41. Bae, S.H., et al., *Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects*. *Proteomics*, 2003. **3**(5): p. 569-79.
42. Herbert, B.R., et al., *Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent*. *Electrophoresis*, 1998. **19**(5): p. 845-51.
43. Olsson, I., et al., *Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension*. *Proteomics*, 2002. **2**(11): p. 1630-2.
44. Righetti, P.G., et al., *Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium*. *Electrophoresis*, 2005. **26**(2): p. 297-319.
45. Righetti, P.G., et al., *Prefractionation techniques in proteome analysis*. *Proteomics*, 2003. **3**(8): p. 1397-407.
46. Görg, A., et al., *Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels*. *Proteomics*, 2002. **2**(12): p. 1652-7.
47. Unlu, M., M.E. Morgan, and J.S. Minden, *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(11): p. 2071-7.
48. [http://www.proteomics.nijmegen.nl/Maldi\\_pages/Maldi-about.htm](http://www.proteomics.nijmegen.nl/Maldi_pages/Maldi-about.htm)
49. *Proteomik - Durchblick im Dickicht* (PDF), Roche.
50. Washburn, M.P., D. Wolters, and J.R. Yates, 3rd, *Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology*. *Nat Biotechnol*, 2001. **19**(3): p. 242-7.

51. Fischer, F., et al., *Toward the complete membrane proteome: high coverage of integral membrane proteins through transmembrane peptide detection*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(3): p. 444-53.
52. Wolters, D.A., M.P. Washburn, and J.R. Yates, 3rd, *An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics*. Anal Chem, 2001. **73**(23): p. 5683-90.
53. NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
54. ExPASy, <http://www.expasy.ch/>
55. Kinoshita, S., Ukada, S., Shimono, M., *Studies of the amino acid fermentation, I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms*. J. Gen. Appl. Microbiol, 1957. **3**: p. 173-185.
56. Bayan, N., et al., *Mycomembrane and S-layer: two important structures of Corynebacterium glutamicum cell envelope with promising biotechnology applications*. J Biotechnol, 2003. **104**(1-3): p. 55-67.
57. Bathe, B., J. Kalinowski, and A. Puhler, *A physical and genetic map of the Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 chromosome*. Mol Gen Genet, 1996. **252**(3): p. 255-65.
58. Brand, *Untersuchung der Zellhüllenstruktur von Corynebacterium glutamicum ATCC13032*, Dissertation. 2001, Universität Bielefeld.
59. Onishi J., M.S., Hayashi M., Ando S., Yokoi H., Ochiai K., Ikeda M., *A novel methodology employing Corynebacterium glutamicum genome information to generate a new L-Lysin-producing mutant*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 2002. **58**: p. 217-223.
60. Patentnummer\_EP1108790, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. (JP). 20.06.2001: Europäisches Patentamt.
61. Hermann, T., *Industrial production of amino acids by coryneform bacteria*. J Biotechnol, 2003. **104**(1-3): p. 155-72.
62. Wohlleben W, M.G., Kalinowski J., *Genetic engineering of gram-positive bacteria*, in *Genetic engineering of microorganisms*, P. A, Editor. 1993, VCH Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim. p. S. 106f.
63. Dominguez, H., et al., *Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of Corynebacterium glutamicum during growth on fructose*. Eur J Biochem, 1998. **254**(1): p. 96-102.
64. Tesch, M., A.A. de Graaf, and H. Sahm, *In vivo fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in corynebacterium glutamicum studied by 15N nuclear magnetic resonance*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(3): p. 1099-109.
65. Wendisch, V.F., et al., *Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with Corynebacterium glutamicum during growth on acetate and/or glucose*. J Bacteriol, 2000. **182**(11): p. 3088-96.
66. Kiefer, P., et al., *Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing Corynebacterium glutamicum cultured on glucose or fructose*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(1): p. 229-39.
67. Schruppf, B., et al., *A functionally split pathway for lysine synthesis in Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol, 1991. **173**(14): p. 4510-6.
68. Schaffer, S., et al., *A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of Corynebacterium glutamicum*. Electrophoresis, 2001. **22**(20): p. 4404-22.
69. Hermann, T., et al., *Proteome analysis of Corynebacterium glutamicum*. Electrophoresis, 2001. **22**(9): p. 1712-23.
70. Hermann, T., et al., *Two-dimensional electrophoretic analysis of Corynebacterium glutamicum membrane fraction and surface proteins*. Electrophoresis, 2000. **21**(3): p. 654-9.
71. Hiller, K., et al., *JVirGel 2.0: comp. prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins*. Bioinformatics, 2006. **22**(19): p. 2441-3.
72. Hiller, K., et al., *JVirGel: Calculation of virtual two-dimensional protein gels*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3862-5.
73. Görg, A., et al., *Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultrathin polyacrylamide layers*. J Biochem Biophys Methods, 1980. **3**(5): p. 273-84.
74. Westermeier, R., *Two-Dimensional Electrophoresis in Proteomics*, in *Protein Purification*. 2004, Third Edition, John Wiley and Sons.
75. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *Analytical techniques for cell fractions. XXII. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: multiple gradient-slab gel electrophoresis*. Anal Biochem, 1978. **85**(2): p. 341-54.

76. Anderson, N.G. and N.L. Anderson, *Analytical techniques for cell fractions. XXI. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: multiple isoelectric focusing*. Anal Biochem, 1978. **85**(2): p. 331-40.
77. Blum, H., H. Beier, and H. Gross, *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. Electrophoresis, 1987. **8**(2): p. 93-9.
78. Neuhoff, V., et al., *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. Electrophoresis, 1988. **9**(6): p. 255-62.
79. Neuhoff, V., et al., *Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution*. Electrophoresis, 1990. **11**(2): p. 101-17.
80. Candiano, G., et al., *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. Electrophoresis, 2004. **25**(9): p. 1327-33.
81. Lamanda, A., et al., *Improved Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-to-background ratio and improved baseline resolution*. Proteomics, 2004. **4**(3): p. 599-608.
82. Smirnov, I.P., et al., *Suppression of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix clusters and reduction of chemical noise in MALDI-TOF mass spectrometry*. Anal Chem, 2004. **76**(10): p. 2958-65.
83. Tam le, T., et al., *Proteome signatures for stress and starvation in Bacillus subtilis as revealed by a 2-D gel image color coding approach*. Proteomics, 2006. **6**(16): p. 4565-85.
84. Gade, D., et al., *Evaluation of two-dimensional difference gel electrophoresis for protein profiling. Soluble proteins of the marine bacterium Pirellula sp. strain 1*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2003. **5**(4): p. 240-51.
85. *Typhoon: Users's Guide v3.0 for Microsoft Windows*, A. Biosciences, Editor.
86. Marouga, R., S. David, and E. Hawkins, *The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology*. Anal Bioanal Chem, 2005. **382**(3): p. 669-78.
87. Rabilloud, T., *Membrane proteins ride shotgun*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(5): p. 508-10.
88. Westbrook, J.A., et al., *Zooming-in on the proteome: very narrow-range immobilised pH gradients reveal more protein species and isoforms*. Electrophoresis, 2001. **22**(14): p. 2865-71.
89. Nawrocki, A., et al., *Correlation of acidic and basic carrier ampholyte and immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis patterns based on mass spectrometric protein identification*. Electrophoresis, 1998. **19**(6): p. 1024-35.
90. Bendt, A.K., et al., *Towards a phosphoproteome map of Corynebacterium glutamicum*. Proteomics, 2003. **3**(8): p. 1637-46.
91. Kalinowski, J., et al., *The complete Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins*. J Biotechnol, 2003. **104**(1-3): p. 5-25.
92. Sharp, P.M. and W.H. Li, *The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(3): p. 1281-95.
93. Molloy, M.P., *Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients*. Anal Biochem, 2000. **280**(1): p. 1-10.
94. Molloy, M.P., et al., *Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis*. Electrophoresis, 1998. **19**(5): p. 837-44.
95. Molloy, M.P., et al., *Extraction of Escherichia coli proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis*. Electrophoresis, 1999. **20**(4-5): p. 701-4.
96. Santoni, V., et al., *Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels*. Electrophoresis, 1999. **20**(4-5): p. 705-11.
97. Santoni, V., M. Molloy, and T. Rabilloud, *Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?* Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1054-70.
98. Henningsen, R., et al., *Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. Proteomics, 2002. **2**(11): p. 1479-88.
99. Expert-Bezancon, N., et al., *Physical-chemical features of non-detergent sulfobetaines active as protein-folding helpers*. Biophys Chem, 2003. **100**(1-3): p. 469-79.
100. Luche, S., V. Santoni, and T. Rabilloud, *Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis*. Proteomics, 2003. **3**(3): p. 249-53.

101. Tastet, C., et al., *Structure-efficiency relationships of zwitterionic detergents as protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis*. Proteomics, 2003. **3**(2): p. 111-21.
102. McHardy, A.C., et al., *Comparing expression level-dependent features in codon usage with protein abundance: an analysis of 'predictive proteomics'*. Proteomics, 2004. **4**(1): p. 46-58.
103. Grote, A., et al., *JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W526-31.
104. Futcher, B., et al., *A sampling of the yeast proteome*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7357-68.
105. Slais, K., et al., *Fluorescein-based pI markers for capillary isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection*. Electrophoresis, 2002. **23**(11): p. 1682-8.
106. Stastna, M., M. Travnicek, and K. Slais, *New azo dyes as colored isoelectric point markers for isoelectric focusing in acidic pH region*. Electrophoresis, 2005. **26**(1): p. 53-9.
107. Wintermeyer, W., et al., *Mechanism of elongation factor G function in tRNA translocation on the ribosome*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2001. **66**: p. 449-58.
108. Kaji, A., et al., *The fourth step of protein synthesis: disassembly of the posttermination complex is catalyzed by elongation factor G and ribosome recycling factor, a near-perfect mimic of tRNA*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2001. **66**: p. 515-29.
109. Reinscheid, D.J., B.J. Eikmanns, and H. Sahm, *Characterization of the isocitrate lyase gene from Corynebacterium glutamicum and biochemical analysis of the enzyme*. J Bacteriol, 1994. **176**(12): p. 3474-83.
110. Robertson, E.F., J.C. Hoyt, and H.C. Reeves, *Evidence of histidine phosphorylation in isocitrate lyase from Escherichia coli*. J Biol Chem, 1988. **263**(5): p. 2477-82.
111. Eschenbrenner, M., J. Coves, and M. Fontecave, *The flavin reductase activity of the flavoprotein component of sulfite reductase from Escherichia coli. A new model for the protein structure*. J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20550-5.
112. Eschenbrenner, M., J. Coves, and M. Fontecave, *NADPH-sulfite reductase flavoprotein from Escherichia coli: contribution to the flavin content and subunit interaction*. FEBS Lett, 1995. **374**(1): p. 82-4.
113. Coves, J., et al., *Flavin mononucleotide-binding domain of the flavoprotein component of the sulfite reductase from Escherichia coli*. Biochemistry, 1997. **36**(19): p. 5921-8.
114. Coves, J., et al., *NADPH-sulfite reductase from Escherichia coli. A flavin reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase*. J Biol Chem, 1993. **268**(25): p. 18604-9.
115. Zeghouf, M., et al., *The flavoprotein component of the Escherichia coli sulfite reductase: expression, purification, and spectral and catalytic properties of a monomeric form containing both the flavin adenine dinucleotide and the flavin mononucleotide cofactors*. Biochemistry, 1998. **37**(17): p. 6114-23.
116. Fieschi, F., et al., *The mechanism and substrate specificity of the NADPH:flavin oxidoreductase from Escherichia coli*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30392-400.
117. Rey, D.A., A. Puhler, and J. Kalinowski, *The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol, 2003. **103**(1): p. 51-65.
118. <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
119. Stein, A.J. and J.H. Geiger, *The crystal structure and mechanism of 1-L-myo-inositol-1-phosphate synthase*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9484-91.
120. Yoshida, K., et al., *The fifth gene of the iol operon of Bacillus subtilis, iolE, encodes 2-keto-myo-inositol dehydratase*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 3): p. 571-80.
121. Michal, G., *Biochemical Pathways*. dritte Edition ed: Roche.
122. Orme-Johnson, W.H., *Iron-sulfur proteins: structure and function*. Annu Rev Biochem, 1973. **42**(0): p. 159-204.
123. Blanco, G., et al., *Identification of a growth phase-dependent promoter in the rpJL operon of Streptomyces coelicolor A3(2)*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1517**(2): p. 243-9.
124. Bruckner, R. and F. Titgemeyer, *Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **209**(2): p. 141-8.
125. Stulke, J. and W. Hillen, *Regulation of carbon catabolism in Bacillus species*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: p. 849-80.
126. Kinoshita, S., *Amino-acid production by the fermentation process*. Nature, 1972. **240**(5378): p. 211.

- 
127. Claes, W.A., A. Puhler, and J. Kalinowski, *Identification of two prpDBC gene clusters in Corynebacterium glutamicum and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle*. J Bacteriol, 2002. **184**(10): p. 2728-39.
  128. Gerstmeir, R., et al., *Acetate metabolism and its regulation in Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol, 2003. **104**(1-3): p. 99-122.
  129. Lilley, K.S. and D.B. Friedman, *All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics*. Expert Rev Proteomics, 2004. **1**(4): p. 401-9.
  130. Bouchez-Mahiout, I., C. Doyen, and M. Lauriere, *Accurate detection of both glycoproteins and total proteins on blots: control of side reactions occurring after periodate oxidation of proteins*. Electrophoresis, 1999. **20**(7): p. 1412-7.
  131. Molenaar, D., et al., *Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol, 2000. **182**(24): p. 6884-91.
  132. Schena, M., et al., *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. Science, 1995. **270**(5235): p. 467-70.
  133. Lucchini, S., A. Thompson, and J.C. Hinton, *Microarrays for microbiologists*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 6): p. 1403-14.
  134. Loos, A., et al., *Development and validation of corynebacterium DNA microarrays*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(5): p. 2310-8.
  135. Muffler, A., et al., *Genome-wide transcription profiling of Corynebacterium glutamicum after heat shock and during growth on acetate and glucose*. J Biotechnol, 2002. **98**(2-3): p. 255-68.
  136. Hayashi, M., et al., *Transcriptome analysis of acetate metabolism in Corynebacterium glutamicum using a newly developed metabolic array*. Biosci Biotechnol Biochem, 2002. **66**(6): p. 1337-44.
  137. Reinscheid, D.J., et al., *Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the Corynebacterium glutamicum pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase*. Microbiology, 1999. **145 ( Pt 2)**: p. 503-13.
  138. Ebbighausen, H., B. Weil, and R. Kramer, *Na(+)-dependent succinate uptake in Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol Lett, 1991. **61**(1): p. 61-5.
  139. Cozzone, A.J., *Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria*. Annu Rev Microbiol, 1998. **52**: p. 127-64.
  140. Wendisch, V.F., et al., *Regulation of acetate metabolism in Corynebacterium glutamicum: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes*. Arch Microbiol, 1997. **168**(4): p. 262-9.
  141. Becker, J., et al., *Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in Corynebacterium glutamicum increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(12): p. 8587-96.
  142. Barreiro, C., et al., *Transcriptional analysis of the groES-groEL1, groEL2, and dnaK genes in Corynebacterium glutamicum: characterization of heat shock-induced promoters*. J Bacteriol, 2004. **186**(14): p. 4813-7.