

**Identifizierung von differentiellen Proteinen aus dem *E.coli*
basierten *in vitro* Translationssystem**



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kerstin Mammeri

April 2004

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis April 2004 am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt. Die Verfasserin versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

Gutachter: Professor Dr. Volker A. Erdmann

Gutachter: Professorin Dr. Brigitte Wittmann-Liebold

Datum der Disputation: 23. 7. 2004

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

Zusammenfassung

1 Einleitung	1
1.1 Transkription und Translation in <i>E.coli</i>	2
1.1.1 Transkription.....	2
1.1.2 Translation.....	4
1.1.2.1 Übersicht.....	4
1.1.2.2 Transfer-RNA als Vermittler zwischen genetischem Code und Aminosäuresequenz.....	5
1.1.2.3 Initiation.....	6
1.1.2.4 Elongation.....	7
1.1.2.5 Termination.....	8
1.2 Die zellfreie Proteinbiosynthese.....	9
1.2.1 Die Entwicklung und Bedeutung der zellfreien Proteinbiosynthese.....	9
1.2.2 Die Transkription im zellfreien System.....	13
1.2.3 Die Translation im zellfreien System.....	14
1.2.3.1 Kationenbedingungen und Puffer.....	14
1.2.3.2 mRNA.....	15
1.2.3.3 Aminosäuren.....	17
1.2.3.4 Energiebedarf.....	17
1.2.3.5 Polyamine.....	19
1.3 Proteom-Analyse.....	23
1.3.1 Separierung eines komplexen Proteingemisches.....	23
1.3.2 Prinzip der 2-DE.....	24
1.3.3 Massenspektrometrie: MALDI-TOF.....	25
1.3.3.1 Prinzip der MALDI-TOF.....	25
1.3.3.2 Auswertung.....	26
1.4 Zielstellung	28
2 Methoden	29
2.1 Zellfreie Proteinsynthese.....	29
2.1.1 Das Batchsystem.....	29

2.1.2	Analyse der exprimierten Proteine und der mRNA.....	31
2.1.2.1	TCA-Fällung.....	31
2.1.2.2	Eindimensionale, denaturierende Gelelektrophorese: SDS-PAGE..	32
2.1.2.3	Autoradiographie.....	34
2.2	Hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE).....	34
2.2.1	Proteinbestimmung.....	34
2.2.2	Probenvorbereitung.....	35
2.2.3	2-DE.....	36
2.2.3.1	1. Dimension – Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	36
2.2.3.2	2. Dimension – SDS-PAGE.....	38
2.3	Analyse ribosomaler Proteine.....	40
2.4	Färben von Gelen.....	43
2.4.1	Coomassie-Färbung.....	43
2.4.2	Silberfärbung.....	43
2.4.3	Fluoreszenzfärbung.....	44
2.5	Identifizierung von Proteinen aus dem Gel.....	45
2.5.1	In-Gel-Verdau.....	45
2.5.2	Extraktion von In-Gel-verdauten Proteinen.....	47
2.5.3	Massenspektrometrie.....	48
2.5.3.1	Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation.....	48
2.5.3.2	Präparierung der Matrix.....	48
2.6	Zellanzucht in <i>E.coli</i> -Zellen.....	48
2.6.1	Zellanzucht in Flüssigkultur.....	48
2.6.2	Zellanzucht in Einzelkolonien.....	49
2.6.3	Herstellung kompetenter Zellen.....	49
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	50
2.7.1	Isolierung von DNA.....	50
2.7.1.1	Präparation genomischer DNA aus <i>E.coli</i>	50
2.7.1.2	Plasmidpräparation.....	51
2.7.2	PCR – Polymerasekettenreaktion.....	52
2.7.3	Klonierung.....	53
2.7.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	53
2.7.3.2	Dephosphorylierung.....	53
2.7.3.3	Phosphorylierung.....	54

2.7.3.4	DNA-Ligation.....	55
2.7.3.5	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Zellen.....	55
2.7.4	Sequenzierung von DNA.....	56
2.8	Chromatografische Methoden.....	57
2.8.1	Dünnschichtchromatografie zur Untersuchung der Nukleotide.....	57
2.8.2	RP-HPLC zur Proteinfractionierung.....	58
2.8.3	RP-HPLC mit Nachsäulenderivatisierung zur Polyaminbestimmung.....	59
3	Ergebnisse	61
3.1	Kinetik der Produktbildung.....	61
3.2	Proteom-Analyse der <i>E.coli</i> -Lysatproteine.....	63
3.2.1	Optimierungen bezüglich der Probenvorbereitung für die 2-DE.....	63
3.2.2	1. Gelsatz. 2-DE aus dem Gesamtansatz – Identifizierung des ersten differentiellen Proteins.....	67
3.2.3	2. Gelsatz. Fraktionierung und Aufkonzentrierung der Proteine mittels analytischer HPLC.....	73
3.2.4	3. Gelsatz. Präparative HPLC-Fraktionierung.....	76
3.2.5	Untersuchung der ribosomalen Proteine.....	83
3.2.6	Klonierung und Expression ausgewählter differentieller Proteine.....	86
3.3	Untersuchung ausgewählter Parameter.....	89
3.3.1	pH-Wertverschiebung.....	89
3.3.2	Kinetik der Transkription im zellfreien System.....	90
3.3.3	ppGpp als Sensor für Aminosäuremangel im Zellfreien Proteinbio- synthese-System (?) – GTP- und ATP-Stabilität.....	92
3.3.4	Analyse der Polyamine.....	94
3.3.4.1	Einfluß der Polyamine auf die Produktausbeute.....	94
3.3.4.2	Polyaminstatus während der zellfreien Translation.....	96
4	Diskussion	100
4.1	Bewertung der Optimierung der 2-DE.....	100
4.2	Welche Erwartungen waren mit der Suche nach differentiellen Proteinen ver- knüpft?.....	102
4.3	Bedeutung der Kinetik ausgewählter Parameter.....	103
4.4	Bedeutung weiterer differentieller Proteine.....	110
4.4.1	Drei differentielle Proteine, die aus dem Periplasma stammen und an Pro- tein-Reparaturmechanismen beteiligt sind: HtrA, surA und DsbA.....	110

4.4.2	H-NS – ein histonähnliches Protein als universeller Modulator.....	112
4.4.3	S-Ribosylhomocysteinase.....	115
4.4.4	Drei nukleinsäurebindende Proteine.....	117
4.5	Ist der Abbruch der Proteinsynthese ein isoliertes Ereignis ?.....	117
5	Literaturverzeichnis.....	119
6	Anhang.....	134
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	134
6.2	Geräte.....	137
6.3	Chemikalien, Biochemika.....	138
6.4	Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren.....	140
6.5	Kits.....	141
6.6	Verwendete Oligonukleotide.....	142
6.7	Übersicht zu den ribosomalen Proteinen.....	143
6.8	Lebenslauf.....	145
6.9	Publikationen.....	146