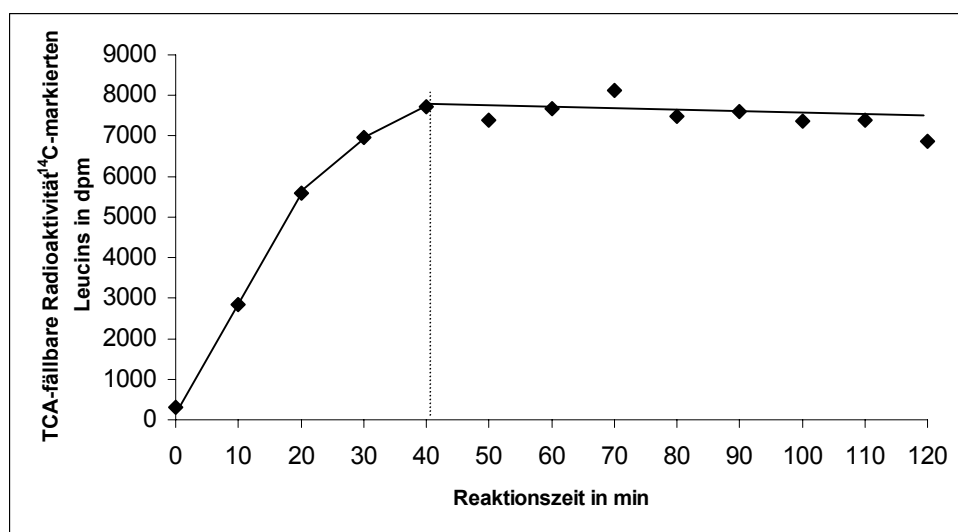


### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Kinetik der Produktbildung

Mit der Proteomanalyse sollte die Frage geklärt werden, ob Proteinkomponenten des *E.coli*-Lysates während der Proteinbiosynthese Veränderungen unterworfen sind. Neben dem vollständigen Batch-Ansatz zum Zeitpunkt 0 als Referenz galt es, einen geeigneten Zeitpunkt zur Analyse des *E.coli*-Lysates auszuwählen. Da bereits beschrieben wurde, dass die Produktausbeute des zu synthetisierenden Proteins im Batchverfahren nach einer gewissen Zeit ein Plateau erreicht, lag es nahe, diesen Zeitpunkt für das eigene System zu ermitteln und die Probenentnahme für die 2-DE entsprechend vorzunehmen (siehe Kap. 1.2.1 und 1.4).

Es wurden Kinetiken der Produktbildung verschiedener, im Labor von Dr. Stiege etablierter Modell-Proteine erstellt. Dies waren FABP (fatty acid binding protein), DHFR (Dihydrofolatreduktase) und CAT (Chloramphenicol-Acetyltransferase). Die Gensequenzen dieser Proteine wurden in den von H. Merk (Dissertation 2000) modifizierten Vektor pHM eingeführt. Ein Standardreaktionsansatz (Kap. 2.1.1) mit radioaktiv markiertem  $^{14}\text{C}$ -Leucin von 375  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen wurde in 25  $\mu\text{l}$  - Einzelportionen für die Entnahme nach der jeweiligen Reaktionszeit aufgeteilt. Je 5  $\mu\text{l}$  wurden für die TCA-Fällung der Proteine eingesetzt und die Radioaktivität des in das Syntheseprodukt eingebauten  $^{14}\text{C}$ -markierten Leucins bestimmt (auf die genaue Berechnung der Produktausbeute wurde verzichtet, weil nur die

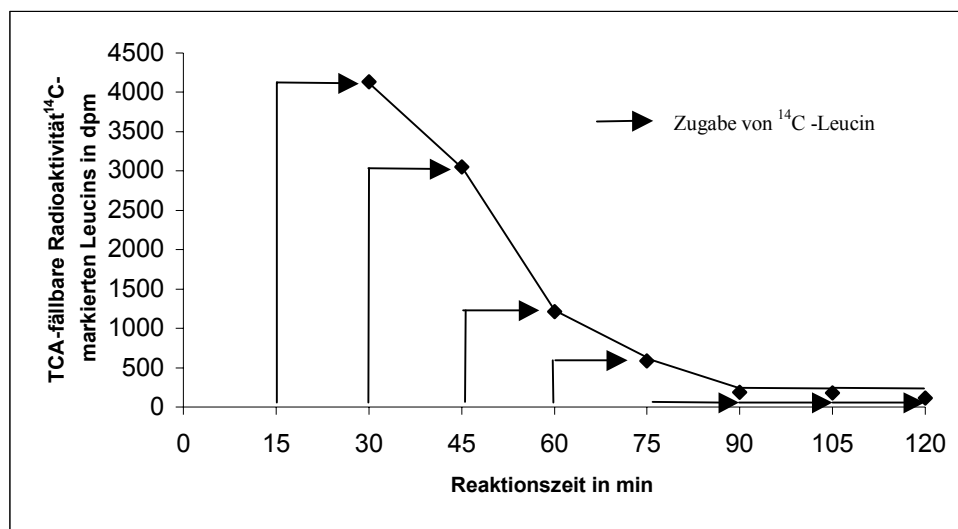


**Abb. 5 Kinetik der FABP-Synthese**

Reaktionsverlauf erreicht nach 40 min ein Plateau, danach kommt die Synthese scheinbar zum Stillstand

Darstellung des Reaktionsverlaufes wichtig war). In Abb.5 ist ein repräsentatives Experiment, die Synthese von FABP dargestellt. Die gleichbleibend hohe Radioaktivität nach 40 min scheint durch einen Synthese-Stopp verursacht worden zu sein. Auch für die Synthese von DHFR und CAT konnte dieser Verlauf bestätigt werden. Das bedeutet, dass dieses Plateau unabhängig von der Art und Größe des zu synthetisierenden Proteins erreicht wird ( $\pm 10$  min in einzelnen Experimenten). Es stellte sich die Frage, ob zwischen 40 und 120 min tatsächlich keine Proteinsynthese mehr stattfindet oder ob das Plateau das Resultat eines dynamischen Gleichgewichtes zwischen Auf- und Abbau des Zielproteins ist.

Die Antwort sollte durch das Ergebnis eines zweiten Experimentes ermittelt werden. Ein Standardreaktionsansatz ohne radioaktiv markiertes  $^{14}\text{C}$ -Leucin wurde wiederum in 25  $\mu\text{l}$ -Aliquots aufgeteilt und inkubiert. Innerhalb der das Produktplateau aus Abb.5 repräsentierenden Zeit (zusätzlich 15 min davor) wurden alle 15 min Proben entnommen, denen 15 min



**Abb. 6 Proteinsynthese von FABP. Untersuchung des Plateaus aus Abb. 5**

Innerhalb von 30 min bis 120 min wurden in 15 min Abständen Proben entnommen (der Zeitraum von 45-120 min repräsentiert das Produktplateau aus Abb.5). Jeweils 15 min vor Ende der Inkubationszeit wurde ein Äquivalent (entsprechend dem Experiment aus Abb.5)  $^{14}\text{C}$ -Leucin hinzupipettiert, um so die Syntheseleistung der letzten 15 min verfolgen zu können.

zuvor ein Äquivalent  $^{14}\text{C}$ -markierten Leucins (entsprechend der Konzentration des Ansatzes aus Abb.5) zugeführt wurde. Damit konnte nach einem Standardreaktionsverlauf die Syntheseleistung der jeweils letzten 15 min verfolgt werden. Abb.6 präsentiert das Ergebnis: Wie zu erwarten war, konnte in den nach 30 und 45 min entnommenen Proben noch eine Aktivität festgestellt werden, während die Aktivität nach 60 min noch gering, aber durchaus im Fehlerbereich des Stillstands der Proteinsynthese von 40 min  $\pm 10$  min lag. Nach 75 min

ist noch immer eine geringe, nicht erwartete Aktivität zu messen. Die Radioaktivität der Proben nach 90, 105 und 120 min entspricht der Negativkontrolle. Zusammenfassend kann man feststellen, dass mit Sicherheit nach 75 min keine Proteinsynthese mehr stattfindet und das Plateau aus Abb.5 im wesentlichen kein dynamisches Gleichgewicht aus Synthese und Abbau des Zielproteins, sondern auf einen absoluten Stillstand der Proteinsynthese zurückzuführen ist.

An dieser Stelle möchte ich auf Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1 vorgreifen. Wegen der Probenaufarbeitung für die 2-DE musste auf PEG 2000 im Standardreaktionsansatz verzichtet werden. Dadurch verlängerte sich die Reaktionszeit. Daher entschied ich mich, die Probenentnahme auf 2h festzusetzen .

## **3.2 Proteom-Analyse der *E.coli*-Lysatproteine**

### **3.2.1 Optimierungen bezüglich der Probenvorbereitung für die 2-DE**

#### **Problemerkennung**

Die Probenvorbereitung ist die wichtigste beeinflussbare Variable in der Hand des Experimentators in der 2-DE. Sie ist für die Reproduzierbarkeit und Auswertbarkeit ausschlaggebend. Wichtige Parameter sind:

1. Löslichkeit der Proteine
2. Die Proteine sollten die einzigen Variablen in den Lösungen sein !
3. Puffer und Salzgehalt
4. konstante Proteinkonzentration, für anschließende Identifikation ausreichende Proteinmengen
5. Schutz vor Degradierung

Üblicherweise werden Zellen, die zwei miteinander zu vergleichende Zustände repräsentieren, zentrifugiert und die Pellets im für die Elektrophorese geeigneten Puffer (Tris-HCl) mit niedriger Salzkonzentration (unter 50 mM), 8 M Harnstoff, DTT, Proteaseinhibitoren und einer Ampholytlösung versetzt und sind so direkt in der 2-DE einsetzbar.

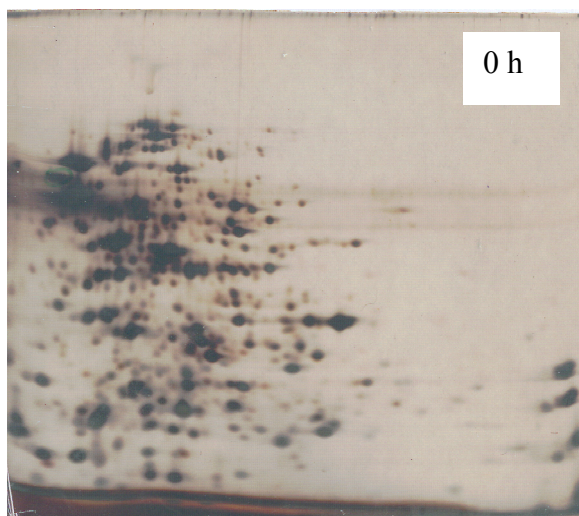
In unserem System, das bereits mit einem Zellysate arbeitet, kann eine Aufkonzentrierung nur mit größerem Aufwand gelingen. Die hohe Salzkonzentration, die das System charakterisiert und zu Proteinpräzipitaten führt, deren Entzug letztlich untersucht werden soll, muss zur 2-DE vermieden werden. Weiterhin besteht das System noch aus anderen Variablen, die den isoelektrischen Punkt der Proteine beeinflussen können. Erwähnt werden soll hier vor allem

die Ansammlung von anorganischem Phosphat durch den Abbau der Nucleosidtriphosphate und die veränderte Polyaminkonzentration (Ausführliche Beschreibung in Kapitel 3.3.3 und 3.3.4) nach dem Ende der Proteinsynthese.

Nachfolgend werden die Probleme und deren Lösung im Einzelnen beschrieben. Für die Vorversuche wurde die 2-DE in Kleingeltechnik ausgeführt.

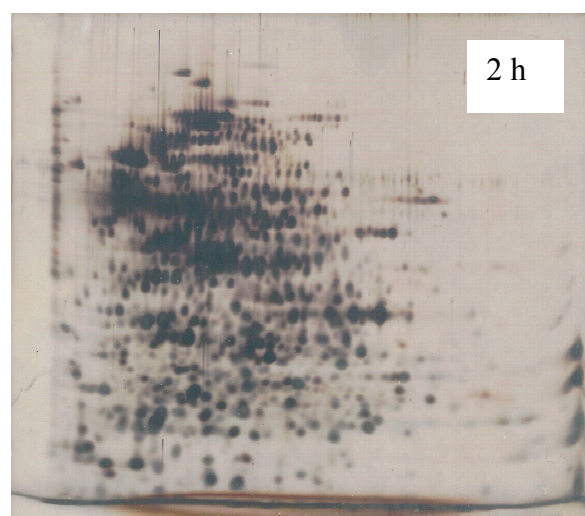
### I. Problem:

Der als Flüssigprobe behandelte Batchansatz wies nach Zugabe von 8 M Harnstoff einen voluminösen, weißen Niederschlag auf. Proteine können unspezifisch an den Niederschlag binden und nach einer Zentrifugation in das Pellet mitgerissen werden. Die Folge sind nichtreproduzierbare Spotmuster. Gelbilder von Überstand und Pellet sind in den Abb. 7 und 8 dargestellt. Die 2 h - Probe wies charakteristische Spotketten auf. Diese neuen, zusätzlichen Spots waren instabil, denn sie konnten nicht zuverlässig wiederholt werden.



**Abb. 7 Batchansatz zum Zeitpunkt 0h / Überstand nach Zentrifugation (Silberfärbung)**

Die Probe wurde original in die 2-DE eingesetzt. Wegen des Polyethylenglykols fiel nach Zugabe von Harnstoff ein Niederschlag aus. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde hier aufgetragen.



**Abb. 8 Batchansatz nach 2h / Überstand nach Zentrifugation (Silberfärbung)**

Die gleichen Vorbedingungen wie Abb. 7. Charakteristisch in diesem Gel ist das Auftreten von waagerechten Spotketten, die in wechselnder Intensität im 2 h - Gel auftraten; ein ähnliches Phänomen konnte auch bei der Gelelektrophorese der ribosomalen Proteine beobachtet werden (siehe Kap. 3.2.5)

Dasselbe Phänomen trat bei der Gelelektrophorese der ribosomalen Proteine (siehe Kap. 3.2.5) auf. Dabei handelt es sich möglicherweise um Salzeffekte, die durch die veränderte Zusammensetzung (s.o.) des Batchansatzes und den in den sauren Bereich verschobenen pH-

Wert nach 2 h verursacht werden. Wie in Abb. 9 zu sehen ist, bestätigte sich der Verdacht, dass im Sediment Proteine vorhanden sind. Der Niederschlag sollte daher vermieden werden.



**Abb. 9 Abzentrifugierter Niederschlag als Festprobe behandelt, (Silberfärbung)**

Beispiel für ein Gel, welches aus dem Rückstand von Proben wie aus Abb. 7 und 8 gewonnen wurde; es bestätigte sich, dass im Sediment zahlreiche Proteine vorhanden waren

### **I. Problemlösung:**

Es musste aufgedeckt werden, welche der Komponenten im Batchansatz (siehe Kap. 2.1.1) den Niederschlag mit Harnstoff verursacht. Zunächst wurden jeweils die Gruppenkomponenten T-Mix, S-Mix und E-Mix weggelassen. Der T-Mix enthielt den störenden Zusatz. In Einzelanalysen wurde Polyethylenglykol 2000 als Verursacher identifiziert. Konnte die gut optimierte Proteinsynthese auf Polyethylenglykol verzichten? Antwort: Ja, unter Produkteinbußen. FABP erreichte nur noch 30 % Produktausbeute im Vergleich zu den Standardansätzen und die Reaktionszeit verlängerte sich auf über 90 min. Um die Reproduzierbarkeit der Gele nicht zu gefährden, musste dieser Nachteil akzeptiert werden.

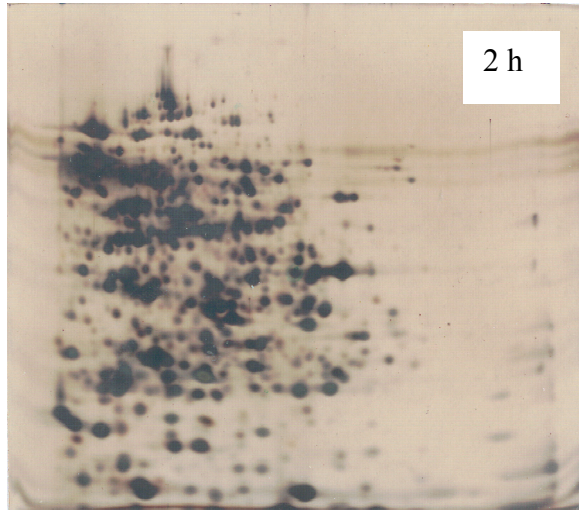
### **II. Problem:**

Wie in Punkt I. gezeigt, warfen die waagerechten Spotketten der 2 h – Gele (vgl. Abb. 8) die Frage auf, ob es sich dabei tatsächlich um Modifikationen oder aber um Salzeffekte handelt.

### **II. Problemlösung:**

Die aus dem Batch übernommenen zu hohen Salzkonzentrationen und ungleichen Nebenbedingungen der beiden miteinander zu vergleichenden Zustände mussten durch gleiche, 2-DE-kompatible Lösungen ersetzt werden. Die Fällung der Proteine mit Aceton und anschließende Lösung in 2-DE-Probenpuffer sollte zunächst aufklären, ob die Spotketten der 2h-Gele unter diesen Bedingungen Bestand haben. Abb.10 zeigt ein Beispiel eines solchen

Gels. Man kann also davon ausgehen, dass es sich nicht um echte Modifikationen sondern um Salzeffekte handelt. Die Acetonfällung ist allerdings keine praktikable Alternative für die Probenvorbereitung der 2-DE, weil 1. nicht alle Proteine quantitativ gefällt werden, und 2. danach nicht immer vollständig in Lösung gehen.



**Abb. 10 Acetonfällung einer 2h-Probe und Auflösung in 2-DE-Probenpuffer, (Silberfärbung)**

Die Spotketten treten nicht mehr auf (vgl. Abb. 8), was darauf hindeutet, dass es sich um Salzeffekte handelt. Die Acetonfällung eignet sich aber nicht für die Probenvorbereitung, weil nicht alle Proteine quantitativ gefällt und danach wieder vollständig gelöst werden können.

Die Ultrafiltration sollte sich für eine Umpufferung besser eignen, weil die Proteine gelöst bleiben. Es wurden Amicon-Filter mit einem Ausschlussmolekulargewicht von 10 kDa verwendet. Leider gehen dabei auch die im Batch enthaltenen Proteasehemmer verloren. Die den Proteinabbau hemmende Ultrafiltration bei 4°C war wegen der in der Kälte entstehenden Niederschläge nicht möglich. Bei Raumtemperatur trat der wegen fehlender Proteasehemmer befürchtete, beschleunigte Proteinabbau ein, wie in Abb. 11 zu sehen ist. Die Umpufferung konnte also nicht mit der Ultrafiltration gelöst werden.



**Abb. 11 Gel nach Ultrafiltration bei Raumtemperatur, (Silberfärbung)**

Obwohl hier dasselbe Äquivalent einer Probe wie in den vorangegangenen Beispielen aufgetragen wurde, sind weniger und in den niedermolekularen Bereich verschobene Proteinspots zu sehen. Das ist die Folge von ungehemmtem Abbau durch Proteasen und unspezifischer Bindung der Proteine an die Filtermembran des Amicon-Röhrchens.

### **III. Problem:**

Im Ansatz befinden sich Nukleinsäuren, an die Proteine spezifisch oder unspezifisch binden können. Zudem stellen die Nukleinsäuren eine unerwünschte Variable dar, denn in den 0h – Ansätzen ist Plasmid-DNA und den 2h-Ansätzen zusätzlich mRNA enthalten.

### **III. Problemlösung:**

Nukleinsäuren können durch 30 min Inkubation bei 37°C mit Benzonase verdaut werden. Der Vergleich der 0h und 2h Gele mit und ohne Benzonasebehandlung erbrachte keine ersichtlichen Vorteile. Im Gegenteil verlängerte diese Inkubation die Verweilzeit bei 37°C und verfälschte die Experimentierbedingungen. Es wurde darauf verzichtet.

### **Zusammenfassung:**

Polyethylenglykol als Störfaktor bei der Probenvorbereitung für die 2-DE konnte identifiziert und weggelassen werden. Das Problem der Umpufferung bzw. anderweitigen Entfernung der Salze konnte noch nicht gelöst werden.

## **3.2.2 1. Gelsatz. 2-DE aus dem Gesamtansatz – Identifizierung des ersten differentiellen Proteins**

Zum Vergleich der Proteinmuster wurde eine Gruppe von Gelen aus Proben zu Beginn der Synthese (0 h: Gele a-e) und nach Beendigung (2 h: Gele f-k) Silber-gefärbt und mit der „Melanie“-Software (Appel *et al.*, 1991) ausgewertet.

Für jedes Gel wurden 20 µl Reaktionsmix ohne PEG 2000 (siehe Variation in Kap. 3.2.1, Punkt 1) wie in Kap. 2.1.1 beschrieben eingesetzt. Dies entsprach einer absoluten Proteinmenge (Proteinbestimmung nach Bradford) von 25 µg pro Gel.

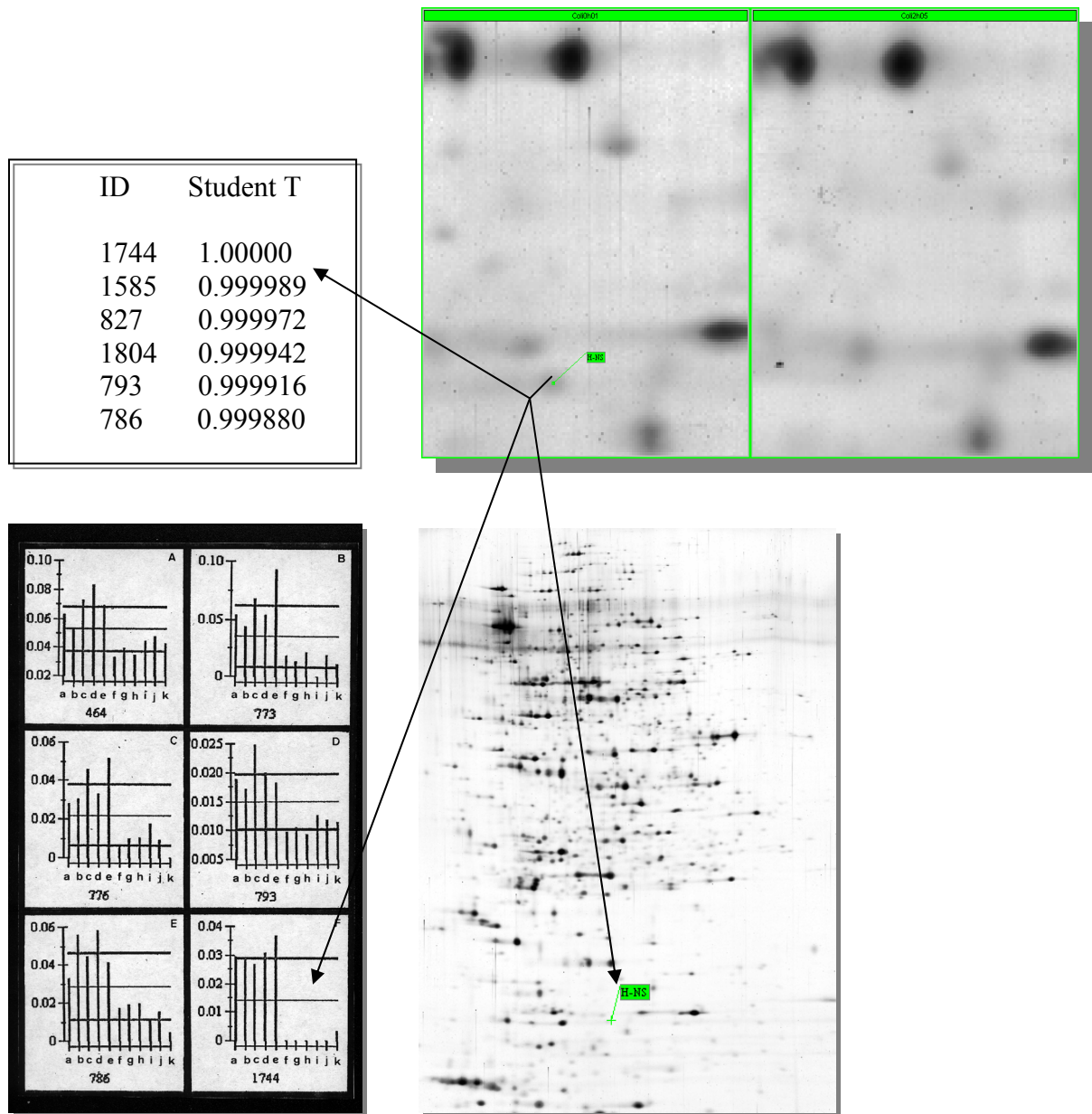
Zirka 1700 Spots konnten pro Gel gezählt werden, über 4000 Gene verfügt das *E.coli*-Genom, wobei ein Teil während der Lysataufarbeitung entfernt worden ist, ein anderer Teil mit der Färbung nicht sichtbar gemacht werden kann. Angenommen 3000 Proteine befinden sich noch im Lysat, dann sind pro Proteinspot ca. 0,007 µg Protein enthalten. Bei einer durchschnittlichen Proteingröße von 50 kDa entspricht das im Durchschnitt 140 fmol pro Spot. Das wäre durchaus eine Größenordnung, die mit der Identifizierung per MALDI vereinbar wäre. Trotzdem darf nicht vergessen werden, dass sich die Konzentrationen einzelner Proteine um mehrere Zehnerpotenzen unterscheiden können.

Die erste Begutachtung der Gele von 0 und 2 h ergab bis auf drei starke Spots, die später als FABP identifiziert wurden, auf den 2 h - Gelen keine sofort sichtbaren, signifikanten Unterschiede. Das sprach für die Wirksamkeit der eingesetzten Proteasehemmer. Mit der „Melanie“-Software konnten jedoch die vielen, schwachen Spots einbezogen werden. Daraus ergab sich folgender Befund: Durchschnittlich  $1743 \pm 6,8$  % Spots konnten in der Gruppe der 0 h - Gele und  $1943 \pm 10,8$  % in der Gruppe der 2 h - Gele ermittelt werden. Die signifikant höhere Zahl der Spots nach 2 h deutete darauf hin, dass doch eine proteolytische Aktivität vorhanden und/oder zusätzliche Modifikationen eingeführt worden sein könnten. Auf der Basis beider Gruppen von Gelen wurde ein „synthetisches“ Gel als Referenzgel erstellt. Aus dem Vergleich jedes einzelnen Gels mit dem Referenzgel resultierten Histogramme für die nummerierten Spot, wie beispielhaft in Abb.12 zu sehen ist. Die Spotintensität wurde in Volumenprozent angegeben und die Signifikanz der differentiellen Proteine nach dem „Student T Test“ berechnet. In die Bewertung wurden nur Spotintensitäten von größer als 0,01 Volumenprozent, einer Differenz von mindestens Faktor 2 und einer Signifikanz von 0,975 einbezogen. Unter diesen Vorbedingungen ergaben sich 27 differentielle Spots, von denen einer nach 2 h nicht mehr vorhanden war (dieser Spot mit der Nummer 1744 hatte gleichzeitig die höchste Signifikanz von 1). Neun Spots wiesen nach 2 h eine verringerte, fünf eine erhöhte Intensität auf und zwölf entstanden neu (Lamla *et al.*, 2001). Die Identifizierung der Spots sollte mit der MALDI-kompatiblen Coomassiefärbung erfolgen. Mit diesem Coomassie-Gel konnten mehrere intensive Spots identifiziert werden, die eine Übersicht zur Lage der isoelektrischen Punkte und Molekulargewichte ermöglichten, siehe Abb.15. Da die Coomassie-Färbung um den Faktor 1000 unempfindlicher als die Silberfärbung ist, konnte von den 27 differentiellen Spots nur Nr. 1744 (neben den 3 FABP-Spots) identifiziert werden. Bei diesem handelte es sich um das Histon-ähnliche Protein H-NS (siehe auch Abb.12 und 13) mit einer Sequenzabdeckung bezogen auf den Peptidfingerprint von 44 %.

Wegen des begrenzten Volumens für den Probenauftrag in der ersten Dimension und der geringen Wiederfindungsrate interessanter Spots beim Übergang vom analytischen, Silbergefärbten Gel zum präparativen Coomassie-gefärbten Gel musste zu einer anderen Strategie übergegangen werden: Die Proben sollten fraktioniert und konzentriert werden. Anstelle der Coomassie-Färbung sollte eine modifizierte Silberfärbung angewandt werden, die gleichzeitig Analyse und Identifizierung ermöglicht.

Die geringe Wiederfindungsrate der differentiellen Spots ließ vermuten, dass es sich bei diesen um Proteine mit relativ geringer Kopienzahl handelt.

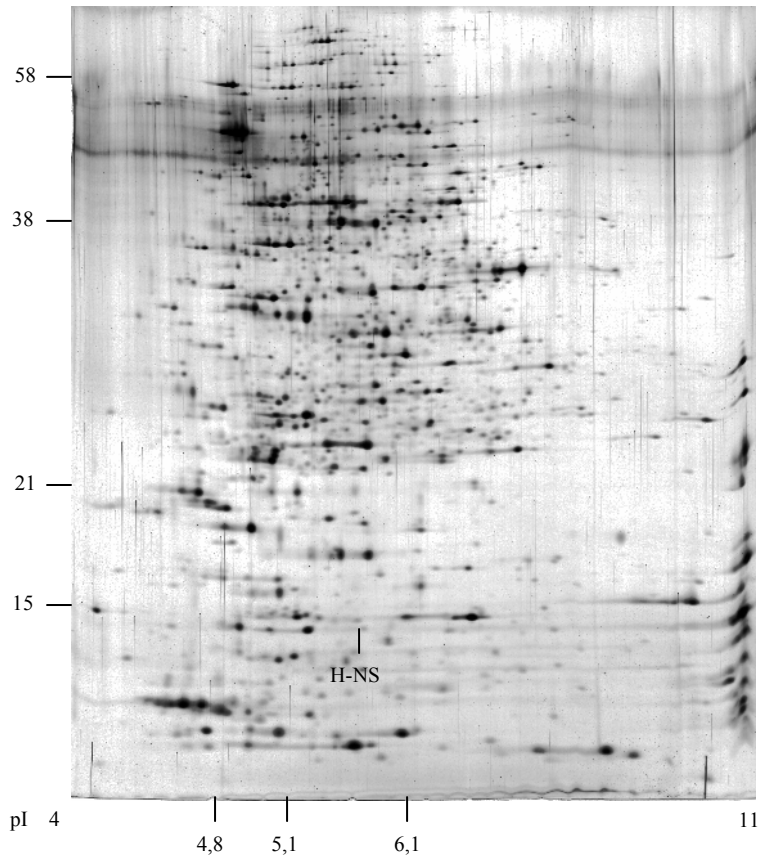




**Abb. 12 Identifizierung des differentiellen Proteins H-NS.**

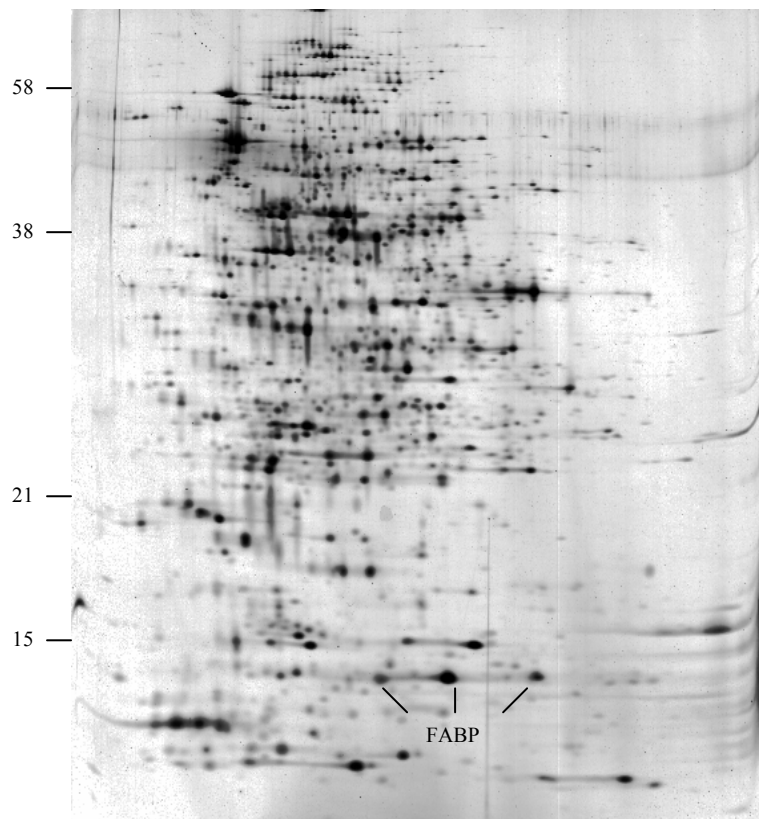
Das Protein mit der Spotnummer 1744 (H-NS) zeigte im Signifikanzreport (Bild oben links) nach dem „Student-T-Test“ den höchstmöglichen Wert 1. Die Signifikanz eines differentiellen Proteins wurde aus dem Vergleich der Gruppe der 0 h - Gele (a-e) und der Gruppe der 2 h - Gele (f-k) mit dem Referenzgel ermittelt. Auf der Basis der Spotintensitäten, angegeben in Vol. %, wurden Histogramme erstellt (Bild unten links). Dargestellt sind 6 Histogramme, deren Spots nach 2 h weniger intensiv bzw. nicht mehr vorhanden waren. H-NS ergab, wie fast alle differentiellen Proteine des ersten Gel-Sets einen Spot schwacher Intensität im Silbergel (Bild oben rechts). Links ist ein Bildausschnitt aus einem 0 h - Gel, daneben derselbe Bildausschnitt nach 2 h. Das Bild unten rechts zeigt die Lage von H-NS auf dem Großgel.

MG in kDa

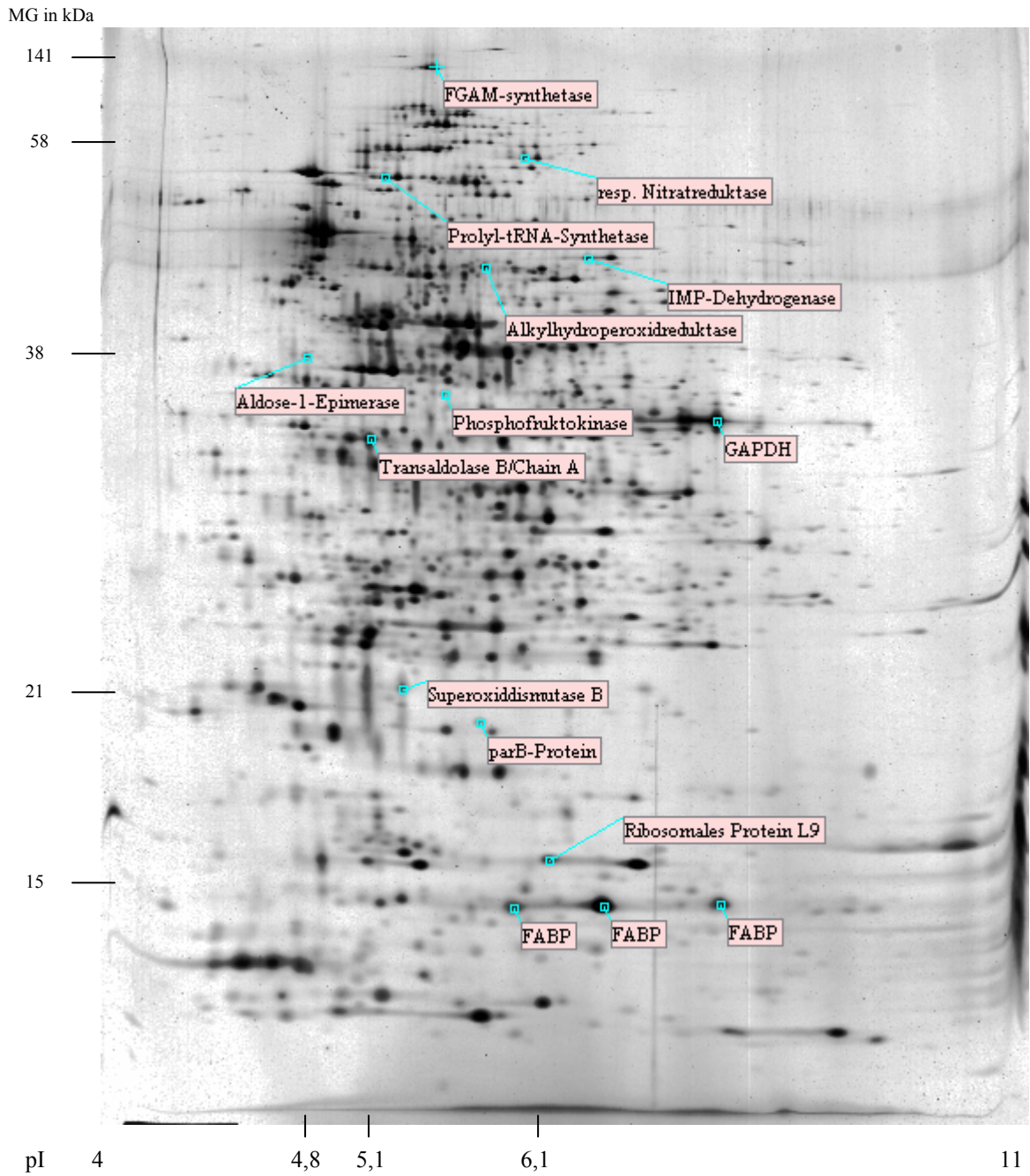


**Abb. 13** *E.coli*-Proteine aus dem Gesamtansatz zu Beginn der zellfreien Proteinsynthese. Auftrag 25 µg. Silberfärbung. Spot des differentiellen Proteins H-NS noch vorhanden

MG in kDa



**Abb. 14** *E.coli*-Proteine aus dem Gesamtansatz nach 2 Stunden der zellfreien Proteinsynthese. Auftrag 25 µg. Silberfärbung. Das zu synthetisierende Protein FABP ist mit 3 neuen Spots vertreten. Starke Unterschiede im Spotmuster sind ansonsten nicht zu erkennen. Die differentiellen Proteine sind schwache Spots.



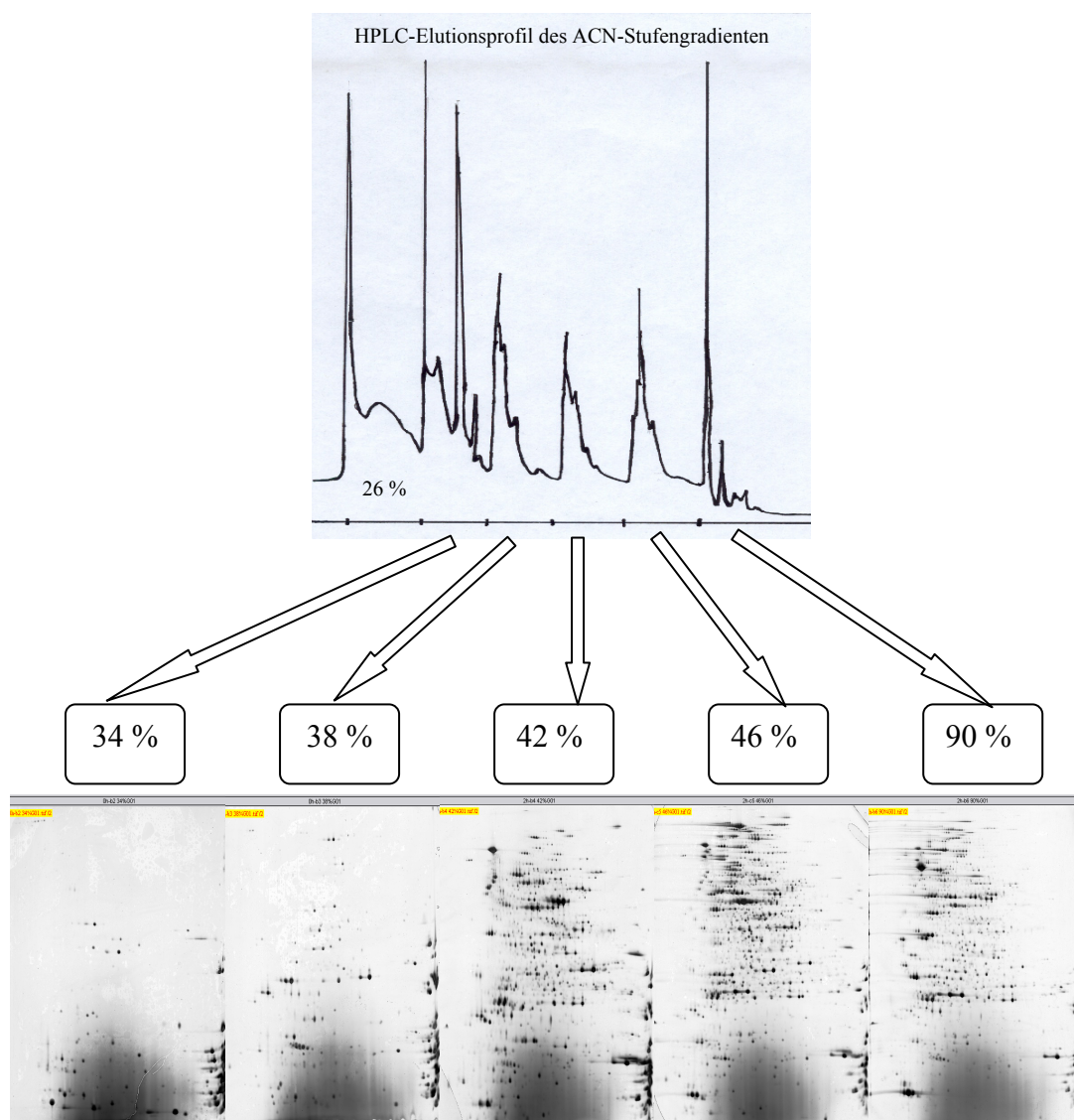
**Abb. 15** Großgel mit ca. 25 µg *E.coli*-Protein aus der Proteinsynthesereaktion nach 2 h, Silberfärbung. Das neu synthetisierte Protein FABP konnte anhand von drei markanten Spots identifiziert werden. Alle anderen Proteine sind keine differentiellen Proteine und dienen der Kartierung von Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt. Die Identifizierung per MALDI wurde aus Coomassie-gefärbten Gelen vorgenommen und die Proteine nachträglich zugeordnet.

**Tabelle 11:** Per MALDI identifizierte Proteine aus dem Coomassie-Gel. Markerproteine (schwarz), Proteinsyntheseprodukt (grün), differentielles Protein (rot); Anhand der identifizierten Peptidmassen (peptide fingerprint) konnte der Prozentsatz der mit den ermittelten Peptiden abgedeckten Proteinsequenz ermittelt werden. Der „Score“ in der Datenbank „Mascot“ gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der es sich anhand des „peptide fingerprint“ tatsächlich um das angegebene Protein handelt. „Score“ bedeutet  $10^{\text{Score}}$ , P = Wahrscheinlichkeit; ein Wert unter 54 gilt als nicht signifikant ( $p < 0,05$ ).

Proteinname	Accession No.	Theoret. MG in kDa	pI	Anzahl ident. Peptide	Sequenz- abdeckung	Score in „Mascot“
Phosphoribosylfomyl- Glycinamid-Synthetase	gi/1788909	141,4	5,2	29	25 %	128
Respiratorische Nitrat- reduktase 1, $\beta$ -Kette	gi/1346663	58,0	6,4	14	21 %	109
RNA-Synthesefaktor bzw. Prolyl-tRNA Synthetase	gi/145803 gi/586061	57,5 63,7	5,5	11 11	25 %	116 111
IMP-Dehydrogenase	gi/146275	51,9	5,9	6	24 %	74
Alkyl-Hydroperoxid- Reduktase Untereinheit F	gi/2507291	56,1	5,5	9	18 %	129
Glyceraldehyd-3-Phos- phat-Dehydrogenase, Kette A	gi/10120771	35,4	6,6	8	29 %	76
Eisen-enthaltende Super- oxid-Dismutase, Kette A	gi/5902908	21,1	5,7	5	26 %	64
Par B Protein	gi/95975	20,2	(10,2)	6	14 %	61
Transaldolase B, Kette A	gi/14277926	35,2	5,1	14	48 %	120
Aldose-1-Epimerase	gi/16128724	38	4,8	12	39 %	86
Phosphofruktokinase	gi/15802134	32,6	5,3	7	25 %	59
Ribosomales Protein L9	gi/5804792	15,8	6,1	11	66 %	69
FABP (bovine), Kette A	gi/6729922	14,6	6,9	9	58 %	124
Histon-ähnliches Protein	gi/123441	15,6	5,4	9	44 %	59

### 3.2.3 2. Gelsatz. Fraktionierung und Aufkonzentrierung der Proteine mittels analytischer HPLC

Die Menge an aufgetragenem Protein pro Gel im vorangegangenen Experiment war zu gering. Darüber hinaus bestand immer noch das Problem des hohen Salzgehaltes in den Proben. Eine Methode zur Fraktionierung und Aufkonzentrierung von komplexen Proteingemischen (und damit gleichzeitig zur Entsalzung) vor dem Einsatz in der 2-DE ist von V. Badock (2001) beschrieben worden. Nach der Beladung einer C<sub>4</sub>-Reversed Phase Säule mit den Gesamtpro-

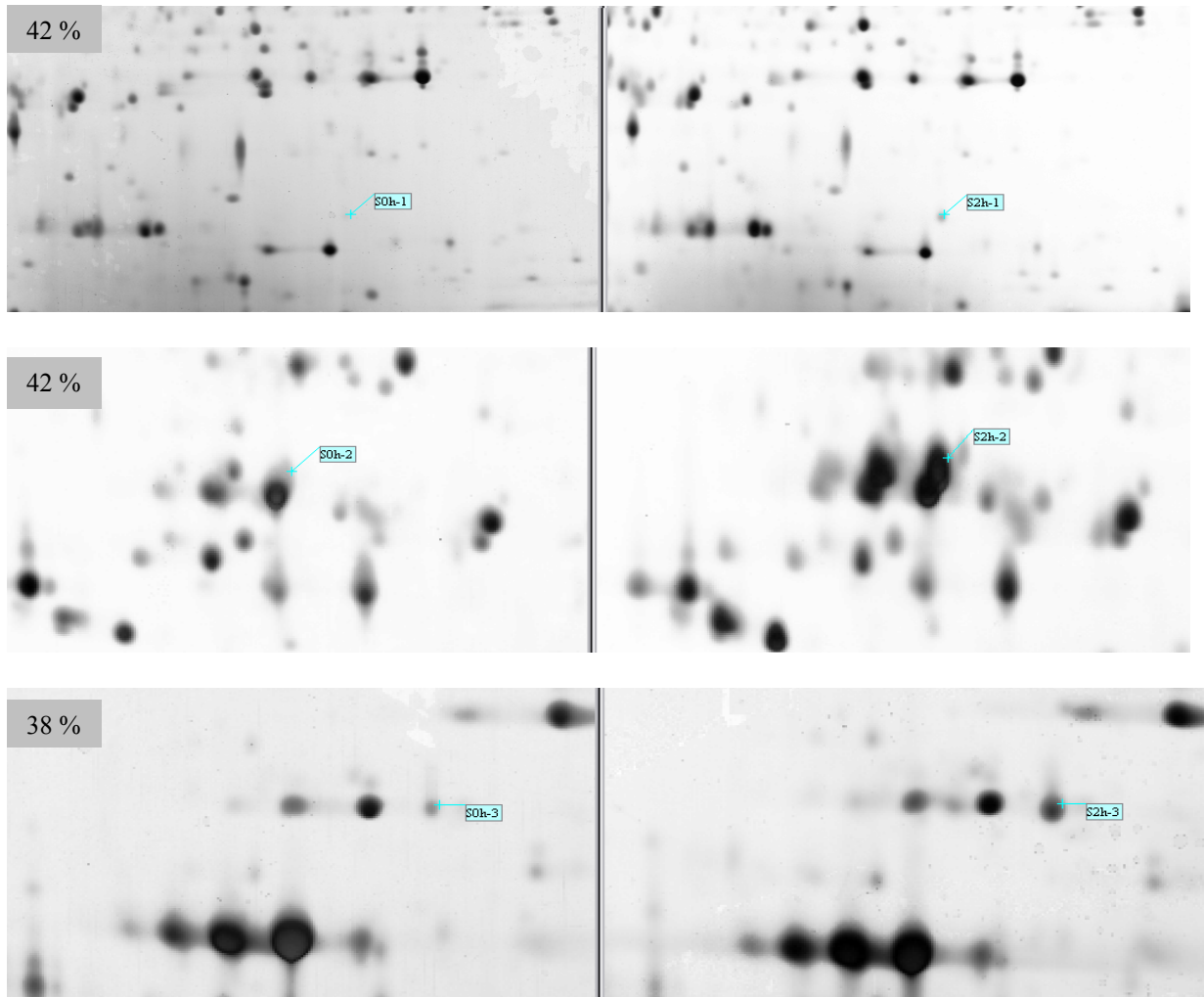


**Abb. 16** Fraktionierung von 500 µl des Gesamtansatzes der *in vitro* Proteinbiosynthese an einer analytischen C<sub>4</sub>-Vydac Reverse Phase Säule mit Hilfe eines Stufengradienten von 26, 34, 42, 46 und 90 % Acetonitril in 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O. Das Elutionsprofil wurde nach UV-Messung bei 220 nm erstellt. Die 26 %-Fraktion wurde verworfen, die anderen lyophilisiert und als „Festproben“ weiterbehandelt, jeweils auf ein Gel aufgetragen und mit der Silberfärbung nach Blum angefärbt.

teinen wurden mit Hilfe eines Stufengradienten steigender Acetonitrilkonzentration in 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O einzelne Fraktionen eluiert.

Durch Variation des Gradienten wurde die Eignung in Bezug auf den Gesamtansatz der zellfreien Proteinsynthese getestet. Eine zusätzliche Elutionsstufe von 26 % Acetonitril wurde daraufhin eingeführt. In der 2-DE ergab diese Fraktion allerdings kein Spotmuster. Möglicherweise befanden sich darin die Aminosäuren und Peptide sehr geringen Molekulargewichts. Ansonsten erwiesen sich die Elutionsstufen 34, 38, 42, 46 und 90 % Acetonitril als optimal und wurden so beibehalten (Abb. 16). Der Auftrag der Fraktionen auf je ein Gel ergab separate Proteinmuster, wobei sich Spots einzelner Proteine hoher Konzentrationen durchaus über mehr als eine Fraktion erstrecken konnten. Die Spotmuster und -intensitäten innerhalb der Fraktionen waren reproduzierbar. Obwohl der Proteingehalt in den Fraktionen laut Elutionsprofil relativ gleichmäßig verteilt war, scheint es, als ob auf den Gelen der 34 und 38 % - Fraktion weniger Protein aufgetragen worden wäre und die Spotmuster nicht die Vielfalt der anderen Fraktionen erreichen. Tendenziell scheint in diesen beiden Fraktionen der Schwerpunkt auf niedermolekularen Proteinen zu liegen, so dass möglicherweise ein Teil der Proteine oder Peptide aus dem Gel herausgelaufen sein könnte (Gele erfassen Proteine erst ab ca. 10 kDa). Trotzdem konnten in der 38 % -Fraktion mehrere potentiell differentielle Proteine erkannt werden und die 38 % - Fraktion des dritten Gelsatzes mit einem noch höheren Proteinauftrag pro Gel zeigte ein differenzierteres Proteinmuster (behandelt im nächsten Kapitel 3.2.4). So kann man schlussfolgern, dass zumindest ein Teil der Proteine in der zweiten Gelserie aufgrund zu geringer Konzentration zunächst nicht angefärbt wurde.

Als Färbung erwies sich die Silberfärbung nach Blum (1987) ohne Glutaraldehyd prinzipiell als MALDI-tauglich. So konnte auf die Anfertigung der wenig sensitiven Coomassie-Gele verzichtet werden. Durch die Fraktionierung wurde theoretisch eine fünfundzwanzigfache Konzentrierung der Proteine auf dem Gel gegenüber dem Auftrag aus Kapitel 3.2.2 erreicht. Trotzdem konnten nur drei weitere differentielle Proteine per MALDI identifiziert werden (Abb.17 und Tab.12). Das kann einerseits daran liegen, dass die Konzentration einzelner Spots immer noch zu gering war. Andererseits machte ich die Erfahrung, dass sich die Spots im Laufe der Lagerungszeit der Gele nicht mehr identifizieren ließen. Daher musste ein weiterer Satz von Gelen angefertigt werden (Kap. 3.2.4).



**Abb. 17** Identifizierte Spots differentieller Proteine nach der Fraktionierung von 500 µl Gesamtansatz der *in vitro* Proteinbiosynthese. Gele nach Blum Silber-gefärbt. Das jeweils linke Bild eines Paares stellt den Gelausschnitt der Probe zu Beginn, das rechte nach Beendigung der Proteinsynthese dar. Die Nummerierung entspricht den Proteinen in Tab. 12

**Tabelle 12:** Per MALDI-fingerprint identifizierte Proteine aus Abb. 17

Proteinname	Accession No.	Theoret. MG in kDa	pI	Anzahl ident. Peptide	Sequenz- abdeckung	Score in „Mascot“
S 2h-1. Protein YFBU	gi/6136700	19,9	5,1	8	25 %	95
S 2h-2. Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase C22	gi/543784	20,9	5,0	8	43 %	
S 2h-3. hypothetisches Protein (AP000422)	gi/7649900	319,9	8,5	22	Fragment, deckt den Bereich AS 1019-2794 ab	101

### 3.2.4 3. Gelsatz. Präparative HPLC – Fraktionierung

Um in den einzelnen Spots noch mehr Material für die MALDI-Analyse zur Verfügung zu haben, wurden Großansätze (12 ml) der zellfreien Proteinsynthese fraktioniert. Dazu wurde ein präparatives HPLC-System mit höherer Durchflußgeschwindigkeit und eine Säule mit höherer Beladungskapazität verwendet. Im Gegensatz zur analytischen HPLC wurden die Proben diesmal nicht vor der Beladung der Säule mit 8 M Harnstoff versetzt, sondern ohne Zusätze eingespritzt. Die Fraktionen enthielten durchschnittlich 3 mg Protein nach der Gefriertrocknung. Pro Gel wurde 1 mg Protein aufgetragen, was einer zweihundertfachen Anreicherung der Proteine gegenüber dem ersten Gelsatz entsprach. Die Gele wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO-Ruby angefärbt. Da die 38 % - Fraktion die größte Anzahl differentieller Proteine enthielt, wurde die Analyse auf diese Fraktion konzentriert. Es konnten 16 differentielle Proteine aus den 0 h - Gelen identifiziert werden. Einige Proteine traten in bis zu drei Isoformen auf. Die Spots dieser Proteine waren nach 2 h schwach oder nicht mehr vorhanden. Sie wurden aus den 0 h – Gelen ausgeschnitten und identifiziert. 2 Proteine konnten aus den 2 h - Gelen identifiziert werden, ihre Spots waren zu Beginn der Translation nicht oder weniger intensiv sichtbar.

Insgesamt wurden 62 Spots analysiert. Dass die überwiegende Zahl der ermittelten, differentiellen Proteine im 2 h – Gel kaum noch erkennbar war, entspricht auch dem Gesamtbild einschließlich der nicht identifizierten Proteine. Wie die weiteren Untersuchungen an vier klonierten Proteinen ergaben, sind diese Proteine zum Teil zwar fragmentiert, aber dennoch nicht vollständig abgebaut worden (Kap 3.2.6; Abb. 30, 31). Sie befinden sich vermutlich wegen ihrer veränderten Hydrophobizität in einer anderen Fraktion.

Um in die Liste der differentiellen Proteine (Tab.13) aufgenommen zu werden, wurde ein Limit von mindestens 20 % Sequenzabdeckung der mit der MALDI ermittelten Peptide gesetzt.

Zwei differentielle Proteine, RF-1 und S1 stehen in direktem Zusammenhang mit der Translation. Die MALDI-Analyse führte bei ihnen zu einer Sequenzabdeckung von unter 20%. Daher wurde zusätzlich eine Fragmentanalyse zur Bestimmung der Aminosäuresequenz eines Peptids vorgenommen, die das Ergebnis bestätigte.



**Tabelle 13: Identifizierung differentieller Proteine aus dem *in vitro* Proteinsynthese-Batchsystem von *E.coli*<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> bezogen auf die 38% acetonitril-fraction der Anreicherung per HPLC (1 mg Proteinauftrag, Fluoreszenzfärbung)

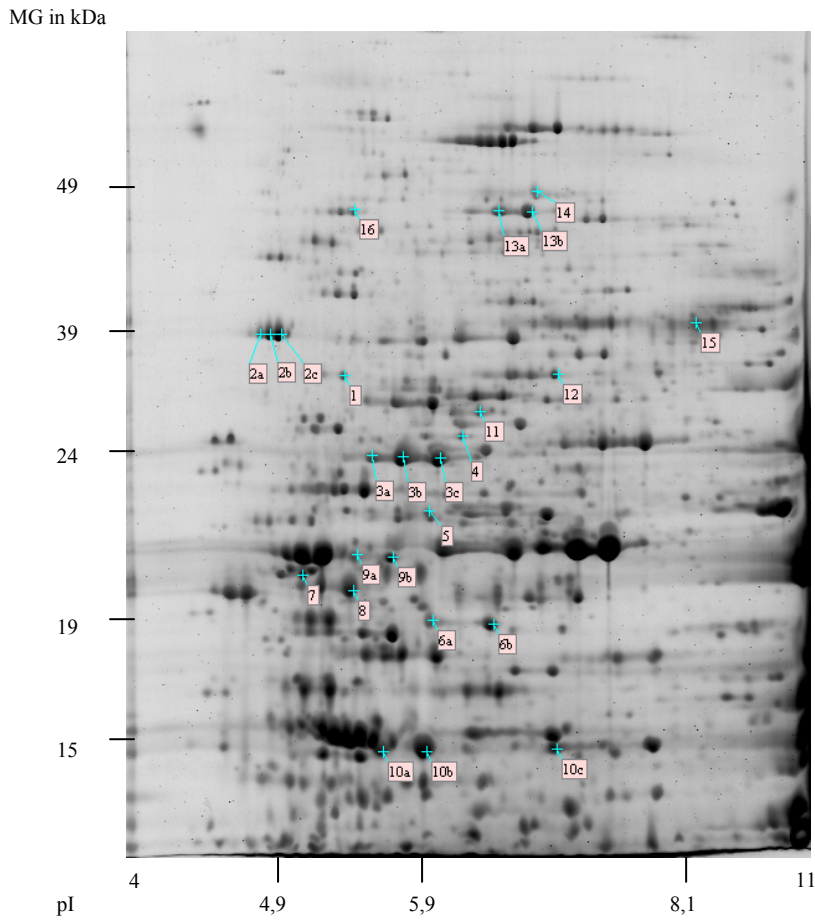
<sup>b</sup> Daten aus Expasy

<sup>c</sup> "peptide fingerprint" nach Trypsinverdau

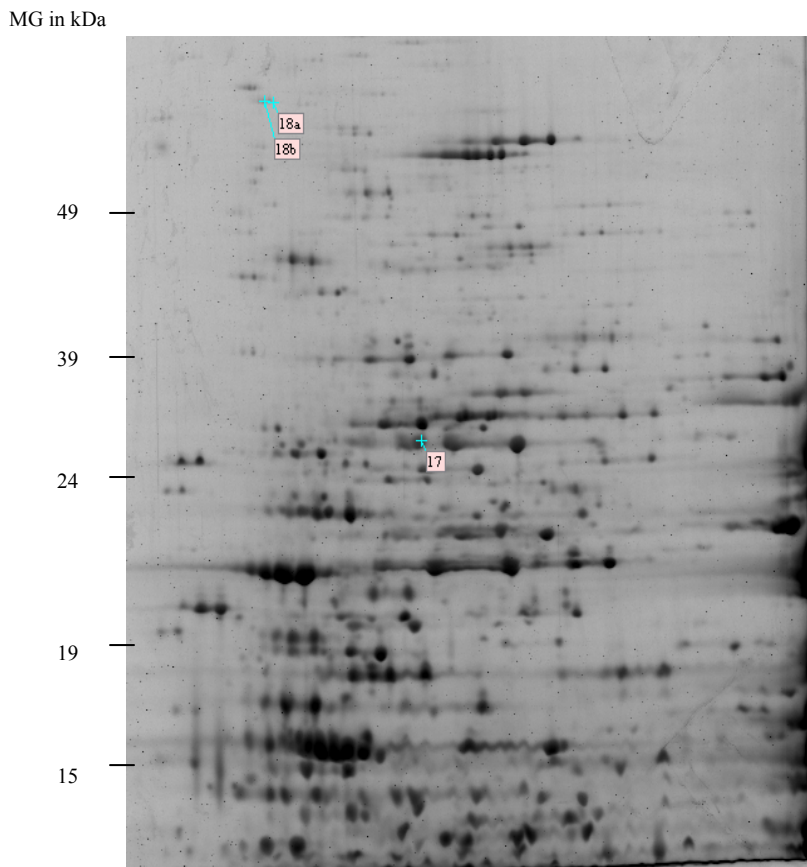
<sup>d</sup> 2-DE image, swiss prot data base

Spotnummer	Proteinname	Abkürzung	Accession No. (Swiss prot)	Theoret. mol. Mass (kDa) <sup>b</sup>	Theoret. pI <sup>b</sup>	Sequenz- abdeckung <sup>c</sup> (%)	Anzahl ident. Pepti- de	Score (Mascot)
<i>Proteine aus dem 0 h - Gel</i>								
0-1	D-galactose D-glucose binding protein	DGAL	P02927	31.345	5.68	25	7	103
0-2a,b,c	spermidine / putrescine periplasmatic transport protein	POTD	Q8X8D9	38.791	5.27	2a) 17 2b) 23 2c) 35	7 10 17	78 92 168
0-3a,b,c	adenylate kinase	KAD	Q8FK84	23.542	5.75	3a) 62 3b) 92 3c) 75	17 25 14	229 321 185
0-4	orf; protein with unknown function, YqjH	-	Q46871	28.840	5.53	31	9	103
0-5	trp-repressor binding protein	WRBA	Q8X4B4	20.703	5.92	40	6	1 (Profound)
0-6a,b	orf, protein with unknown function, YajQ	-	P77482	19.047	5.99	6a) 63 6b) 62	17 62	193 193
7	orf, protein with unknown function, YrdC	-	P45748	20.768	4.94	38	13	154
0-8	S-ribosylhomocysteinase	LUXS	Q8X902	19.313	5.18	60	15	163
0-9a,b	thiol:disulfide interchange protein	DSBA	P59589	23.118	5.95	9a) 35 9b) 26	10 8	137 88

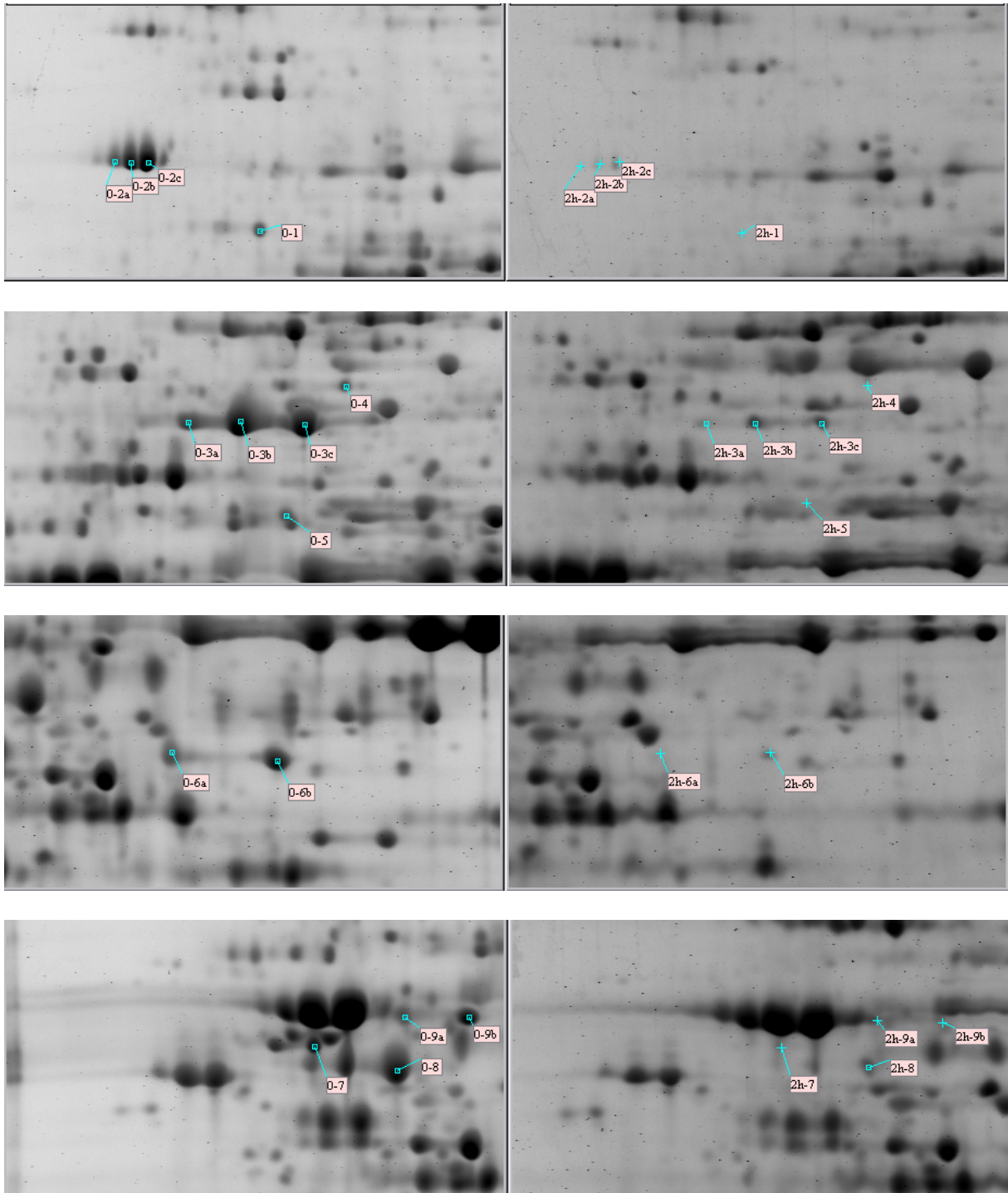
Spotnummer	Proteinname	Abkürzung	Accession No. (Swiss prot)	Theoret. mol. Mass (kDa) <sup>b</sup>	Theoret. pI <sup>b</sup>	Sequenz- abdeckung <sup>c</sup> (%)	Anzahl ident. Pepti- de	Score (Mascot)
0-10a,b,c	DNA-binding protein H-NS	H-NS	P08936	15.408	5.44	10a) 31 10b) 40 10c) 52	5 5 8	61 70 113
0-11	homolog of pectin degrading enzyme 5-keto 4-deoxyuronate isomerase	KDUI	Q8X618	31.090	5.71	37	14	183
0-12	Udp-galactose 4-epimerase	GALE	P09147	37.265	5.89	32	10	93
0-13a,b	survival protein, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	SURA	P21202	47.283	6.48	13a) 47 13b) 34	30 21	341 234
0-14	heat shock protein HtrA, serin protease do	HTRA	P09376	49.354 map loca- tion <sup>d</sup> : 66,44	8.65 8.01	34	16	148
0-15	lipoic acid synthase	LIPA	P25845	36.071	8.08	21		1 (Profound)
0-16	peptide releasing factor 1	RF1	P07011	40.517	5.15	sequence K)ALSVLGAR(I		
<i>Proteine aus dem 2 h - Gel</i>								
2-17	orf, protein with unknown function, YbgF	-	P45955	28.231	8.58	46	14	1 (Profound)
2-18a,b	ribosomale protein S1	RS1	P02349	61,988	4,90	sequence F)LPGLVD(V		



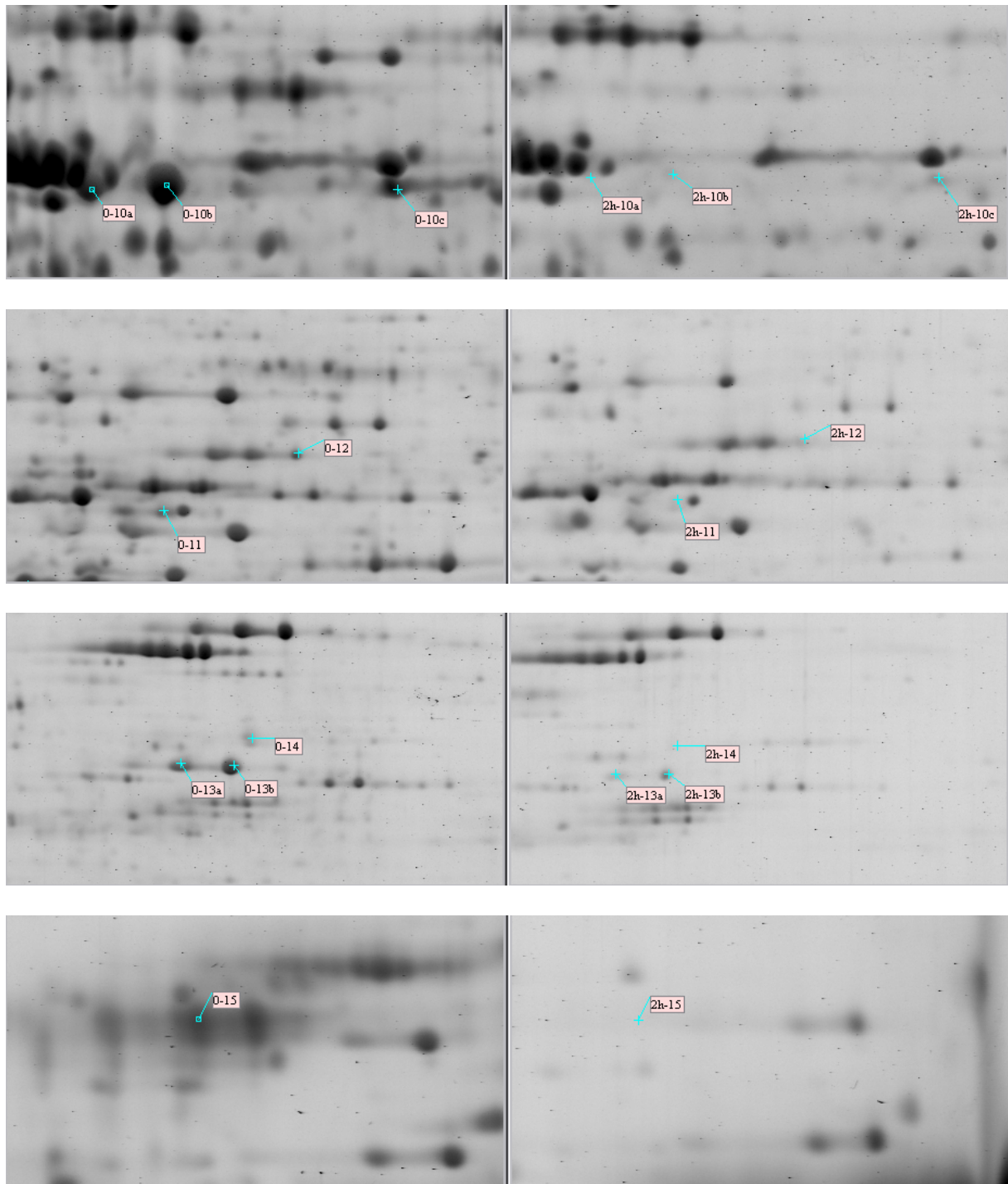
**Abb. 18** *E.coli*-Proteine aus dem Gesamtansatz zu Beginn der zellfreien Proteinsynthese und nach präparativer Fraktionierung mittels HPLC, Fraktion 38 % ACN, Auftrag 1 mg Protein. Fluoreszenzfärbung. Markiert sind differentielle Proteine, deren Spots nach 2 h nicht oder nur noch schwach erkennbar waren, Nummerierung siehe Tabelle 13.



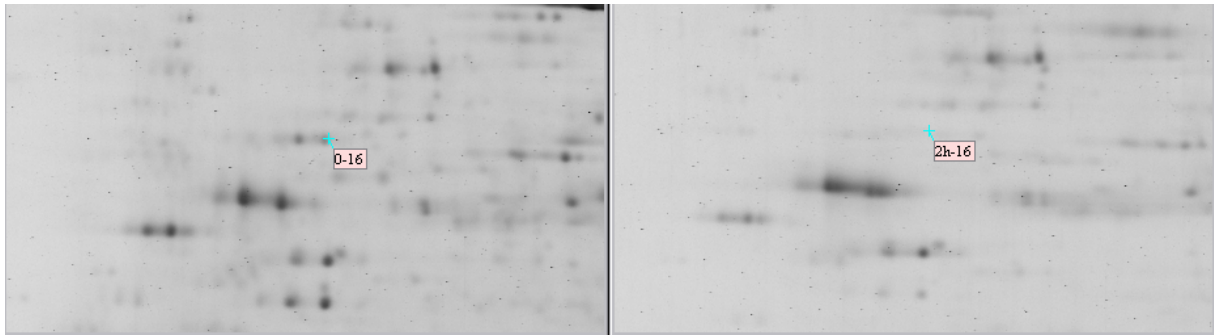
**Abb. 19** *E.coli*-Proteine aus dem Gesamtansatz nach 2 Stunden der zellfreien Proteinsynthese und präparativer Fraktionierung mittels HPLC Fraktion 38 % ACN, Auftrag 1 mg Protein. Fluoreszenzfärbung. Markiert sind differentielle Proteine, deren Spots zu Beginn nicht oder schwach erkennbar waren, Nummerierung siehe Tabelle 13.



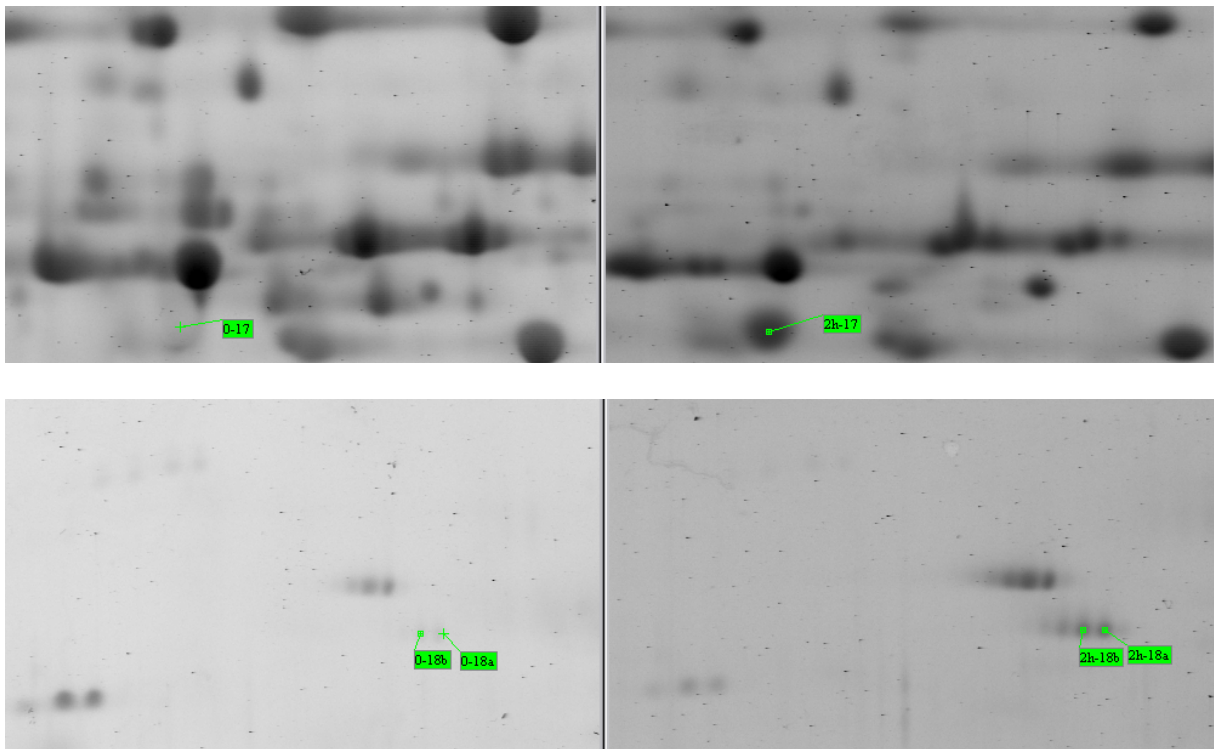
**Abb. 20** Vergrößerte Bildausschnitte der differentiellen Proteine aus der Tabelle 13 und der Gesamtansicht des 0 h – Geles aus Abb. 18. Jeweils linker Bildausschnitt entspricht einem Gel zu Beginn, rechter Bildausschnitt nach 2 h Proteinsynthese.



**Abb. 21** Vergrößerte Bildausschnitte der differentiellen Proteine aus der Tabelle 13 und der Gesamtansicht des 0 h – Geles aus Abb. 18. Jeweils linker Bildausschnitt entspricht einem Gel zu Beginn, rechter Bildausschnitt nach 2 h Proteinsynthese



**Abb. 22** Vergrößerte Bildausschnitte eines differentiellen Proteins aus der Tabelle 13 und der Gesamtansicht des 0 h – Geles aus Abb. 18. Jeweils linker Bildausschnitt entspricht einem Gel zu Beginn, rechter Bildausschnitt nach 2 h Proteinsynthese



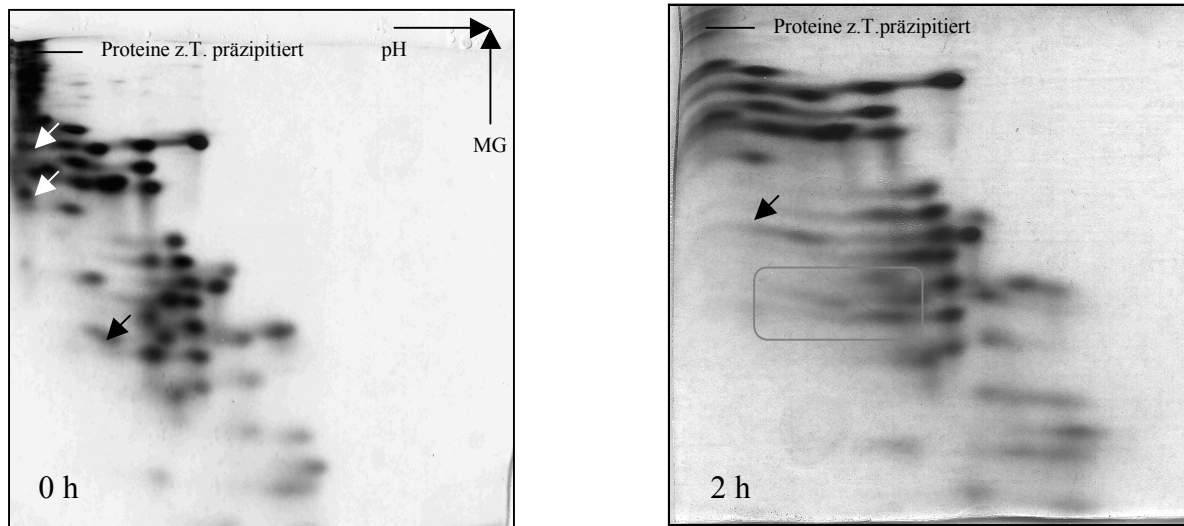
**Abb. 23** Vergrößerte Bildausschnitte der differentiellen Proteine aus der Tabelle 13 und der Gesamtansicht des 2 h – Geles aus Abb. 19. Jeweils linker Bildausschnitt entspricht einem Gel zu Beginn, rechter Bildausschnitt nach 2 h Proteinsynthese

### 3.2.5 Untersuchung der ribosomalen Proteine

Ribosomale Proteine sind fest im RNA-Gerüst der Ribosomen verankert. Sie müssen daher durch eine spezielle Essigsäureextraktion isoliert und anschließend durch stufenweise Dialyse in absteigenden Konzentrationen verdünnter Essigsäure gereinigt werden. Danach können die ribosomalen Proteine einer zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Geyl *et al.* (1981) unterzogen werden. Diese Spezialelektrophorese für ribosomale Proteine ist in der ersten Dimension keine klassische isoelektrische Fokussierung: Die Gellösung ist auf einen pH-Wert von 5 eingestellt und wird vom oberen Puffer mit pH 4 und dem unteren Puffer mit pH 5 begrenzt. Das ermöglicht überhaupt erst eine vernünftige Wanderung der Proteine im Gel, die in der klassischen 2-DE am äußeren basischen Rand in der ersten Dimension verbleiben würden (die meisten, vgl. Tabelle 14, Kap. 6.7 mit Auflistung der isoelektrischen Punkte).

Im Ergebnis der Anwendung dieser Methode ergaben sich zwei grundlegende Probleme, wie in Abbildung 24 zu erkennen ist.

1. Ein Teil der Proteine war offenbar vor (bzw. während) des Einlaufens in das Gel ausgefallen.
2. In den Ausgangsproben (0 h) bereits andeutungsweise zu erkennen, wiesen besonders die Gele der nach 2 h aus dem Batch entnommenen Proben eine starke, nicht zu akzeptierende Schlierenbildung auf.



**Abb. 24** Zweidimensionale Gelelektrophorese ribosomaler Proteine / Standardproben  
Die hohe Salzkonzentration im Batchverfahren führte dazu, daß ein Teil der Proteine präzipitierte und nicht in das Gel einlaufen konnte. Nach 2h Proteinsynthese war eine verstärkte Schlierenbildung zu beobachten. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Proteine waren in der jeweils anderen Probe nicht / kaum zu sehen.

Dieses Phänomen war reproduzierbar. Dabei präzipitierten die Proteine in unterschiedlichem Ausmaß. Im eingerahmten Bereich des 2h-Gels kam es zu einer relativen Reduzierung der Proteine. Besonders der linke Doppelspot ist kaum noch vorhanden, ebenso die beiden mit weißen Pfeilen markierten Proteine aus dem 0h-Gel. Gelegentlich traten scheinbar neue Spots in den 2h-Gelen auf (z.B.: Pfeil im 2h-Gel), die sich aber nicht zuverlässig wiederholen ließen.

Die Präzipitate entstehen abhängig von der Zusammensetzung der Batch-Reaktion. Vermutlich destabilisiert der hohe Salzgehalt, Polyethylenglykol (welches Wasser entzieht) u.a. die Proteine. Die verstärkte Schlierenbildung und das z.T. veränderte Aussalzverhalten nach 2h Batchreaktion sind jedoch die Folge eines Vorganges, über den man nur eine hypothetische Aussage machen kann: Der Zerfall der Nukleosidtriphosphate führt zu einer Anhäufung von anorganischen Phosphaten, die sich wahrscheinlich an den meist basischen ribosomalen Proteine ablagern und vermutlich durch die einfache Dialyse schlecht entfernen lassen. Außerdem sinkt der batchinterne pH-Wert von 7,7 auf 6,3 innerhalb von 2h. Das mag zu den beschriebenen relativen quantitativen Veränderungen (pH-abhängiges Aussalzen der Proteine) führen.

Aufgrund dieses Befundes wurden verschiedene Möglichkeiten der Optimierung geprüft. Zunächst wurde versucht, die Dialyse unter möglichst schonenden Bedingungen zu verlängern. Nach der Essigsäuredialyse wurde gegen TMA I (Puffer, welcher zur Ribosomenisolierung verwendet wurde) mit zweimaligem Pufferwechsel nach je einer Stunde dialysiert. Die Probe verblieb im letzten Puffer über Nacht. Die Proteinspots zogen weiterhin „Schweife“ nach sich (ohne Abbildung).

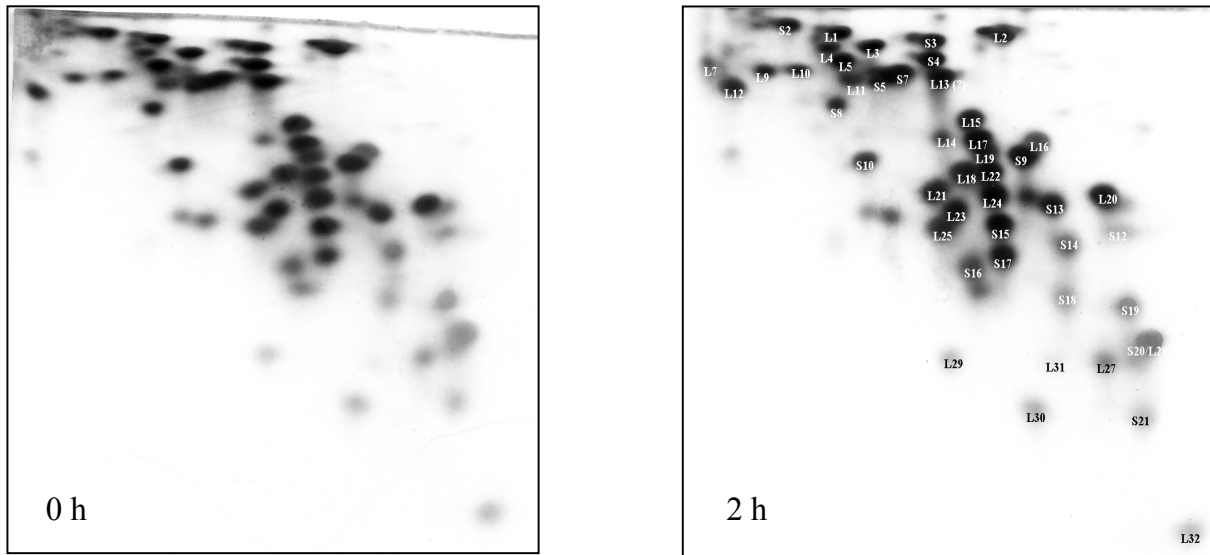
Als weitere Ergänzung folgte der oben beschriebenen Behandlung eine Acetonfällung. Danach war die Form der Spots zwar noch nicht optimal, näherte sich aber dem gewünschten Aussehen an. Allerdings konnten nach der Acetonfällung nicht mehr alle Proteine quantitativ in Lösung gebracht werden, insbesondere eine Gruppe von Proteinen im sehr basischen, niedermolekularen Bereich und einige Proteine im vergleichsweise „sauen“, höhermolekularen Bereich (ohne Abbildung).

Da sich bestätigte, dass die Schweifbildung wohl ein Salzeffekt sei, benutzte ich nach der Essigsäuredialyse NAP-5 Säulen zum Entsalzen. Das Spotmuster der Gelelektrophorese wurde entscheidend verbessert, aber wiederum konnten nicht alle Proteine quantitativ eluiert werden.

Die 24 stündige Dialyse gegen destilliertes Wasser mit mehrmaligem Wechsel im Anschluss an die Essigsäuredialyse führte schließlich zu einem gut aufgelösten, schlierenfreien



Proteinmuster ohne Verluste durch Präzipitate (Abb.25). Die nun gut vergleichbaren Gele zeigten keine Unterschiede, so dass auf der Basis des bisherigen technischen Standes und der methodischen Möglichkeiten davon auszugehen ist, dass die ribosomalen Proteine im Batchsystem unverändert geblieben sind. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die im 2 h - Gel anfangs sichtbaren Salzeffekte nicht doch funktionelle Konsequenzen für das Ribosom haben.



**Abb. 25** Zweidimensionale Gelelektrophorese ribosomaler Proteine / Probenaufarbeitung mit zusätzlicher 24 stündiger Dialyse gegen Aqua dest.

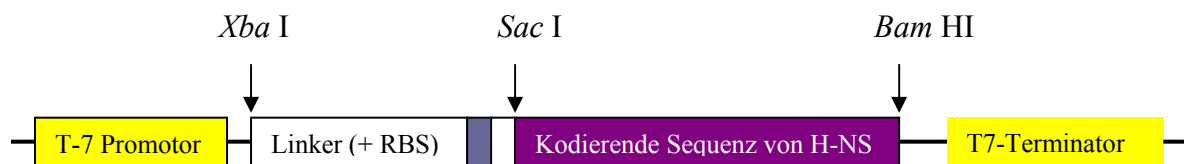
Außerdem möchte ich hier noch kritisch anmerken, dass es ist nicht auszuschließen ist, dass unter verbesserten technischen Möglichkeiten ein anderes Ergebnis zu erzielen wäre: Wie ich aus meinen praktischen Erfahrungen mit der Optimierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese der *E.coli*-Gesamtproteine weiß, ist die kürzeste Probenvorbereitung meist die Beste. Die sehr drastische Essigsäureextraktion mit Eisessig und die notwendigerweise langen Dialysezeiten - eine Vorbereitung, die sich insgesamt über 2 Tage erstreckt, dürfte nicht jede Modifikation unbeschadet überstehen. Ähnliche Erfahrungen mit instabilen *E.coli*-Modifikationen sind bereits beschrieben worden (Molloy *et al.*, 1999). Es gibt insgesamt wenige Modifikationen an ribosomalen *E.coli*-Proteinen. Bisher wurden nur 2 ribosomale Proteine in der 2DE-Datenbank swiss prot (S1 und L9, auch in dieser Arbeit) identifiziert. Das spiegelt die Schwierigkeiten der Darstellung wider, die durch die endosmotische Drift dieser basischen Proteine und der damit verbundenen, problematischen Handhabung verursacht werden (siehe auch Tabelle 15, Kap. 6.7). (nicht gezeigt)

### 3.2.6 Klonierung und Expression ausgewählter differentieller Proteine

Die Gene einiger ausgewählter differentieller Proteine wurden kloniert und im *in vitro* Proteinsynthesystem exprimiert, um deren Veränderungen im Batchsystem gezielt verfolgen und eventuelle Auswirkungen auf die Proteinausbeute aufzeigen zu können.

Dies betraf folgende Proteine: H-NS, Putrescin/Spermidin periplasmatisches Transportprotein, Adenylatkinase und Peptide releasing factor 1.

Die Gensequenz von H-NS wurde in das Plasmid pHMFA (Merk, 2001) eingefügt. Nach dem Ausschneiden der ursprünglich in das Plasmid klonierten Sequenz von FABP mit den Restriktionsenzymen *Xba* I und *Bam* HI wurde ein Linker zwischen die *Xba* I-Schnittstelle und die neue Gensequenz gesetzt, um einerseits die Ribosomenbindungsstelle wiederherzustellen und andererseits die Gensequenz von H-NS mit der Schnittstelle *Sac* I am 5'-Ende einfügen zu können (Abb.26). Da dieses Plasmid aber nicht über eine vollständige „Multiple cloning site“ verfügt und neue Gene nur über einen extra anzufertigenden Linker eingeführt werden konnten, wurde für die anderen Gene das kommerziell erhältliche Plasmid



**Abb. 26** Klonierungsstrategie für das Gen H-NS in den Vektor pHMFA (RBS: Ribosomenbindungsstelle)

pIVEX2.3d (FA Roche) verwendet. Das Plasmid und die amplifizierte Gensequenz (aller drei anderen Gene) wurde über die Restriktionsschnittstellen *Nco* I am 5'-Ende und *Sma* I am 3'-Ende miteinander verknüpft. Die Amplifizierung der aus genomischer DNA von *E.coli* gewonnenen Gene erfolgte mit Hilfe der PCR und der jeweiligen Primer (Sequenzen im Anhang 6.6). In Ergänzung der Beschreibung der PCR-Bedingungen in Kapitel 2.7.2 wurden Temperaturprogramme etabliert (folgende Seite).

Der Erfolg der Klonierung wurde mit der Sequenzierung überprüft (ohne Abbildung).

Die vier ausgewählten differentiellen Proteine wurden im *in vitro* Proteinsynthesystem exprimiert und der zeitliche Verlauf der Produktbildung verfolgt. Keines der Proteine konnte über die 40 min Grenze hinaus synthetisiert werden. Grundlage dafür war die Auswertung der radioaktiv markierten, TCA-gefällten Produkte (ohne Abbildung) und die Analyse der eindimensionalen SDS-Gele (Abb. 28, 29, 30).

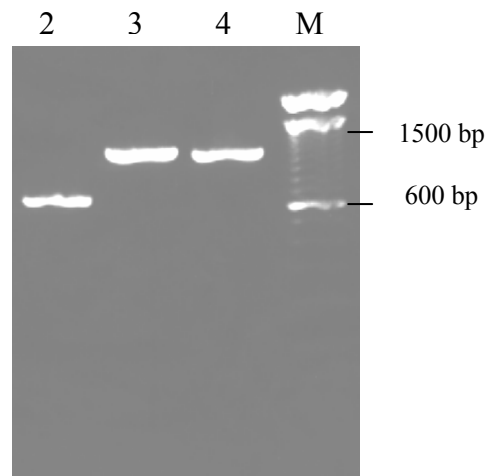
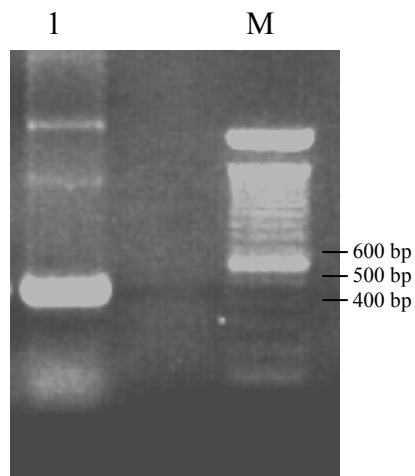
**Temperaturprogramme:**

H-NS

Putrescin/Spermidin periplasmatisches Transportprotein, Adenylatkinase, Peptide releasing factor 1.

94 °C 3 min  
 94 °C 30 sec.  
 58 °C 15 sec. } 25 Zyklen  
 72 °C 15 sec.  
 72 °C 5 min

94 °C 3 min  
 94 °C 45 sec.  
 64 °C 1 min } 27 Zyklen  
 72 °C 4 min  
 72 °C 5 min

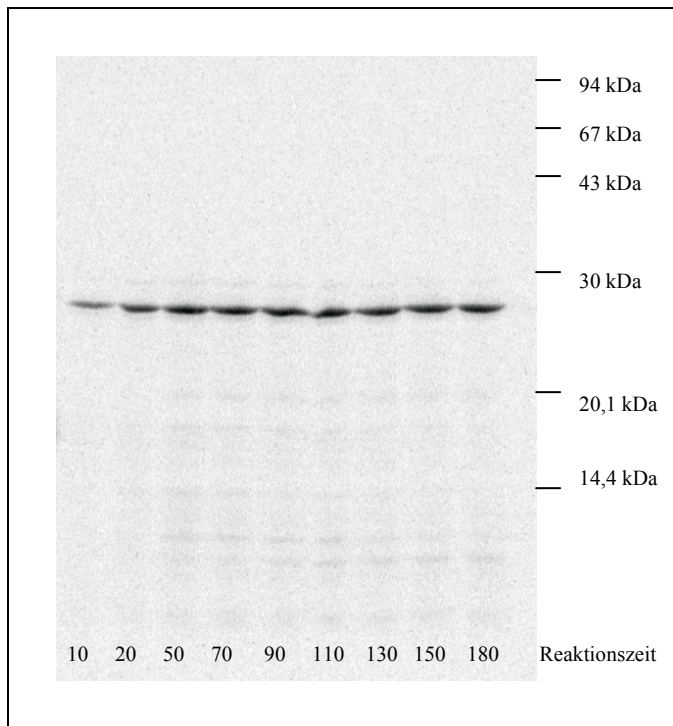


**Abb. 27** PCR-Amplifikate folgender Gene: (1) H-NS – 437 bp, (2) Adenylatkinase – 645 bp, (3) Releasing factor 1 - 1083 bp, (4) Spermidin/Putrescin periplasmatisches Transportprotein - 1047 bp, (M) 100 bp Marker

RF-1 (Abb. 29) und Adenylatkinase (Abb.28) wurden als Produkt in voller Länge generiert. RF-1 zeigte ein Laufverhalten, das einem höheren Molekulargewicht als 40,5 kDa entspricht. Das deutete sich auch schon im 2-DE (Abb. 18, Spot 16) an.

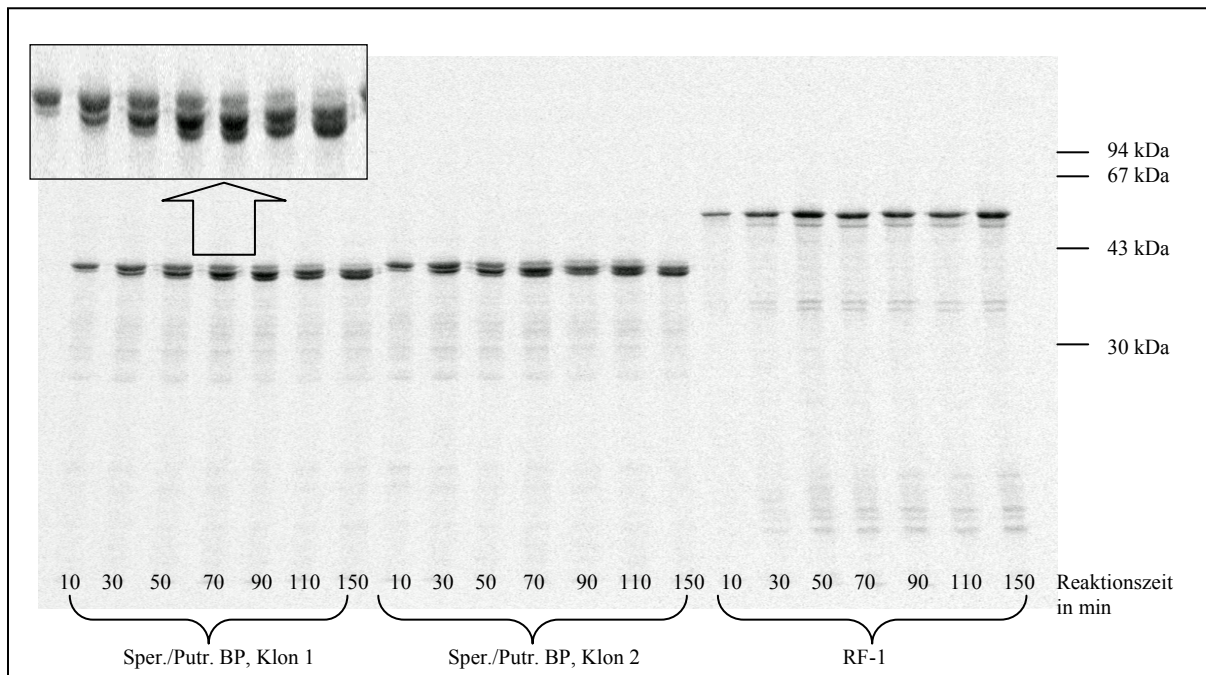
Die Art der Modifikationen muss durch weiterführende Untersuchungen ermittelt werden.

Dagegen wurden H-NS (Abb. 30) und das Spermidin/Putrescin periplasmatische Transportprotein (Abb. 29) kurz nach der Synthese proteolytisch gespalten.



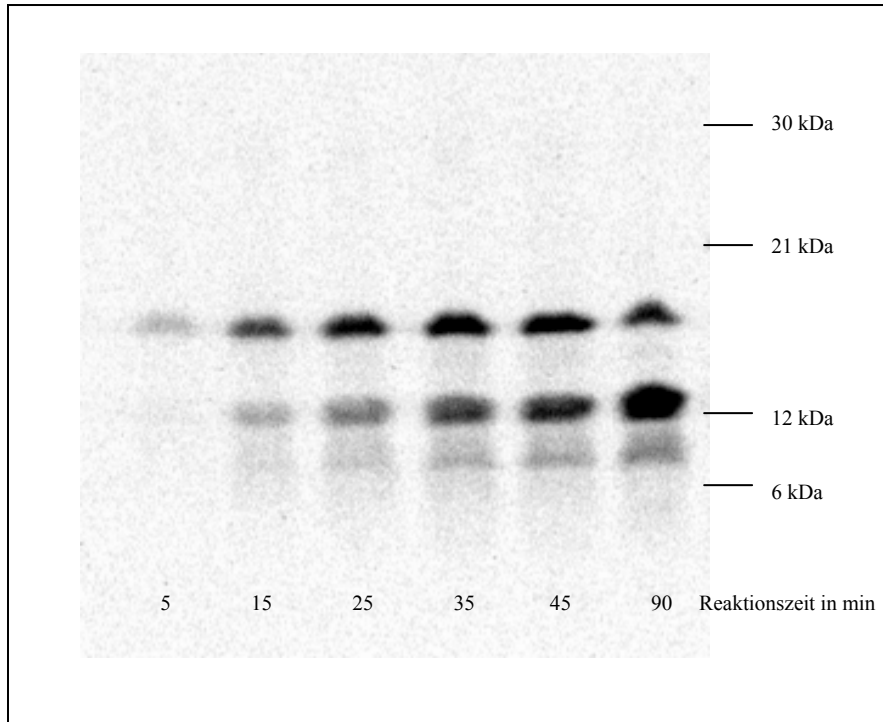
**Abb. 28 Expression des differentiellen Proteins Adenylatkinase**

Das Protein wird nicht länger als über die übliche Zeit hinaus im Batch synthetisiert, was an der konstanten Bande ab 50 min zu erkennen ist. Es ist stabil (keine Proteolyse). Die Art seiner Veränderung nach Abbruch der Proteinsynthese ist bislang unbekannt.



**Abb. 29 Expression der differentiellen Proteine Spermidin / Putrescin periplasmatisches Transportprotein (POTD) und Releasing Factor 1 im Batchsystem**

POTD ist mit zwei Klonen vertreten. Beide zeigen eine charakteristische Proteolyse nach der Synthese. Das Protein wird in zwei aufeinanderfolgenden Schritten verkürzt. Das kleine Fragment akkumuliert im Laufe der Reaktionszeit. RF-1 bleibt dagegen stabil, sein Laufverhalten entspricht dem eines größeren Proteins (40,5 kDa).

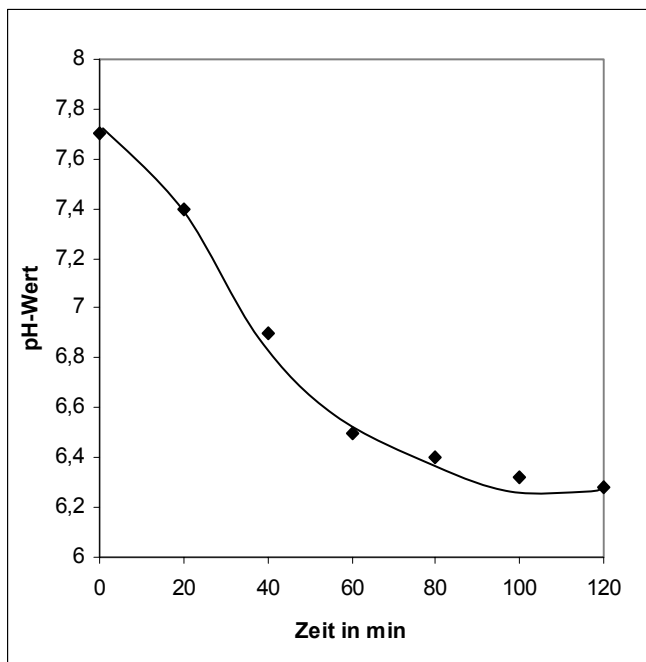


**Abb. 30 Expression des differentiellen Proteins H-NS.**

Das Protein wird zunächst in voller Länge (15,4 kDa) im Batchsystem synthetisiert, dann sofort gespalten. Nach 45 min ist die Synthese beendet. Zwischen 45 und 90 min akkumuliert das 12 kDa große Fragment, das kleine Fragment ist instabil.

### 3.3 Untersuchung ausgewählter Parameter

#### 3.3.1 pH – Wertverschiebung



**Abb. 31** pH-Wert -Verlauf während der zellfreien Proteinbiosynthese

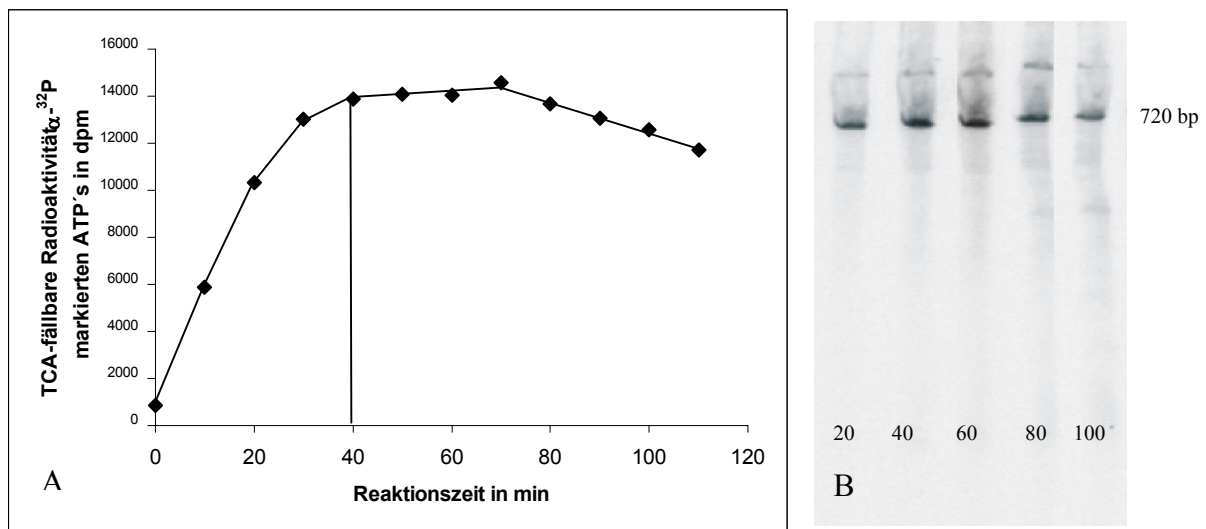
Der Verlauf des pH-Wertes als grundlegender Parameter gibt einen ersten Hinweis zu Stoffwechselaktivitäten im Lysat während der Proteinbiosynthese. Überraschenderweise verschiebt er sich innerhalb kurzer Zeit in den sauren Bereich, obwohl man davon ausgehen sollte, dass der HEPES-Puffer diesen Abfall zumindest eine Zeit lang bremsen würde (Abb.31). Innerhalb der Zeit, in der die Proteinbiosynthese ihr Plateau erreicht, also der ersten vierzig Minuten und darüber hinaus bis zu

sechzig Minuten ist der steilste Abfall zu verzeichnen. Insgesamt handelt es sich um eine pH-Wert-Differenz von 1,4. Die Messung sollte einen Anhaltspunkt zur besseren Interpretation der differentiellen Proteine liefern (siehe Kap. 4.3).

### 3.3.2 Transkription im zellfreien System

Der Abbruch der Transkription im zellfreien System in Verbindung mit einer schnellen Degradierung der mRNA könnte ein limitierender Faktor der *in vitro* Proteinbiosynthese sein. Daher wurden Standardreaktionsansätze (siehe Kap.2.1.1) mit radioaktiv markierten Nukleotiden,  $^{32}\text{P}$ -ATP oder  $^{35}\text{S}$ -CTP, versetzt und zu den jeweiligen Zeiten Proben entnommen.

Zunächst sollte mit Hilfe von TCA-gefällter mRNA (siehe Kap. 2.1.2.1) und deren Scintillationsmessung eine Kinetik der eingebauten Radioaktivität erstellt werden. Die Tendenz der Verlaufskurven von  $^{32}\text{P}$ -ATP und  $^{35}\text{S}$ -CTP war vergleichbar. Abb.32A veranschaulicht ein repräsentatives Experiment.

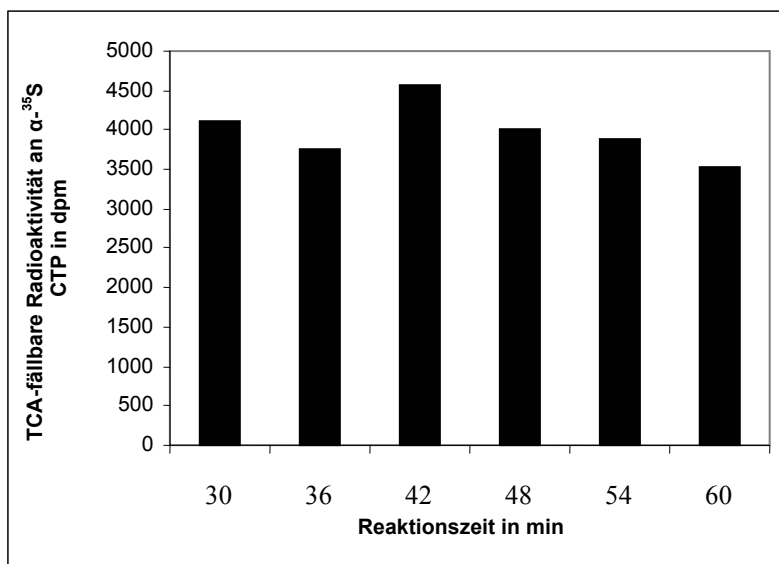


#### Abb. 32 Transkription von FABP und Stabilität der mRNA

A TCA-gefällte mRNA während der gekoppelten zellfreien Transkription/ Translation dargestellt durch den Einbau von  $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP, pro Messpunkt wurden 25  $\mu\text{l}$  Standardreaktionsmix (0,25  $\mu\text{Ci}$   $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP pro Messpunkt) mit Stopp-Lösung versetzt, wovon 20  $\mu\text{l}$  zur Szintillationsmessung verwendet wurden; nach 40 min wird ein Plateau erreicht (ebenso wie bei der Translation) B mRNA, markiert mit  $\alpha^{35}\text{S}$ -CTP (0,1  $\mu\text{Ci}$   $\alpha^{35}\text{S}$ -CTP pro Messpunkt) zu den Zeitpunkten 20, 40, 60, 80 und 100 min entnommen und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen; translatierbare mRNA repräsentiert durch die Hauptbande bei 720 bp ist über den gesamten Zeitraum vorhanden, daneben treten nach 80 min und darüber hinaus verstärkt Degradierungsfragmente auf.

In diesem Beispiel wird nach 40 min ein Plateau erreicht ( $\pm 10$  min im Durchschnitt aller Experimente), welches 30 min aufrechterhalten wird. Danach fällt die Radioaktivität allmählich wieder ab. Bemerkenswert ist, dass das Plateau zur gleichen Zeit erreicht wird, wie bei der Kinetik der Produktausbeute von synthetisiertem Protein (siehe Kap. 3.1, Abb. 5). Inwieweit die mRNA noch in ihrer vollen Länge erhalten geblieben ist, zeigt Abb. 32B. Hier wurde die mRNA auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und per Autoradiografie detektiert (Kap. 2.1.2.2, 2.1.2.3). Die vollständig erhaltene mRNA wird zu jedem der untersuchten Zeitpunkte zwischen 20 und 100 min durch die Hauptbande bei 720 bp repräsentiert, wobei nach 80 und 100 min zunehmend Degradierungsfragmente zu erkennen sind. Abhängig von der Dauer der Exposition der Detektionsplatte konnten jedoch schon zu früheren Zeiten mRNA-Abbauprodukte festgestellt werden (ohne Abb.).

Es stellte sich auch hier, ähnlich wie im Fall des Plateaus der Proteinproduktbildung die Frage, ob tatsächlich nach 40 min keine mRNA mehr synthetisiert wird. Um das beantworten zu können, wurde  $^{35}\text{S}$ -CTP zu verschiedenen Zeiten (jeweils 6 min vor Ende der jeweiligen Reaktionszeit) während der Reaktion hinzugefügt. Mit den Entnahmezeitpunkten 30, 36, 42, 48, 54, 60 min wurde ein Zeitraum abgedeckt, der sowohl die ansteigende als auch die Plateau-Phase einbezog, um einen direkten Vergleich der Radioaktivitätsmesspunkte zu haben. Abb.33 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung: Jedem der angegebenen Messpunkte ist Transkriptionsaktivität zuzuordnen, die zwischen 3500 und 4500 dpm schwankt.



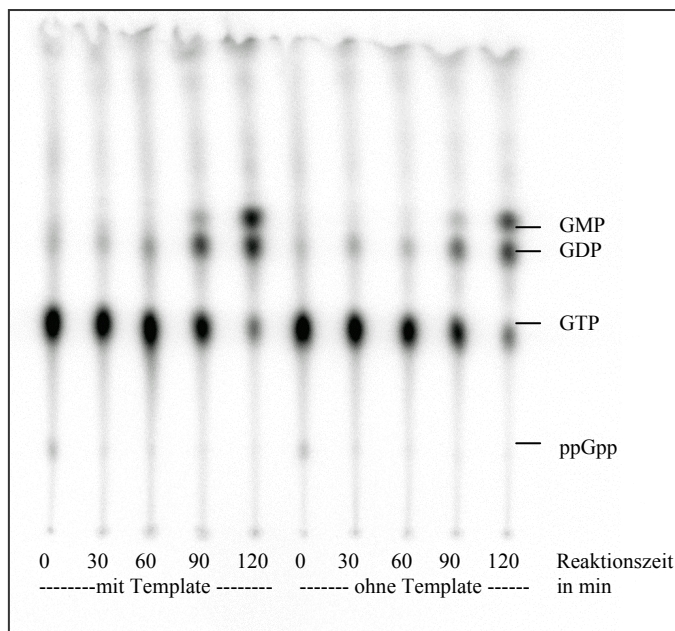
**Abb. 33** Transkriptionsaktivität während der Phase steigender (30, 36, 42 min) und gleichbleibender (48, 54, 60 min) mRNA Konzentration, siehe auch Abb. 32A.

Jeweils 6 min vor Entnahme wurde die Probe mit  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -CTP (0,1  $\mu\text{Ci}$   $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -CTP pro Messpunkt) versetzt. Es stellte sich heraus, dass die Transkriptionsaktivität über den gesamten, getesteten Zeitraum nahezu unverändert blieb, unabhängig davon, ob die mRNA-Konzentration zunahm oder gleich blieb.

Das entspricht einem Unterschied von 22 % vom höchsten zum niedrigsten Wert. Eine Tendenz ist dabei nicht zu erkennen. Man kann also davon ausgehen, dass innerhalb eines

Zeitraumes von 24 bis 60 min relativ gleichbleibend transkribiert wird. Daraus kann man schlussfolgern, dass sich entweder die Abbaugeschwindigkeit der mRNA erhöhen muss und/oder der Anteil ungeschützter mRNA steigt (siehe auch Diskussion 4.3).

### 3.3.3 ppGpp als Sensor für Aminosäuremangel im zellfreien Proteinbiosynthese-System (?) – GTP- und ATP-Stabilität



**Abb. 34** Guanin-Nukleotide in Abhängigkeit von Transkription und Translation:  $\alpha$ - $^{32}$ P-GTP im Standardreaktionsansatz mit und ohne Template, anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und dünnschichtchromatografisch aufgetrennt

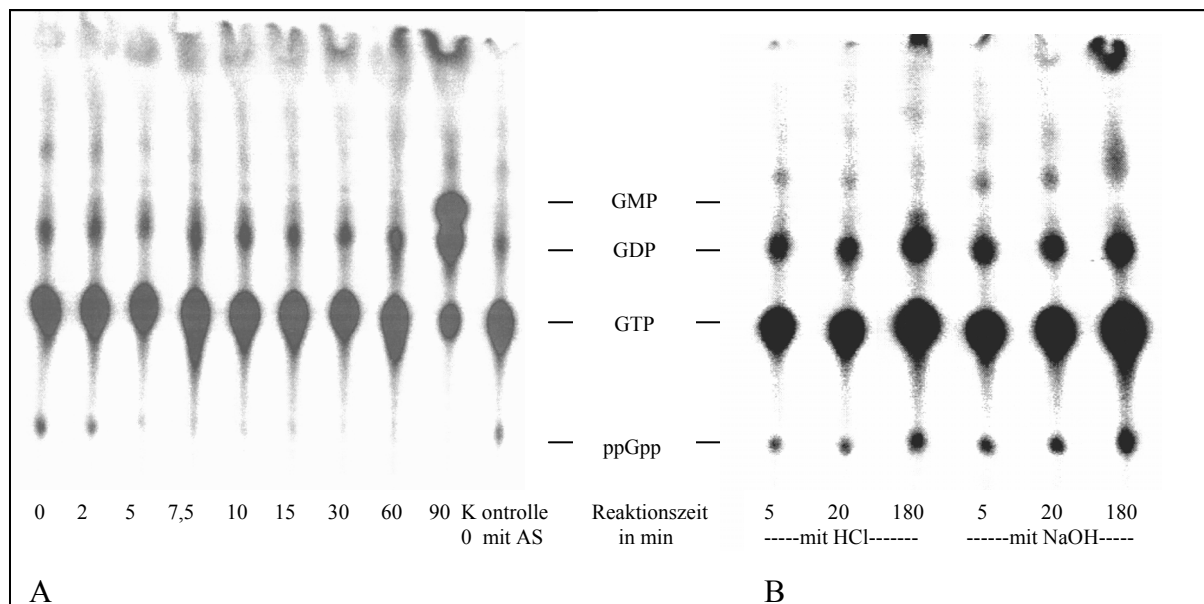
Im vorangegangenen Kapitel konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA nicht die Ursache für den Abbruch der Translation ist. Es sollte daher weitergehend untersucht werden, ob die Aminosäuren bis zum Proteinsyntheseende in ausreichender Menge vorhanden sind. Wie in Kap.

1.2.3.3 beschrieben, bestand die Idee, die stringente Kontrolle durch die ppGpp-Synthetase als Aminosäure-Mangelanzeiger auszunutzen. Der Standardreaktion wurde  $\alpha$ - $^{32}$ P-GTP zugeführt. Damit konnten alle Varianten von Guanosin-Nukleotiden detektiert werden, um so gleichzeitig einen Überblick über Verbrauch und Stabilität dieses Energieträgers und mRNA-Ausgangsstoffes zu erhalten. Zum Vergleich wurde ein Ansatz ohne Plasmid inkubiert. Abb.34 zeigt die Dünnschichtchromatografie dieser beiden Ansätze. Zu Beginn ist unabhängig von der Translation ein dem Signal ppGpp entsprechender Spot zu erkennen, der aber im Laufe der Inkubation stark abgeschwächt wird. Das deutete zunächst darauf hin, dass die Aminosäurekonzentration kein Limit darstellt. GTP zerfällt jedoch beginnend zum Zeitpunkt 90 min. Der Zerfall ist nicht auf die Transkription und Translation zurückzuführen, denn ohne Template ist dasselbe Phänomen zu beobachten. Möglicherweise ist die Folge davon der Abfall der mRNA-Konzentration aus Abb.32.

Auch hier gilt wieder wie schon für die mRNA, die sinkende Konzentration von GTP ist nicht die Ursache für den Abbruch der Proteinsynthese. Zur Absicherung des Ergebnisses (kein

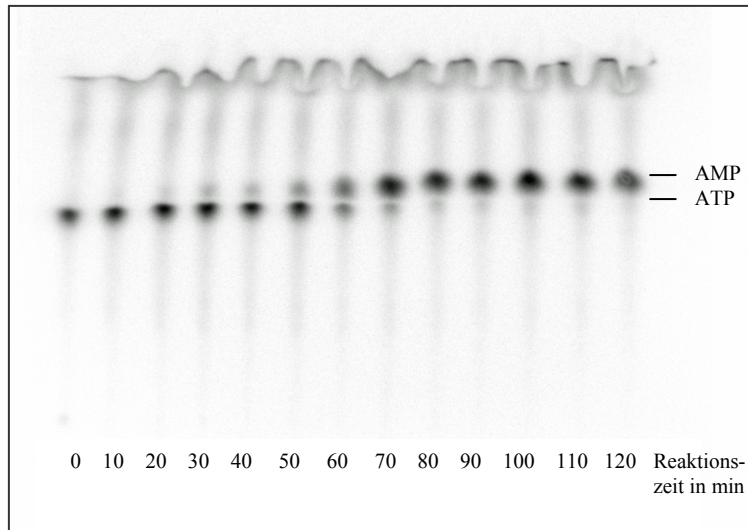


Aminosäurenmangel) und Suche nach der Ursache des GTP-Zerfalls folgten weitere Untersuchungen. Zum einen sollte mit einer Positivkontrolle geklärt werden, ob mit einer stringenten Antwort und dem Signalmolekül ppGpp überhaupt gerechnet werden kann und wenn ja, wie lange es dauern würde, bis das Signal entsteht. Daher wurde ein Standardansatz ohne Aminosäuren inkubiert und in anfangs kurzen Zeitabständen Proben entnommen (Abb. 35A). Das erwartete ppGpp wurde nicht synthetisiert. Im Gegenteil: Dieser Spot zum Zeitpunkt 0 war nach 2 min praktisch verschwunden. Somit war die Annahme, über genügend Aminosäuren bis zum Ende der Proteinsynthese verfügen zu können, weiterhin unbewiesen. Andererseits sollte abgeklärt werden, ob GTP wegen thermischer Hydrolyse oder enzymatischem Abbau zerfällt. Dazu wurde GTP in saurer (0.01 M HCl) und alkalischer (0,01 M



**Abb. 35A** Hydrolyse von  $\alpha$ - $^{32}$ P-GTP während der Inkubation mit einem Standardansatz ohne Aminosäuren; dünnschichtchromatografische Auftrennung, Ziel war die Verstärkung von ppGpp als Positivkontrolle zur Darstellung eines Aminosäuremangels. Es zeigte sich jedoch, dass dieses Signal als Indikator für fehlende Aminosäuren unbrauchbar ist. **B** Hydrolyse von  $\alpha$ - $^{32}$ P-GTP in saurer und alkalischer Lösung bei 37 °C, Probenentnahme nach 5, 20 und 180 min; dünnschichtchromatografische Auftrennung

NaOH) Lösung bei 37 °C inkubiert (Abb. 35B). Es zeigte sich, dass ppGpp, GDP und andere Nukleotide bereits als Nebenprodukte in der GTP-Lösung vorhanden waren und von Enzymen des Zelllysates in gewissem Maß sogar beseitigt wurden. Die weitere Hydrolyse ohne Enzyme hielt sich jedoch in Grenzen. Lediglich nach 3 h war ein geringes Aufkommen von GMP zu beobachten. Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die Hydrolyse von GTP nach dem Abbruch der Proteinsynthese unter Mitwirkung von Enzymen und unabhängig von Transkription und Translation erfolgt.



**Abb. 36** Hydrolyse von  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -ATP während einer Standardreaktion, die eindeutige Unterscheidung von cAMP und ADP ist aufgrund des ähnlichen Laufverhaltens nicht möglich

Neben GTP ist ATP der zweite wichtige Energieträger der Proteinbiosynthese, der die Beladung der tRNA's mit Aminosäuren unterstützt. Analog den Versuchen mit GTP wurde hier

$\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -ATP eingesetzt. Abb.36 dokumentiert das Ergebnis der Dünnschichtchromatografie. ATP wurde schneller als GTP abgebaut. Die ersten leichten Veränderungen waren bereits nach 20-30 min zu erkennen. Der entscheidende Wendepunkt im Verhältnis von ATP zu seinen Zerfallsprodukten lag jedoch zwischen 50 und 70 min, und damit wieder erst in unmittelbarer Folge des Proteinsyntheseabbruchs. Zwischen 80 und 110 min waren nur noch Reste von ATP vorhanden. Bedacht werden muss jedoch, dass in Bakterien cAMP ein wichtiger Signalübermittler ist, dagegen kommt cGMP nicht vor. cAMP konnte von ADP nicht unterschieden werden. Alle vier möglichen Adenin-Nukleotide folgen dicht aufeinander mit folgenden relativen Laufwerten: ATP: 0,5; cAMP: 0,52; ADP: 0,54; AMP: 0,6.

Eine Optimierung gelang nicht, zur eindeutigen Identifizierung der Zwischenprodukte müsste eine HPLC-Methode etabliert werden.

### 3.3.4 Analyse der Polyamine

#### 3.3.4.1 Einfluss der Polyamine auf die Produktausbeute

Ausgehend von dem Befund, dass eines der differentiellen Proteine das Putrescin/Spermidin-bindende Protein ist, stellte sich die Frage, welchen Einfluss diese beiden Polyamine auf die Proteinausbeute im Batch-Verfahren haben. Da in der Literatur sowohl von fördernden als auch von inhibitorischen Effekten berichtet wird, galt es den Sachverhalt im eigenen System zu klären (Abb.37). In die Experimente wurde neben den beiden genannten Polyaminen auch das in *E.coli* nicht vorkommende Spermin einbezogen, weil sich in der Reihenfolge Putrescin-Spermidin-Spermin eventuell auch Einflüsse in Abhängigkeit von der Moleküllänge und Anzahl der Aminogruppen bzw. der Ladungszahl erklären lassen. Die Standardsynthese von

FABP wurde als Referenzsynthese gleich 100 % gesetzt und die zu untersuchenden Polyamine in der jeweiligen Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 5 mM bzw. 50 mM vor Beginn der Synthese zugegeben. Es wurde die Proteinausbeute mit Hilfe  $^{14}\text{C}$ -markierten Leucins und TCA-Fällung nach 10 und 60 min ermittelt. Da sich herausstellte, dass die Relationen nach 10 und 60 min übereinstimmten, wurde künftig nur noch eine Messung nach 60 min vorgenommen. Es zeigte sich, dass sich die Proteinsynthese durch Putrescin und Spermidin, wenn auch in bescheidenem Rahmen optimieren lässt. So konnte mit Putrescin nach externer Zugabe von 5 mM noch eine Synthesesteigerung von 19%, mit 500  $\mu\text{M}$  Spermidin von 13% erreicht werden. Danach fallen die Produktausbeuten rapide ab, im Falle von Spermidin innerhalb einer Zehnerpotenz auf 0, nach Gabe von 50 mM Putrescin sind noch 21% Syntheseleistung in Relation zur Referenzsynthese zu erreichen. Spermin zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich keine (50  $\mu\text{M}$ ) bzw. inhibitorische (ab 500  $\mu\text{M}$ ) Wirkung. Wie in der Abb. 37 zu erkennen ist, haben Putrescin und Spermidin tendenziell ähnliche Auswirkungen auf die Proteinsynthese, jedoch um eine Zehnerpotenz in der Konzentration verschoben. Für Spermin kann diesbezüglich keine genaue Aussage getroffen werden, dazu wäre die Untersuchung von Konzentrationen unter 50  $\mu\text{M}$  notwendig gewesen. Es lässt sich aber sagen, dass sich die wirksame inhibitorische Konzentration aller Wahrscheinlichkeit nach mit steigender Anzahl der Aminogruppen, der positiven Ladung und/oder der Kettenlänge des Moleküls eher einstellt.

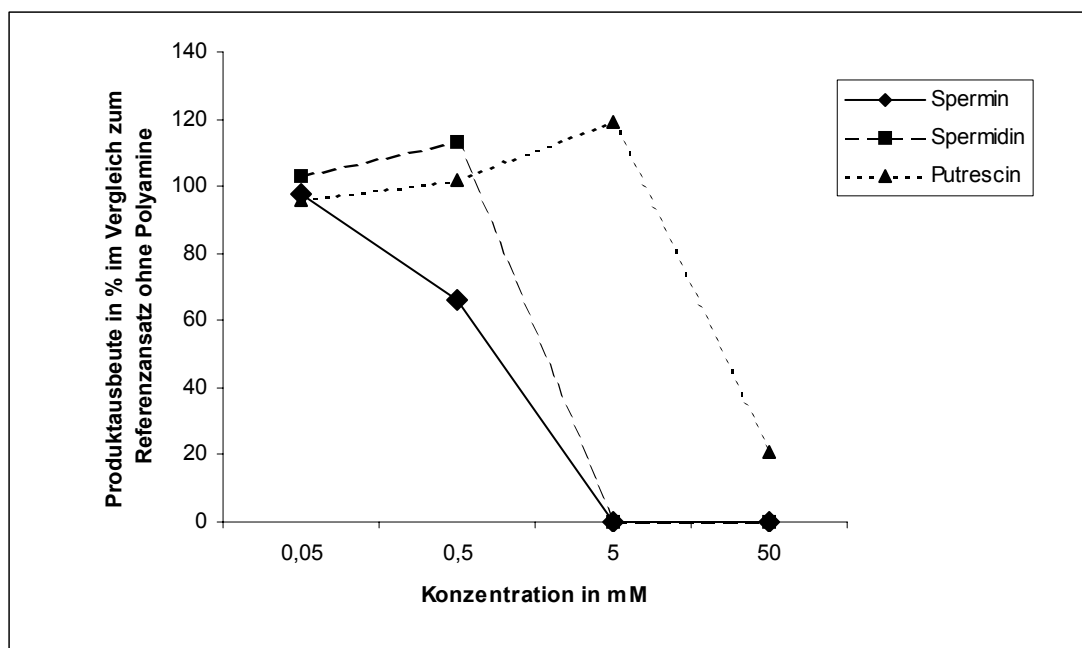
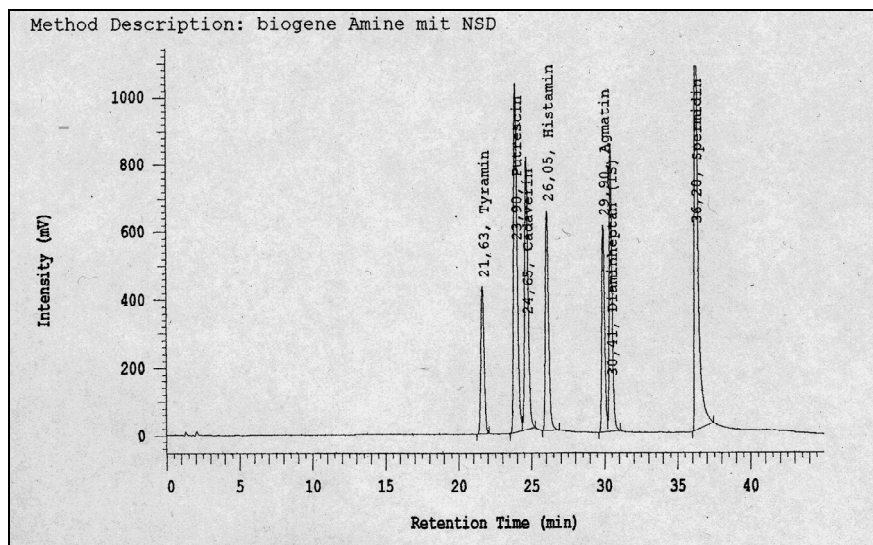


Abb. 37 Polyaminabhängige Produktausbeute von FABP

### 3.3.4.2 Polyaminstatus während der zellfreien Translation

Nachdem festgestellt wurde, dass die für *E.coli* physiologischen Polyamine Putrescin und Spermidin einen beachtlichen Einfluss auf die Proteinsynthese im Batchsystem haben können, war die Frage nach der **internen** Polyaminkonzentration eine logische Folge. Die Polyamine wurden an einer Reversed Phase-Säule mittels HPLC aufgetrennt und per Nachsäulen-derivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) durch Fluoreszenzdetektion quantitativ bestimmt.



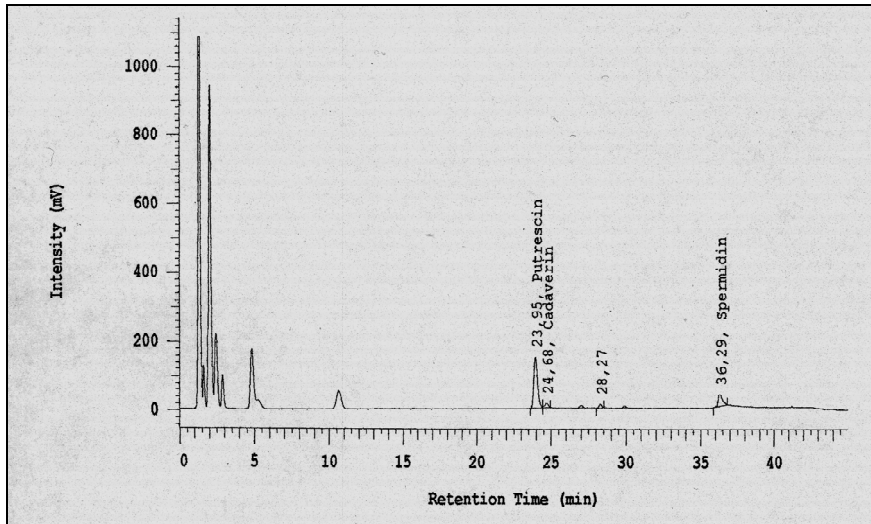
**Abb. 38** HPLC-Retentionszeiten von Standards verschiedener Polyamine:

Tyramin 21,63 min  
 Putrescin 23,90 min  
 Cadaverin 24,65 min  
 Histamin 26,05 min  
 Agmatin 29,90 min  
 Spermidin 36,20 min

Als interner Standard diente Diaminoheptan 30,41 min

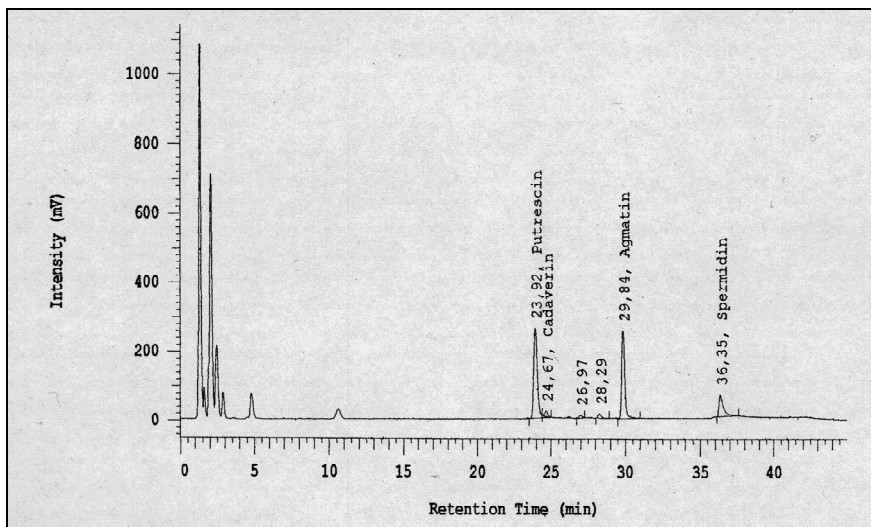
Die Retentionszeiten und Konzentrationen der einzelnen Polyamine wurden durch Vergleich mit Standardlösungen ermittelt (siehe Abb.38). Um auch den Verlauf der Konzentrationen der Polyamine erfassen zu können, wurde eine Kinetik von 0 - 2 h aufgenommen. Beispiele für markante Polyaminstaten sind in den Abb. 39, 40, 41 dargestellt, der Verlauf während der gesamten Analyse ist in Abb. 42 zu sehen.

Die Proteinsynthese startet mit 53  $\mu\text{M}$  Putrescin und 20  $\mu\text{M}$  Spermidin. Beide Polyaminkonzentrationen nehmen während der gesamten Zeit kontinuierlich zu, wobei die Bildungsgeschwindigkeit sich gegen Ende der 2stündigen Analyse verringert und bei entsprechender Weiterführung wahrscheinlich gegen 0 gehen würde. Agmatin wird gänzlich neu gebildet und zwar innerhalb der ersten 30 min. Die Konzentration steigt steil an auf einen Peak von 206  $\mu\text{M}$ , danach sinkt sie kontinuierlich. Agmatin, Putrescin und Spermidin sind, wie in der Einleitung ausführlich dargelegt wurde, eng miteinander verknüpft. Agmatin entsteht aus Arginin. Arginin wandelt sich über die Zwischenstufe Putrescin in Spermidin um. Arginin als Ausgangsstoff für Putrescin und Spermidin ist aber eher ein Nebenweg, normalerweise dient Ornithin als Substrat. Die Frage stellt sich, ob Arginin die alleinige Basis



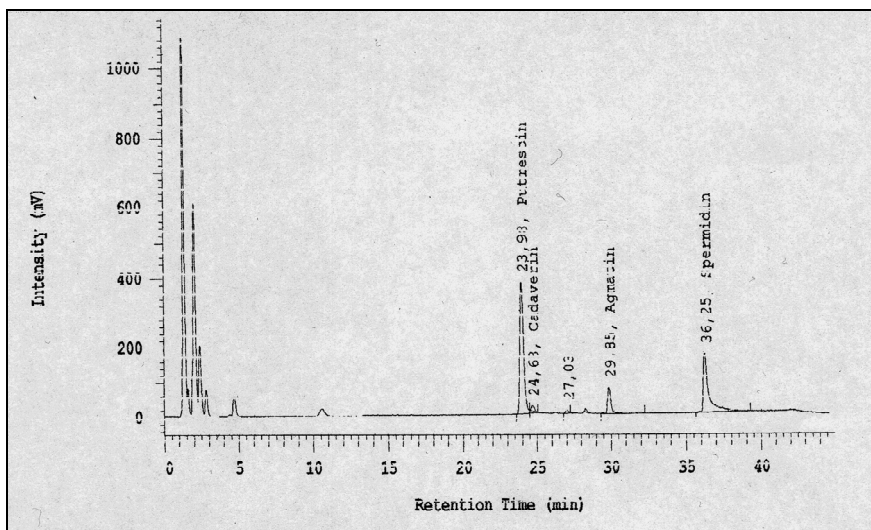
**Abb. 39 Polyaminstatus zum Zeitpunkt 0 min**

Putrescin und Spermidin sind bereits enthalten, Cadaverin, das Decarboxylierungsprodukt von Lysin ist in Spuren vorhanden und verändert sich nicht (Die Peaks zwischen 1 und 11 min sind Aminosäuren zuzuordnen, die auch derivatisiert werden, aber keine gute Auflösung erreichen)



**Abb. 40 Polyaminstatus zum Zeitpunkt 30 min**

Neben dem Anstieg der Putrescin- und Spermidinkonzentration erreicht das neu entstandene Agmatin sein Maximum



**Abb. 41 Polyaminstatus zum Zeitpunkt 120 min**

Der Agmatin-Peak hat sich deutlich verringert, die Putrescin- und Spermidinkonzentrationen sind weiter gestiegen

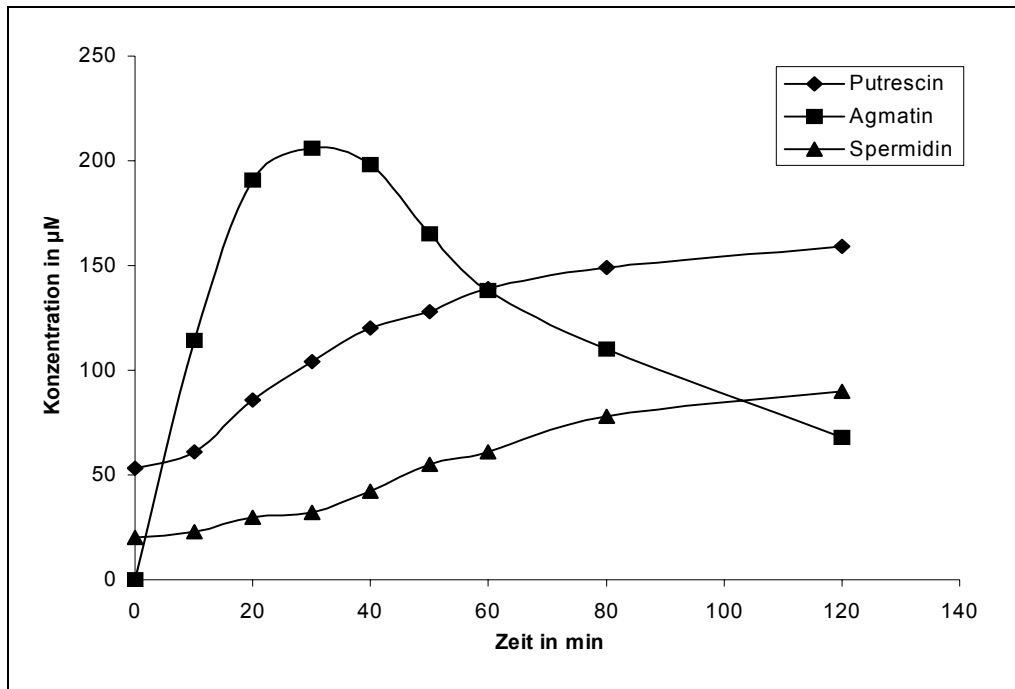


Abb. 42 Batchinterner Polyaminstatus während der Proteinbiosynthese

für Putrescin/Spermidin ist, oder ob nicht ein Teil doch über den Hauptweg Ornithin generiert wird. Das soll anhand der folgenden Berechnung geklärt werden. Es wird folgende Überlegung zugrunde gelegt: Wenn der Agmatinweg der ausschließliche ist, dann muss die Summe der drei Polyamine in jedem Zeitpunkt gleich sein. Es ist die Ausgangskonzentration von 73 µM Putrescin/Spermidin (Zeitpunkt 0) abzuziehen.

Bsp.:

30 min:  $137 \mu\text{M Pu/Sp} - 73 \mu\text{M Pu/Sp}(0) = 64 \mu\text{M Pu/Sp}$

$64 \mu\text{M Pu/Sp} + 206 \mu\text{M Agmatin} = \mathbf{270 \mu\text{M Gesamt-Polyamingehalt}}$

60 min:  $200 \mu\text{M Pu/Sp} - 73 \mu\text{M Pu/Sp}(0) = 127 \mu\text{M Pu/Sp}$

$127 \mu\text{M Pu/Sp} + 138 \mu\text{M Agmatin} = \mathbf{265 \mu\text{M Gesamt-Polyamingehalt}}$

Diese Rechnung lässt sich fortsetzen und bestätigt innerhalb einer akzeptablen Streuung einen konstanten Wert. Das bedeutet, dass Agmatin die einzige Quelle für Putrescin/Spermidin ist und die Ornithindecaboxylase inaktiv ist oder kein Ornithin zur Verfügung steht. Ob Arginin als Ersatzweg für die Bildung von Putrescin/Spermidin ausschließlich positive Auswirkungen auf die Proteinsynthese hat oder aber als „Stoppssignal“ (kompetitive Hemmung durch ähnliche Substanz) für die Proteinsynthese dient, kann ohne weitere Untersuchungen nicht beantwortet werden. Jedenfalls kann die optimale Spermidinkonzentration nicht mehr erreicht werden. Bemerkenswert ist, dass der Abbruch der Agmatinsynthese nach 30 min zu einem

sehr frühen Zeitpunkt noch vor dem Stillstand der Proteinsynthese erfolgt. Die möglichen Konsequenzen werden in der Diskussion besprochen.

Was man mit Sicherheit sagen kann, ist, dass der Argininpool (Ausgangskonzentration 400  $\mu\text{M}$ ) erheblich schrumpft. Unter Einbeziehung des verbrauchten Arginins für die Proteinsynthese dürfte es aber innerhalb des untersuchten Zeitraumes nicht zu einem Mangel kommen (siehe Diskussion Kap. 4.3).