

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Bewertung der Optimierung der 2-DE

Die zentrale Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Identifizierung differentieller Proteine des *E.coli*-Lysates während der zellfreien Proteinbiosynthese im Batchverfahren als einem Modellsystem, aus dem Rückschlüsse auf die Ursache des Stillstands der Proteinsynthese gezogen werden sollten.

Die hochauflösende 2-DE als gegenwärtig zuverlässigste Methode zum Vergleich komplexer Proteingemische in verschiedenen Zuständen setzt, wie bereits in der Einleitung Kap. 1.3.1 beschrieben, gewisse Grenzen der Nachweisbarkeit. Dies betrifft auch einige Proteine des Translationsapparates. Während die tRNA-Synthetasen und Elongationsfaktoren in ausreichender Kopienzahl vorhanden sind und im durchschnittlichen Bereich von Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt liegen, gelten einige Initiations- und Terminationsfaktoren, sowie die meisten ribosomalen Proteine (vgl. Anhang Kap. 6.7, Tab. 14) als schwierig nachweisbar in der Standard-2DE. Die Initiationsfaktoren 1 und 3 sind mit einem pI von über 9 zu basisch (das basischste, selbst nachgewiesene Protein hat einen pI von 8,1), darüber hinaus ist der Initiationsfaktor 1 mit 8 kDa zu klein. Die Terminationsfaktoren 1-3 liegen in geringer Kopienzahl vor und sind bisher in 2-DE Datenbanken auch noch nicht erfasst worden (Swiss prot, Stand 18.04.2004). Das geringe Vorkommen der Terminationsfaktoren verdeutlicht das molare Verhältnis von 1:50 der Terminationsfaktoren 1 und 2 zur Anzahl der Ribosomen (Neidhardt, 1987), wohingegen der Elongationsfaktor EF-Tu das am häufigsten vorkommende Protein ist. Für die ribosomalen Proteine konnte ein modifiziertes 2-DE-System (Kap. 2.3) angewandt werden.

Dem Erfassen von Proteinen geringen Vorkommens wurde mit 3 Gelsätzen steigender Proteinkonzentration Rechnung getragen. Der erste Gelsatz mit einer Proteinmenge von 25 µg pro Gel zeigte in der Silberfärbung einige differentielle Spots, die bis auf das Protein H-NS schwach gefärbt und unterhalb der Nachweisgrenze waren. Ansonsten zeigten die Gele dieses Satzes eine hohe Auflösung und bis zu 2000 Spots. Das bedeutete aber auch, dass die Elongationsfaktoren mit hoher Wahrscheinlichkeit keiner Veränderung in Bezug auf den Abbruch der Proteinsynthese unterworfen sind. Das hätte man aufgrund ihrer prominenten Spots sehen müssen. Diese Tatsache steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Schindler (2000).

In diesem System geht eine Threoninphosphorylierung am EF-Tu und EF-Ts nach Abbruch der Proteinsynthese verloren, eine Serinphosphorylierung an EF-Ts nimmt ab.

In den folgenden beiden Gelsätzen wurde das komplexe Proteingemisch durch Fraktionierung mittels Umkehrphasen-HPLC von allen niedermolekularen Zusätzen, vor allem den Salzen befreit und gleichzeitig konzentriert. Der theoretisch mögliche Anreicherungsfaktor bezogen auf den ersten Gelsatz und ein einzelnes Protein betrug 25 bzw. 200. Infolgedessen konnten sogar so seltene Proteine wie der Terminationsfaktor RF-1 und das auf Transkriptionsregulationsebene wirksame trp-Repressor-bindende Protein identifiziert werden. Damit relativiert sich die eingangs erwähnte Behauptung, einige Translationsfaktoren nicht erfassen zu können. Lediglich IF-1 und IF-3 können im 2-DE-Gel mit den gegenwärtigen Möglichkeiten nicht dargestellt werden.

Obwohl Proteine von hoher Konzentration wie erwartet unerwünscht starke Spots ergaben, war die Auflösung der mit 1 mg Protein beladenen, 200fach angereicherten Gele von guter Qualität. Die Anfertigung von Gelsätzen verschiedener Konzentration und Fraktionen stellt somit eine Möglichkeit dar, Proteine unterschiedlicher Kopienzahl gut aufgelöst zu erfassen.

Durch den Einsatz der HPLC zusätzlich zu den beiden Parametern im Gel wurde eine dritte Dimension eingeführt - die Trennung aufgrund der hydrophoben/hydrophilen Wechselwirkung der Proteine mit dem Säulenmaterial. Während bei der analytischen Fraktionierung die Proteine noch vor der Beladung der Säule in 8 M Harnstoff gelöst wurden (was sich aus der bei Badock, 2001, beschriebenen Prozedur ergab), wurde dieser Schritt bei der präparativen HPLC weggelassen. Obwohl sich, soweit das wegen des unterschiedlichen Proteinauftrages in beiden Gelsätzen möglich war, kaum Unterschiede ergaben, so fiel doch das als differentielles Protein identifizierte Enzym Adenylatkinase auf. In den Gelen des präparativen Ansatzes waren die Spots zum Zeitpunkt 0 deutlich stärker als nach 2 Stunden, während sich in den Gelen der analytischen Fraktionierung kein Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten feststellen ließ. Das ist möglicherweise so zu interpretieren, dass es sich um keine echte Modifikation handelt, sondern auf dem Wissen um den Abbau der Triphosphate basierend auf unterschiedlichen Beladungszuständen mit Nukleotiden. Andererseits könnte auch der Faltungszustand einen Einfluss haben. Während mit Harnstoff alle Proteine vor der Beladung der Säule denaturiert wurden, nimmt die native Konformation noch Einfluss auf die Affinität. Insofern könnten native von denaturierten oder anderweitig in ihrer Konformation veränderten Proteinen unterschieden werden. Auch das wäre eine wichtige Aussage im Hinblick auf die Aktivität des Lysats.

Dass die Gele gut reproduzierbar waren, zeigt die Identifizierung von H-NS als differentielles Protein in den Gelen des ersten und dritten Satzes. Auch die Anreicherung wird hier deutlich: während das Protein im ersten Gelsatz schwach gefärbt war, ist es im dritten Gelsatz mit einem starken (einem der hervortretendsten in diesem Gel) und zwei Nebenspots zu erkennen.

#### **4.2 Welche Erwartungen waren mit der Suche nach differentiellen Proteinen verknüpft ?**

Die beiden hauptsächlich verwendeten Verfahren der *in vitro* Proteinbiosynthese sind das Batchverfahren und das Prinzip des semikontinuierlichen Flusses, auch Dialyseverfahren genannt (Kap. 1.2.1). Während das Zielprotein im Batchverfahren im Vergleich zum Dialyseverfahren mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit produziert wird, ist das Dialysesystem über einen längeren Zeitraum aktiv. Da der Syntheseabbruch im Batchverfahren leicht definiert werden kann, wurde es als Modell ausgewählt. Die Idee war, bei der Suche nach differentiellen Proteinen auf Proteine des Translationsapparates zu stoßen. Falls es sich um rein quantitative Veränderungen handeln würde, z.B. ein bestimmter Translationsfaktor würde degradiert werden, könnte dieser durch Koexpression kontinuierlich nachgeliefert und die Stabilität des Systems erhalten werden.

Zweifel an einer rein quantitativen Veränderung dürften aber schon aus der Tatsache heraus entstehen, dass das kontinuierliche und semikontinuierliche System über einen Zeitraum von 24 Stunden und länger stabil ist. Auch die Gele des ersten Satzes wiesen keine so gravierenden Veränderungen auf. Die zugesetzten Proteaseinhibitoren schienen zumindest im beobachteten Zeitrahmen die Proteolyse wirksam zu verhindern. Einen weiteren Hinweis gaben Untersuchungen von Kim und Choi (1996). Nach dem Abbruch der Proteinsynthese im Batchverfahren „recyclten“ sie das S30-Extrakt, indem sie den gesamten Ansatz auf das ursprüngliche Volumen des S30-Mixes einengten und zweimal gegen das zehnfache Volumen des S30-Puffers dialysierten, um alle niedermolekularen Substanzen zu entfernen. Diesen gereinigten S30-Extrakt setzten sie unter Zugabe aller anderen Reaktionskomponenten in eine neue Syntheserunde ein. Die Syntheseleistung entsprach nahezu der eines neuen S30-Mixes. Das Ergebnis lässt tatsächlich den Schluss zu, dass reversible Modifikationen im Bereich der Proteine des Translationsapparates und keine Proteolyse zu erwarten ist.

Daneben darf natürlich nicht außer Acht gelassen werden, dass inhibitorische Nebenprodukte oder der Mangel an bestimmten Reaktionskomponenten für den Stopp der Proteinsynthese verantwortlich sein könnten. Letzteres als alleiniger Grund konnte jedoch auch ausge-

geschlossen werden. Mit dem Zusatz von Aminosäuren, NTP's und Phosphoenolpyruvat allein oder in Kombination konnte die Proteinsynthese nicht fortgesetzt werden (Kim and Choi, 1996). Auch die wiederholte Zugabe von  $Mg^{2+}$ , welches dem System als Folge der Bildung von  $Mg_3(PO_4)_2$  oder anderen unlöslichen Phosphaten (z.B. in Verbindung mit Ammoniumionen) entzogen worden sein könnte, führte nicht zu einem erneuten Start (eigene Untersuchungen).

### 4.3 Bedeutung der Kinetik ausgewählter Parameter

Neben der Analyse der Proteine des *E.coli*-Lysates war es nicht zuletzt zur Interpretation dieser Ergebnisse wichtig, Kinetik und Status einiger reaktionsrelevanter Parameter zu untersuchen. Das waren im wesentlichen pH-Wert, Aminosäuregehalt, Polyamine, Nukleotide und mRNA (Abb. 43).

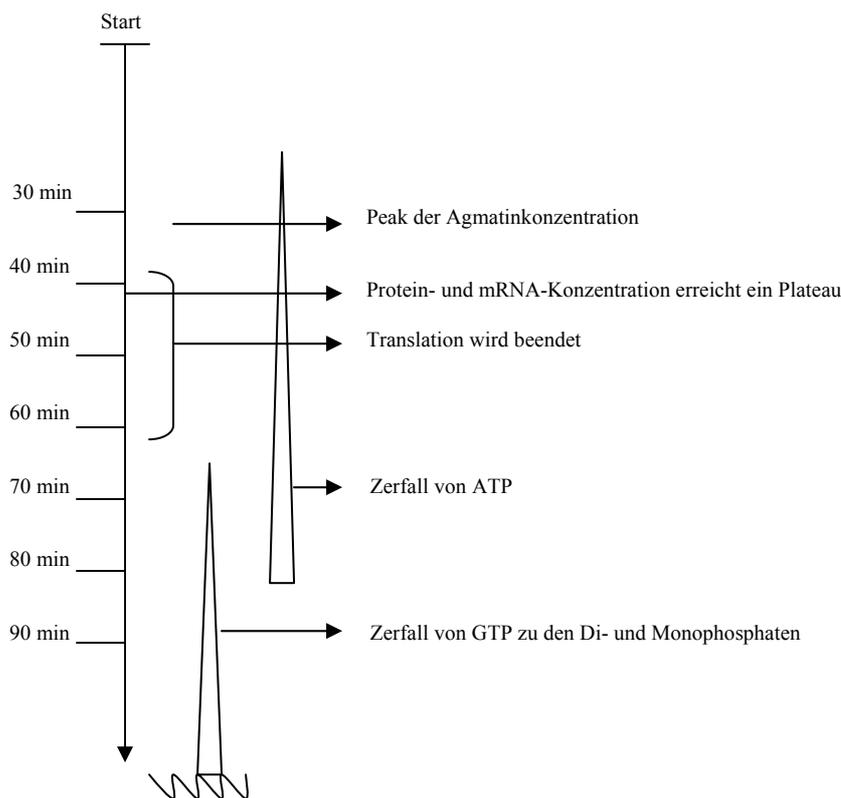


Abb. 43 Zeitskala zum Stillstand der Proteinsynthese in Verbindung mit anderen Parametern

Der pH-Wert fiel innerhalb des untersuchten Zeitraumes von zwei Stunden überraschenderweise von 7,7 auf 6,2 ab (Abb.31). Das hat Einfluss auf die Produktausbeute, ist aber nicht für den Abbruch der Proteinsynthese verantwortlich, wie W. Stiege (unveröffentlicht) in einer

Untersuchung nachweisen konnte. Dementsprechend ist die Syntheseausbeute im Bereich von pH 7,2 bis 7,8 gleichbleibend, bei einem pH-Wert von 5,8 ist noch mehr als die Hälfte der optimalen Ausbeute erreichbar (ohne Abb.). Nach 40 min, dem Zeitpunkt des Abbruchs der Proteinsynthese ist der pH-Wert 6,8. Die Frage stellt sich natürlich, was die Ursache dieser Verschiebung in den sauren Bereich ist. Dass das Lysat außer der Proteinsynthese noch andere Stoffwechselaktivitäten hat, wurde vielfach vermutet, aber nicht über den direkten Bezug zur Proteinsynthese hinaus untersucht. Die meiner Meinung nach größte Schwachstelle des Systems ist der Energiestoffwechsel. Das heißt nicht, dass zum Zeitpunkt des Abbruchs der Proteinsynthese nicht genug ATP und GTP vorhanden wäre, wie ich nachweisen konnte (Kap. 3.3.3). In der intakten Zelle aber ist der Gleichgewichtsfaktor von ATP bzw. GTP zu deren Hydrolyseprodukten  $10^{10}$  bzw.  $10^8$  (Blomberg *et al.*, 1980). Allen Missverhältnissen kann die Zelle durch Regulation entgegenwirken. Sie verfügt über „Sensoren“, die entsprechende Gegenreaktionen in Gang setzen. Wir wissen nicht, inwieweit zelluläre Regulationsmechanismen im Lysat noch intakt sind. Über zwei Möglichkeiten der Reaktion verfügt das Lysat jedoch nicht mehr, die Regulation über die Transkription und den Austausch über die Membran. Die Membran ist auch der Sitz der für den Energiestoffwechsel so wichtigen ATPase (oder auch ATP-Synthase genannt) mitsamt der Protonenpumpe und dem Elektronenübertragungssystem. Das bedeutet, dass eine aerobe Glykolyse, bei der sowie auch im anschließenden Zitronensäurezyklus gewonnene chemische Energie in Form von NADH und  $\text{FADH}_2$  über Cytochromoxidasen letztlich auf ATP übertragen wird, nicht mehr stattfinden kann. Im zellfreien Proteinsynthesystem wird Phosphoenolpyruvat (PEP) und Acetylphosphat eingesetzt in der Hoffnung, mit dem Phosphatrest ADP zu regenerieren. Im Fall von PEP ist aber nicht nur die Reaktion zu Pyruvat, sondern auch in Umkehrrichtung zur Glykolyse die Bildung von 2-Phosphoglycerat und alle weiteren Reaktionen der Glukoneogenese möglich. *E.coli* ist darüber hinaus ein fakultativer Anaerobier, was bedeutet, dass Pyruvat auch zu Formiat (und anschließend zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$ ), Ethanol, Acetat und Laktat abgebaut werden kann. Einige Endprodukte dieser vier möglichen Wege des anaeroben Abbaus von Pyruvat könnten für die Übersäuerung des Reaktionsansatzes verantwortlich sein. Zwei der von mir identifizierten differentiellen Proteine stehen im Zusammenhang mit der Glukose-/Galaktoseverwertung und somit indirekt auch mit dem Energiestoffwechsel: das D-Galaktose-D-Glukose-bindende Protein (DGAL) und die UDP-Galaktose-4-Epimerase (GALE). Obwohl die ursprünglich in der Membran lokalisierten „bindenden Proteine“, wie DGAL und das Spermidin/Putrescin periplasmatische Transportprotein (POTD), auf das ich später eingehen möchte, im Lysat keine Funktion mehr haben, ist nicht auszuschließen, dass

sie einer Regulation z.B. in Form einer proteolytischen Spaltung unterliegen oder ihre „Differenz“ im Vergleich zum Ausgangszustand in einer veränderten Beladung bzw. Entladung mit ihrem Substrat besteht, wenn ein Bedarf daran im Stoffwechsel „gemessen“ wird.

GALE ist ein zentrales Enzym im sogenannten „Leloir pathway“ (Kalckar, 1958). UDP-Galaktose kann in UDP-Glukose und weiter zu Glukose-6-Phosphat, dem zweiten Substrat der Glykolyse umgewandelt werden. Umgekehrt kann aus UDP-Glukose UDP-Galaktose entstehen, die dann als Kohlenstoffquelle und Energielieferant dient. Die Kontrolle der Galaktose-Enzyme des Leloir-Weges erfolgt über cAMP (zu cAMP auch Erklärung im Zusammenhang mit den Nukleotiden).

Obwohl in der Liste der differentiellen Proteine von mir nicht aufgeführt, so scheint auch die Pyruvatdehydrogenase dazuzugehören. In die Liste wurden nur Proteine von mindestens 20% Sequenzabdeckung aufgenommen. Die MALDI-Analyse der Pyruvatdehydrogenase hat nur 17 % Sequenzabdeckung ergeben (allerdings mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 in der Datenbank ProFound). Die Pyruvatdehydrogenase ist ein durch Phosphorylierung regulierter Multienzym-Komplex, der die Glykolyse mit dem Zitronensäurezyklus verbindet. Das Enzym wird u.a. durch Pyruvat und ADP inhibiert.

Kim und Swartz (2000) maßen dem PEP eine zentrale Rolle bei der Suche nach den Ursachen für den Abbruch der Proteinsynthese bei, die durch eines ihrer Experimente eindrucksvoll bestätigt wird. Sie inkubierten den S30-Mix ohne die anderen Reaktionskomponenten verschieden lange bei 37°C vor, um dann nach Ergänzung der anderen Reaktionskomponenten die Proteinsynthese 30 min ablaufen zu lassen. Selbst nach 2 Stunden Vorinkubation war die Synthese nur geringfügig gesunken. Andererseits betrug die Ausbeute nur noch ca. 10 %, wenn der gesamte Syntheseansatz ohne Plasmid 40 min vorinkubiert und die Reaktion mit Zugabe des Plasmids gestartet wurde. Wurden bei der Vorinkubation PEP und die Aminosäuren weggelassen und dann zusammen mit dem Plasmid hinzugefügt, ergab sich eine nahezu unverändert gute Syntheseleistung. Die leistungssenkenden Effekte von Aminosäuren und PEP separat waren jeweils schwächer. Das bedeutet, dass wir es mit einem kumulierenden negativen Effekt der beiden Komponenten zu tun haben.

Ob die Konzentration der Aminosäuren sinkt und sich gegebenenfalls limitierend auswirkt, war ebenfalls von Interesse. Wie in Kap. 3.3.3 beschrieben, wollte ich mir dafür ppGpp als Signal für nichtbeladene tRNA's zu Nutze machen. Doch als Reaktion auf die Positivkontrolle, bei der ich extern keine Aminosäuren zugegeben hatte, entstand kein „Magic spot“,

so dass sich diese Idee als unbrauchbar erwies. Die Analyse der Aminosäuren kann auch mit einer durch UV-Messung detektierbaren Derivatisierung und Trennung per HPLC ähnlich der Polyaminbestimmung (Kap. 3.3.4) vorgenommen werden. Kim und Swartz (2000) legten inzwischen folgende Ergebnisse vor (so dass ich von weiteren Untersuchungen absah): die Konzentration der Aminosäuren Alanin und Asparaginsäure/Asparagin stieg an, die von Arginin, Cystein und Tryptophan sank, wobei sie jedoch nicht vollständig abgebaut wurden. Alle anderen Konzentrationen blieben nahezu unverändert. Das ist eigentlich auch nicht überraschend, denn die Proteinbiosynthese verbraucht im Batchverfahren bei durchschnittlicher Ausbeute ca. 1  $\mu\text{M}$  je Aminosäure. Kim und Swartz setzten ursprünglich 500  $\mu\text{M}$  je Aminosäure ein, in unserem System sind es 400  $\mu\text{M}$ , so dass die Ausgangsbedingungen ähnlich sind. Betrachtet man die Abbauwege der Aminosäuren mit sinkender Konzentration, stellt man fest, dass Cystein und Tryptophan zu Pyruvat abgebaut werden. Es kann darüber spekuliert werden, ob das Lysat auf die sinkende Konzentration von Tryptophan „reagieren“ kann. Das differentielle Protein trp-Repressor-bindendes Protein könnte ein Indiz dafür sein. Alanin dagegen kann aus Pyruvat gebildet und zu Pyruvat abgebaut werden. Seine Konzentration steigt jedoch innerhalb der ersten Stunde um das zwölfwache. Alanin ist ein Maß für den Stickstoffspiegel in Bakterien (Quelle: Phoet und Phoet, 1994, S. 718). Insofern könnte es einerseits angeregt durch eine hohe Pyruvatkonzentration, andererseits durch einen Überschuss an Stickstoff aus dem Abbau der anderen Aminosäuren und der Polyaminsynthese Entgiftungsfunktion haben.

Ein anderes differentielles Protein führte mich auf die Spur, den Verbleib von Arginin aufzudecken - das Spermidin/Putrescin periplasmatische Transportprotein (POTD). Die Bedeutung von Spermidin und der Abbau von Arginin ist ausführlich in Kap. 1.2.3.5 besprochen worden. Die Klonierung und Expression von POTD im Batch deckte auf, warum dieses Protein in der 2-DE differentiiell ist: vom vollständigen Protein wurden im weiteren Verlauf vermutlich Peptide in zwei Stufen abgetrennt (alternativ könnte es sich um 3 verschiedene Beladungszustände handeln), so dass das Gleichgewicht vom höchsten zum niedrigsten Molekulargewicht verschoben wurde (Abb.30). Das kann man als Bedarf an Spermidin interpretieren, weil POTD nach einer Spaltung vermutlich nicht mehr in der Lage ist, die Polyamine zu binden. Eine solche Abspaltung ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden! Tatsächlich scheint das System bestrebt zu sein, die Polyaminkonzentration zu erhöhen, kann aber die für die Proteinsynthese optimale Konzentration von 5 mM für Putrescin und 500  $\mu\text{M}$  für Spermidin nicht erreichen. Nach 40 min sind 120 bzw. 40  $\mu\text{M}$  gemessen worden. Wie aus dem Polyaminstatus (Test auf Tyramin, Putrescin, Cadaverin,

Histamin, Agmatin, Spermidin) hervorging, diene Agmatin als Vorstufe für Putrescin (siehe Kap. 3.3.4.2) und nicht das sonst übliche Ornithin aus dem Harnstoffzyklus. Warum war der Agmatinlyase/Ornithindecaboxylase-Weg inaktiv? Erstens könnten die Enzyme die Lysataufarbeitungsprozedur nicht unbeschadet überstanden haben. Zweitens ist der Harnstoffzyklus außer Kontrolle (sehr wahrscheinlich, weil keine Membranen mehr existieren). Drittens wird die Aktivität von Arginin- und Ornithindecaboxylase zwar bei saurem pH-Wert induziert (Gale and Epps, 1942), doch speziell die Arginindecaboxylase erfordert zusätzlich ein anaerobes Milieu zu optimaler Aktivität. Das könnte ein zusätzliches Argument für die eingangs erwähnte anaerobe Energiegewinnung und Übersäuerung sein. Überraschend stellt die Arginindecaboxylase ihre Aktivität nach etwa 30 min ein, kurz vor dem Ende der Proteinsynthese. Gibt es da einen Zusammenhang? Einerseits stimuliert die Agmatinbildung indirekt die Proteinsynthese als Ausgangssubstrat für Spermidin und versucht, wie Polyamine allgemein negative Ladungen/sauren pH-Wert abzupuffern, andererseits ist sie Ausdruck eines extremen Milieus und steht in Verbindung mit Säureresistenz (Iyer *et al.*, 2003). Die direkte Wirkung auf die Proteinsynthese in verschiedenen Konzentrationen ist noch nicht getestet worden. Vermutlich kann diese ebenso fördernd in niedrigen Konzentrationen und hemmend in hohen Konzentrationen wie die getesteten Polyamine Putrescin und Spermidin sein. Agmatin ist in eukaryotischen Zellen in Zusammenhang mit Apoptose genannt worden (Gardini *et al.*, 2001). Die Möglichkeit einer Apoptose ist in jüngster Zeit auch für Bakterien diskutiert worden. Darauf möchte ich in Zusammenhang mit dem differentiellen Protein HtrA eingehen (unter dem Vorbehalt, dass es sich hier nicht mehr um intakte Zellen handelt).

Das Ergebnis der Überprüfung der Stabilität der Nukleotide GTP und ATP widerlegte die verbreitete Meinung, dass deren Hydrolyse ursächlich für den Stillstand der Proteinsynthese sei. Betrachtet man den Zeitpunkt des Zerfalls von ATP und GTP, so stellt man fest, dass die Proteinsynthese bereits ihr Plateau erreicht hat, bevor die Energiekomponenten massiv degradiert werden. Das für die Proteinsynthese besonders wichtige GTP ist nach 60 min noch unverändert und selbst nach 90 min noch ausreichend vorhanden. Der Abbau von ATP setzt früher ein. Der „Umschlagpunkt“, d.h. wann sich das Verhältnis zugunsten der Hydrolyseprodukte verschiebt, liegt zwischen 50 und 70 min. In der Dünnschichtchromatografie kann man aufgrund des ähnlichen Laufverhaltens ADP nicht von cAMP unterscheiden. Ein erhöhter cAMP-Spiegel könnte jedoch Aufschluss über eine Fehlregulation des Kohlenstoff-/Energiestoffwechsels geben und zumindest beweisen, dass eine nicht intakte Zelle noch im Ansatz zur Regulation fähig ist.

Im Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel ist das differentielle Protein Adenylatkinase untersucht worden. Die Adenylatkinase (KAD) katalysiert die Bildung vom 2 ADP zu AMP und ATP und umgekehrt. Sie gilt als eines der ATP-regenerierenden Enzyme und wird zum Teil in zellfreien Systemen extra zugesetzt (z.B. im PURE-System, Einleitung Kap. 1.2.1; dort als eukaryotisches Pendant Myokinase). KAD wurde kloniert und im Batch exprimiert. Das Protein ist im Gegensatz zu POTD und H-NS stabil, seine Zugabe kann die Proteinsynthese aber nicht über das übliche Maß hinaus verlängern und auch nicht die Regenerierung von ATP forcieren (eine DC im Zusammenhang mit der Expression von KAD ist angefertigt worden, zeigte aber keinen Unterschied zu Abb. 36, Ergebnis nicht gezeigt). Auf die Frage, ob die Identifizierung als differentielles Protein auf eine Modifikation oder eine Änderung der Aktivität/Beladung zurückzuführen ist, bin ich bereits im Kap. 4.1 eingegangen. Erstaunlich ist, dass selbst im PURE-System, welches unabhängig von allen unnötigen Zellproteinen unter Zusatz ATP-regenerierender Enzyme (Myokinase u.a.) arbeitet, nach 60 min keine Proteinsynthese mehr stattfindet.

Schließlich möchte ich auf die Kinetiken der Transkription und Translation und in diesem Zusammenhang auf die differentiellen Proteine RF-1 und S1 (ribosomales Protein) sowie auf die Analyse der ribosomalen Proteine eingehen.

Im Hinblick auf die Stabilität der mRNA konnte eine weitere mögliche Limitierung ausgeschlossen werden. Die Transkription ist über den Zeitpunkt des Proteinsyntheseabbruchs hinaus aktiv, im getesteten Fall 60 min mit nahezu gleichbleibender Geschwindigkeit (Abb. 33, darüber hinaus wurde nicht untersucht). Trotzdem erreicht die m-RNA-Konzentration schon nach 40 min ein Plateau, also zum gleichen Zeitpunkt wie die Proteinsynthese (Abb. 32). Auf den ersten Blick sieht es so aus, als ob Transkription und Translation gleichzeitig beendet werden. Aber nur bei der Translation ist das Erreichen des Plateaus auch das Ende der Proteinsynthese. Für die mRNA bedeutet das, dass bei gleichbleibender Synthesegeschwindigkeit im untersuchten Zeitraum die Abbaurate steigt. Warum? Die Aktivität von Endonukleasen könnte hochreguliert worden sein. Oder die mRNA ist ungeschützt dem Abbau ausgeliefert. Der wirksamste Schutz vor Abbau ist die aktive Translation, d.h. die Abdeckung mit Ribosomen. Eine Störung bei der Initiation verhindert den Eintritt, eine Störung bei der Termination in Verbindung mit dem Ribosomenrecycling den Austritt aus dem Ribosom. In beiden Fällen würde neu synthetisierte mRNA ungenutzt akkumulieren und möglicherweise verstärkt abgebaut werden.

Es gibt Hinweise auf eine Veränderung am Terminationsfaktor RF-1 (zur Funktion siehe Kap. 1.1.2.5). Nach Klonierung von RF-1 und Expression im Batch wurde das vollständige Protein hergestellt. Dabei fällt auf, dass sein Laufverhalten im eindimensionalen Gel nicht dem eines 40,5 kDa großen Proteins entspricht. Schon im zweidimensionalen Gel läuft RF-1 auf gleicher Höhe mit dem Survival Protein (surA), einem 47 kDa und ähnlich HtrA, einem 49 kDa großen Protein. Wie schon berichtet, gibt es auch keine Vergleichsmöglichkeiten, weil dieses Protein aufgrund seiner geringen Kopienzahl noch nicht in 2-DE-Datenbanken enthalten ist. Die Identifizierung aus dem Gel war zunächst schwierig, wahrscheinlich auch wegen zu geringer Konzentration. Wir konnten nur eine Sequenzabdeckung von 17 % (Wahrscheinlichkeit 1 in ProFound) erreichen, doch die anschließende MS/MS Fragmentanalyse (Tab.13) ergab eindeutig RF-1. RF-1 hatte für die Expression des Modellproteins FABP keine Bedeutung, weil dessen Stopp-Codon von RF-2 erkannt wird. Doch ist es wahrscheinlich, dass Veränderungen an RF-1 auch RF-2 betreffen. Beide besitzen das konservierte GGQ-Motiv. Erstmals an RF-2 (Dincbas-Renquist *et al.*, 2000), dann auch an RF-1 (Heurgue-Hamard, 2002) entdeckt, können beide am N(5)-Glutamin methyliert sein. Diese Methylierung ist für ihre Aktivität essentiell. Die Funktion des GGQ-Motivs besteht wahrscheinlich in der Hydrolyse der Peptidyl-tRNA.

Eine Erklärung für die Beendigung der Proteinsynthese wäre, dass die Dissoziation der Ribosomen aufgrund der nicht vollendeten Termination nicht mehr möglich wäre und die Ribosomen inaktivieren würde. RF-1 ist das erste bisher von mir identifizierte differentielle Protein, welches möglicherweise direkt am Ende der Proteinsynthese beteiligt ist.

S1, ein ribosomales Protein aus der kleinen Untereinheit, ist ebenfalls differentiell. Es verdichten sich die Hinweise der exponierten Bedeutung von S1 (siehe auch Kap. 1.2.3.2) für die Proteinsynthese. Das ist aufgrund seines gegenüber den anderen ribosomalen Proteinen höchsten Molekulargewichts und seiner besonderen Lage auf dem Ribosom zu erwarten. Darüber hinaus ist die Assoziation von S1 mit dem Ribosom schwach und reversibel. Ribosomenpräparationen enthalten oftmals weniger als die stöchiometrische Menge an S1 (B. Wittmann-Liebold, persönliche Mitteilung; Subramanian and van Duin, 1977). Neben der Shine-Dalgarno-Sequenz ist S1 an der initialen Selektion und Bindung der mRNA beteiligt. Es konnte nachgewiesen werden, dass freies S1 dieselbe mRNA-Bindungsspezifität aufweist wie an 30S gebundene (Ringquist *et al.*, 1995). S1 ermöglicht sogar die Translation von mRNA, der die Shine-Dalgarno-Sequenz fehlt bzw. eine davon abweichende Sequenz hat (Roberts and Rabinowitz, 1989; Farwell *et al.*, 1992; Tzareva *et al.*, 1994). Kürzlich sind einige interessante Interaktionspartner von S1 identifiziert worden. Das sind die in den

mRNA-Abbau involvierte tmRNA (Wower *et al.*, 2000; Karzai and Sauer, 2001), die RNA Polymerase und die ATPase Hfq (Sukhodolets and Garges, 2003).

S1 kann phosphoryliert werden, der Verlust einer Serinphosphorylierung nach Beendigung der Proteinsynthese ist bei Schindler (2000) beschrieben worden.

Neben S1 hätten aufgrund ihrer Größe und ihres pI-Wertes (vgl. Anhang Kap. 6.7, Tabelle 14) folgende, weitere ribosomale Proteine im normalen 2-DE Gel erkannt werden können: S2, S6, S10, L4, L7, L9, L12 und L21. S1 und L9 wurden in dieser Arbeit identifiziert (Abb.19 bzw.15). Signifikante Veränderungen an anderen ribosomalen Proteinen (außer S1) konnten weder in der Standard- noch in der Spezialelektrophorese (Kap. 2.3 und 3.2.5) nachgewiesen werden. Was man mit Sicherheit sagen kann ist, dass die ribosomalen Proteine nicht degradiert werden. Die Ablagerungen, die ursprünglich zu Verschmierungen vor allem in den Gelen der Proben nach 2 h führten, lassen aber vermuten, dass die Ribosomen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

#### **4.4 Bedeutung weiterer differentieller Proteine**

Im folgenden Kapitel möchte ich auf einige weitere differentielle Proteine eingehen, deren Funktion etwas über den Zustand des Lysats aussagen kann bzw. deren weitere Untersuchung sinnvoll wäre. Darunter sind einige Proteine mit unbekannter oder vermuteter Funktion.

##### **4.4.1 Drei differentielle Proteine, die aus dem Periplasma stammen und an Protein-Reparaturmechanismen beteiligt sind: HtrA, surA und DsbA**

###### **HtrA**

Die ursprünglich als DegP (oder Do Protease) bezeichnete, Hitzeschock-induzierte Serinprotease wurde zuerst in *E.coli* beschrieben (Lipinska *et al.*, 1989; Strauch *et al.*, 1989). Inzwischen stellte sich heraus, dass neben weiteren Homologen in *E.coli* und anderen Bakterien ein hoher Verbreitungsgrad auch in eukaryotischen Zellen besteht. Die Hauptaufgabe von HtrA besteht im Abbau Missgefalteter Proteine im Periplasma. Spiess *et al.* (1999) wiesen darüber hinaus abhängig von den äußeren Umständen auch eine Chaperonfunktion nach, bzw. anders ausgedrückt, die Qualitätskontrolle durch HtrA kann unterscheiden, ob ein nicht-natives Protein noch zurückgefaltet werden kann oder degradiert werden muss (Krojer *et al.*, 2002). HtrA ist in einen Signaltransduktionsweg eingebettet. Selbst Bestandteil des sigma E-Regulations, wird seine Transkription durch das Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem

CpxR/CpxA positiv beeinflusst. Darin einbezogen sind auch zwei Phosphoproteinphosphatasen PrpA (als Hitzeschockprotein identifiziert) und PrpB (Missiakas and Raina, 1997).

HtrA in Säugerzellen ist Bestandteil der Mitochondrienmembran. Hier nimmt es die Funktion einer Apoptose-abhängigen Serin-Protease an. Es ist der Antagonist des Apoptoseinhibitors XIAP. In Hefe wurde Nma111p, eine HtrA-ähnliche, im Zellkern enthaltene Serinprotease ebenfalls im Zusammenhang mit Apoptose beschrieben (Fahrenkrog *et al.*, 2004).

### **SurA**

SurA (sur = survival) unterstreicht schon im Namen die Bedeutung dieses Proteins. Ebenfalls im Periplasma lokalisiert, handelt es sich um eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase. Die Peptidyl-Prolyl-Bindung besitzt eine Sonderstellung gegenüber den Peptidbindungen anderer Aminosäuren: Aufgrund der Ringstruktur des Prolins ist die freie Drehbarkeit der N-C $\alpha$ -Bindung nicht möglich. Es kann daher sowohl die *cis*- als auch die *trans*-Peptidyl-Prolyl-Peptidbindung in der Proteinkonformation auftreten. Die Energiebarriere zur *cis/trans*-Isomerisierung ist so hoch, dass es einer katalytischen Unterstützung bedarf.

Das *surA*-Gen wurde identifiziert, als nach *E.coli*-Mutanten gesucht wurde, die in der stationären Phase nicht überleben konnten (Tormo *et al.*, 1990). Es ist an der korrekten Zusammensetzung von Außenmembran-Porinen beteiligt (Pouviere and Gross, 1996). Darüberhinaus steigern *surA*-Mutanten die lytische Aktivität einer Transglycosylase (Lazar *et al.*, 1998). *SurA* gehört ebenso wie HtrA und DsbC zum sigma E-Regulon (rpoE = Subfamilie von Sigmafaktoren mit extracytoplasmatischer Funktion), (Dartigalongue *et al.*, 2001).

### **DsbA**

Dsb-Proteine sind im Allgemeinen Proteindisulfid-Isomerasen. Disulfid-Brückenbindungen können in *E.coli* wegen des dort herrschenden oxidierenden Milieus nur im periplasmatischen Spalt geknüpft werden (Wülfing and Plückthun, 1994; Missiakas and Raina, 1997). Eventuell doch im Cytoplasma gebildete Disulfidbrücken werden durch Thioredoxine wieder reduziert (Prinz *et al.*, 1997; Aslund and Beckwith, 1999). DsbA ist das Enzym, dass vorwiegend die Oxidation von Cysteinen katalysiert (Grauschopf *et al.*, 1995), während es von DsbB reoxydiert wird (Bardwell *et al.*, 1993). DsbB ist über eine Elektronentransportkette mit dem Redoxmilieu des Cytosols verknüpft (Bader *et al.*, 1999). DsbA wurde im Zusammenhang mit der zellfreien Proteinbiosynthese koexprimiert, um die Funktionsfähigkeit von Proteinprodukten durch die Knüpfung von Disulfidbrücken herzustellen (Swartz, Kongreßbeitrag, 2003).

HtrA, surA und DsbA sind in Abb. 20 und 21 als differentielle Proteine in der 2-DE dokumentiert. Der Spot von HtrA ist nach 2h nicht mehr zu sehen. DsbA und surA kommen zum Zeitpunkt 0h jeweils in 2 Isoformen vor, die nach 2h im Fall von surA schwach, in Bezug auf den starken Spot von DsbA nicht bzw. den schwachen Spot kaum erkennbar zu detektieren sind. Es erscheint als eine logische Konsequenz und wahrscheinlich nicht als Zufall, dass gerade drei periplasmatische Reparaturenzyme verändert wurden. Die *E.coli* - Membran ist zerstört worden und es ist fraglich, ob diese Proteine ihre Funktion weiterhin ausüben können, was wichtig für den Erhalt von Translationskomponenten und künftige Syntheseprodukte wäre. Die weitere Charakterisierung dieser Proteine, besonders von HtrA, wäre außerordentlich wichtig.

#### **4.4.2 H-NS – ein Histon-ähnliches Protein als universeller Modulator**

H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) gehört zur Familie der Nucleoid-assoziierten Proteine. H-NS ist jedoch kein typisch basisches Histonprotein – es ist insgesamt eher neutral und besteht aus einem durch eine Protease-sensitive Linkerregion getrennten N-terminalen sauren Bereich und einem für die DNA-Bindung bekannten basischen C-terminalen Bereich. Seine 3 Isoformen wurden schon von Spassky *et al.* (1984) beschrieben. Sie treten in den isoelektrischen Punkten 7,5; 6,5 und einer weniger dominanten Variation mit saurerem pI auf (Ussery *et al.*, 1994). Es könnte sich um posttranslationale Modifikationen handeln. Wegen seines unvergleichlichen Aufbaus und der besonderen Beachtung, die es in der mikrobiologischen Literatur findet, wo es mit zahlreichen Regulationsmöglichkeiten in Verbindung gebracht wird, möchte ich auf dieses Protein im Detail eingehen.

H-NS war das auffälligste differentielle Protein, seine Existenz zu Beginn der Modell-Synthese von FABP und sein Fehlen nach 2 h konnte bereits in den ersten Coomassie-gefärbten Gelen nachgewiesen und im dritten Gelsatz reproduziert werden. In den 0 h - Gelen des dritten Gelsatzes konnten seine 3 bekannten Isoformen nachgewiesen werden. In den 2 h - Gelen fehlten diese 3 Spots (bzw. Spot 10c sehr schwach, Abb. 21). H-NS wurde in den Translationsvektor pHM kloniert und *in vitro* exprimiert. Obwohl, wie bei allen Klonierungen, die Richtigkeit mit der Sequenzierung überprüft wurde, konnte ich das Protein nur in Spuren in seiner vollen Größe detektieren. Stattdessen wurden 2 kleine Proteine gebildet, wobei das kleinere in sehr viel geringerer Konzentration auftrat. Zwei getestete

Klone ergaben das gleiche Bild. Eine Kinetik der Produktbildung lieferte dann die mögliche Erklärung: H-NS wurde in voller Länge synthetisiert, aber wahrscheinlich sofort gespalten.

Der Protease-sensitiven Linkerregion zwischen den Aminosäureresten 76 und 90 (insgesamt 137) ist in der Literatur bisher wenig Beachtung geschenkt worden. Cusick und Belfort (1998) setzten H-NS und sein Homolog StpA einem Proteaseverdau mit verschiedenen Enzymen aus. Der Verdau mit Trypsin resultierte für beide Moleküle in einem stabilen 6 kDa großen Fragment, das vom DNA/RNA-bindenden C-Terminus abstammte und einem kleineren und instabilen N-terminalen Fragment. Sie konnten in Versuchen mit der *E.coli*-eigenen Lon-Protease nachweisen, dass diese StpA, jedoch nicht H-NS nach demselben Muster spaltet. Goldberg *et al.* (1997) postulierten, dass bei der Preparation von Zellextrakten aus *E.coli* die outer membran Protease OmpT für die unerwünschte Spaltung von H-NS verantwortlich ist. Außerdem stieg die Proteaseaktivität mit dem Alter der Zellkultur, was auf eine Abhängigkeit von der Wachstumsphase zurückzuführen wäre. Obwohl sie auch die oben genannte Linkerregion als Spaltstelle identifizierten, ergab sich hier ein ganz anderes Spaltungsmuster: ein 10,5 kDa Fragment aus dem N-terminalen Bereich und ein 4 kDa Fragment aus dem C-terminalen DNA-bindenden Bereich. Kein Fragment war instabil. Hier einen Vergleich zur Proteaseaktivität in unserem zellfreien System anzustellen, ist ohne weitere N-terminale Sequenzierung der Spaltprodukte nicht möglich, obwohl die Ähnlichkeit zu dem Muster von Cusick und Belfort nicht unerheblich ist.

Beide Arbeitsgruppen gehen von einer funktionellen Relevanz der Fragmente aus. Es gibt bisher keine Untersuchungen, welche Auswirkungen eine Spaltung hat. Zusammen mit den 3 Isoformen könnte das ein breites Funktionsspektrum ergeben.

Einige mögliche Konsequenzen möchte ich anhand der bisher bekannten Funktionen erläutern. H-NS ist mit ca. 20.000 Kopien pro Zelle das zweithäufigste nukleoidorganisierende Protein und könnte damit in einem Abstand von 200 bp die chromosomale DNA bedecken (Varshavsky *et al.*, 1977; Spassky *et al.*, 1984). Das bakterielle Chromosom verfügt nur über wenige nichtkodierende Sequenzen und ist daher nicht so rigide als Chromatin strukturiert. Trotzdem erlangt es eine gewisse Kompaktheit, weil es in Schleifen, sogenannten Topodomänen organisiert ist (Worcel and Burgi, 1972). Eine Sequenzspezifität zeigt H-NS nicht, doch bindet es bevorzugt AT-reiche, gebogene DNA (Goosen and van de Putte, 1995; Rowbury 1997). Obwohl es nicht Promotor-spezifisch ist, beeinflusst es Gene, die auf Umwelteinflüsse wie Sauerstoff-, Nahrungsangebot, pH-Wert, Temperatur und Osmolarität reagieren. Seine Expression ist in der Wachstumsphase

gegenüber der stationären Phase erhöht. In den meisten Fällen wirkt es als Repressor der entsprechenden Gene (McGover *et al.*, 1994; Spurio *et al.*, 1992), jedoch nicht im klassischen Sinn eines Operons. Insofern könnte seine Spaltung ein Ausdruck dafür sein, dass das Lysat in einem solchen Zustand ist, dass bestimmte Gene aktiviert werden müssten, um auf Stressbedingungen reagieren zu können, wenn es sich noch um eine intakte Zelle handeln würde.

Da H-NS sequenzunspezifisch an DNA binden kann, sollte man seinen Einfluss auf das Plasmid im zellfreien System nicht unterschätzen. Dass H-NS tatsächlich an Plasmide binden kann, ist belegt (Hulton *et al.*, 1990; Hinton *et al.*, 1992; Dorman *et al.*, 1990; Tupper *et al.*; 1994). Solange nukleoidbindende Proteine im System existieren, werden sie vermutlich vor Endonukleasen geschützt.

Viele der Autoren, die schlussfolgern, dass H-NS ausschließlich auf genregulatorischer Ebene wirkt, beziehen sich auf Mutationsstudien und die Tatsache, dass H-NS bisher nur an der DNA nachgewiesen wurde. Direkte Beweise gibt es nicht.

H-NS und sein Homolog StpA können auch an RNA binden. Obwohl für StpA überzeugender bewiesen, gelten beide als RNA-Chaperone (Deighan *et al.*, 2000).

Der proteinbindenden Domäne ist bislang zu wenig Beachtung geschenkt worden. Zwar weiß man, dass H-NS überwiegend mit Hilfe der N-terminalen, sauren Domäne zu Oligomeren komplexiert (Smyth *et al.*, 2000), die Homodimere oder größere Einheiten bilden können, doch die Interaktion mit anderen Proteinen wurde nicht beschrieben. Schroeder und Wagner (2000) stellten erstmals aufgrund detaillierter Strukturuntersuchungen fest, dass die Genrepression ribosomaler RNA eher auf eine Behinderung der RNA-Polymerase als auf die Belegung der DNA zurückzuführen ist. Nieto *et al.* (2002) konnten die direkte Interaktion von H-NS mit einer neuen Familie globaler Regulatoren – Hha/YmoA – ohne Anwesenheit von DNA nachweisen. Inzwischen schließen Schroeder und Wagner (2002) auch nicht mehr die Beteiligung von H-NS an RNA/Protein-Komplexen und damit die Regulation der Translation aus.

Studien zur Lokalisierung verschiedener nukleoidbindender Proteine identifizierten Hfq (vgl. Kap.4.3, S. 116 ff., Hfq – S1 Interaktion) in Assoziation mit Ribosomen (Kajitani *et al.*, 1994).

### **Beispiele für „globale“ Proteinsyntheseinhibitoren**

Wenig ist bisher über „Schalter“-Proteine der Proteinsynthese bekannt, die nicht nur die Expression spezieller Proteine, sondern die Synthese ganz allgemein betreffen. Ein gutes

Modellsystem zur Erforschung solcher Proteine stellt die zellfreie Proteinsynthese dar. Oka *et al.* (1995) berichteten von einem Perchlorsäure-löslichen Protein, sie nannten es PSP, isoliert aus Rattenleber und -niere, welches nach Zugabe zum Kaninchenretikulozytenlysat (Fa. Amersham) die zellfreie Proteinsynthese des Kontrolltemplates Tabakmosaikvirus-mRNA stoppte. Es wurde im Zuge der Analyse von HMG-Proteinen (High mobility group), einer Familie von Nichthistonproteinen, aus Chromatin koextrahiert. HMG-Proteine sind in Transkription und DNA-Replikation involviert. Der Mechanismus ist bisher ungeklärt.

PSP konnte in seinem ursprünglichen Gewebe im Kern und interessanterweise auch im Cytoplasma lokalisiert werden, wobei die Verteilung über Zellen gleichen Typs sehr unregelmäßig war.

Es konnte nachgewiesen werden, dass PSP seine Proteinsynthese-inhibierende Wirkung erst einige Minuten nach Zugabe zum Lysat entfaltete und mit einer Polyribosomendisaggregation einherging. Die Polyribosomendisaggregation konnte auch bei dem Translationsinhibitor HRI nachgewiesen werden (Howard *et al.*, 1970; Hunt *et al.* 1972; Bruns and London, 1972; Adamson *et al.*, 1968; Zucker and Schulman 1968). Anders als ein HRI-ähnlicher Inhibitor aus Ehrlichs Aszites-Tumorzellen (Clemens, 1976) und Rattenleber (Delaunay, 1977) phosphoryliert PSP nicht die 38-kDa Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2.

Das Beispiel von PSP zeigt, dass wenn auch im eukaryontischen System wirkend, zumindest die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein mit dem Chromosom assoziiertes Protein (wie H-NS im prokaryotischen System) auch einen regulatorischen Einfluss auf die Proteinsynthese haben könnte.

#### **4.4.3 S-Ribosylhomocysteinase**

Erst in jüngster Zeit wurde erkannt, dass Bakterien zur Kommunikation von Zelle zu Zelle über ein hormonähnliches Signaltransduktionssystem verfügen. Wachstumsphasen-abhängig werden niedermolekulare Botenstoffe nach außen abgegeben, die die Expression bestimmter Gene regulieren. Diesen Prozess nennt man „quorum sensing“ bzw. das hauptsächlich identifizierte Signalmolekül Acyl-Homoserin-Lacton auch Autoinducer (AI). Ein weiteres Autoinducer-System (AI-2) ist in pathogenen und nichtpathogenen *E.coli* und *Salmonella*-Stämmen gefunden worden. Zu dessen Synthese ist das *luxS*-Genprodukt erforderlich (Surette *et al.*, 1999). Es handelt sich dabei um eine S-Ribosylhomocysteinase, deren Aktivität zur Bildung von L-Homocystein und 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion führt. Die physiologische Rolle von AI-2 ist noch nicht vollständig aufgedeckt worden, doch weisen erste Ergebnisse

daraufhin, dass die Inhibierung chromosomaler Replikation das Ziel sein könnte (Withers and Nordstrom, 1998). Kürzlich konnte ein Einfluss auf die Expression und Aktivität von SdiA, einem LuxR-Typ-transkriptionellen Aktivator des Zellteilungsgens *ftsQAZ* durch AI-2 nachgewiesen werden (DeLisa *et al.*, 2001a). Darüberhinaus beeinflusst SdiA die Expression von Virulenzfaktoren und stationäre-Phase-Genen, darin einbezogen der Sigma-Faktor *rpoS*. In einer Studie wurde auf der Basis von DNA-Microarrays die mRNA-Expression von AI-2 stimulierten *E.coli-luxS*-Mutanten mit unstimulierten Zellen verglichen (DeLisa *et al.*, 2001b). Bei 6% des *E.coli*-Genoms konnte eine mehr als 2,3fache Veränderung der mRNA-Konzentration festgestellt werden. Positiv wurden der  $\sigma^{54}$ -transkriptionelle Aktivator und das  $\sigma^{54}$ -modulierende Protein, jedoch kaum der alternative  $\sigma$ -Faktor *rpoS* moduliert. Hervorgehoben wurde die Herabregulation von *potA* und *potB*. Weiterhin wurden u.a. *trpR* (Tryptophan-Aporepressor), *yqjC* und *ybgF* moduliert.

Es kann durchaus zufällig sein, dass 4 von 18 in dieser Arbeit als differentiell erkannten Proteinen direkt mit dem AI-2-System wie in beschriebener Studie in Verbindung stehen, zumal sich die beschriebenen Veränderungen auf die mRNA und nicht auf die Proteine beziehen. Doch wäre es durchaus im Sinne einer komplexen Regulation, dass nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch in Bezug auf die bereits vorhandenen Proteine Modulationsmechanismen greifen. Solche Untersuchungen sind bisher nicht vorgenommen worden. Zum Beispiel wurde in der Studie von DeLisa als Folge der Aktivität von AI-2 die mRNA-Expression von *potA* (ATP-bindende Komponente des Spermidin/Putrescin-Transports) um den Faktor 5,1 und von *potB* (Spermidin/Putrescin-Transportpermease) um 3,1 herabgesetzt. In dieser Arbeit wurde POTD (Spermidin/Putrescin-periplasmatisches Transportprotein) wahrscheinlich gespalten, was ebenfalls in die Richtung einer Herabregulation wirken würde. *LuxS*, dessen Genprodukt in dieser Arbeit ebenfalls nach 2h nur noch in geringer Konzentration an der ursprünglichen Stelle vorhanden war, ist noch nicht kloniert und auf die Art seiner Veränderung untersucht worden. Falls es degradiert werden würde, wäre der hypothetisch hergestellte Zusammenhang eines aktiven AI-2-Signalweges hinfällig. Wäre eine Modifikation der Grund, ist eine Untersuchung auf einen Anstieg von Homocystein und 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion sinnvoll. Über Modifikationen der S-Ribosylhomocysteinase ist noch nichts bekannt, zumal die Funktion selbst erst seit kurzem zugeordnet werden konnte (in der Datenbank matrix science stand es noch unter orf: gi/15803206 bzw. gi/16130599). Wenn sich die beschriebene Vermutung bestätigt, wäre die Wirkung von AI-2 auf die oben erwähnten differentiellen Proteine sicher eine gute Ergänzung zur Vervollständigung des

Bildes über diesen Signalweg und könnte zur Aufklärung des Stillstandes von Transkription und Translation im Batch-System beitragen.

#### **4.4.4 Drei nukleinsäurebindende Proteine**

Ich möchte schließlich noch auf drei differentielle Proteine eingehen, deren Erforschung der Funktion noch im Anfangsstadium ist, von denen zwei potentiell mit dem Stillstand der Proteinsynthese in Verbindung gebracht werden könnten, weil sie RNA-Bindeproteine sind.

Die YrdC-Genfamilie kodiert für Proteine, die unabhängig oder als Domäne in regulatorischen Proteinen vorkommen und hochkonserviert ist. Ein Beispiel ist sua5 aus Hefe, welches ein Supressor des Translationsinitiationsdefekts in Cytochrom c und für normales Wachstum unentbehrlich ist (Na *et al.*, 1992). Die Strukturanalyse von YrdC aus *E.coli* erbrachte eine neue, bisher in anderen Proteinen noch nicht beobachtete Faltung. YrdC kann an einzel-, und doppelsträngige DNA und RNA binden, bevorzugt aber an doppelsträngige RNA (Teplova *et al.*, 2000).

Die Struktur von YajQ ist kürzlich aufgeklärt worden (Teplyakov *et al.*, 2003). Dieses in Bakterien konservierte Protein zeigt ein für RNA-Bindung typisches Strukturmotiv.

YqjH gehört zur einer Familie von DNA-Polymerasen, die in die Stationäre-Phase und UV-induzierte Mutagenese involviert sind (Sung HM *et al.*, 2003).

### **4.5 Ist der Abbruch der Proteinsynthese ein isoliertes Ereignis ?**

Die Pioniere der zellfreien Proteinsynthese haben ihren Nachfolgern ein „schweres“ Erbe hinterlassen: Seit Jahrzehnten weiß man, dass die Proteinsynthese im *E.coli*-Batchsystem weniger als eine Stunde stabil ist, hat bislang die Ursache dafür aber noch nicht finden können. In Weizenkeimlysaten sind dagegen mit der Identifizierung eines Suizidsystems schon Fortschritte erzielt worden (Madin *et al.*, 2000). Dieses ist jedoch artspezifisch und nicht übertragbar.

Trotzdem deutet einiges darauf hin, dass der Abbruch der Proteinsynthese in *E.coli* ein durchorganisierter Prozess ist. Allein die zeitliche Abfolge (Abb.43) des Abbruchs der Agmatinsynthese kurz vor Ende der Proteinsynthese, die gleichbleibende mRNA-Konzentration (für eine begrenzte Zeit) ab dem Stopp der Proteinsynthese und der massive Abbau von ATP und später GTP nach dem Stopp der Proteinsynthese unterstreichen diese These. Wenn

es eine generelle Nukleaseaktivität gäbe, müsste diese von Beginn an wirken. Auch das Dialysesystem würde bei diesem Tempo innerhalb kurzer Zeit nicht so lange stabil sein können, wenn die nachgelieferten Energiekomponenten so schnell zerstört werden würden. Es muss sich also um eine induzierte Nukleaseaktivität handeln, die so wirksam nur unter definierten Umständen ist. Auch wenn die Art der Veränderungen in den differentiellen Proteinen bislang nur ungenügend charakterisiert worden ist, so deuten sich allein schon aus deren Funktionen Zusammenhänge an. Unter ihnen sind substratbindende Proteine, Proteinreparaturenzyme, Proteine des Translationsapparates und regulatorische Proteine. Besonders letztere sollten näher charakterisiert werden. Eine zentrale Stellung nimmt dabei das universell konservierte HtrA ein. Auf der Suche nach Sequenzhomologien von Apoptose-assoziierten Genen in allen Lebensformen stieß man auf diese(s) Protease/Chaperon, die in Vertebraten, Arthropoden, Nematoden, Pflanzen, Pilzen und Prokaryoten verbreitet ist (Koonin and Aravind, 2002). Bislang galt Apoptose als Eigenschaft mehrzelliger Organismen, doch die Hinweise mehren sich, dass Apoptose auch in Bakterien vorkommt (Lewis, 2000; Nyström, 2003, Bayles 2003). Neben physiologischen Gründen für einen programmierten Zelltod, wie Autolyse wegen Sporulation beispielsweise in *Bacillus subtilis*, sind Beschädigungen der Membran und DNA-Strangbrüche die Ursache. Als eine solche ist die Lysat-Herstellung anzusehen. Werden dann noch Glykolysezwischenprodukte (PEP) hinzugefügt oder Pyruvat als Folge des Aminosäureabbaus entsteht, „registriert“ die „Zelle“, dass ihre in der Membran gelegene Protonenpumpe und die Elektronentransportkette nicht mehr funktionieren und ein Apoptose-ähnlicher Prozess (bzw. Teile davon) könnte eingeleitet werden. Im Anfangsstadium eines solchen Schadens können in Gemeinschaft lebende Bakterien (Biofilm) über ein Pheromonystem miteinander kommunizieren, welches dazu führen kann, dass bestimmte Gene exprimiert werden (AI) und/oder die Zellteilung ausgesetzt wird (AI-2, Ribosylhomocysteinase), bis der Schaden behoben ist. Die vorübergehend nicht stattfindende Proteinsynthese kann auch ein Schutzmechanismus sein. Wenn ein Kontrollmechanismus die Unumkehrbarkeit (point of no return) der Apoptose feststellt, wird ein Abbaumechanismus in Gang gesetzt, in den beispielsweise die Hydrolyse von Nukleotiden und die Fragmentierung der DNA involviert ist.

Ob sich das oben beschriebene „Szenario“ tatsächlich so im Lysat als nicht existenter Zelle „abspielt“ ist rein spekulativ, doch nicht ausgeschlossen. Weitere Untersuchungen müssten diese These bestätigen oder widerlegen.