

# 1 EINLEITUNG

Während die Genomforschung in den letzten 20-30 Jahren einen enormen Erkenntnisgewinn gipfelnd in der Sequenzierung des menschlichen Erbgutes erbracht hat, wurde die Analyse der Genprodukte, der Proteine zunächst vergleichsweise stiefmütterlich behandelt. Doch spätestens seit wir wissen, dass das humane Genom nur über geschätzte 35 000 Gene verfügt und die „Ein Gen-ein Protein-eine Funktion-Hypothese“ so nicht zutreffen kann, wurden die Proteine in ihrer Vielfalt, in ihrer Zusammensetzung und ihren Interaktionsmöglichkeiten wieder in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Der Begriff „Proteom“, erstmals 1994 erwähnt (Wilkins *et al.*, 1997), steht für die Gesamtheit der Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen in der Zelle vorhanden, bzw. gebildet (exprimiert) werden. Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) erlaubt uns einen Überblick über den jeweiligen Zustand der Zelle zu erhalten. Veränderungen an Proteinen führen zur Aufdeckung von Signaltransduktionsnetzwerken. Hierbei sind die Mengen an Proteinen, die z.B. bei der Signaltransduktion eine große Rolle spielen, oftmals sehr niedrig exprimiert, weshalb die Anreicherung einzelner Proteine für die Untersuchung der Proteinzustände häufig notwendig ist. Anders als bei der unkomplizierten Vervielfältigung der DNA mittels der PCR-Technik ist man dabei auf den zellulären Synthesemotor, dem Ribosom, angewiesen, denn die chemische Synthese kann nur eine begrenzte Anzahl von Aminosäuren korrekt zu kurzen Peptiden miteinander verknüpfen, die Faltung der Proteine nicht unterstützen und keine gezielten Modifikationen einführen. Unter Umgehung der Nachteile, die bei der Überexpression einzelner Proteine in der lebenden Zelle auftreten, wurde das System der zellfreien Proteinbiosynthese entwickelt, welches gegenüber der Expression in der lebenden Zelle zu einer Ausbeutesteigerung führte und durch die Entkopplung von der intakten Zelle auch erlaubt, toxische Proteine zu synthetisieren.

Doch die zellfreie Proteinbiosynthese erfüllt auch heute noch nicht alle Anforderungen. Am Beispiel des *E.coli-in vitro*-Batchsystems soll im Rahmen dieser Arbeit nach Gründen für den frühen Abbruch der Synthese gesucht werden.

## 1.1 Transkription und Translation in *E.coli*

### 1.1.1 Transkription

Die Transkription ist der erste Schritt auf dem Weg vom Gen zum Protein. Hier wird die genetische Information von der DNA in mRNA übertragen.

Obwohl im zellfreien Proteinsynthesesystem die *E.coli* eigene Transkription unterdrückt wird, soll hier kurz auf den natürlichen Mechanismus eingegangen werden, weil

1. die Transkription und Translation in Bakterien eng miteinander gekoppelt sind und
2. *E.coli*-Komponenten der Transkription im Lysat noch vorhanden sein können.

Die für die Transkription benötigte *E.coli*-RNA-Polymerase ist ein Holoenzym aus 5 Untereinheiten der Zusammensetzung  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$  und mit 480 kDa eines der größten Enzyme. Unter Verwendung einer DNA-Matrize koppelt es die Nukleosidtriphosphate ATP, GTP, CTP und UTP unter Freisetzung und anschließender Hydrolyse von Pyrophosphat. Um die Transkription initiieren zu können, benötigt es zur Bindung einen stromaufwärts von Strukturgenen gelegenen Promotor. Dieser besteht aus der Pribnow-Box (Pribnow, 1979) mit der Konsensussequenz TATAAT, die mit ihrem Zentrum etwa bei -10 bp vom Transkriptionsstartpunkt aus gelegen ist und der -35 Region, die ebenfalls AT-reich, aber weniger stark konserviert ist. Das Holoenzym bindet mit einer Dissoziationskonstanten von  $K_D \approx 10^{-14}$  M an die DNA und bedeckt einen Bereich von -20 bis +20 bp. Viele Promotorsequenzen weichen aber erheblich von der Konsensussequenz ab und beeinflussen damit die Komplexbildungsgeschwindigkeit mit der RNA-Polymerase und letztlich die Transkriptionsgeschwindigkeit.

Die Rolle der  $\sigma$ -Untereinheit ist die am besten verstandene. Das Kernenzym ohne die  $\sigma$ -Untereinheit kann DNA sehr fest, aber unspezifisch binden. Das Holoenzym bindet DNA dagegen mit niedrigerer Affinität, sobald es aber den Promotor gefunden hat, verstärkt sich seine Bindung. Erst die  $\sigma$ -Untereinheit ermöglicht also den korrekten Transkriptionsstart. Sobald die ersten Phosphodiesterbindungen geknüpft sind, dissoziiert die  $\sigma$ -Untereinheit von der DNA ab. Die Hauptform der bakteriellen RNA-Polymerase enthält die  $\sigma^{70}$ -Untereinheit, daneben existieren noch weitere, die verschiedene Promotorsequenzen erkennen. Häufig werden diese Sigmafaktoren auf spezielle Umweltreize hin bereitgestellt, um Gene zu aktivieren, die einem Mangelzustand entgegenwirken können. Daneben gibt es noch Gen-Regulatorproteine, die oft in Verbindung mit niedermolekularen Signalmolekülen als

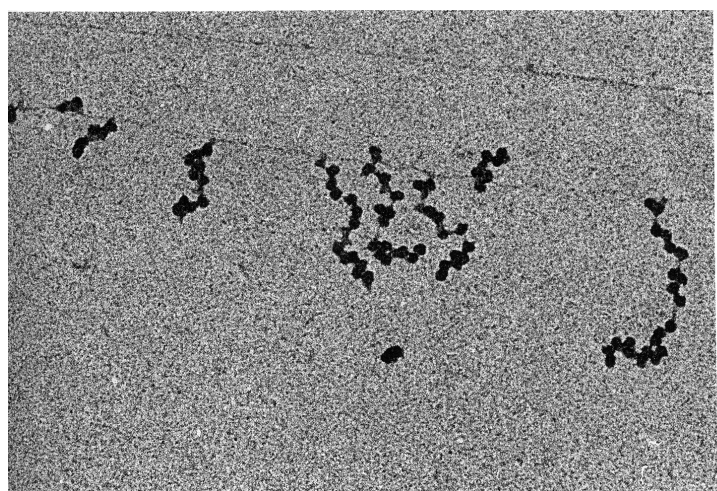
Sensoren agieren, z.B. cAMP in Verbindung mit dem Katabolit-Aktivatorprotein (CAP) bei der Umstellung von Glukose auf eine andere Kohlenstoffquelle. Diese Aktivator- oder Repressormoleküle können im Gegensatz zu  $\sigma$ -Untereinheiten (diese binden nur an die Polymerase) direkt an die DNA binden und die Polymerase aktivieren oder behindern.

Die AT-reichen Sequenzen des Promotors erleichtern das initiale Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges. Im weiteren Verlauf der Elongation bleibt ein „DNA-Auge“ geöffnet, ein Bereich von etwa 12 bp, in welchem die entstehende RNA eine Hybridhelix mit der DNA bildet. Davor liegt die DNA wahrscheinlich in erhöhter Windungszahl vor (positive Superspiralisierung), während sie danach entsprechend entwunden ist, woraus eine negative Superspiralisierung resultiert. Die Transkription schreitet bei 37°C mit einer Geschwindigkeit von 20-50 Nukleotiden pro Sekunde voran.

Neben der Transkriptionsinitiation unterliegt auch die Transkriptionstermination sequenzabhängiger Regulation durch die Transkriptionsterminatoren. Es gibt Rho-abhängige und -unabhängige Terminatoren. Beide enthalten inverse Wiederholungen, die am 3'-Ende sogenannte stem-loop Strukturen bilden. Rho-unabhängige Terminatoren sind reich an G-C-Paarungen, gefolgt von 4-6 Uridylat- und 1 oder 2 Adenylatresten. Dagegen enthalten die Rho-abhängigen Terminatorsequenzen wenige bis keine G-C-Paarungen in ihrem Stamm und haben nur gelegentlich Uridylatreste in dessen Folge. Rho ist ein oligomeres Protein, welches an RNA bindet, wobei es ATP zu ADP und anorganischem Phosphat hydrolysiert. Wahrscheinlich wandert es entlang der sich bildenden RNA-Kette bis zum Terminator und veranlaßt oder unterstützt die Dissoziation der RNA-Polymerase. Selten ist jedoch die Abhängigkeit von Rho absolut.

Weitere Proteine existieren - die Antiterminatoren, die entweder Rho inhibieren können oder unter bestimmten Bedingungen die Ausbildung alternativer stem-loop's unterstützen.

Transkription und Translation sind eng miteinander gekoppelt - sobald sich mRNA bildet, heften sich Zellorganellen, die hierfür spezialisierten Ribosomen an, um sofort mit der Proteinsynthese zu



**Abb. 1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von in *E.coli* transkribierter DNA, die in unmittelbarer Folge translatiert wird (Polysomenbildung); die längeren, mit den meisten Ribosomen besetzten mRNA-Ketten sind am weitesten vom Transkriptionsstart entfernt.

Quelle: Miller *et al.*, 1970. *Science* 169 : S. 392

beginnen (Abb.1). Das hat den Vorteil, dass mRNA keine unnötigen Sekundärstrukturen bildet und die Ribosomen folglich später nicht mehr binden kann.

## 1.1.2 Translation

### 1.1.2.1 Übersicht

Die Translation überträgt die von der mRNA abgelesene Kodierung in die Aminosäuresequenz der Proteine. Die vorhandenen vier verschiedenen RNA-Basen können in Triplets zu 64 Variationen kombiniert werden, die die einzelnen Aminosäuren kodieren. Die meisten der 20 Standardaminosäuren verfügen daher über mehr als ein mögliches Triplet, wobei AUG das Startcodon ist (und auch Methionin kodiert), während drei Triplets das Sequenzende determinieren (Crick *et al.*, 1961; Wittmann, 1961; Wittmann, 1963; Nirenberg and Lederle, 1964; Yanofsky, 1967). Die kontinuierliche Übertragung der Triplettabfolge von der mRNA in die Aminosäuresequenz erfordert tRNA, die die aktivierten Aminosäuren nacheinander zur Synthese bereitstellt. Durch Codon-Anticodonbindung an die mRNA ermöglichen die beladenen tRNAs die einzelnen Aminosäuren im Ribosom in der richtigen Reihenfolge zu verknüpfen.

Ribosomen haben ein Molekulargewicht von  $2,5 \times 10^6$  Da und bestehen zu 2/3 aus RNA und 1/3 aus Proteinen. Die Peptidyltransferase-Funktion wird von der RNA übernommen (Cech, 2000). Ribosomen bestehen aus 2 Untereinheiten, die in *E.coli* entsprechend ihrem Sedimentationskoeffizienten ( $S = \text{Svedberg-Konstante}$ ) als 30S und 50S Untereinheit bezeichnet werden, zusammen ergeben sie die 70S. Die Assoziation der beiden Untereinheiten wird durch  $\text{Mg}^{2+}$  unterstützt. Die große Untereinheit besteht aus 34 verschiedenen Proteinen, von denen 2 in mehreren Kopien vorliegen (Terhorst *et al.*, 1972; Pettersson *et al.*, 1976; Pettersson and Liljas, 1979), der 23S rRNA und der 5S rRNA (Brownlee *et al.*, 1968; Erdmann *et al.*, 1983; Specht *et al.*, 1991). Die 30S Untereinheit setzt sich aus 21 Proteinen und der 16S rRNA zusammen (Brosius *et al.*, 1978; Carbon *et al.*, 1978). Eine große Anzahl der Sequenzen ribosomaler Proteine wurde im Labor Wittmann isoliert (Wittmann, 1974) und im Labor Wittmann-Liebold in ihrer Primärstruktur aufgeklärt (z. B. Wittmann and Wittmann-Liebold, 1974, Wittmann, 1983; Wittmann-Liebold, 1986; Giri *et al.*, 1984, Wittmann-Liebold *et al.*, 1990, Vlamirov *et al.*, 1996;). Die Struktur der Ribosomen konnte in jüngster Zeit hochauflösend dargestellt werden (Yusupov, 2001). Es wurde gezeigt, dass sowohl die 30S / 50S Kontaktfläche als auch die Flächen zwischen Ribosom und beladener tRNA und mRNA

weitgehend frei von ribosomalen Proteinen ist, was die Theorie des RNA-Enzyms eindrucksvoll bestätigt (Ausnahme u.a. Protein L2, Wittmann-Liebold, 1990).

Die ribosomalen Proteine liegen auf der Oberfläche des Ribosoms, ihre loops ragen als fingerförmige Fortsätze tief in die rRNA-Strukturelemente hinein und stabilisieren so die komplexe Struktur des Ribosoms. Die Nachbarschaftsverhältnisse der wichtigsten ribosomalen Proteine zu den Kontaktstellen der jeweiligen RNA-Regionen konnten durch Quervernetzungsstudien aufgeklärt werden (Wittmann-Liebold *et al.*, 1995). Obwohl die Funktion vieler ribosomaler Proteine noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, prägen etliche durch Mutationen phänotypische Veränderungen aus und es gibt Hinweise auf allosterische Wechselwirkungen, zum Beispiel mit Translationsfaktoren.

Die Bindung jeder einzelnen Aminosäure mit der wachsenden Peptidkette verläuft in den Teilschritten Initiation, Elongation und Termination. Die schon erwähnten Translationsfaktoren unterstützen diese. In jedem Stadium ist ein Translationsfaktor mit einer GTPase-Aktivität involviert, der Konformationswechsel bewirkt. Die GTPase Domänen von EF-G, EF-Tu und IF2 interagieren alle mit den ribosomalen Proteinen L7 und L10-L12.

Die Mechanismen der einzelnen Stadien der Proteinbiosynthese werden in den folgenden Unterkapiteln näher erläutert.

### **1.1.2.2 Transfer-RNA als Vermittler zwischen genetischem Code und Aminosäuresequenz**

Transfer-RNA's (tRNA) sind an zwei Kontrollmechanismen der exakten Übersetzung des genetischen Codes in die Aminosäuresequenz beteiligt. Zum einen müssen die tRNA's mit Hilfe der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen korrekt mit ihrer spezifischen Aminosäure beladen werden (Schimmel, 1987) und andererseits ihr Basentriplett auf der mRNA binden (Crick, 1966).

Die Aminosäure-spezifischen tRNA's mit einer Länge von 60-95 Nukleotiden sind untereinander nicht homolog. Sie besitzen jedoch eine ähnliche, sehr charakteristische Sekundärstruktur, die sogenannte Kleeblattstruktur. Helikale Bereiche werden von 3-4 Schleifen (Anticodon-, D-, TΨC- und variable Schleife) unterbrochen. Die Tertiärstruktur wird zum Großteil aus modifizierten, Nicht-Watson-Crick-Basenpaaren zu einem „L“ geformt. Am 3'-Terminus mit der konservierten Sequenz CCA-3' wird die Aminosäure gebunden (Akzeptorarm). Jeder Aminosäure ist mindestens eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase zugeordnet, die wiederum untereinander nicht homolog sind. Ihr Erkennungsbereich an der

tRNA liegt meist im „L-Knick“, in einigen Fällen auch am Anticodon (z.B. fMethionyl-, Phenylalanyl-tRNA) (Schulman and Abelson, 1988). Die Aminoacyl-tRNA-Synthetase katalysiert im ersten Schritt die Bildung eines Enzym-gebundenen Aminoacyl-Adenylat-Intermediates unter Verwendung von ATP, wobei eine Pyrophosphatase zur weiteren Energiegewinnung beiträgt. Im zweiten Schritt wird die so aktivierte Aminosäure, ein gemischtes Anhydrid, auf den 3`-Adenylatrest der tRNA übertragen.

Eine Besonderheit besteht für die erste Aminosäure N-Formyl-Methionin einer jeden Polypeptidkette. Die tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> wird zunächst mit Methionin beladen. Der Komplex wird von einer Transformylase erkannt und eine Formylgruppe von N<sup>10</sup>-Formyltetrahydrofolat auf die  $\alpha$ -Aminogruppe des Methionins übertragen und ist für den Start prädestiniert. Die Formylierung und häufig auch das erste Methionin werden von der reifen Polypeptidkette wieder entfernt.

### 1.1.2.3 Initiation

Ribosomen werden vor jeder neuen Syntheserunde aktiviert, indem die Untereinheiten voneinander dissoziieren. Das wird durch den Initiationsfaktor IF-3, unterstützt durch IF-1 eingeleitet (Godefroy-Colburn *et al.*, 1975). Ein korrekter Start wird durch das Codon AUG auf der mRNA in Abhängigkeit von der Shine-Dalgarno-Sequenz (Shine and Dalgarno, 1974) determiniert. Die Shine-Dalgarno-Sequenz kurz vor dem Startcodon paart sich mit der Komplementärsequenz am 3`-Ende der 16S-rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit und legt damit fest, an welchem der Methionincodons die Proteinsynthese beginnt. Das wird wiederum von IF-3 gefördert.

GTP ist in der Proteinbiosynthese ein wichtiger Faktor. Es spielt dabei weniger die Rolle eines Energielieferanten als dass es vielmehr durch Hydrolyse in GDP und P<sub>i</sub> zu Konformationsänderungen in Komplexen beiträgt. Im Initiationskomplex wird es an IF-2, zusammen mit der fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>, der mRNA und der 30S ribosomalen Untereinheit gebunden. Unter Ablösung von IF-3 und Hydrolyse von GTP (die Hydrolyse wird von den ribosomalen Proteinen L7/L12 unterstützt) verbinden sich die ribosomale 50S-Untereinheit und der 30S-Initiations-komplex zum 70S-Initiationskomplex. Dabei werden IF-1 und IF-2 freigesetzt. Die fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> wird als einzige beladene tRNA an der P-site des Ribosoms positioniert, einem Raum, der während der Elongation der Peptidyl-tRNA vorbehalten ist. In *in vitro*-Experimenten konnte bei hohen Mg<sup>2+</sup>-Ionenkonzentrationen nachgewiesen werden, dass die Initiator-fMet- tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> auch ohne die mRNA diese Position einnehmen kann (Petersen *et al.*, 1976).

Die Initiation ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteinbiosynthese. Man sollte daher annehmen, dass hier Regulationsmechanismen ansetzen können. Dies ist für das eukaryotische System nachgewiesen worden. Beispielsweise in Retikulozyten akkumuliert in Abwesenheit von Häm ein Häm-kontrollierter Inhibitor, der den eukaryontischen Initiationsfaktor eIF-2 phosphoryliert. Der phosphorylierte eIF-2 bindet stärker an eIF-2B und zieht letzteren „aus dem Verkehr“. eIF-2B ist für die Regenerierung von eIF-2 durch GDP-GTP-Austausch zuständig (Jagus *et al.*, 1981; Proud, 1986). Bistlang konnte im prokaryontischen System keine Phosphorylierung an Initiationsfaktoren nachgewiesen werden. Das mag einerseits daran liegen, dass Phosphorylierungen allgemein in Bakterien eine nicht so große Rolle wie in eukaryontischen Zellen spielen, andererseits aufgrund des schnellen Lebenszyklus schwierig nachzuweisen sind. Die Maskierung von mRNA oder der forcierte Abbau durch RNasen wären eine weitere Möglichkeit, in die Initiation der Translation regulierend einzugreifen.

#### 1.1.2.4 Elongation

Die Elongation beschreibt den dreistufigen Prozess der Peptid-Kettenverlängerung, bestehend aus der Bindung der Aminoacyl-tRNA am Ribosom, der Transpeptidierung und der Translokation. Als Folge der korrekten Assoziierung der ribosomalen Untereinheiten mit der mRNA bilden sich die schon erwähnte P-site für die Bindung der Peptidyl-tRNA, die A-site zur Aufnahme jeder neu zu verknüpfenden Aminoacyl-tRNA sowie die E-site für den Abgang (Exit) der entladenen tRNA's.

Für jede neue Elongationsrunde wird zunächst ein ternärer Komplex aus dem Elongationsfaktor EF-Tu, daran gebundenem GTP und einer Aminoacyl-tRNA gebildet. EF-Tu ist das am häufigsten in *E.coli* vorkommende Protein mit mehr als 5% Anteil am Gesamtproteingehalt und einer Kopienzahl von ca. 100 000 pro Zelle. Damit wäre EF-Tu theoretisch in der Lage mit allen Aminoacyl-tRNA's gleichzeitig einen ternären Komplex zu bilden. EF-Tu koordiniert die zeitliche Abstimmung zwischen der Bindung der Aminoacyl-tRNA an der A-site und der Peptidbindung. Die Aminoacyl-tRNA wäre auch ohne die Mithilfe von EF-Tu/GTP in der Lage aufgrund der Anticodon-Codon Wechselwirkung mit der mRNA seine Bindungsstelle zu finden - allerdings langsamer. Neben der Beschleunigung der A-site-Bindung verzögert EF-Tu/GTP die Peptidbindung folgendermaßen: Bevor sich EF-Tu nicht von der Aminoacyl-tRNA entfernt hat, kann auch die neue Aminosäure nicht übertragen werden. Dafür ist aber die Hydrolyse von GTP nötig. Eine inkorrekte, aber in den ersten beiden Basen des

genetischen Codes übereinstimmende und daher transient an die mRNA gebundene Aminoacyl-tRNA kann so in der Regel wieder abgelöst werden. EF-Tu/GTP hat somit indirekt eine Korrekturfunktion.

Das vom Komplex entfernte EF-Tu/GDP wird durch EF-Ts recycelt.

Die Peptidbindung wird von der Peptidyltransferase-site der großen ribosomalen Untereinheit katalysiert, woran hauptsächlich RNA beteiligt ist. Die freie Aminogruppe der tRNA-gebundenen Aminogruppe aus der A-site verdrängt nukleophil die tRNA an der P-site. Die Reaktion ist thermodynamisch begünstigt, die benötigte Energie wurde schon bei der Aminoacylierung investiert. Die ungeladene tRNA besetzt die P-site, die Peptidyl-tRNA die A-site. Während der Translokation bewegt sich die mRNA um drei Basen weiter. Die Peptidyl-tRNA besetzt nun die P-site, die unbeladene tRNA die E-site und wird schnell freigesetzt und die A-site steht wieder für eine neue Belegung bereit. Ein weiterer GTP-gebundener Elongationsfaktor EF-G unterstützt die Translokation und wird dabei wiederum hydrolysiert. Für den exakten Mechanismus der Elongation werden verschiedene Modelle diskutiert (Nierhaus, 1993; Abel and Jurnak, 1996; Rodnina *et al.*, 1997)

#### **1.1.2.5 Termination**

Die Beendigung der Peptidkettensynthese wird von 3 spezifischen Codons auf der mRNA ausgelöst – UAA, UAG und UGA. Sie resultiert in der Freisetzung des Peptids von der ribosomal gebundenen tRNA. An der Termination beteiligte Faktoren sind im wesentlichen RF (release factor) 1-3 und der RRF (ribosome recycling factor). Seit der Entdeckung der Terminationsfaktoren Ende der sechziger Jahre (Ganoza, 1966; Capecchi, 1969) bis heute sind noch nicht alle Teile des Puzzles bezüglich der Aufklärung des Mechanismus der Termination gefunden worden.

RF-1 und RF-2 sind die beiden Terminationsfaktoren, die die Stoppcodons erkennen und anstelle einer Aminoacyl-tRNA an der A-site andocken. RF-1 bindet UAA und UAG, RF-2 dagegen UAA und UGA. Bemerkenswert ist, dass die Codon-Wechselwirkung nicht auf der sonst üblichen Basenpaarung beruht, sondern von Proteinen übernommen wird (Scolnick *et al.*, 1968). Schon Dalgarno und Shine (1973) vermuteten, dass auf der Basis der Sequenz am 3'-Ende der 16S rRNA Basenpaarungen mit den Stopcodons der mRNA möglich sein können und diese in die Erkennung involviert sind. Caskey *et al.* (1977) wiesen experimentell nach, dass ohne einen 49-Nukleotide langen Bereich am 3'-Ende der 16S rRNA keine Bindung der Faktoren RF-1 und RF-2 an das Ribosom mehr möglich ist. Das Modell der indirekten



Stoppcodonerkennung entweder über eine Interaktion zwischen rRNA und mRNA oder einem Stoppcodon-/Terminationsfaktorkomplex wird auch heute noch vertreten (Arkov and Murgola, 1999). Die andere Hypothese konzentriert sich auf eine direkte Wechselwirkung zwischen Aminosäuren der Terminationsfaktoren RF-1 und RF-2 und der Stopptripletts, unterstützt durch Untersuchungen an RF-2 (Brown and Tate, 1994; Poole *et al.*, 1997). Auch hier ist noch zu beweisen, ob die Spezifität jeweiliger Tripeptide in RF-1 bzw. RF-2 für den direkten Kontakt mit den Codons oder über einen mRNA-rRNA-Komplex verursacht wird (Ito *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000).

Auffällig ist an allen Codon-assoziierten Terminationsfaktoren, sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten, das konservierte GGQ-Motiv. Ihm wird eine Funktion bei der Weitergabe des „Signals“ vom Stoppcodon zum katalytischen Zentrum zugeordnet (Frolova *et al.*, 1999). Es interagiert mit der Peptidyl-tRNA im Peptidyltransferase-Zentrum, um die Peptidyl-tRNA-Hydrolyse auszulösen. Das Gly-Gly-Gln Tripeptid, umrahmt von positiv geladenen Aminosäuren, könnte das CCA-Motiv an der Peptidyl-tRNA binden und so die Position nahe der hydrolysierbaren Esterbindung fixieren. Trotzdem ist das Ribosom auch in der Lage, die Hydrolyse ohne Translationsfaktoren auszuführen. Dies wird durch einen hohen pH-Wert, deacylierte t-RNA in der A-site und organische Lösungsmittel gefördert (Caskey *et al.*, 1971). Ein dritter, GTP-abhängiger Terminationsfaktor RF-3 unterstützt die Freisetzung von RF-1 und RF-2 (Goldstein and Caskey, 1970), sobald die Hydrolyse der Peptidkette vollzogen wurde. RF-3 reduziert die  $K_m$  (Michaelis-Menten-Konstante) für die Trinukleotidcodons um das 5-8 fache.

Schließlich binden an den sogenannten 70S-Post-Terminationskomplex die Faktoren RRF (Ribosomenrecyclingfaktor) und EFG, um wiederum in einer GTP-abhängigen Reaktion die Dissoziation der 50S ribosomalen Untereinheit zu vermitteln. Der IF3 entfernt die deacylierte tRNA vom 30S-Post-Terminationskomplex (Karimi *et al.*, 1999), womit sich der Kreis zur nächsten Initiation schließt.

## 1.2 Die zellfreie Proteinbiosynthese

### 1.2.1 Die Entwicklung und Bedeutung der zellfreien Proteinbiosynthese

#### Entwicklung:

Über einen Zeitraum von mehreren Dekaden bis in die Gegenwart diente die *in vitro* Proteintranslation der Aufklärung ihres eigenen Mechanismus. In den frühen 50er Jahren

konnten mehrere Gruppen unabhängig voneinander demonstrieren, dass die Proteinsynthese keine intakte Zelle erfordert (Borsook *et al.*, 1950; Winnick *et al.*, 1950 a,b; Siekevitz and Zamecnik, 1951; Siekevitz, 1952; Peterson and Greenberg, 1952; Khesin, 1953; Gale and Folkes, 1954). Die Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Energiezufuhr in Form von ATP und GTP wurde wenig später von Schachtschabel und Zillig (1959) nachgewiesen. Das erste bakterielle zellfreie System mit einer exogenen mRNA entwickelte Nirenberg (1961, 1963). Damit war der Grundstein für das klassische System gelegt: Der Überstand einer Zentrifugation von *E.coli*-Lysat bei 30 000 x g (S30-Fraktion) wird mit Aminosäuren, Energiekomponenten ATP und GTP, einem Energieregenerierungs-System, reduzierenden Agentien und optimalen  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  oder  $NH_4^{2+}$ -Ionenkonzentrationen ergänzt. Weitere *in vitro* Translationssysteme auf der Basis eukaryotischer Zellextrakte wie beispielsweise Kaninchen-Retikulozyten- (Woodward *et al.*, 1974) und Weizenkeimlysate (Anderson *et al.*, 1983) folgten.

Die Instabilität der separat zugeführten mRNA stellte jedoch einen limitierenden Faktor dar. Das Problem wurde mit der gekoppelten Transkription-Translation gelöst (Wood and Berg, 1962; Byrne *et al.*, 1964), d.h. von einem externen DNA-Templat ausgehend kann immer wieder mRNA nachgeliefert werden. Zubay erweiterte das Aufbereitungsprozedere für das *E.coli*-Lysat um eine verlängerte Vorinkubation mit dem Ziel, endogene RNA und DNA durch zelluläre Nukleasen zu degradieren (Lederman and Zubay, 1967; De Vries and Zubay, 1967; Zubay 1973). Gold und Schweiger verwendeten isolierte Ribosomen und einen über Ionenaustausch-Chromatografie von endogenen Amino- und Nukleinsäuren befreiten S100-Überstand. Das ermöglichte ebenfalls eine geringe Hintergrundtranslation (Gold and Schweiger, 1969; 1971; Schweiger and Gold, 1969).

Den aus cytoplasmatischen Fraktionen eukaryotischer Zellen gewonnenen Extrakten fehlen naturgemäß die RNA-Polymerasen. Daher wurden RNA-Polymerasen extern eingeführt. Als optimal erwiesen sich die RNA-Polymerasen aus den Bakteriophagen T7 und SP6 unter Verwendung der entsprechenden Promotoren und Terminatoren im Templat (Spirin, 1991; Baranov and Spirin, 1993; Craig *et al.*, 1992), die schließlich auch im prokaryotischen System Einzug gehalten haben.

Endogene Protease-, Nuklease- u.a. unerwünschte Enzymaktivitäten limitieren die zellfreie Proteinbiosynthese. Deshalb ist schon relativ früh versucht worden, ein System ausschließlich mit den die Proteinsynthese direkt betreffenden Komponenten zu etablieren (Kung *et al.*, 1975; 1977). Das scheiterte zunächst, da der Ribosomen-Recycling-Faktor noch unbekannt war. Shimizu *et al.* (2001) unternahmen einen zweiten, diesmal erfolgreichen Versuch mit

ihrem **PURE-System** (protein synthesis using recombinant elements). Unter Umgehung eines groben Zellysats wurden 31 Protein-Translationskomponenten rekombinant hergestellt und mit gereinigten Ribosomen und den anderen niedermolekularen Bestandteilen in einem Batch-System vereinigt. Dieses Verfahren stellt zwar einen gelungenen „proof of principle“ dar, doch 1.) kann die Produkt-Ausbeute noch nicht mit herkömmlichen Lysaten konkurrieren und 2.) sind die Kosten für die rekombinante Gewinnung der Translationsproteine unverhältnismäßig hoch.

#### Techniken:

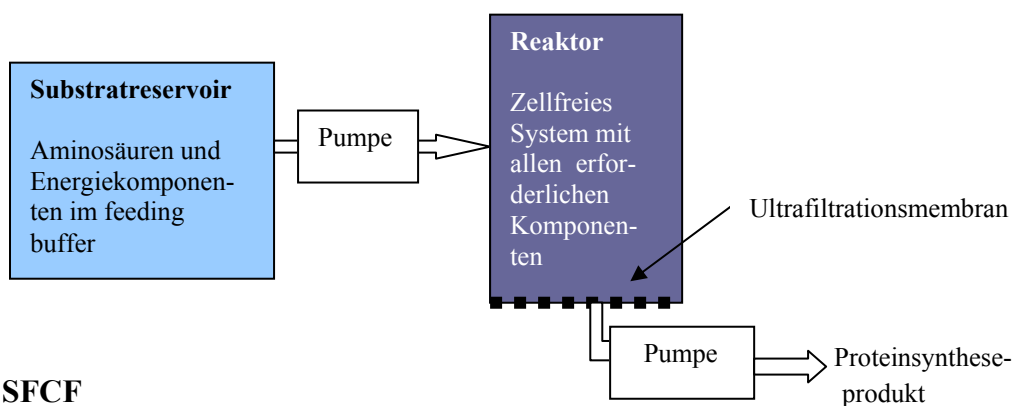
Das **Batch-System** (alle Komponenten in einem Reaktionsraum) hat den allgemeinen Nachteil, dass Proteine nur im analytischen Maßstab hergestellt werden können. Zwar ist seine Effizienz in Bezug auf die durchschnittlich knapp einstündige Reaktionsdauer hoch, dennoch können mit (semi)kontinuierlichen Systemen insgesamt höhere Ausbeuten erreicht werden, obwohl deren Reaktionsgeschwindigkeit niedriger ist.

Die Apparatur für die Methode des **kontinuierlichen Flusses (CFCF = continuous flow cell-free system / Abb.2A)** besteht im wesentlichen aus einem Reaktor mit allen bisher aufgeführten Bestandteilen, einem Substratreservoir mit Aminosäuren und Nukleotiden im Reaktionspuffer und angeschlossenen Pumpen (Spirin *et al.*, 1988; Spirin, 1991). Die dahinter stehende Idee ist, dass ein kontinuierlicher Strom aus dem Substratreservoir verbrauchte Bestandteile ergänzt, während niedermolekulare Nebenprodukte und das gewünschte Polypeptid durch Ultrafiltrationsmembranen entfernt werden. Spirin erreichte eine Reaktionsdauer von durchschnittlich 20-40 h. Abgesehen davon, dass das System aufwändig und teuer ist, konnten einige Labore die Experimente nicht reproduzieren (beschrieben in Jermutus *et al.*, 1998). Das Hauptproblem war der Abbau der RNA, selbst im gekoppelten Transkriptions- / Translationsmodus, weiterhin die niedrige Effizienz der Initiationskomplexbildung (wahrscheinlich durch den Verlust von Translationskomponenten durch die Membran verursacht) und die Verstopfung der Ultrafiltrationsmembran. Obwohl einige technische Verbesserungen in jüngster Zeit vorgenommen wurden (Baranov *et al.*, 1989; Kigawa and Yokoyama, 1991; Nishimura *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1996; Buchberger *et al.* 2002), erwies sich das System nicht als allgemein praktikabel.

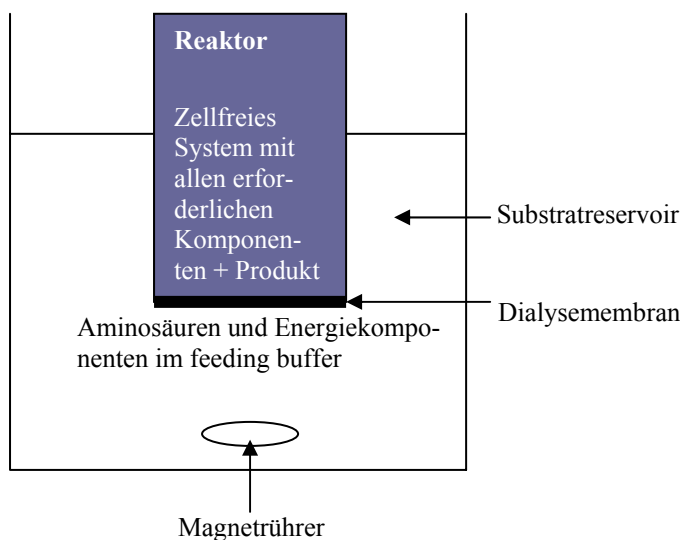
Dagegen scheint das **semikontinuierliche System (SFCF = semicontinuous flow cell-free system / Abb.2B)** gegenwärtig erfolgversprechender zu sein (Kim and Choi, 1996; Madin *et al.*, 2000). Der Reaktionsmix ist von der „Nachschub“-Lösung (feeding buffer) durch eine Dialysemembran mit niedrigem Ausschluß-Molekulargewicht getrennt, so dass nur ein

Austausch niedermolekularer Bestandteile möglich ist. Der Austausch wird durch einen Rührer beschleunigt. Damit ist zwar das Problem der Produktentfernung noch nicht gelöst, denn es akkumuliert weiterhin im Reaktionsansatz. Doch die Verwendung immobilisierter Affinitätsliganden, z.B. matrix-gebundenes Methotrexat zur Bindung neusynthetisierter Dihydrofolatreduktase (Marzal and Scouten, 1996), der Einsatz von Magnetbeats (Haukanas and Kwam, 1993) oder die Synthese des gewünschten Proteins in Kombination mit einem Affinitäts-tag und dessen anschließende Spaltung mit einer Endoprotease (Hochuli *et. al.*, 1987; Lamla, 2003; kommerziell erhältlich z.B. bei FA Roche, IBA usw.) nach der Aufreinigung stellen handhabbare Alternativen dar. Schließlich sei noch erwähnt, dass auch das Batchverfahren weiter verbessert wurde und noch Potential hat (Kawarasaki *et al.*, 1995; Kim and Swartz, 1999, 2000, 2001).

**A) CFCF**



**B) SFCF**



**Abb. 2:** Techniken der zellfreien Proteinbiosynthese; (A) Prinzip des kontinuierlichen Flusses CFCF, (B) Prinzip des semikontinuierlichen Flusses - SFCF

### Anwendungsmöglichkeiten:

Während die zellfreie Proteinbiosynthese lange nur Insidern bekannt war, ist sie in der Postgenom-Ära (seit etwa 2001) in den Focus der Forschungsgemeinde gerückt. Mit den inzwischen kommerziell erhältlichen *in vitro* Translationskits lassen sich schneller und sicherer (Gentechnikgesetz !) als mit herkömmlichen Expressionssystemen lebender Organismen Proteine im Labormaßstab herstellen. Die Bandbreite der Anwendungen reicht von der direkten Translation von PCR-Produkten (Kain *et al.*, 1991; Lesley *et al.*, 1991; Merk, 2001), zur schnellen Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken und Mutanten (Henkel and Baeuerle, 1993; Burks *et al.*, 1997), über die Einführung unnatürlicher Aminosäuren (Kurzchalia *et al.*, 1988; Noren *et al.*, 1989; Bain *et al.*, 1992) zur Expression und Studie von Proteinkomplexen (Huppa and Ploegh, 1997) und vielen anderen Möglichkeiten (zusammengefasst in: Stiege and Erdmann, 1995; Jermutus *et al.*, 1998). Nicht zu vergessen sind Proteine, zu deren Expression es im zellfreien System keine Alternative gibt: Membranproteine, toxische Proteine und solche, die in lebenden Organismen stark reguliert werden, instabil sind oder in sogenannten inclusion bodies akkumulieren.

Angelehnt an die DNA-Chip-Technologie, bei der man im Hochdurchsatzverfahren das Transkriptionsmuster der mRNA ganzer Zellsysteme untersuchen kann, versucht man auch im Proteinmaßstab high-throughput-Systeme zu entwickeln (Sawasaki *et al.*, 2002).

Anders als die bisher genannten der Analyse dienenden Anwendungsmöglichkeiten gewinnt ein weiterer Bereich wachsende Bedeutung: die *in vitro* Evolution. Das Konzept des Polysome Display (Mattheakis *et al.*, 1996, Gersuk *et al.*, 1997) und darauf aufbauend des Ribosome Display (Hanes and Plückthun, 1997; Plückthun *et al.*, 2000) ermöglicht die Selektion kurzer Peptide und Generierung neuartiger Proteine, die z.B. als Liganden, kompetitive Hemmer, neue Enzyme o.ä. dienen können (Lamla, 2003).

## **1.2.2 Die Transkription im zellfreien System**

Wie in Kapitel 1.1.1 erwähnt, kann die Transkription durch eventuell noch vorhandene chromosomale DNA aus *E.coli*, die vom Zellaufschluß zurückgeblieben sein könnte, gestört werden. Dies wird durch die Zugabe von Rifampicin verhindert. Rifampicin, ein halbsynthetisches Derivat abgeleitet von Rifamycin B (aus *Streptomyces mediterranei*) hemmt selektiv prokaryontische RNA-Polymerasen. Wahrscheinlich hat es eine Bindungsstelle für die  $\beta$ -Untereinheit, inhibiert jedoch weder die Bindung der RNA-Polymerase an den

Promotor, noch die Bildung der ersten Phosphodiesterbindung. Ist die RNA-Kette jedoch einmal begonnen worden, kann die Elongation nicht mehr aufgehalten werden.

Die Transkription der in Plasmide integrierten Gene wird im zellfreien System durch die separat hinzugefügte RNA-Polymerase aus dem T7-Phagen ausgeführt. T-Phagen sind eine spezielle Art von Viren, deren Wirt *E.coli* ist. Wegen ihrer relativ großen Anzahl von Genen sind sie kaum auf die Synthesemaschine Ihres Wirtes angewiesen. Die T7-RNA-Polymerase besteht aus einem einzigen Polypeptid von 98 kDa Größe. Die verwendeten Plasmide enthalten einen T7-Promotor und -Terminator. Der Promotor ist wie die TATA-Box und die -35 Region der *E.coli*-Gene A-T-reich, sollte aber spezifisch sein. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass *E.coli*-RNA-Polymerase die entsprechenden Bindungsstellen unspezifisch besetzt und blockiert. Der T7-Terminator mit der Sequenz 5'-CCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG-3' besitzt nur zu Beginn seines 5'-Endes eine G-C-reiche Sequenz, die einen Stamm ausbilden könnte sowie die beiden weiteren unterstrichenen A-T-reichen Sequenzen. Der T7-Terminator ist verglichen mit den *E.coli*-Terminatoren untypisch. Es ist wenig über die Wechselwirkung von *E.coli*-Proteinen zu T7-Promotoren und -Terminatoren bekannt.

Da die Transkriptionsgeschwindigkeit der T7-RNA-Polymerase mit 200 bp pro sec (Golomb and Chamberlin, 1974; Chamberlin and Ryan, 1982) sehr viel schneller ist als die Translationsrate in *E.coli* mit 21-36 Nukleotiden pro sec (Bremer and Dennis, 1987; Iost *et al.*, 1992; Sørensen *et al.*, 1989), vorausgesetzt diese Werte stimmen auch so unter den Bedingungen des eigenen Transkriptions- / Translationssystems, sind die beiden normalerweise fein aufeinander abgestimmten Systeme entkoppelt. Ob und wie sich der „theoretisch angenommene“ mRNA-Überschuß auswirkt, ist bislang nicht bekannt. Spekuliert werden kann, ob ein Teil der nicht mit Ribosomen besetzten mRNA Sekundärstrukturen bildet und somit für die Translation unbrauchbar wird, verstärkt abgebaut wird oder die überschüssige mRNA-Synthese zu einer negativen Feedback-Inhibierung der Transkription und / oder Translation führt.

## **1.2.3 Die Translation im zellfreien System**

### **1.2.3.1 Kationenbedingungen und Puffer**

Ein Unterschied zwischen dem cytoplasmatischen Milieu in *E.coli* und dem herkömmlichen *in vitro* Translations-System besteht in der sehr viel komplexeren Ionenkomposition in Bakterien. Neben Magnesium-, Kalium- und Ammonium-Ionen enthält das Cytosol hohe

Konzentrationen von Kalzium-Ionen und Polyaminen (Jelenc and Kurland, 1979). Für die Translation essentiell ist eine definierte Magnesium-Ionenkonzentration. Dabei ist bemerkenswert, dass die optimale Magnesiumkonzentration für die Beladung der tRNA's mit Aminosäuren bei 12–15 mM liegt, die Translationsgeschwindigkeit bei Verwendung beladener tRNA mit sinkender Magnesiumkonzentration (meßbar bis 5 mM  $Mg^{2+}$ , darunter ist die Bindung der Aminosäuren an die tRNA äußerst instabil) erhöht wird (Bartetzko and Nierhaus, 1986). Die unter natürlichen Bedingungen mögliche Translationsgeschwindigkeit ist im *in vitro* System unter den in *E.coli* nachempfundenen Ionenbedingungen nicht zu erreichen (Jelenc and Kurland, 1979). Lediglich die Zugabe hoher Konzentrationen Ternärkomplex und anderer Translationsfaktoren, vorinkubiert mit poly(U) und N-acetyl-Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (in einem Modell, welches Polyphenylalanin generiert, wobei es auf keinen exakten Startpunkt ankommt), führte zu einer explosionsartigen Synthese von 10 AS pro sec pro Ribosom (Wagner *et al.*, 1982; Lucas-Lenard and Lipman, 1967).

Neben Magnesium-Ionen sind Kalium- und Ammonium-Ionen essentiell. Kalzium-Ionen und Polyamine sind fakultativ und in unserem System nicht enthalten.

Als Puffer hat sich neben Tris, welcher jedoch wegen großer Temperatur-abhängiger pH-Wert-Schwankungen und einer maximalen Pufferkapazität bei pH 8,3 weniger optimal ist, HEPES (maximale Pufferkapazität bei pH 7,55) bewährt.

### 1.2.3.2 mRNA

Die mRNA könnte ein limitierender Faktor im zellfreien Proteinsynthese-System sein. Im Kapitel Transkription wurde bereits festgestellt, dass die anfängliche Bereitstellung der mRNA im gekoppelten Transkriptions- / Translationssystem kein quantitatives Problem darstellt (die Folgen eines Überangebotes sind bereits erörtert worden), bliebe noch die Translatierbarkeit, die Stabilität oder die Hemmung durch Maskierung mit RNA-bindenden Proteinen zu betrachten.

#### Translatierbarkeit

Die Translationseffizienz hängt im prokaryotischen System in der Hauptsache von der Shine-Dalgarno-Sequenz, die mit der 16S rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit interagiert, und vom Startcodon AUG ab. Beide Sequenzen sollten keine Möglichkeit zur Ausbildung einer Sekundärstruktur haben, weil die Translation dadurch gehemmt werden würde. Uridinreiche Sequenzen stromaufwärts der Ribosomenbindungsstelle wurden als Enhancer

charakterisiert. Das Ziel dieser und ähnlicher Sequenzen ist das ribosomale Protein S1 (Boni *et al.*, 1991; Tzareva *et al.*, 1994). Trotzdem wird auf den Einbau verstärkender Elemente in den 5'-nichttranslatierenden Bereich verzichtet, weil nur eine mRNA konkurrenzlos translatiert werden soll.

Um die Formylierung des ersten Methionins zu fördern, wird dem Ansatz Folsäure hinzugefügt. Abhängig von NADPH und  $H^+$  wird es in zwei Schritten zu Tetrahydrofolat (THF) reduziert. Die Aufrechterhaltung eines reduzierenden Milieus über den gesamten Zeitraum ist bislang noch nicht geprüft worden. THF ist neben seiner Funktion als Formyl-Donor Ausgangspunkt für weitere C1-Gruppen in verschiedenen Oxydationsstufen. Damit ist THF eng mit dem Aminosäure- und Nucleinsäurestoffwechsel verknüpft. Beispielsweise wird  $N^5$ ,  $N^{10}$ -Methylen-THF aus der Umwandlung von Serin in Glycin gewonnen und zu  $N^{10}$ -Formyl-THF oxydiert – Voraussetzung für Formyl-Methionin. Alle daran beteiligten Enzyme und Kofaktoren müssen in optimaler Menge vorhanden und funktionstüchtig sein. Darüber sind bislang ebenfalls keine Untersuchungen bekannt. Auch der Verbrauch von Aminosäuren für diese Nebenreaktionen muß noch mit einem Fragezeichen versehen werden.

Versuche von H. Merk (Diss. 2000) zeigten, dass die Verwendung seltener Codons, z.B. AGG und AGA (Robinson *et al.*, 1984; Spanjaard and van Duin, 1988) zu einer verringerten Proteinsynthese führt .

### Stabilität

Die Halbwertszeit extern transkribierter mRNA im *in vitro* Translationsansatz unter der Voraussetzung eines optimalen 3'-untranslatierten Bereiches mit T7-Terminator wurde mit 65 min angegeben (Merk, Diss. 2000). Dabei ist der Sekundärstrukturen ausbildende T7-Terminator ein unerläßlicher Stabilitätsfaktor für die mRNA. Die Stabilität der mRNA im Praxis-relevanten gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem ist bislang unbekannt.

In eukaryontischen Zellen tritt mRNA häufig im Komplex mit Proteinen auf. Diese Proteine können die mRNA einerseits maskieren und somit an der Translation hindern, andererseits die Lebensdauer durch den Schutz vor RNasen erhöhen. Ob solche Mechanismen in Prokaryonten relevant sind, ist unbekannt und möglicherweise wegen der kurzen Lebensdauer der Bakterien nicht notwendig. Die Abdeckung mit Ribosomen ist wahrscheinlich der einzig wirksame Schutz vor Degradation. Insofern könnte eine verzögerte Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten von der mRNA bei Mangelscheinungen, z.B. Mangel an Aminosäuren vor sofortigem Abbau schützen.



### 1.2.3.3 Aminosäuren

Freie Aminosäuren sind die Grundbausteine der Proteinsynthese. Bei einem Mangel einer oder mehrerer Aminosäuren wird in *E. coli* und anderen Bakterienarten ein Kontrollsystem, der stringent response aktiviert (Cashel, 1969). Der dafür notwendige stringent factor ist normalerweise an Ribosomen gebunden. Treten bei einem Aminosäuremangel gehäuft unbeladene tRNA's mit den entsprechenden Codons der Ribosomen-gebundenen mRNA in Kontakt, wird der *stringent factor* (auch rel-Produkt genannt) aktiviert und diffundiert in das Cytoplasma. Das rel-Protein ist eine ppGpp-Synthetase, welche aus ATP und GTP das ungewöhnliche pppGpp synthetisiert, das in ppGpp überführt werden kann. Dessen Konzentration kann auf 0,5-1 mM ansteigen. Die Interaktion von ppGpp mit der RNA-Polymerase verhindert im intakten *E.coli* den Kontakt zu dem starken Promotor P1 der polycistronischen rRNA/ tRNA-Gene, um deren unnötige Expression zu verhindern.

Es wäre möglich, sich dieses Kontrollsystem bei der zellfreien Proteinsynthese zu Nutze zu machen. Ob ein Aminosäuremangel Anlaß für den Stillstand der Proteinsynthese im *in vitro* Batchsystem ist, könnte man so indirekt über den Nachweis von ppGpp als „Signalmolekül“ prüfen.

### 1.2.3.4 Energiebedarf

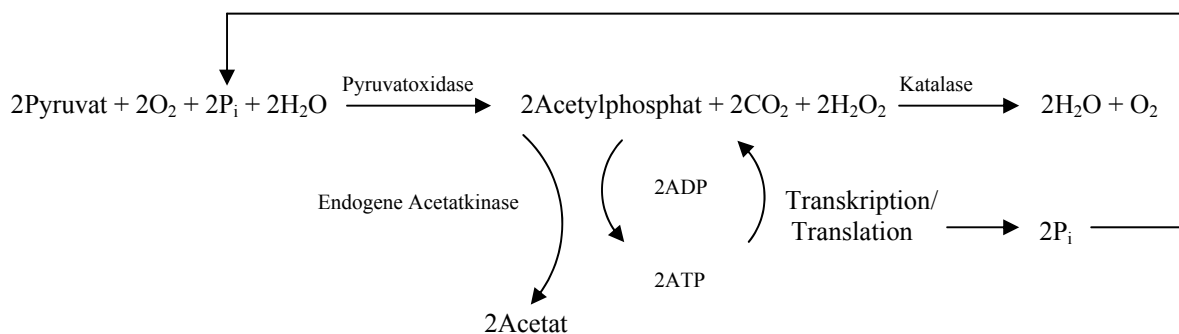
Das hier verwendete Batchsystem ist, wie bereits erwähnt, ein gekoppeltes Transkriptions-/Translationssystem. Die Transkription wird durch die Hydrolyse der kettenverlängernden Nucleosidtriphosphate vorangetrieben. Die Translation bezieht ihre Energie zum einen aus der Spaltung von ATP bei der Beladung der tRNA mit der jeweiligen Aminosäure (Aminoacylierung) und der Spaltung von GTP bei der Verknüpfung jeder einzelnen aktivierten Aminosäure mit der Polypeptidkette, der Elongation. Diese GTPase-Aktivität geht von den Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu aus. Die Ribosomen besitzen darüber hinaus eine intrinsische ATPase- und GTPase-Aktivität (Ogata *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass sie einen Konformationswechsel ermöglichen, um einerseits die Kopplung der Elongationskomponenten an das Ribosom zu erleichtern und andererseits die Translokation der tRNA's an den A, P und E sites zu unterstützen.

Diesem Energiebedarf wird bei der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes Rechnung getragen. ATP und GTP sind in zweifach höherer Konzentration (1 mM) im Endansatz enthalten als CTP und UTP (0,5 mM).

Zur Regenerierung des ATP wird Phosphoenolpyruvat (Pratt, 1984) Pyruvatkinase und Acetylphosphat (Ryabova *et al.*, 1995) zugesetzt. Phosphoenolpyruvat entsteht als Zwischenprodukt der Glykolyse. Die Pyruvatkinase überträgt den Phosphatrest vom Phosphoenolpyruvat auf ADP. Allerdings birgt dieses Regenerierungssystem 2 Nachteile, zum einen ist Phosphoenolpyruvat teuer, andererseits wenig stabil. Mehr als 70% der anfangs eingesetzten Menge ist nach 30 min zu Pyruvat und anorganischem Phosphat degradiert (Kim *et al.*, 1999). Bei der alternativen Energiequelle Acetylphosphat wird mit Hilfe der im S30-Lysat vorhandenen endogenen Acetatkinase ebenfalls ATP aus ADP regeneriert, wobei Acetat anfällt. Eine weitere Möglichkeit der Gewinnung von ATP soll hier noch erwähnt werden, die Verwendung von Kreatinphosphat (Anderson *et al.*, 1983). Grundsätzlich leiden aber alle erwähnten Systeme an der Instabilität der sekundären Energiequellen.

Das Hauptproblem aber ist der rasche Zerfall der Nucleosidtriphosphate ATP und GTP selbst - ein nicht zu unterschätzender limitierender Faktor im Batchsystem (Kim *et al.*, 2001; Schindler PT, 2000; eigene Untersuchungen). Dabei ist der Verbrauch von ATP und GTP in vernachlässigbar geringer Menge durch die Transkription und Proteinbiosynthese selbst verursacht, auch die thermische Hydrolyse spielt nur eine untergeordnete Rolle. Die Aufdeckung der tatsächlichen Ursache für den schnellen Zerfall würde für die Verbesserung des Batchsystems einen großen Fortschritt bedeuten.

Es gibt jedoch Ansätze, die Proteinsyntheseausbeute durch modifizierte ATP-Regenerierungssysteme zu verbessern. Ausgangspunkt sind wiederum Intermediate der Glykolyse.



**Abb. 3:** Schema zur Regenerierung von ADP unter Mitwirkung von Pyruvatoxidase und endogener Acetatkinase

Einige Organismen (Lactobakterien) sind in der Lage, Pyruvat und anorganisches Phosphat mit Hilfe der Pyruvatoxidase (Muller *et al.*, 1993) zu Acetylphosphat umzusetzen, wenn die Kofaktoren Flavinadenindinukleotid (FAD) und Thiaminpyrophosphat (TPP) vorhanden sind.

Im beschriebenen System wurde Pyruvatoxidase und dessen Koenzyme extern dazugegeben (Kim *et al.*, 1999; Abb.3). Entstehendes Wasserstoffperoxid kann durch endogene Katalase schnell unschädlich gemacht werden. Obwohl die initiale Syntheserate geringer als in herkömmlichen Systemen ist, konnte die Reaktionszeit doch von 20 min auf 2 Stunden verlängert und die Proteinausbeute um 60 % gesteigert werden. Ein entscheidender weiterer Vorteil ist das Recycling anorganischen Phosphates. Die Akkumulierung anorganischen Phosphates führt bei ca. 50 mM Konzentration zu einer signifikanten Inhibierung der Proteinbiosynthese. Die Phosphate entziehen essentielle Magnesiumionen, wobei die Wirkung noch kontrovers diskutiert wird: Magnesiumphosphat und Phosphoenolpyruvat-Magnesium-Komplex haben ähnliche Stabilitätskonstanten (Dawson *et al.*, 1986). Die Inhibierung könnte daher auch direkt durch Magnesiumphosphat statt durch einen Magnesiummangel verursacht werden.

#### 1.2.3.5 Polyamine

Da die Rolle der Polyamine im Kapitel 1.1 „Transkription und Translation in *E.coli*“ noch nicht erörtert wurde, soll hier neben den bisher bekannten Auswirkungen auf die *in vitro* Translation ausführlicher auf die allgemeine Bedeutung der Polyamine (in Pro- und Eukaryonten) und deren Synthese eingegangen werden.

**Tabelle 1:** Struktur von häufig auftretenden biogenen Polyaminen

Name	Strukturformel
Putrescin	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Spermidin	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Spermin	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ (nicht in <i>E.coli</i> )
Cadaverin	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$
Agmatin	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$

Polyamine regulieren bei optimalen und physiologischen Konzentrationen eine Vielzahl von Zellaktivitäten einschließlich der DNA-Replikation, Genexpression, Proteinsynthese und Zelloberflächenrezeptorfunktion (Tabor 1984, 1985; Pegg 1982, 1988; Russell 1975). Erhöhte Polyaminkonzentrationen dagegen sind toxisch und erleichtern hauptsächlich durch oxidative Mechanismen den Zelltod (Brunton *et al.*, 1990; Morgan, 1990).

Die Struktur der häufig vorkommenden Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin sowie von Cadaverin und Agmatin ist in Tab.1 angegeben.

Zu den Funktionen im Einzelnen:

In allen bisher getesteten Zellen sind Polyamine nachgewiesen worden. In schnell wachsenden Zellen ist die Konzentration besonders hoch, beispielsweise in Tumorzellen. Ihre enge **Verflechtung mit der DNA- und RNA-Synthese** wird auch durch die Zellzyklusbedingte Auf- und Abregulation unterstrichen (Bertuzzi *et al.*, 1999). In der späten G1-Phase ist der Polyamin-Level am höchsten. Dies wird als Vorbereitung der Zelle auf die DNA-Synthese interpretiert. Hier wird den Polyaminen u.a. ein Einfluß auf das Tempo der fortschreitenden Replikationsgabel zugeschrieben (Geiger and Morris, 1978).

Polyamine stellen eine Art Gegenion zu den negativen Ladungen der Phosphat-Gruppen dar und schirmen die DNA nach außen ab. Sie schützen vor Denaturierung und bedingt auch vor dem Angriff von Nukleasen. Sie wirken strukturfördernd: Bei mehr als 90% Abdeckung der negativen Ladung kondensiert DNA. In Anwesenheit geringer Konzentrationen Polyamine wird B-DNA in Z-DNA *in vitro* konvertiert (Behle and Felsenfeld, 1981). Es ist schwierig, den Polyaminen konkrete Einflüsse auf Enzyme der DNA-Synthese und -Metabolismus nachzuweisen. Die Wirkung der Polyamine kann z.T. auch mit anderen Ionen in höheren ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) oder ähnlichen Konzentrationen ( $Co^{3+}(NH_4)_6$ ) *in vitro* erreicht werden.

Ähnlich abschirmend wirken Polyamine natürlich auch auf die RNA. Es wird sogar angenommen, dass der größte Teil der Polyamine in Komplexen mit RNA vorkommt (Igarashi, 2000). Ein enger Zusammenhang des Schlüsselenzyms der Polyaminsynthese, der Ornithin-decarboxylase mit der RNA-Synthese konnte nachgewiesen werden (z.B. Russell, 1983; Kuehn *et al.*, 1979).

Der Einfluß der Polyamine erstreckt sich auch auf die tRNA. Sie können an speziellen Stellen binden (Pochon and Cohen, 1972). Frydman *et al.* (1990) wiesen 12-14 Bindungsstellen von Spermidin nach, die durch steigende  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen auf drei essentielle reduziert werden konnten. Es handelt sich um eine rein elektrostatische Bindung ohne Nachweis einer kooperativen Ligandenbindung oder Wechsel der tRNA-Konformation (McMahon and Erdmann, 1982).

Spermidin fördert das akkurate Spleißen sowohl der tRNA (Peebles *et al.*, 1983) als auch ribosomaler und mRNA (Childs *et al.*, 2003).

Die Beladung der tRNA wird durch Polyamine stimuliert (Matsuzaki and Takeda, 1973).

Der Einfluß von Polyaminen auf die **Proteinbiosynthese** ist überwiegend in zellfreien *in vitro* Systemen untersucht worden. In vielen, aber nicht allen Studien waren die durch Polyamine hervorgerufenen Effekte wiederum nicht spezifisch, sondern durch zweiwertige Kationen kompensierbar. Beispielsweise ist bekannt, dass  $Mg^{2+}$ , welches an Ribosomen gebunden vorliegt, die Assoziation der ribosomalen Untereinheiten fördert. Polyamine können das ebenfalls (Sperrazza and Spremulli, 1983).

Andererseits zeigten Ribosomen aus Polyamin-defizienten *E.coli* selbst unter optimalen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen im *in vitro* Translationssystem eine geringere Syntheseleistung wegen eines Defektes in der 30S ribosomalen Untereinheit. Die RNA ist in geringerem Maß methyliert und S1 assoziiert (Algranati and Goldemberg, 1977; Igarashi *et al.*, 1979; 1981).

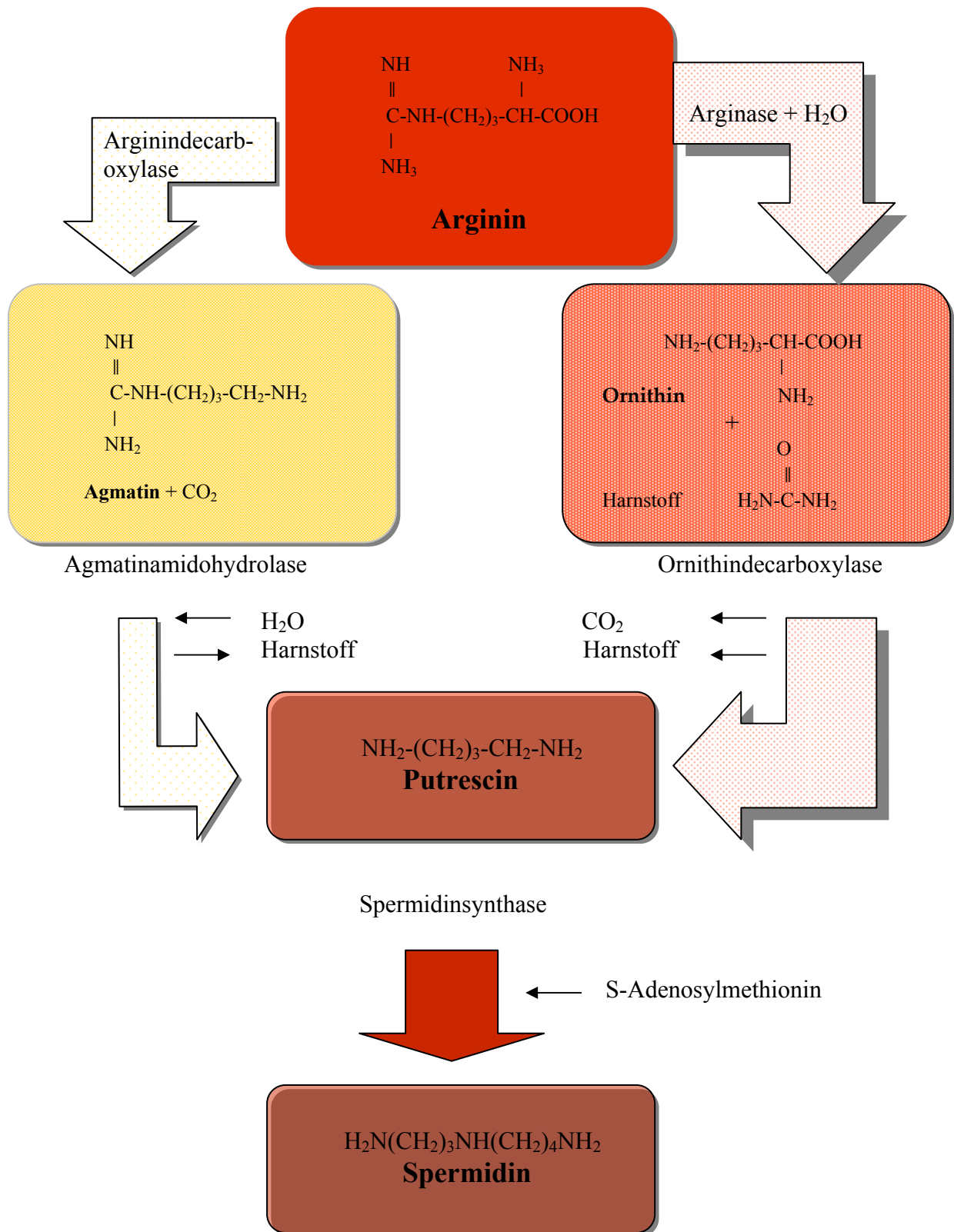
Im eukaryontischen *in vitro* System auf der Basis von Kaninchen-Retikulozytenlysate führte die Zugabe von 0,4–0,6 mM Spermidin, einer Konzentration ähnlich der in intakten Retikulozyten zu einer auf das 8–10 fache gesteigerten Synthese-Ausbeute an Globin (Igarashi, 1988). 10 mM Spermin inhibierten dagegen die Peptidbindungsformation durch kompetitive Hemmung am Aminosäure-tRNA-Komplex (Kalpaxis, 1993) im *E.coli*-System.

Abgeleitet aus einer Arbeit von Karahalios *et al.* (1999) über die Wirkung von Ethyl- und Benzylanaloga des Spermins stellte sich ein differenzierteres Bild dar: geringe Konzentrationen fördern, höhere inhibieren die Proteinbiosynthese.

### Biosynthese der Polyamine

Es gibt zwei Möglichkeiten, Putrescin/Spermidin zu synthetisieren, beide benötigen Arginin als Ausgangsstoff (siehe Abb.3). Der Hauptweg führt über die Aminosäure Ornithin. Diese wird mit Hilfe des Enzyms Ornithindecaboxylase (ODC) zu Putrescin abgebaut.

Die ODC ist das Enzym mit der höchsten Geschwindigkeitsrate (Pegg, 1981) und ein multifunktionales Protein. Seine Aktivität wird im eukaryontischen System durch vielfältige posttranslationale Modifikationen reguliert (Kuehn, 1982). In *E.coli* vermutet man, dass es durch cAMP, GTP und ppGpp sowie durch Antizyme reguliert wird (Wright and Boyle, 1982; Paulin and Pösö, 1983; Hölttä *et al.*, 1974; Kyriakidis *et al.*, 1978). Antizyme haben eine hohe Affinität für Enzyme und inhibieren diese durch nichtkovalente Bindung. Einige dieser Protein-Antizyme sind im Zusammenhang mit ODC bekannt (z.B.:Berlin and Schimke, 1965; Heller *et al.*, 1983; Fujita *et al.*, 1982; Coffino, 2001).



**Abb. 4** Polyaminsynthese aus Arginin über 2 Wege; Hauptweg führt über Ornithin, Nebenweg über Agmatin

Durch die Verknüpfung mit einem Aminopropyl-Rest unter der Katalyse von Spermidinsynthase entsteht aus Putrescin Spermidin. In diesen Biosyntheseweg ist S-Adenosylmethionin als Donor des Aminopropyl-Restes involviert.

Im zweiten Weg wird Arginin decarboxyliert und das entstandene Agmatin zu Putrescin abgebaut. Die weitere Synthese erfolgt wie im ersten Fall.

## 1.3 Proteom-Analyse

Das Proteom ist im Sinne der Definition das quantitative Protein-Expressionsmuster einer Zelle oder eines Organismus unter präzise definierten Bedingungen. So gesehen ist die Analyse eines bearbeiteten Zellysates, welches nicht mehr über sein eigenes Genom verfügt, streng genommen keine Proteom-Analyse. Trotzdem sind die Ziele der vorliegenden Arbeit in methodischer Hinsicht einer Proteomanalyse einer Zelle gleichzusetzen, denn die Ziele sind:

1. den quantitativen und qualitativen Zustand eines komplexen Proteingemisches im zellfreien System zu analysieren und
2. die technischen Mittel, denen ich mich im Rahmen dieser Arbeit bediente, identisch denen der Proteomanalyse.

### 1.3.1 Separierung eines komplexen Proteingemisches

In den 70er Jahren verfügte man mit der **zweidimensionalen Gelelektrophorese** (2-DE) bereits über das technische know-how, ein komplexes Proteingemisch in einzelne Proteine aufzulösen (Kaltschmidt and Wittmann, 1970; Klose 1975; O'Farrell, 1975). Infolge der stürmischen Entwicklung und Anwendbarkeit der Massenspektrometrie zur Identifikation der einzelnen Proteine aus kleinsten „Flecken“ (Spots) von Gelelektrophoresen und der Verlagerung des wissenschaftlichen Interesses vom Genom zum Proteom erlebte die 2-DE eine Renaissance. Doch zeigen nicht nur der hohe Arbeitsaufwand der Methode (ca. 1 Woche für die Herstellung analysierbarer Gele), die erst durch Übung zu erlangende Reproduzierbarkeit sowie die schlechte Vergleichbarkeit von Gelen aus verschiedenen Laboren (Erstellung von 2-DE Datenbanken) Grenzen im personellen Bereich auf. Auch die Methode selbst ist mit bislang unüberbrückbaren Nachteilen behaftet. So beschränkt sich die analysierbare Molekülgröße auf Proteine zwischen 10 und 150 kDa, basische Proteine wie

beispielsweise die meisten ribosomalen Proteine verbleiben am äußeren Rand des Gels und die häufig nur in wenigen Kopien vorkommenden regulatorischen Proteine (z.B.: Transkriptionsfaktoren, einige Translationsfaktoren, wie der peptide chain releasing factor) lassen sich nicht darstellen. Die sich z.T. um Zehnerpotenzen unterscheidende Konzentration einzelner Proteine im Vergleich zu anderen ist das Hauptproblem. Bezüglich der Sensitivität der Färbemethoden sind Fortschritte gemacht worden. So war es noch zu Beginn dieser Arbeit üblich, die Analyse der Spots aus den wenig sensitiven Coomassie-gefärbten Gelen vorzunehmen. Inzwischen gibt es MALDI-kompatible, empfindliche Fluoreszenzfarbstoffe. Auch die Auftrennung des gesamten Proteingemisches auf ein Gel hat sich als wenig sinnvoll erwiesen. Die Vorfraktionierung der Probe ist eine für jedes, mit einem guten HPLC-Gerät ausgestatteten Labor, eine praktikable Methode, Proteine geringer Konzentration anzureichern und die Auflösung zu verbessern. Inzwischen arbeitet auch die Industrie an neuen Systemlösungen, gering konzentrierte Proteine detektieren zu können. Die **zweidimensionale HPLC** verbindet die Trennung nach der Ladung an einer Ionenaustauschersäule mit der weiteren Fraktionierung an einer reversed Phase Säule. Die Fraktionierung wird durch UV-Messung der Proteine als Bandenmuster ähnlich einem eindimensionalen Gelbild dargestellt. Die einzelnen Fraktionen können anschließend sofort per MALDI ausgewertet werden. Der Vorteil liegt auf der Hand: Schnelle, weniger arbeitsaufwändige Analyse verbunden mit variablem Probeneinsatz ! Leider sind alle säulenchromatographischen und HPLC-Methoden damit behaftet, dass nur ein Teil der präsenten Proteine eluiert werden kann, z.B. nicht die hydrophoben oder die großen Proteine, oder nur Gruppen werden gewonnen, entweder die basischen oder sauren Proteine! Daher ist die hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese noch immer die Methode der Wahl, wenn eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine aufgetrennt werden müssen. (Die Praxis wird zeigen, ob sich die Abkehr vom Gel lohnt.)

### **1.3.2 Prinzip der 2-DE**

Mit der hochauflösenden 2-DE kann man bis zu 10 000 Proteine eines Proteingemisches trennen und darstellen (Klose and Kobalz, 1995). Die Probenvorbereitung ist der wichtigste, vom Experimentator beeinflussbare Schritt (siehe auch Ergebnisteil, Kap. 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3). Generell werden die Proteine mit Hilfe von Harnstoff denaturiert und die Disulfidbrücken mit DTT reduziert, um das Laufverhalten in Abhängigkeit von der Molekülgröße nicht durch die äußere Form der Proteine zu verfälschen und eine maximale Löslichkeit zu erreichen.



In der ersten Dimension wird nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine und in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht getrennt (Prinzip der SDS-PAGE siehe Kap.2.1.2.2). Bei der Art des pH-Gradienten in der ersten Dimension kann man sich zwischen einem immobilisierten pH-Gradienten, bei welchem die puffernden Substanzen bereits Bestandteil eines vorgefertigten Geles sind und einem pH-Gradienten, der mit Hilfe von Trägerampholyten erst im Verlauf der Elektrophorese aufgebaut wird, entscheiden. Letzterer kam in dieser Arbeit zum Einsatz. Trägerampholyte sind heterogene Synthesegemische aus mehreren hundert unterschiedlichen, niedermolekularen aliphatischen Oligoamino-Oligocarbonsäuren, die sich in ihren isoelektrischen Punkten unterscheiden und den gewünschten pH-Bereich lückenlos abdecken.

Die Nettoladung eines Proteins ist die Summe aller negativen und positiven Ladungen an den Aminosäureseitenketten. Im sauren pH-Bereich sind hauptsächlich Lysin, Arginin und Histidin positiv geladen, im basischen Bereich überwiegen die negativen Ladungen von Aspartat und Glutamat. Insofern bestimmt die Aminosäurekomposition den isoelektrischen Punkt, d.h. den pH-Wert an dem die Gesamtladung gleich null ist und die Proteine im elektrischen Feld nicht mehr wandern können. Die erste Dimension ist somit je nach verwendeter Ampholyt-Methode weitgehend eine Endpunktmethode. Die verwendeten Gele sind großporig, damit die Molekülgröße vernachlässigbar bleibt.

In der zweiten Dimension kommen gewöhnlich SDS-Gele in Betracht; sie trennen die Moleküle nach Größe, da durch den Überschuss an SDS, das an die Proteine angelagert ist, die Proteine alle negativ geladen sind.

### **1.3.3 Massenspektrometrie - MALDI-TOF**

#### **1.3.3.1 Prinzip der MALDI-TOF**

Die Massenspektrometrie ist eine in der organischen Chemie verwendete Methode, bei der Moleküle an einer Ionisierungsquelle geladen, in einem elektrischen Feld beschleunigt, fokussiert und in einem Hochvakuumfeld abhängig von ihrem Molekulargewicht/Ladungsverhältnis abgelenkt werden. Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ist die auf die Analyse von Biomolekülen, insbesondere Peptiden zugeschnittene Abwandlung dieser Methode. Biomoleküle werden normalerweise mit starkem Lasereinschuss fragmentiert. Bei der MALDI-MS werden sie jedoch während des milden Beschusses mit Laserstrahlen durch die Einbettung des Analyten in einen Überschuss von niedermolekularen, organischen Säuren (z.B.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure), der Matrix, nicht

fragmentiert sondern durch die Kokristallisation beider Stoffe können die leicht ionisierenden Matrix-Moleküle die Ionisation der Biomoleküle ermöglichen (Karas and Hillenkamp, 1988). Der als Ionisierungsquelle fungierende, gepulste Laser (z.B.: Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm) trifft auf die kristalline Oberfläche auf, die Matrixmoleküle nehmen über ihr  $\pi$ -Elektronensystem einen Teil der Energie auf und geben diese sehr rasch durch die Entspannung des Kristallgitters und die damit verbundene, oberflächliche, explosionsartige Freisetzung der Einzelmoleküle wieder ab. Das Aufreißen der Oberfläche bewirkt eine Sublimierung von Analyt und Matrix, ohne durch die Anregung innerer Freiheitsgrade die Moleküle zu zerstören. Außerdem bewirken die photoionisierten, radikalischen Matrixmoleküle eine hohe Ausbeute an elektrisch geladenen Probenmolekülen.

Die gasförmigen Peptid-Ionen werden in einem elektrostatischen Feld beschleunigt und durchlaufen eine feldfreie Driftstrecke, in der sie entsprechend ihrem Masse/Ladungsverhältnis eine bestimmte Flugzeit absolvieren (TOF - time of flight) und so getrennt werden. Die Qualität eines Analysators wird durch sein Auflösungsvermögen bestimmt, d.h. welche geringe Massendifferenz zweier Ionen noch voneinander getrennt werden kann. Obwohl gleiche Ionen dieselbe Flugzeit absolvieren müssten, kann sich eine gewisse Unschärfe entwickeln, die durch den Ionisierungsprozeß verursacht wird. Nicht alle Ionen werden vom gleichen Ort zur gleichen Zeit desorbiert und ionisiert. Abstoßende und abschirmende elektrische Kräfte tragen ebenfalls zur Unschärfe bei. Um diesen Fehler zu minimieren, hat man Ionenreflektoren in die Flugstrecke eingebaut. Ein elektrisches Gegenfeld erzwingt die Umkehr auf der Flugbahn. Dabei dringen Ionen gleichen Masse/Ladungsverhältnisses mit höherer Startenergie tiefer in das Gegenfeld ein und benötigen daher mehr Zeit zum Richtungswechsel. Die Flugzeit wird dadurch korrigiert.

Eine weitere Möglichkeit, die Massenauflösung zu verbessern, ist die verzögerte Ionenextraktion. Das elektrische Feld zur Ionenbeschleunigung wird nicht permanent sondern zeitversetzt zum Laserimpuls angelegt. Sich bereits weiter entfernt befindende Ionen werden vom elektrischen Feld weniger beschleunigt. Bei geeigneten Einstellungen kann diese Ungenauigkeit kompensiert werden (Brown and Lennon, 1995). Unter Einbeziehung dieser Verbesserungen können Massenabweichungen von unter 10 ppm erreicht werden.

### 1.3.3.2 Auswertung

Differentielle Proteinspots werden aus einem präparativen Gel ausgeschnitten und dem in-Gel-Verdau mit einer Endoprotease, z.B. Trypsin unterzogen (Rosenfeld *et al.*, 1992). Trypsin

hydrolysiert die Peptidbindung spezifisch nach den Aminosäuren Lysin und Arginin. Die hypothetische Berechnung eines 300 Aminosäuren langen Proteins führt zu durchschnittlich 35 Peptidfragmenten von ca. 9 Aminosäureresten Länge (Kellner *et al.*, 1999). Das Molekulargewicht eines einzelnen Peptids ist aufgrund der zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten der Aminosäuren relativ selten in mehreren Proteinen gleich groß.

Doch ist eine Kollektion von mehreren Peptiden, der sogenannte **peptide mass fingerprint (PMF)** (Henzel *et al.*, 1993; James *et al.*, 1993; Mann *et al.*, 1993; Yates *et al.*, 1993) erforderlich. Dieser Peptidmassen-Fingerabdruck wird mit Software-Paketen, z.B. [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com) oder [http://129.85.19.192/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe) in den vorhandenen Proteindatenbanken abgeglichen. Die möglichst hohe Sequenzabdeckung mit den Peptiden eines Proteins, der Vergleich mit dem Molekulargewicht und dem isoelektrischen Punkt auf dem Gel für das potentielle Protein sowie die Auswahl der Spezies führt zu Identifizierungswahrscheinlichkeiten von nahezu 1.

Eine noch detailliertere Suche kann nach der Sequenzierung einzelner Peptide erfolgen, falls der Peptidmassen-Fingerprint kein eindeutiges Ergebnis erbracht hat. Diese zweite Art der Fragmentierung ist das **post-source decay (PSD)**. Nicht nur unmittelbar an der Ionisierungsquelle, sondern auch noch während der feldfreien Drift können Molekül-Ionen spontan zerfallen. Diese metastabilen Fragmentierungen hinterlassen in der Regel geladene Fragment-Ionen und neutrale Fragmentmoleküle, die aus der statistisch verteilten Trennung aller möglichen Peptidbindungen hervorgegangen sind. Während des Standardbetriebes der MALDI-Apparatur werden diese Molekül-Ionen am Reflektor zu früh abgelenkt und erreichen den Detektor entweder nicht oder werden als breites Rauschen im unteren Massebereich registriert. Variable Spannungen am Reflektor, die der geringen Energie der PSD-Ionen angepaßt sind, können abschnittsweise Teilspektren aufnehmen, die dann rechnerisch zur Partailsequenz eines einzelnen Peptids zusammengefaßt werden.

## 1.4 Zielstellung

Die Synthese von Proteinen ist ein hochkomplexer Vorgang, der noch auf unabsehbare Zeit auf zelluläre Komponenten angewiesen sein wird. Der Nachteil der dafür verwendeten Zelllysate besteht aber in der Unkontrollierbarkeit einer großen Zahl scheinbar nicht benötigter Proteine. Die Details jedes technischen Systems sollten aber bekannt und regulierbar sein. Zwar besteht das *E.coli in vitro* Translationssystem aus einem unter klar definierten Bedingungen hergestellten S30-Lysat und extern zugeführten Reaktionskomponenten, wie Template, Aminosäuren und Nukleotide, doch ist nicht bekannt, inwieweit die Proteinsynthese noch mit anderen Regelkreisen in der nicht mehr intakten Zelle verknüpft ist, die die Translationsfaktoren und Ribosomen beeinflussen und modifizieren können.

Es ist daher Hauptziel dieser Arbeit, eine Bilanzierung der Lysatproteine, die während der Proteinbiosynthese Veränderungen unterworfen sind, vorzunehmen. Als Modell dient das *E.coli* Batchsystem. Es ist bekannt, dass die anfangs mit hoher Geschwindigkeit ablaufende Proteinsynthese im Batchverfahren innerhalb einer Stunde zum Stillstand kommt. Es muß zunächst das genaue Ende der Translation im eigenen System ermittelt werden. Mittels hochauflösender zweidimensionaler Gelelektrophorese sollen die Proteinmuster vor und nach der Proteinsynthese miteinander verglichen werden. Differentielle Proteine sollen mit Hilfe der MALDI identifiziert und wo es sinnvoll erscheint, kloniert werden. Diese klonierten Gene sollen dann selbst im Batchsystem exprimiert werden, um die Stabilität und den eventuell Synthese- verlängernden Einfluß zu untersuchen.

Das Hauptziel begleitend soll erforscht werden, ob die mRNA, die Aminosäuren und Energiekomponenten zum Zeitpunkt des Abbruchs der Proteinsynthese limitierend wirken.