

Proteomics und molekularbiologische Analyse der zellfreien Proteinbiosynthese

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zur Erlangung des
Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.) genehmigte Abhandlung.

vorgelegt von

Petra T. Schindler
aus
Schönthal (Bayern)

Hauptberichter:	Prof. Dr.-Ing. Matthias Reuss
Mitberichter:	Prof. Dr. Christoph Syldatk
Tag der mündlichen Prüfung:	21.02.2000

Universität Stuttgart

Institut für Bioverfahrenstechnik

Januar 2000

für Jessica

Das ist der Weisheit letzter Schluss:
Nur der verdient sich Freiheit wie das Leben,
der täglich sie erobern muss.

Faust II

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
2. Stand des Wissens in der Proteomforschung	
2.1. Grundlagen und Anwendungspotentiale	6
2.2. Methoden und deren Limitierungen	9
3. Stand des Wissens in der zellfreien Proteinbiosynthese	
3.1. Grundlagen und Anwendungen	16
3.2. Der Proteinbiosyntheseapparat	17
3.2.1. Transkription	18
3.2.2. Translation	
3.3. <i>In vitro</i> -Systeme	24
3.4. Lysate und weitere Reaktionskomponenten	27
3.5. Energieversorgung	29
3.6. Faltung	30
3.7. Posttranslationale Modifikationen	32
3.8. Reaktoren und Prozessführungskonzepte	34
3.9. Offene Probleme	38
4. Problemstellung und Zielsetzung	40
5. Material und Methoden	
5.1. Lysatherstellung	42
5.2. Gekoppelte Transkription/Translation im Batch	43
5.3. Gekoppelte Transkription/Translation im Dialyzer	45
5.4. Gekoppelte Transkription/Translation im Durchflussreaktor	
5.5. Radioaktive Transkription	
5.6. Nukleotidbestimmung mit HPLC	
5.7. Bestimmung freier Aminosäuren mit HPLC	47
5.8. Photometrische Aminosäurebestimmung mit Ninhydrin	48
5.9. Nachweis von anorganischem Phosphat	
5.10. Bestimmung von Acetylphosphat	49
5.11. Nachweis proteolytischer Aktivitäten	50
5.12. Zweidimensionale Elektrophorese	
5.12.1. Strip Rehydrierung	
5.12.2. Probenvorbereitung	51
5.12.3. Isoelektrische Fokkussierung	
5.12.4. Equilibrierung	52
5.12.5. Herstellung der SDS-PAGE Gele für die zweite Dimension	
5.12.6. Lauf der zweiten Dimension	53
5.12.7. Nachweis der Proteine im Gel	
5.12.8. Weitergehende Analysen	54
5.12.9. Computergestützte Auswertung	
6. Computergestützte Auswertung von 2DE Gelen	
6.1. Bildbearbeitung	55

6.2. Einsatz von Datenbanken	56
7. Auffinden von Proteinen in Proteom-Maps	
7.1. Proteine des Biosynthese-Apparats	58
7.1.1. Translationsfaktoren	59
7.1.2. tRNA-Synthetasen	61
7.1.3. Ribosomale Proteine	64
7.2. Identifizierung von Proteinen	67
7.3. Calibrierungen in zweidimensionalen Gelen	71
7.3.1. Molekulargewichtsmarker	72
7.3.2. IEF-Marker	
7.3.3. Gereinigte Proteine als Standards	73
7.3.4. Datenbankvergleiche	74
7.3.5. Sequenzanalysen	75
8. Praktischer Einsatz der 2DE in der zellfreien Proteinbiosynthese	77
8.1. Bewertung der Lysatherstellung	78
8.2. Bewertung zellfreier Biosynthesereaktionen im Batch	79
8.3. Bewertung zellfreier Biosynthesereaktionen im halbkontinuierlichen Reaktor	80
8.4. Bewertung zellfreier Biosynthesereaktionen im kontinuierlich betriebenen Reaktor	81
9. Nachweis von Modifizierungen an Proteinen	87
9.1. Untersuchungen zum Nachweis der chemischen Acetylierung an Aminosäuren	
9.2. Untersuchungen zum Nachweis der chemischen Phosphorylierung und Acetylierung an Aminosäuren	89
9.3. Nachweis von Phosphorylierungen an Proteinen in der zellfreien Biosynthese	91
10. Proteaseaktivität im zellfreien System	92
11. Lokalisierung von tRNA-Synthetasen	96
12. Energieregenerierung	99
12.1. Verwendung von Acetylphosphat als Phosphatdonor	100
12.2. Nukleotidmessung mit HPLC	104
13. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	109
14. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	113
15. Literaturverzeichnis	115
16. Danksagung	127

17. Anhang: Publikationen

Publikation I:

Investigation of translation dynamics under cell-free protein biosynthesis conditions using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. Petra Theresia Schindler, Franz Macherhammer, Sabine Arnold, Matthias Reuss and Martin Siemann. *Electrophoresis*, **20**, 806-812 (1999).

Publikation II:

From Gene to Protein: Evaluation of Cell-Free Protein Biosynthesis by High-Resolution 2D-Electrophoresis. Petra T. Schindler, S. Baumann, M. Reuss and M. Siemann. *BIO TECH international*, **11**, 12-14 (1999).

Publikation III:

In Vitro Coupled Transcription/Translation: Effects of Modification in Lysate Preparation on Protein Composition and Biosynthesis Activity. Petra T. Schindler, S. Baumann, M. Reuss, M. Siemann. *Electrophoresis*, submitted.

Publikation IV:

Non-radioactive screening technique for phosphoproteins in proteome analysis for application in high resolution two dimensional electrophoresis. Petra T. Schindler, M. Reuss, M. Siemann, *BioTechniques*, submitted.

Publikation V:

State of Protein Phosphorylation Among Limitations in Cell-Free Protein Biosynthesis. M. Siemann, P.T. Schindler, S. Arnold, S. Baumann, K. Scharnweber, M. Reuss. *European Journal of Biochemistry*, submitted.

Tagungsbeiträge

1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe bioanalytischer Methoden und Proteomanalysen eine eingehende Diagnose der Limitationen der zellfreien Proteinbiosynthese durchzuführen. Bei den Untersuchungen wurden ausschliesslich S30 Zellextrakte von *Escherichia coli* eingesetzt. Langfristiges Ziel soll dabei die Therapie der identifizierten Begrenzungen der *in vitro* Biosynthese sein, um schliesslich die Produktkonzentrationen und Raum-Zeitausbeuten für die synthetisierten Proteine zu verbessern.

Die für die Beantwortung dieser Fragestellung eingesetzten Methoden umfassen die analytische Bestimmung der Dynamik nieder- und hochmolekularer Reaktionskomponenten.

Für die analytische Untersuchung der niedermolekularen Zustandsvariablen wurden spezielle Methoden entwickelt und implementiert, die die quantitative Bestimmung des in der Energieversorgung der zellfreien Synthese eingesetzten Acetylphosphates erlauben. Die Nachweisgrenze liegt bei 50 μ M. Ebenso konnte mit einer HPLC Methode die Trennung von 11 der 12 Standardnukleotide und ihrer acht wichtigsten Abbau- und Umbauprodukte mit einer Nachweisgrenze von ca. 10 μ M in einer Messung erreicht werden. Mit Hilfe dieser Methoden konnte gezeigt werden, dass die Energieversorgung der zellfreien Biosynthese durch das Energieregenerierungssystem von Acetatkinase/Acetylphosphat in der derzeitigen Dimensionierung nicht limitierend für die Proteinbiosynthese ist.

Für die Charakterisierung der makromolekularen Schlüsselkomponenten kam die hochauflösende zweidimensionale Elektrophorese (2DE) zum Einsatz. Diese "Proteomanalyse" konnte so optimiert werden, dass eine relative Quantifizierbarkeit wichtiger Proteinspots möglich war. Die Abweichung der zu reproduzierenden Proben in einem Lauf silbergefärbter Gele wurde auf unter 5% ermittelt. Durch Sequenzanalyse konnten viele Proteinspots eindeutig identifiziert werden, darunter für die Biosynthese essentielle Proteine, wie Elongationsfaktoren und ribosomale Proteine. Es wurde festgestellt, dass die entsprechenden Proteinspots auch in translational inaktiven Lysaten oder nach Abbruch der zellfreien Reaktion noch vorhanden waren, jedoch lagen diese Proteine dann zum Teil in unterschiedlichen Isoformen vor.

Aufgrund dieser Beobachtungen, wonach offensichtlich Zustandsänderungen der Lysatproteine im Zusammenhang mit der Translationsaktivität eines zellfreien Lysates stehen,

wurden weitere Methoden entwickelt, diese genauer zu charakterisieren. Mit einer HPLC-Methode konnte zunächst gezeigt werden, dass nach 48h im kontinuierlich betriebenen zellfreien Reaktor (CFCF) eine, durch das Gruppenübertragungspotential des für die Energieregenerierung eingesetzten Acetylphosphates bedingte chemische Phosphorylierung, an Lysatproteinen stattgefunden hat. Eine exaktere Dimensionierung der Energieversorgung muss deshalb angestrebt werden. Weiterhin erlaubte die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Technik zum Screening von zweidimensionalen Western-Blots mit monoklonalen Antikörpern die Identifizierung von Phosphorylierungen an Serin- oder Threonin-Resten in Proteinen. Mit dieser Methode wurde festgestellt, dass sich das Phosphorylierungsmuster mit der translationalen Aktivität des zellfreien Lysates ändert. In, aufgrund fehlerhafter oder unvollständiger Herstellung, inaktiven Lysaten konnten keine Modifizierungen dieser Art gefunden werden, während in aktiven Lysaten die Elongationsfaktoren Ts & Tu, mehrere ribosomale Proteine und Chaperone, mindestens an einer Stelle phosphoryliert waren. Zeitgleich mit dem Zusammenbruch der zellfreien Synthese im Batch-Verfahren nach 50min haben die meisten dieser Proteine ihre Modifikation verloren. Allein von EF-Tu war bisher bekannt, dass eine Phosphorylierung an Threonin 382 essentiell für eine Reaktivierung des Faktors für den nachfolgenden Elongationszyklus ist. Aufgrund weiterer Messungen konnte ausgeschlossen werden, dass die Energie- oder Substratversorgung des zellfreien Systems sowie die Transkription den Zusammenbruch nach 50min Batch-Reaktion herbeiführen. Als alleiniger Biosynthese limitierender Faktor zeigte sich die Änderung des Modifizierungsmusters der Lysatproteine und damit vorhandene Aktivität und Funktion.

Diese Erkenntnisse sollten genutzt werden, um künftig bei der Extrakterstellung Bedingungen zu etablieren, welche den Lysatproteinen erlaubt, ihre funktional essentiellen Modifizierungen zu konservieren. Eine sorgfältige Sichtung des Schrifttums zeigt die Möglichkeiten auf, mit Hilfe von klonierten Genen, allen voran eine Proteinkinase aus dem Bakteriophagen T7, eine Koexpression dieser Kinase und dem Zielprotein anzustreben. Die T7 Kinase soll möglichst spezifisch Proteine aus dem Biosyntheseapparat des *E.coli* Lysates phosphorylieren, womit die verloren gegangenen essentiellen Modifikationen ersetzt werden sollen. Dies sollte eine signifikante Verlängerung der Synthesedauer und damit eine erhöhte Gesamtkonzentration an Protein zur Folge haben.

Proteasen, für die Biosynthese kontraproduktive Proteine, wurden ebenfalls analytisch und mit 2DE in ihrer Wirkung quantifiziert. Die dabei entwickelten Verfahren erlauben eine Überprüfung der Wirksamkeit potentieller Proteaseinhibitoren im zellfreien Lysat. Da noch

keine geeignete Substanz gefunden werden konnte, sind weitere Studien auf diesem Gebiet durchzuführen.

2. Stand des Wissens in der Proteomforschung

2.1. Grundlagen und Anwendungspotentiale

Während das Genom aller Zellen eines Organismus gleich und somit statisch ist, weisen die Expressionsmuster der Proteine in Abhängigkeit von physiologischem Zweck, Differenzierungsstatus und Umweltfaktoren gravierende Unterschiede auf. *Escherichia coli* besitzt 4285 Gene und pro Gen geschätzte 1,3 Genprodukte (Wilkins *et al.*, 1997). *Saccaromyces cerevisiae* besitzt ca. 3 Proteine pro Gen, ein Mensch vermutlich über 10 Proteine pro Gen. Ein menschliches Genom besteht aus über 100.000 Genen, von denen nur ca. 10.000 gleichzeitig in einer Zellart exprimiert werden. Die Dynamik und Komplexität des Protein-Expressionsmusters einer Zelle wird durch posttranslationale Modifikationen, die wesentlich für die Modulierung von Aktivität und Funktion eines Proteins sind, dramatisch erhöht. Konservative Schätzungen gehen von 2-3 Formen pro Protein aus (Klose, 1999b). Darüber hinaus gibt es keinerlei Abschätzungen über zusätzliche Einflüsse von Protein-Protein, Protein-Nukleinsäure oder andere zelluläre Wechselwirkungen. Denis F. Hochstrasser stellte dem Auditorium des Deutschen Elektrophorese-Forums 1999 in München die provokative Frage: „Do you think it is infinite?“

Die „Ein-Gen-Ein-Protein-Eine-Funktion-Hypothese“ ist somit hinfällig. Strohmman schreibt 1994: „Only two percent of our total disease load is related to monogenic causality, and even here the final phenotype is modulated by many factors.“ (Strohman, 1994). Quantität und Qualität des Transkriptoms, das mit Hilfe der DNA-Chip Technologien einer im Verhältnis zum Proteom einfacheren Detektion zugänglich ist, lässt keine Aussagen über Abbau- und Transportphenomene, Prozessierungen und andere Modifikationen zu. Für eine Funktionsanalyse, welche Rückschlüsse auf beteiligte Reaktions- und Regulationsnetzwerke, sowie deren Relation zum Phänotyp zulässt, müssen die Analysen des Genoms, Transkriptoms und Metaboloms, mit denen des Proteoms verknüpft werden.

Der Ausdruck „Proteom“ wurde erstmalig 1994 erwähnt (Wilkins *et al.*, 1997) und bezeichnet die Gesamtheit der PROTEine, die von einem GenOM, in Abhängigkeit einer Umgebung und eines Zeitpunktes, exprimiert werden. Somit stellt die Proteomanalyse die eingefrorene Momentaufnahme eines aktuellen Stoffwechszustandes dar. Mehrere sukzessive Aufnahmen bilden sozusagen den Film eines hoch dynamischen Systems ab. Die „bildliche“ Darstellung des Proteoms erfolgt durch die zweidimensionale Gelelektrophorese, die bereits 1975 beschrieben wurde (Klose, 1975; O'Farrell, 1975), aber erst in der zweiten Hälfte der neunziger Jahre durch technische Neuerungen und vor allem durch Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Massenspektroskopie und der Bioinformatik zu wissenschaftlicher Signifikanz gelangte. Massenspektroskopie und Bioinformatik, nicht zuletzt über das World Wide Web, erlauben erst die definierte Interpretation der Proteinmuster auf 2DE Gelen.

Ein 2DE Gel gibt Auskunft über Art, Modifikationen und -relative- Menge eines Proteins, ohne dessen Aktivitätszustand während des Arbeitsablaufes berücksichtigen zu müssen. Proteomanalyse definiert sich somit als subtraktiver Ansatz: über direkten Vergleich wohl determinierter Zustände werden Differenzen herausgestellt, welche schliesslich mit biologischen Auswirkungen korreliert werden müssen. Die Anwendungsbreite dieser Vorgehensweise ist gross:

- Nachweis der Beteiligung von Proteinen an Netzwerken oder bestimmten Mechanismen als Grundlagenforschung für Regulations- und Transportvorgänge, Metabolic Engineering oder Drug Targeting.
- Nachweis von phänotypischen Manifestationen genetischer Mutationen oder Polymorphismen und deren Auswirkungen. Das Proteom als Expression des Genotyps wurde von Klose bereits als Phänotyp definiert (Klose, 1999a).
- Einfluss von Substanzen (z.B. Toxine, Medikamente) auf das Proteom und damit Differenzierung, Proliferation und Stoffwechsel.
- Grundlagenforschung für biotechnologische Produktionsoptimierungen, z.B. mit Mikroorganismen, Zelllinien oder -wie in dieser Arbeit- zellfreien Systemen, sowie deren Qualitätskontrolle. In diesem Zusammenhang wurde Proteomanalyse bereits als Beweismittel vor Gericht zugelassen (Görg, persönliche Mitteilung).
- Erkennen diagnostischer Marker in einem Proteinmuster als Reaktion von Zellen auf Infektionen (Liberatori *et al.*, 1997) oder Allergene (Posch *et al.*, 1997), oder

Ursprungsermittlung einer pathogenen Ansammlung von Körperflüssigkeiten, z.B. in Gehirn oder Lunge eines Patienten (Hochstrasser and Tissot, 1993) können durchgeführt werden.

- Das Erkennen von „Prognose“ Markern als Folge einer Krankheitsdiagnose erlaubt Aussagen über Herkunft, Therapierbarkeit und momentanen Stand im Krankheitsverlauf (Wilkins *et al.*, 1997).
- Das Erkennen von therapeutischen Markern ermöglicht z.B. die patientenspezifische Kontrolle über die positiven und negativen Auswirkungen einer Chemotherapie, womit u.a. die Konzentration des verabreichten Chemotherapeutikums optimal eingestellt werden kann, und ist deshalb eng mit dem Feld des Pharmacogenomics verknüpft. Ganz generell lassen sich nicht nur Arzneimittelwirkungen, sondern auch unerwünschte Nebenwirkungen beobachten.
- In der Krebsforschung wird versucht, durch das Zusammenspiel von Genomics und Proteomics den Einfluss von Störungen des Zellzyklus auf die Tumorentwicklung zu untersuchen, unter anderem durch das Erstellen von theoretischen 2DE Maps mit Positionen von Tumormarkern (Sanchez *et al.*, 1997). In der klinischen Krebstherapie wurden bereits die Ursprünge von Tumorgewebe über 2DE Analytik nachverfolgt, so dass Metastasenbildungen zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte (Wilkins *et al.*, 1997).

Die Verwendung der Proteomanalyse, als schnelle und parallele Methode verglichen mit klassischer Proteinchemie, findet in der biologischen Grundlagenforschung, der Biotechnologie und der medizinischen Forschung mehr und mehr Eingang, und es ist damit zu rechnen, dass diese Analytik in wenigen Jahren standardmässig etabliert sein wird. In der klinischen Medizin hingegen werden derzeit noch sowohl der Kostenfaktor, als auch ethische Gründe für die Zurückhaltung in Proteomics angeführt. Eine klinische Proteomanalyse ist noch sehr teuer, da sie nicht standardmässig durchgeführt und nicht anstatt, sondern zusätzlich zu herkömmlichen diagnostischen Tests angewandt wird. Darüber hinaus stellt sich die grundlegende ethische Frage des Pharmacogenomics: müssen aufgrund des Gleichheitsgrundsatzes alle Patienten gleich behandelt werden oder darf, ja sogar müssen Patienten Vorteile bzw. Nachteile aufgrund ihrer genetischen Ausstattung eingeräumt werden?

2.2. Methoden und deren Limitierungen

Voraussetzung für jede Proteomanalyse sind definierte und reproduzierbare Bedingungen für alle relevanten Parameter während der Probenahme, der Probenvorbereitung und der Durchführung. Es muss sichergestellt werden, dass das Material reproduzierbar gewonnen wird, d.h. von Zellen gleicher Art, im gleichen Differenzierungsstatus und unter gleichen Bedingungen. Dies stellt bereits bei Laborversuchen eine erhebliche Schwierigkeit dar, ist aber unter klinischen Bedingungen unmöglich. Gewebe von Patienten kann nicht synchronisiert werden und weicht durch Polymorphismen erheblich voneinander ab, so dass die Definition eines „Normalzustandes“ bereits problematisch ist.

Grundsätzlich lassen sich alle Proteine mit 2DE auftrennen, jedoch bewegt sich der Konzentrationsbereich an Proteinen in einer Zelle über mindestens sechs Zehnerpotenzen (Lottspeich, 1999) und umfasst Moleküle mit äusserst heterogenen biochemischen und physikalischen Eigenschaften. Da man davon ausgeht, dass Proteine erst ab einer Kopienzahl von >100.000 pro Zelle sicher nachgewiesen werden können, kann man low-copy Proteine anreichern und gegebenenfalls sehr prominente Moleküle abreichern. Eine sehr elegante Methode hierzu ist z.B. die Free-Flow-Elektrophorese (Krivankova and Bocek, 1998). Fraktionierungen von Proteinproben vor der Elektrophorese reduzieren die Komplexität der Proben und erlauben sogar die Darstellung von Proteinen, welche nur in wenigen Dutzend Kopien pro Zelle vorkommen (Corthals *et al.*, 1997). Methoden zur Solubilisierung schwer löslicher Moleküle, wie z.B. stark basischer Membranproteine, wurden ebenfalls entwickelt (Herbert, 1999; Molloy *et al.*, 1998). Es liegt aber auf der Hand, dass die angeführten Spezialmethoden die Quantifizierbarkeit, Reproduzierbarkeit und somit die Bewertung der Ergebnisse erschweren. Einige Proteine bilden in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration Aggregate oder Komplexe und präzipitieren; wiederum zu Lasten der Reproduzierbarkeit. Deshalb muss das zu verwendende Probenvolumen experimentell ermittelt werden. Aus genannten Gründen muss die Probenvorbereitung immer spezifisch auf die Art der Probe und die gewünschte Aussage des Experimentes ausgerichtet werden. Es gibt also keine allgemein gültigen Standardprotokolle, welche die Vergleichbarkeit von Labor zu Labor fördern könnten.

Um komplexe Proteinmischungen in ihren Einzelkomponenten darzustellen, werden sie nach zwei komplementären Verfahren aufgetrennt. Proteine sind zwitterionische Moleküle und wandern im pH-Gradienten der ersten Dimension, der sogenannten Isoelektrischen Fokussierung (IEF), zu dem Ort an dem ihre Nettoladung null ist. Die IEF ist also eine

Endpunktmethode. Die Entwicklung immobilisierter pH-Gradienten (IPG) zur isoelektrischen Fokussierung der Proteine, ermöglichte ab Ende der achtziger Jahre auch laborübergreifend einigermaßen reproduzierbares Arbeiten (Gorg *et al.*, 1988) und löste die Verwendung von Träger-Ampholyten weitgehend ab (Fichmann, 1999; Matsui *et al.*, 1999b). Der Einsatz von IPG Gelen ermöglicht die Verwendung sehr enger pH-Gradienten von z.B. nur einer pH-Einheit, was entscheidend zur Verbesserung der Auflösung beiträgt, sowie die Darstellung sehr basischer Proteine (Gorg, 1999). Anschliessend wird die Eigenladung der Proteine mit negativ geladenem SDS „maskiert“ und diese in der zweiten Dimension aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Separierung erfolgt in denaturierenden SDS Polyacrylamid Gelen, welche horizontal oder vertikal angeordnet sein können (Gorg and Weiss, 1999; Walsh and Herbert, 1999). Gewöhnlich sind die Gele so aufgeteilt, dass die sauren Proteine links, die basischen rechts, sowie die kleineren Moleküle unten zu sehen sind. In der Regel haben die Gele der zweiten Dimension eine Grösse von bis zu 20x20cm und erlauben damit eine Auflösung von bis zu 3000 Spots. Es finden aber auch Spezialformate von Gelen Verwendung, die über 30x40cm gross sind und somit eine Auftrennung von mehr als 10.000 Spots erlauben (Klose, 1999b). Ein kritischer Punkt ist der Übergang der Proteine von der ersten auf die zweite Dimension, die sogenannte Equilibrierung, die für alle Moleküle vollständig und homogen ablaufen muss, da der Vorgang ansonsten nicht reproduzierbar ist.

Die verwendete Technik zum Sichtbarmachen der Proteine im 2DE Gel hängt wiederum von der Aufgabenstellung ab. Die klassische Silberfärbung ist relativ sensitiv, aber nur linear im Bereich von 0,5–20ng Protein. Dazu kommt, dass silbergefärbte Spots aufgrund der Verwendung von Glutaraldehyd und einer Fixierung im Gel im Allgemeinen nicht mehr nachbearbeitet werden können, z.B. mit Massenspektroskopie oder Blotten. Eine Färbung mit kolloidalem Coomassie ist ca. zwei Zehnerpotenzen weniger sensitiv (linearer Bereich zwischen 50ng–1µg), ermöglicht aber die Spaltung von Polypeptiden im Gel und eine folgende massenspektrometrische Analyse (Houen *et al.*, 1997; Matsui *et al.*, 1999a; Rabilloud, 1999).

Eine Coomassie Färbung ist auch für geblottete PVDF-Membranen gängig. In jedem Fall ist für die bildliche Verarbeitung gefärbter Gele ein Laserscanner mit Durchlicht notwendig, da nur ein solches Gerät den notwendigen dynamischen Bereich abdecken kann. Jedoch erstreckt sich, wie bereits beschrieben, der Konzentrationsbereich der Proteine über ca. sechs Zehnerpotenzen. Das bedeutet, dass nur wenige Proteine im linearen Bereich der Färbung und damit des Scanners liegen. Da Proteine in Abhängigkeit ihrer heterogenen Eigenschaften

nicht vorhersagbar und sehr spezifisch anfärben, muss für jeden Spot eine Normierung auf sich selbst oder bezogen auf den Gesamtproteingehalt in einer „Eichreihe“ von 2DE Gelen, durchgeführt werden, falls eine Quantifizierung vorgesehen ist. Da grundsätzlich keine absolute Quantifizierung (in g oder mol Protein) möglich ist, sondern nur eine Relative, bezogen auf Vergleichsgele in Prozent, ist der Aufwand sehr hoch und wird nur für einzelne, bereits als besonders interessant charakterisierte Proteine durchgeführt, aber keinesfalls für ein gesamtes Proteom (Patton *et al.*, 1999a).

Weitere Färbetechniken, z.B. mit Ponceau Rouge oder Metal-Chelaten, werden nur in Spezialfällen angewandt (Castellanos-Serra *et al.*, 1999; Chevallet *et al.*, 1997; Patton *et al.*, 1999b). Neuartige Fluoreszenzfärbungen sind ähnlich sensitiv wie Silber, aber wesentlich schneller in der Anwendung und eine Nachbearbeitung ist meist durchführbar, allerdings färben Proteine in Abhängigkeit ihrer Gruppen sehr unterschiedlich an. Unterschiedlich lange Messzeiten sind möglich, aber eine Detektion erfolgt nur unter UV-Licht.

Das sogenannte „Multiplexing“ ermöglicht das Darstellen von Unterschieden zwei verschiedener Proteinproben in einem einzigen Gel (Unlu *et al.*, 1997). Dabei werden die Proben vor der Elektrophorese getrennt voneinander mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zur 2DE vereinigt. Nach dem Auftrennen erscheinen Proteine, die nur in einer der beiden Proben vorkommen, in der entsprechenden Farbe. Der Vorteil bei dieser Methode ist, dass man die schwierige Reproduzierbarkeit ausser acht lassen kann, allerdings verändern die Fluoreszenzfarbstoffe zum Teil die Laufeigenschaften der Proteine im Gel sehr geringfügig, aber unterschiedlich. Die Konsequenz ist, dass manche gleichen Proteine, welche unterschiedlich markiert wurden, nicht vollständig zur Deckung gebracht werden können und eventuell zu falschen Schlüssen führen.

Proteine können bereits *in vivo* mit schwachen β -Strahlern, wie ^3H , ^{14}C , ^{35}S , starken β -Strahlern, wie ^{32}P , oder sogar γ -Strahlern, wie ^{125}I gelabelled werden (Link, 1999b). Die Isotopenmarkierung ist wesentlich sensitiver als eine Färbung (die absolute Sensitivität ist abhängig von dem verwendeten Isotop, der Markierungsdauer und dem Stoffwechsel der Zelle) und erlaubt eine zielgerichtete Bearbeitung bestimmter experimenteller Fragestellungen, wie z.B. die Inkorporation von radioaktivem ^{32}P zur Detektion von posttranslationalen Phosphorylierungen (Gatti and Traugh, 1999; Yan *et al.*, 1998).

Eine weitere Methode zum Sichtbarmachen bestimmter Proteine ist der Nachweis mit Antikörpern auf Western-Blots von 2DE Gelen. In Abhängigkeit der Aufgabenstellung

können so Proteine mit bestimmten Eigenschaften, Herkunft oder Modifizierungen dargestellt werden (Sanchez *et al.*, 1997; Schindler *et al.*, 1999d). Die Sensitivität der Antikörper ist höher als einer Färbung, schwankt jedoch sehr stark je nach Qualität des Antikörpers und Art des Antikörpernachweises, z.B. mit Chemolumineszenz oder Färbung.

Leistungsfähige Massenspektrometer, sowohl Matrix-Assisted-Laser-Desorptions-, als auch Elektronenspray-Ionisationsgeräte, erlauben theoretische Höchstdurchsätze von bis zu mehreren tausend Proben täglich, falls einfache Massenfingerprints von bekannten Proteomen durchgeführt werden. In der Praxis ist es jedoch so, dass mit Massenfingerprints nur ca. 75-85% der Proteine identifiziert werden können. Sollen die restlichen Proben nicht vernachlässigt werden, ist eine zeitaufwendige Nachbearbeitung, z.B. durch Aufnahme von PSD-Spektren oder manueller Datenbanksuche unumgänglich (Kellner *et al.*, 1999). Werden de-novo Sequenzierungen vorgenommen, reduziert sich die Durchsatzzahl auf maximal 1-10 Proben (beste Qualität vorausgesetzt). Voranschreitende Automatisierung im Vorfeld, z.B. Ausschneide- und Verdauroboter oder automatische Probenauftragung, sowie automatische Datenver- und -bearbeitung, sobald die Massenspektrometrie abgeschlossen ist, erleichtern dies. Allerdings werden durch die automatisierte Vorgehensweise mehrere Zehnerpotenzen an Empfindlichkeit verloren: die Nachweisgrenze von Proteinen aus 2DE Gelen liegt bei manueller Bearbeitung im fmol-Bereich. Dieser zunächst überraschende Sachverhalt ist darauf zurückzuführen, dass die manuelle Bearbeitung den Einsatz geringerer Volumina bei gleicher Probemenge erlaubt. Darüber hinaus kann der Experimentator bei der Bearbeitung von "kritischen" Proben seine Erfahrungen besser einbringen, was das Gesamtergebnis entscheidend verbessert. Zudem erzeugt die Verwendung nicht-inerter Materialien in vielen Robotern und Automaten einen Hintergrundschleier, z.T. aus Plastik-Weichmachern.

Der klassische Edman-Abbau nimmt für die routinemässige Sequenzierung nur eine Nebenrolle ein, da 2DE Gele vor dem Edman-Abbau im allgemeinen erst geblottet werden müssen und bis zu 50% aller Proteine N-terminal blockiert sind. Zudem sind die Geräte zwar in der Anschaffung günstiger, aber dafür im Betrieb wesentlich teurer als Massenspektrometer. Die parallele Berechtigung des Edman-Abbaus beweist sich im Überprüfen von Fehlern (auch in Datenbanken) oder bei Verschiebungen in Reading-Frames von EST-Datenbanken. Ergebnisse aller Sequenzierungen aber ermöglichen nicht nur das Identifizieren eines Proteins, sondern auch das Klonieren von cDNA und letzten Endes das Fischen eines Gens, wobei dieser Prozess im günstigsten Fall mehrere Monate dauert und deshalb nicht routinemässig angewendet wird.

Die absolute Quantifizierung von Proteinen ist nur mit einer Aminosäureanalyse möglich (Kellner *et al.*, 1999; Lottspeich, 1999). Diese ist aber sehr aufwendig, anfällig und darüber hinaus für Spots aus 2DE Gelen zu unempfindlich. Somit wäre eine Anreicherung notwendig, was aber aufgrund der mangelnden Reproduzierbarkeit eine Quantifizierung der Ergebnisse nahezu ausschliesst. High-Throughput Proteomics ist für die Aufgabenstellung der eindeutigen Identifizierung von Proteinen aus den genannten Gründen ungeeignet und zudem zu teuer.

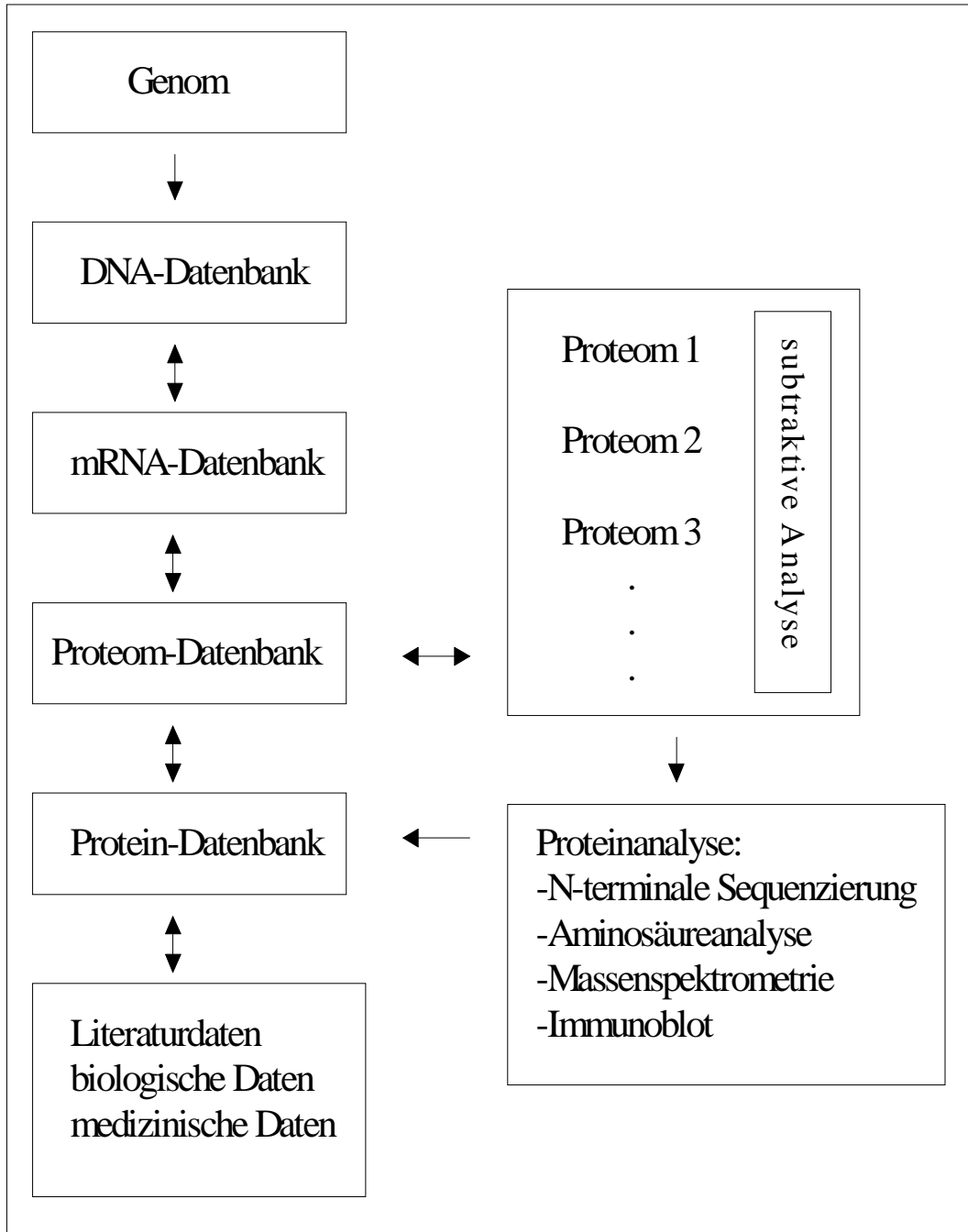
Da in der Proteomanalytik sehr grosse Datenmengen anfallen, ist eine computergestützte Bearbeitung und Verwaltung unumgänglich. Das Forschungsfeld Proteomics begann sich erst richtig zu entwickeln, als die Informatik die entsprechenden Werkzeuge bereitstellen konnte. Diese lassen sich einteilen in Software zur Mustererkennung und Bildbearbeitung von 2DE Gelen, zur Auswertung von Massenspektren und deren Fragmenten und die entsprechenden Datenbanken mit ihren Werkzeugen, die über das WWW frei zugänglich oder aber auch kostenpflichtig sind.

Die Bildbearbeitungssoftware für 2DE Gele stellt einen Bottleneck in der Proteomanalytik dar, da bislang keine vollautomatische Mustererkennung möglich ist, sondern immer sehr aufwendig von Hand nachbearbeitet werden muss. Ausserdem setzt hier die schwierige Reproduzierbarkeit der 2DE Gele den Massstab nach unten: eine entsprechende Software erkennt keine Abweichungen aufgrund geringfügig anderer Muster als Problem der Reproduzierbarkeit, womit sich der subtraktive Ansatz der Proteomforschung grundsätzlich erschwert. Demgegenüber arbeiten Programme zur Auswertung von Massenspektren relativ zuverlässig und selbständig, so dass nur bei schwierigen Proben oder Problemfällen von Hand editiert werden muss.

Daten aus lokalen Bildverarbeitungs- oder Massenspektroskopieprogrammen werden mit Datenbanken aus dem WWW ausgewertet und weiter verlinkt. Der Bildabgleich kann über 2DE Maps erfolgen, welche im Internet abgelegt sind; dies sollte aber aus Gründen der Labor-übergreifenden Nicht-Reproduzierbarkeit der Gele nur zur Kontrolle erfolgen. Theoretische Koordinaten von gesuchten Proteinen können ebenfalls ermittelt werden. Diese können aber aufgrund der vielfältigen möglichen Modifizierungen nur als Anhaltspunkt dienen. Zusätzlich können weitere Informationen über interessierende Proteine ermittelt und die entsprechende Literatur dazu angefordert werden. Eine Organismen-übergreifende Homologiesuche ist möglich. Messwerte aus Massenspektrometern oder Sequenzern werden Daten von bekannten Proteinen, welche in Protein-Datenbanken abgelegt sind, zugeordnet, womit die

entsprechenden Spots eindeutig identifiziert werden. Sollte ein Protein noch nicht bekannt sein, werden die Aminosäuresequenzen mit dem entsprechenden genetischen Code in die DNA-Sequenz „übersetzt“ und in Genom- bzw. EST-Datenbanken gesucht.

Vernetzte Datenbanken sind aus dem heutigen wissenschaftlichen Betrieb nicht mehr wegzudenken. Gegenwärtige Datenbankstrukturen sind in Figur 2.1 gezeigt. Allein die Swiss-Prot Datenbank verfügt über Daten zu mehr als 80.000 Proteinen, direkt verbunden mit entsprechenden Links zu DNA-, Literatur- und -falls vorhanden- 2DE Datenbanken oder Strukturvorhersageprogrammen. Es ist aber darauf hinzuweisen, dass Datenbanken Fehlerquellen darstellen (Bork and Bairoch, 1996). Gemäss dieser Literaturquelle dürften rund 5% aller Proteine fehlerhaft sequenziert worden sein. Die daraus resultierenden Punktmutationen, Frameshifts oder auch Polymorphismen werden an die Datenbanken weitergegeben und dort akkumuliert. Zum Teil werden auch Sequenzen eingegeben, welche auf Kontaminationen einer cDNA Bank zurückzuführen sind. Korrekt sequenzierte DNA wird manchmal fehlerhaft an Datenbanken weitergeleitet, da die Algorithmen, welche zur automatischen Translation oder Gen-Identifikation eingesetzt werden, nur eine geschätzte Trefferquote von 60-70% haben (Bork and Bairoch, 1996). Das führt nicht nur zu fehlerhafter Übersetzung, sondern vor allem zu Missverständnissen in der Exon/Intron-, ORF oder Initiations- Erkennung. In den Datenbanken selbst treten häufig Annotationsprobleme auf, z.B. werden gleiche Abkürzungen für unterschiedliche Proteine oder Gene verwendet, was im Umkehrschluss zu falschen Schlüssen führt. Im Gegenzug dazu werden oft verschiedene Namen für ein identisches Molekül benutzt, da keine einheitliche Nomenklatur vorgeschrieben ist. Dies ist besonders beim Wechsel zwischen verschiedenen Datenbanken problematisch. Unter Umständen sind bestimmte Daten aber auch nicht (kostenfrei) zugänglich.



Figur 2.1: Gegenwärtige Stellung von Proteomics im Rahmen der Datenbankstrukturen. Nach Lottspeich (Lottspeich, 1999).

3. Stand des Wissens in der zellfreien Proteinbiosynthese

3.1. Grundlagen und Anwendungen

Die Verwendung klassischer *in vivo* Verfahren zur Expression fremder, insbesondere synthetischer Gene wird durch folgende Faktoren beeinträchtigt: zelleigene Regulationsmechanismen unterdrücken die Expression heterologer Genstrukturen, oder die entsprechenden mRNA bzw. Genprodukte sind instabil und werden durch intrazelluläre Nukleasen bzw. Proteasen zerstört. Nicht zuletzt führen toxische Eigenschaften der Zielprodukte (u.a. Hormone, Toxine, Rezeptorstrukturen) zur Inaktivierung des Wirtsorganismus und können somit kaum überproduziert werden. Auch kann die extreme Überexpression rekombinanter Gene zu biologisch unwirksamen Produkten (inclusion bodies) führen, die erst durch umfangreiche Umfaltungsverfahren unter hohen Ausbeuteverlusten renaturiert werden müssen. Auch die Entwicklung artifizierender (natürlicherweise nicht vorhandener) Genprodukte, z.B. durch die strukturelle Einbindung nicht proteinogener, unnatürlicher Aminosäuren, ist unter *in vivo* Bedingungen kaum denkbar und bislang nicht beschrieben. Nicht zuletzt entstehen hohe Kosten durch besondere Sicherheitsvorschriften bei der *in vivo* Expression (Stiege and Erdmann, 1995).

Prinzipiell können diese Nachteile durch die Verwendung zellfreier Proteinbiosynthese-Systeme gelöst werden. Exogene Erbinformationen, in Form von mRNA oder DNA können *in vitro* direkt exprimiert werden (Schweiger and Herrlich, 1974; Zubay, 1973). Die Abwesenheit von zellulären Kontrollmechanismen, die Möglichkeit zur direkten Einflussnahme der Darstellung von Reaktionsmischungen, die selektive Anreicherung und Isolierung der Zielproteine, insbesondere aber auch die Möglichkeit zur direkten Analyse des komplexen Proteinsynthesevorgangs, lässt die Untersuchung derartiger *in vitro* Systeme äusserst interessant erscheinen.

Da die Reaktion der zellfreien Proteinbiosynthese nur die gewünschte Nukleinsäure als Template enthält, entfällt die Belegung der Transkriptions- und Translationsmaschinerie durch die Synthese der für das Zellwachstum benötigten Proteine. Das Verfahren kann sowohl präparativ, zum Herstellen von benötigten Standard-Proteinen, als auch analytisch, für die Synthese zu Studienzwecken vorgesehener, neuer Konstrukte genutzt werden.

- Neben Enzymen, die als Monomer und mit einfacher Struktur vorkommen, können auch komplexe Moleküle wie Antikörper mit dem zellfreien System hergestellt werden. Da sich

in vitro die nötigen funktionellen Strukturen der Antikörper, z.B. Disulfidbrücken, ebenfalls ausbilden lassen, zeigen solche künstlich hergestellten Immunglobuline keine Aktivitätsdefizite (Merk *et al.*, 1999; Ryabova *et al.*, 1997). Aufgrund der besonderen Reinheit können für manche Enzyme zum Teil sogar um bis zu 10-fach erhöhte Aktivitätswerte gegenüber herkömmlich aufgereinigten Proteinen gemessen werden (Stiege and Erdmann, 1995).

- Proteine von DNA und RNA Viren konnten zellfrei so synthetisiert werden, dass sie infektiös waren (Jermutus *et al.*, 1998; Katanaev *et al.*, 1996). Dadurch wird nicht nur das Grundlagenstudium von Infektions- und Assembly-Zuständen ermöglicht, sondern es eröffnen sich auch neue Anwendungen im Bereich der Impfstoffentwicklung oder als Carrier für Gentherapien.
- Neben der Expression natürlicher Proteine für Produktions- und Analysezwecke, nimmt das Design neuer Moleküle eine wichtige Stellung ein. So können unter Anwendung der zellfreien Proteinbiosynthese die Auswirkungen von natürlichen oder artifiziellen Mutationen auf DNA-Ebene direkt anhand der Proteinfunktion untersucht werden, ohne die Einflussnahme zellulärer Kontrollmechanismen beachten zu müssen (“functional genomics”).
- Künstliche Modifizierungen, wie z.B. der Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren in Proteine zum Zweck von Funktions- oder Strukturstudien sind, im Gegensatz zur *in vivo* Expression, machbar (Cornish *et al.*, 1995; Noren *et al.*, 1989).
- Ribosomales Display als neue Methode zum Screening von grossen Peptid-Banken, ermöglicht eine molekulare Evolution unter *in vitro* Bedingungen (Hanes and Pluckthun, 1997; Jermutus *et al.*, 1998) (Tawfik and Griffiths, 1998). Dies eröffnet interessante Anwendungen im Bereich des evolutiven Designs von Enzymen und automatischen Screenings von pharmakologischen Wirkstoffen.

3.2. Der Proteinbiosynthese-Apparat

Eine tiefere Diagnose der Reaktionsbedingungen bei der zellfreien Proteinbiosynthese bedingt eine detaillierte Betrachtung des komplexen Reaktionssystems auf den Ebenen der Transkription und Translation. Weil sich die vorliegende Arbeit speziell mit zellfreien

Systemen auf Basis von *Escherichia coli*-Extrakten befasst, beschränken sich die nachfolgenden Darlegungen zur Proteinsynthese auf prokaryontische Systeme. Bezüglich der ebenfalls für die zellfreie Biosynthese eingesetzten eukaryontischen Systeme sei auf die Beschreibungen von Merrick (Merrick, 1992) verwiesen.

3.2.1. Transkription

Um ein geeignetes DNA-Template für die zellfreie Proteinbiosynthese konstruieren zu können, muss beachtet werden, dass ein prokaryotisches Operon aus Promotor-, Operator-, codierender und Terminator-Region besteht. *In vivo* erkennt eine DNA-abhängige RNA-Polymerase die -35 und -10 Consensus-Sequenzen im Promotor und startet daraufhin die Transkription mit einem Fehler von ca. 1 pro 10^4 Nukleotiden (Michal, 1999). *In vitro* hingegen wird die *Escherichia coli* interne Polymerase durch Zugabe des Antibiotikums Rifampicin spezifisch gehemmt und eine virale Polymerase, in dieser Arbeit aus dem Bakteriophagen T7, eingesetzt, da deren Bindung an den zugehörigen, klonierten T7-Promotor ausgeprägter ist und nur eine Fehlerrate der Transkription von 1 pro 10^8 bis 10^{12} Nukleotiden geschätzt wird (Jorgensen *et al.*, 1991; Klaus *et al.*, 1992; Kohrer *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1986). Eine funktionelle Transkriptions-Terminationssequenz für die Polymerase muss hinter das Strukturgen kloniert werden, welches *in vitro* synthetisiert werden soll. Im Falle eines ungenügenden Terminators, oder eines fehlerhaften Leserahmens desselben, kommt es zu einem Überlesen ("Read-Through") des Stop-Signals und somit zur Transkription nicht codierender Bereiche. Dadurch werden hoch- und niedermolekulare Ressourcen des zellfreien Systems verbraucht, ohne dass signifikante Mengen an codierender mRNA für die Translation zur Verfügung gestellt werden. Die Grundlagen bakterieller Transkription sind detailliert beschrieben in (Herendeen *et al.*, 1990; McClure, 1985; Platt, 1986; Pruss and Drlica, 1989; Richardson, 1990; Richardson, 1991; Treier and Bohmann, 1996; von Hippel *et al.*, 1984; Yanofsky, 1988). Eine Zusammenfassung wird gegeben in (Michal, 1999).

3.2.2. Translation

Sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* beginnt die prokaryontische Translation noch vor dem Abschluss der Transkription. Dabei werden je drei Nukleotide in eine Aminosäure übersetzt. Die dazu benötigten Reaktionskomponenten werden im Folgenden dargestellt:

- Transfer-RNAs werden, unter Hydrolyse von ATP zu AMP, von hochspezifischen Synthetasen mit ihrer speziellen Aminosäure beladen (ein Enzym pro Aminosäure) (Burbaum and Schimmel, 1991; Lloyd *et al.*, 1995; von der Haar, 1979). Da sie während der Lysatherstellung als niedermolekulare Komponenten aus dem System entfernt werden, müssen sie vor Beginn der zellfreien Reaktion zugegeben werden. Die Untersuchung der tRNA-Synthetasen ist Gegenstand von Abschnitt 7.1.
- Bakterielle 70S Ribosomen bestehen aus der 30S Untereinheit mit 21 Proteinen und 16S rRNA, sowie der 50S Untereinheit mit 34 Proteinen, dazu 23S und 5S rRNA. Ribosomen haben eine Struktur, denen unterschiedliche Aktivitäten zugewiesen werden konnten: die mRNA wird von der kleinen Untereinheit gebunden, während die grosse Untereinheit die Peptidyltransferase-Aktivität besitzt. Die **A**-Site an Ribosomen bindet die **aa**-tRNA während der Elongation, die **P**-Site bindet die **Peptidyl**-tRNA und die **E**-Site entlässt die tRNA (Arnold and Reilly, 1999; Clark *et al.*, 1999; Kaltschmidt and Wittmann, 1970; Morley, 1994; Ostergaard *et al.*, 1998; Ramakrishnan and White, 1998; Wittmann, 1982; Wittmann, 1989). Während in zellfreien S30 Extrakten, wie in dieser Arbeit verwendet, die Ribosomen vollständig enthalten sein dürften, werden sie aus S100 Extrakten während der Herstellung entfernt und in aufgereinigter Form vor Beginn der Biosynthese zugegeben (Jermutus *et al.*, 1998). Da das Vorkommen aller ribosomalen Proteine, sowie deren Funktionalität für die zellfreie Translation absolut essentiell ist, sind eingehendere Analysen im Abschnitt 7.1, sowie in Publikation I und V (Schindler *et al.*, 1999c; Siemann *et al.*, 2000) dargestellt.
- Initiations- (IF), Elongations- (EF) und Terminations- (RF) Faktoren sind für die Translation notwendig und bereits im zellfreien Lysat enthalten. Da diese im weiteren Verlauf dieser Arbeit im Hinblick auf die Aktivität in der zellfreien Proteinbiosynthese eingehender untersucht werden, sollen ihre Grundfunktionen in Tabelle 3.1. kurz dargelegt werden.

Tabelle 3.1.: Funktionen der Translationsfaktoren.

IF-1	Stimuliert IF-2 und IF-3
IF-2	Bindet die fMet-tRNA an die P-Site
IF-3	Bindet die mRNA an die 30S Untereinheit
EF-Tu	Bindet die aa-tRNA an die A-Site
EF-Ts	Regeneriert EF-Tu
EF-G	Katalysiert die Translokation der Ribosomen
RF-1	Bewirkt die Termination an Codons UAA und UAG
RF-2	Bewirkt die Termination an Codons UAA und UGA
RF-3	Unterstützt RF-1 und RF-2
RRF	Stimuliert die Freilassung von Peptidyl-tRNA und mRNA

RRF: Ribosomaler Recycling Faktor

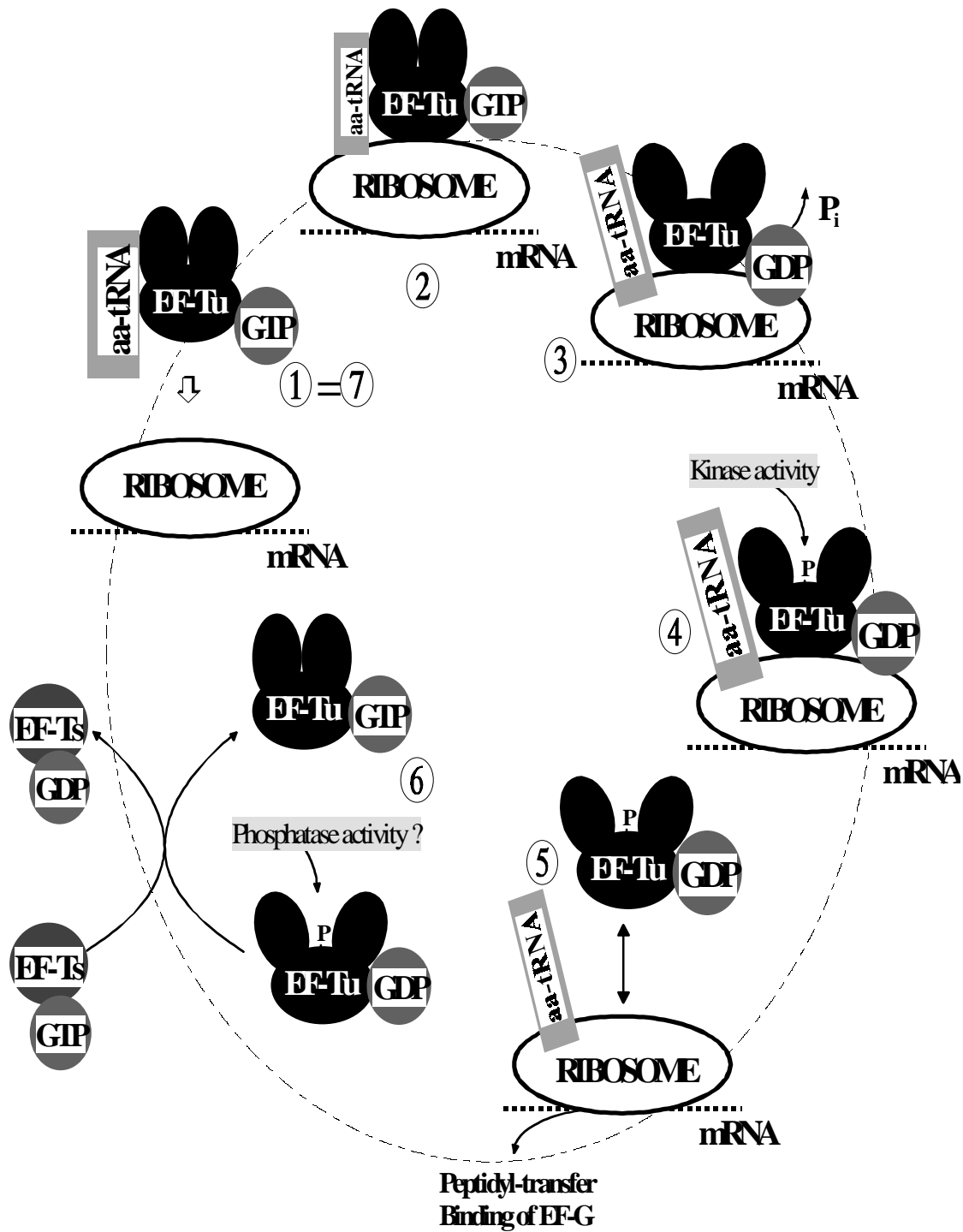
Die Translation gliedert sich in Initiation, Elongation und Termination. Bestimmte Proteine, die sogenannten Translationsfaktoren, und niedermolekulare Bestandteile wie ATP und GTP, werden neben den Ribosomen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* für den reibungslosen Ablauf der Synthese benötigt. Im Folgenden sind die Vorgänge der Translation beschrieben, wie sie *in vivo* ablaufen und *in vitro* ablaufen sollten. Eine Störung dieser komplexen Vorgänge würde einen Zusammenbruch der *in vitro* Translation nach sich ziehen.

Sobald die Shine-Dalgarno-Sequenz auf der naszierenden mRNA transkribiert wird, bindet sie die 16S rRNA und die Initiation der Translation beginnt. Die erste Aminosäure ist in Prokaryoten immer Formyl-Methionin und wird in zellfreien Systemen artifiziell zugegeben. Die neu synthetisierte mRNA, fMet-tRNA (*in vitro* zugegeben), der Initiationsfaktor 2 und GTP (*in vitro* zugegeben) binden die ribosomale 30S Untereinheit an der P-Site, dann komplexiert die 50S Untereinheit. Die Spaltung von GTP stimuliert die Entlassung von IF-2 aus dem Komplex. Bei der Elongation werden die aa-tRNAs von je einem EF-Tu + GTP an

die A-Site angedockt. Nach der Hydrolyse von GTP ändert sich die Konformation von EF-Tu, so dass eine Phosphorylierung ermöglicht wird, welche das Ablösen von EF-Tu.GDP vom ribosomalen Komplex stimuliert (Alexander *et al.*, 1995; Clark and Nyborg, 1997; Lippmann *et al.*, 1993) (siehe Figur 3.1.). Eine genauere Untersuchung dieser Phosphorylierung und deren Auswirkung auf das zellfreie System ist dargestellt in Publikation V (Siemann *et al.*, 2000). EF-Tu.GDP wird von EF-Ts -wiederum unter Spaltung von GTP- regeneriert und steht somit für weitere Elongationszyklen zur Verfügung. Die Aminosäure der tRNA in der A-Site wird an die Aminosäure an der tRNA der P-Site gebunden und von der Peptidyltransferase katalysiert. Dann erfolgt die EF-G katalysierte Translokation des Ribosoms zum nächsten Codon, wobei die Peptidyl-tRNA zur P-Site verschoben wird und die desacylierte tRNA zur E-Site, von wo sie aus dem Ribosom entfernt wird. Dabei wird wiederum ein GTP verbraucht. Wird ein Stopcodon erreicht, binden RF-2 oder RF-1, plus RF-3.GTP und die Elongation endet. Durch die Spaltung des GTP wird die Polypeptidkette freigesetzt (Liljas and Garber, 1995; Nyborg and Kjeldgaard, 1996) (Short *et al.*, 1999). Das Fehlen oder die Inaktivierung nur einer dieser beteiligten Komponenten bringt die Translation und somit die gesamte zellfreie Biosynthese zum Erliegen, siehe Publikation V (Siemann *et al.*, 2000). Die Fehlerrate in der Translation beträgt *in vivo* etwa 1/10.000 (Michal, 1999).

Nach (Alexander *et al.*, 1995) spielt sich die Funktion der Elongationsfaktoren Tu und Ts in den folgenden Schritten ab. Die Nummerierungen beziehen sich auf die Darstellung in Figur 3.1.

1. Die geschlossene Konformation von EF-Tu ist assoziiert mit GTP und bindet aminoacylierte tRNA, um damit den sogenannten Ternären Komplex zu bilden.
2. Der ternäre Komplex bindet an die A-Site des Ribosoms, welches mit der mRNA verknüpft ist.
3. Durch die Hydrolyse des GTP zu GDP wechselt EF-Tu in die offene Konformation.
4. In der offenen Konformation ist das Threonin an der Position 382 nun zugänglich, so dass es durch eine Kinase phosphoryliert werden kann. Es gibt Anhaltspunkte, dass die entsprechende Kinase-Aktivität mit ribosomalen Proteinen verknüpft ist (Alexander *et al.*, 1995)



Figur 3.1: Die Funktionen der Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-Ts während eines Elongationszyklus sind in in sieben Schritten dargestellt.

- Die eingeführte Phosphorylierung begünstigt die Ablösung des EF-Tu/GDP Komplexes vom Ribosom mit der aa-tRNA. Der ribosomale Komplex kann somit in die nächste Phase der Elongation eintreten.

6. Der Nukleotid-Austauschfaktor EF-Ts ersetzt das GDP an EF-Tu durch GTP und führt somit die Rückführung von EF-Tu in die geschlossene Konformation durch. An dieser Stelle ist die Phosphorylierung an Thr-382 bereits entfernt, jedoch ist unklar, ob die Phosphatase-Aktivität mit EF-Ts assoziiert ist.
7. Der reaktivierte EF-Tu ist nun in der Lage, erneut aa-tRNA zu binden und somit in den nächsten Elongationszyklus einzutreten.

In Übereinstimmung mit (Alexander *et al.*, 1995; Mesters *et al.*, 1994) blockiert das Antibiotikum Kirromycin die Phosphorylierungsstelle für die Kinase und verhindert damit den Konformationswechsel von EF-Tu, so dass die an der Elongation beteiligten Komponenten in Schritt 4 quasi steckenbleiben. Der Gesamtkomplex kann nicht mehr dissoziieren, was zu einem Ribosomen-Stau auf der mRNA führt. Ein kompletter Stop der Translation ist die Konsequenz (Clark and Nyborg, 1997; Liljas and Garber, 1995; Michal, 1999; Nyborg and Kjeldgaard, 1996; Nyborg *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998). Die Folge einer Störung dieses komplexen Systems für die zellfreie Proteinbiosynthese ist eingehend in Publikation V (Siemann *et al.*, 2000) dargestellt.

Eine Peptidbindung erfordert sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* $1\text{ATP} + 3\text{GTP} \rightarrow 1\text{AMP} + 3\text{GDP} + 1\text{PP}_i + 3\text{P}_i$. In der Literatur wird meist ein Verbrauch von $1\text{ATP} + 2\text{GTP} \rightarrow 1\text{AMP} + 2\text{GDP} + 1\text{PP}_i + 2\text{P}_i$ angegeben (Michal, 1999), jedoch wird dabei nicht die Hydrolyse eines GTP durch EF-Ts berücksichtigt. Zwar steht EF-Ts nicht selbst in Kontakt mit dem ternären Komplex, ist aber für die Erhaltung der Funktion von EF-Tu essentiell. Zusätzlich wird je Polypeptid ein GTP für Initiation und 1GTP für Termination verwendet. Es daher wichtig, dass sowohl ATP, als auch GTP für die zellfreie Biosynthese in ausreichendem Masse zur Verfügung stehen, um die Fortführung der Translation zu gewährleisten. Eine weitergehende Untersuchung der Versorgung mit Nukleotiden erfolgt in den Abschnitten 3.5 und 12 dieser Arbeit (siehe auch Diplomarbeit von Claudia Thiele (Thiele, 1999) und Dissertation von Sabine Arnold (Arnold, 2000)).

Endo- oder Exonukleasen dienen *in vivo* unter anderem dazu, fehlsynthetisierte Stränge abzubauen und die Nukleotide zu recyceln, bzw. auch zur Regulation der Synthese durch mRNA Abbau. Manche RNasen sind im Besonderen an der Prozessierung von rRNA und tRNA beteiligt (Lindahl and Hinnebusch, 1992; Neidhardt, 1996; Nierhaus *et al.*, 1993). *In*

in vitro hingegen wirken sich diese Aktivitäten negativ auf die Gesamtkonzentration an Zielprotein im System aus, da neu synthetisierte mRNA bereits vor der (vollständigen) Translation degradiert wird. Diese Einflüsse sind daher im Abschnitt 12, in der Dissertation von Sabine Arnold (Arnold, 2000) und in Publikation V (Siemann *et al.*, 2000) genauer untersucht worden.

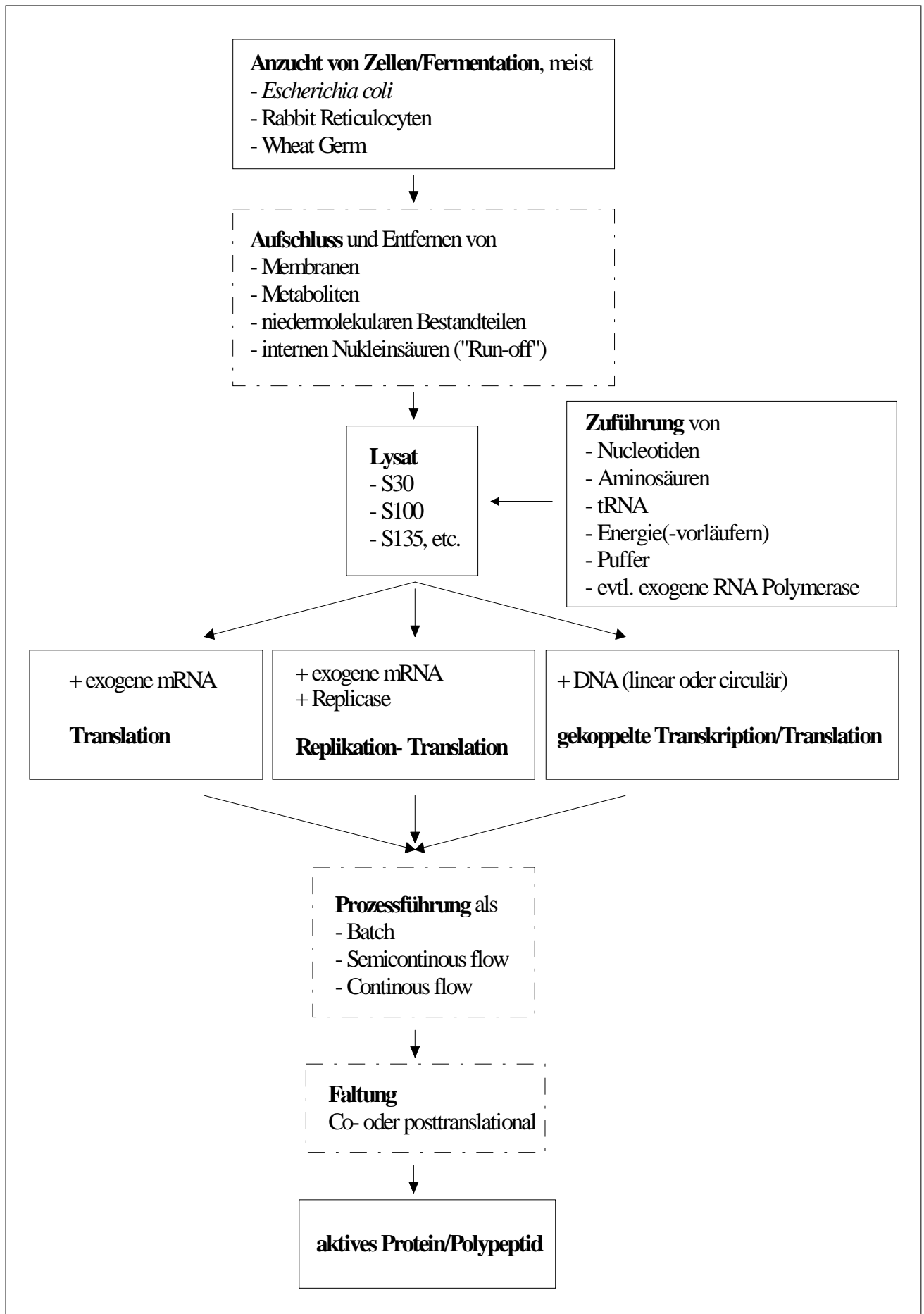
Einfluss auf die zellfreie Proteinbiosynthese könnte ebenfalls die “stringente Kontrolle” nehmen. Gerät die Zelle während der Lysatherstellung, oder auch während der zellfreien Reaktion selbst, in Aminosäuremangel (das Fehlen einer einzigen Aminosäure genügt), binden nicht-acylierte tRNAs an die Ribosomen, welche dann ihrerseits die Synthese von Guanosintetraphosphat (ppGpp) auslösen. ppGpp verringert die Affinität der Polymerase zu Promotoren (v.a. von tRNA, rRNA, aber auch anderen Genen (Michal, 1999)), wodurch die Transkriptionsrate herabgesetzt, ein Read-Through ausgelöst, und die Aminosäuresynthese stimuliert wird. So wirkt sich also ein Ereignis der Translation direkt regulierend auf die Transkription aus (Bremer and Ehrenberg, 1995; Faxen and Isaksson, 1994; Goldman and Jakubowski, 1990).

Bei einer Durchführung und Dimensionierung der zellfreien Proteinbiosynthese muss bedacht werden, dass rund 200 Faktoren an der Translation direkt oder indirekt beteiligt sind. Sie machen etwa 15% der Zellmasse aus und verbrauchen ca. 80% der vorhandenen Energie (Stiege and Erdmann, 1995).

3.3. In vitro-Systeme

Es gibt drei mögliche Varianten, die Proteinbiosynthese unter *in vitro* Bedingungen zu nutzen (siehe Figur 3.2). Bei der sogenannten Replikation-Translation wird im zellfreien System eine Replikation mit einer aus dem Q beta-Phagen gewonnenen Q β -Replikase durchgeführt (Katanaev *et al.*, 1995; Ryabova *et al.*, 1994; Ryabova *et al.*, 1998). Als Vorlage dient eine amplifizierbare mRNA. Dieses System hat den Vorteil, dass man kein DNA-Templat benötigt, welches unter Umständen von Nukleasen abgebaut werden kann. Dazu liegt die Fehlerrate in der Replikation nur bei ca. 1 pro 10¹⁰ Nukleotiden (Michal, 1999). In der zellfreien “Nur-Translation” wird bereits die codierende mRNA als Templat für die Translation vorgelegt. Die mRNA kann chemisch synthetisiert sein oder aus einer *in vitro*

Transkription stammen. Die optimierten Bedingungen für eine Transkription und eine Translation sind unterschiedlich: Transkription wird unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, da RNA Polymerasen empfindlich auf Oxidation reagieren, während Proteine in oxidierender Umgebung besser falten; auch sind die optimalen Konzentrationen an mono- und divalenten Ionen unterschiedlich (Jermutus *et al.*, 1998; Matveev *et al.*, 1995; Ryabova *et al.*, 1998). Gemäss dieser Literaturangaben sind die Produktkonzentrationen an mRNA, bzw. Protein, in separaten Transkriptionen, bzw. Translationen höher als in gekoppelten Systemen. Dazu kommt, dass bei reiner Transkription unter Rnase-freien Bedingungen gearbeitet werden kann, da kein Einsatz von Zellextrakten notwendig ist. Allerdings wird dann mRNA im nachfolgenden Translations-Ansatz sehr rasch abgebaut und nicht nachproduziert. Dies ist der Fall in einem gekoppelten Transkriptions/Translationssystem. Diese Methode kommt der prokaryotischen Biosynthese am nächsten: noch während der Transkription beginnt die Translation. Obwohl dabei die produzierte mRNA den Nukleasen im Translationssystem ausgesetzt ist, ist die Transkription wohl nicht der limitierende Schritt, siehe Publikation V und Dissertation Sabine Arnold (Arnold, 2000; Siemann *et al.*, 2000). Während bei der entkoppelten Transkription und Translation die mRNA relativ rasch durch die RNasen abgebaut wird, nimmt man an, dass während der gekoppelten Translation angelagerte Polysomen die mRNA gegen Angriffe von Nukleasen schützen; zudem wird ständig neue mRNA produziert und der Translation zugeführt (Chen and Zubay, 1983; Pratt, 1987).



Figur 3.2 : Flusschema der zellfreien Proteinbiosynthese.

3.4. Lysate und weitere Reaktionskomponenten

Grundlage einer zellfreien Translation bildet ein Zelllysate, welches die benötigten höhermolekularen Komponenten für eine Translation enthält. Dies sind unter anderem die beteiligten Translationsfaktoren, tRNA-Synthetasen und Ribosomen, insgesamt rund 200 verschiedene Moleküle (Stiege and Erdmann, 1995). Da die funktionelle Komplexität dieser Faktoren nicht *in vitro* nachempfunden werden kann, werden sie aus einem Zellaufschluss lebender Zellen gewonnen und aufbereitet. Üblicherweise werden dazu Zellen von *Escherichia coli* für prokaryotische, und Zellen von Wheat germ oder Rabbit Retikulozyten für eukaryotische Extrakte verwendet. In prokaryotischen Extrakten wird mRNA rascher abgebaut, wohingegen die mRNA in eukaryotischen Lysaten eine höhere Stabilität aufweist. Diese ist aber zurückzuführen auf einen komplizierteren Aufbau, z.B. Capping oder Tailing, bzw. den Einfluss von cis- und trans-Elementen, was bei der Konstruktion eines Templates für die eukaryontische zellfreie Biosynthese zu berücksichtigen ist. Eine Translation an naszierenden mRNA-Strängen ist nur in Prokaryoten möglich, während die Ausbildung komplexer funktioneller Strukturen im Zielprotein, durch Faltung und posttranslationale Prozessierungen oder Modifizierungen, eukaryotischen Systemen vorbehalten bleibt. Die optimale Reaktionstemperatur liegt für *E. coli* bei 30-37°C, für Rabbit Reticulocyten bei 37°C und für Wheat germ bei ca. 25-27°C (Anderson *et al.*, 1983; Baranov and Spirin, 1993; Jermutus *et al.*, 1998; Kawarasaki *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1996; Woodward *et al.*, 1974; Zubay, 1973).

Die für ein Zelllysate verwendeten Zellen sollen während einer maximalen Wachstumsrate geerntet werden, damit die am Syntheseapparat beteiligten Proteine *in vivo* hochinduziert und degradierende Enzyme, wie Nukleasen und Proteasen, wenig prominent sind. Wenn die Zellen vor und während der Ernte in einen Mangelzustand geraten, könnte eine stringente Kontrolle stimuliert werden (siehe Abschnitt 3.2). Generell kann davon ausgegangen werden, dass der physiologische Zustand der Zellen vor und während der Ernte die Beschaffenheit reflektieren sollte, den man von einem translational hochaktiven System erwartet.

Nach dem Aufschluss werden aus den Lysaten niedermolekulare Bestandteile entfernt. Dazu gehören u.a. Nukleotide, Reduktionsäquivalente und zelleigene Nukleinsäuren. Mit dem sogenannten „Run-Off“-Verfahren soll während einer Inkubation interne mRNA von den enthaltenen Ribosomen abgelöst werden, damit sie in der zellfreien Translation nicht mit der

Target-mRNA konkurriert und die Ribosomen frei vorliegen. In einer Dialyse werden die Lysate auf den Reaktionspuffer umgepuffert. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten von Lysaten, nämlich S30 und S100 Lysate. Die Zahlen beziehen sich auf die Zentrifugationsgeschwindigkeit während der Lysat-Herstellung (30.000 g; 100.000 g). Während bei einer Zentrifugation mit 30.000 g die Ribosomen im Extrakt verbleiben, werden sie bei 100.000 g abgetrennt, separat gereinigt und dem Extrakt vor dem Beginn der zellfreien Synthese in angereicherter Form wieder zugegeben (Chen and Zubay, 1983; Pratt, 1984; Pratt, 1987; Zubay, 1973). Für die vorliegende Arbeit wurden ausschliesslich S30 Extrakte verwendet. Extrakte können auch mit PEG aufkonzentriert werden (Kim *et al.*, 1996). Bezogen auf die eingesetzte Konzentration an Lysatproteinen ist die Endkonzentration an Zielprotein jedoch nicht höher als bei verdünnt eingesetzten Lysaten (Jermutus *et al.*, 1998).

Obwohl in Zellextrakten interne RNA-Polymerase enthalten ist, wird diese häufig durch die Zugabe des Antibiotikums Rifampicin gehemmt (Nevin and Pratt, 1991). Statt dessen werden virale Polymerasen, meist aus T3 oder T7-Phagen eingesetzt. Vorteil ist, dass eine definierte Menge zum zellfreien Ansatz zugegeben wird und die Stabilität *ex vivo* bestimmt werden kann. T3 oder T7 Polymerasen sind -im Gegensatz zu zelleigenen RNA-Polymerasen- hochproduktiv und absolut promotorspezifisch, was bedeutet, dass bei Einsatz des richtigen Promotors nur die gewünschte mRNA in der richtigen Leserichtung entsteht und keine Nebenprodukte anfallen, welche Energie- und Substrat-Ressourcen verbrauchen würden. Wird aber zuviel exogene Polymerase zum Reaktionsansatz gegeben, besteht die Gefahr des „Überladens“ der Translationsmaschinerie. Viele Transkriptions- und, in der gekoppelten Synthese, Translationsstarts würden dann initiiert, aber aufgrund von Nicht-Verfügbarkeit bestimmter Komponenten (welche bereits anderweitig gebraucht oder aufgebraucht sind) vorzeitig abbrechen. Resultat wäre ein hoher Hintergrund an unerwünschten Nebenprodukten, so dass der Einsatz der RNA-Polymerasen in jedem Fall optimiert werden muss. Zudem ist die Enzymaktivität der RNA-Polymerase teilweise von der DNA Konzentration abhängig (Chevrier-Miller *et al.*, 1990; Jorgensen *et al.*, 1991; Kohrer *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1986; Nevin and Pratt, 1991).

Die Verwendung exogener Polymerasen bedingt die Konstruktion von DNA-Templates, welche einen entsprechend spezifischen Promotor tragen. Auf ausreichend starke Terminator-Sequenzen muss geachtet werden, da es sonst zu einem read-through des Signals kommt und damit kein funktionelles Protein entstehen kann, bzw. Substrat- und Energieressourcen im System unnötig verbraucht werden. Meist wird die DNA aus Stabilitätsgründen als circuläres

Plasmid eingesetzt, aber auch lineare Templates, PCR-Produkte oder cDNA-Klone werden verwendet. Eine Co-Expression mehrerer Proteine ist möglich; ebenso werden manche Gene auf DNA-Ebene durch eine spezifische Sequenz ergänzt ("tag"), die eine spätere rasche Aufreinigung des resultierenden Proteins mit dem Tag aus dem Reaktionsansatz erlauben (Craig *et al.*, 1992; Jermutus *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1986).

Alle benötigten Aminosäuren sind dem Reaktionsansatz in der jeweils benötigten Menge extern zuzuführen, da sie während der Lysatherstellung entfernt wurden. Dabei kann die schlechte Löslichkeit einiger Aminosäuren ein Problem darstellen, da diese nicht in der konzentrierten Form zugegeben werden können, sondern nur stark verdünnt, was wiederum das Reaktionsvolumen des zellfreien Ansatzes unerwünschterweise vergrößert. Unnatürliche, also nicht proteinogene Aminosäuren können auf eine tRNA, die einem Stopcodon complementär ist, geladen und so in das Protein eingebaut werden (Cornish *et al.*, 1995; Noren *et al.*, 1989).

tRNAs werden dem System ebenfalls extern zugegeben. Dabei muss beachtet werden, dass die tRNA-Konzentration gegenüber den entsprechenden Aminosäuren nicht im Überschuss vorliegt, da sonst eine stringente Kontrolle induziert wird (siehe Abschnitt 3.2).

Nukleotide werden sowohl als „Baumaterial“ für mRNA im zellfreien Ansatz benötigt, als auch in ihrer Funktion als Energieträger und Cofaktoren für Elongationsfaktoren (s.u.). Der eventuelle Einsatz von Nuklease- oder Protease-Inhibitoren kann sinnvoll sein, muss aber speziell geprüft und optimiert werden (s.u.) (Ehretsmann *et al.*, 1992; Gottesman, 1996; Gottesman and Maurizi, 1992; Higgins *et al.*, 1992).

3.5. Energieversorgung

Die Proteinsynthese ist ein energieaufwendiger Prozess. Die benötigte Energie wird dem System in Form von ATP bzw. GTP zugeführt. Zusätzlich ist der Abbau von NTPs durch NTPasen um eine Größenordnung von 1000 höher als der eigentliche Verbrauch für die Synthesetätigkeit (S.Arnold, persönl. Mitteilung). Nun kann man dem Reaktionsansatz eine gewisse Menge Tri-Phosphate zusetzen, diese werden aber schnell verbraucht werden, womit die Synthese abbricht, welche vorher noch zusätzlich durch die entstehenden Abbauprodukte inhibiert werden kann (Michal, 1999; Skarstedt and Silverstein, 1976). Um also eine kontinuierliche Versorgung der Reaktion mit NTPs zu gewährleisten, werden unterschiedliche

Energierегenerationssysteme zum Recycling der Abbauprodukte eingesetzt. Grundsätzlich ist die Energierегeneration im Reaktionsansatz selbst, als auch in einem externen Modul möglich. Am häufigsten verwendet wird das Phosphoenolpyruvat (PEP)/Pyruvatkinase-System (Jermutus *et al.*, 1998; Ryabova *et al.*, 1995). PEP ist relativ stabil und besitzt ein hohes Energieübertragungspotential, ist aber relativ teuer. Dabei überträgt eine Pyruvatkinase im Lysat Phosphatgruppen aus zugegebenem PEP auf ADP oder GDP, welche unter Bildung von Pyruvat zu ATP bzw. GTP regeneriert werden. Ein geringeres Energieübertragungspotential besitzt Acetylphosphat (AcP), dessen Phosphatgruppen von einer endogenen Acetatkinase unter Abspaltung von Acetat auf alle NDPs und NMPs übertragen werden können. AcP ist kostengünstig, aber im Reaktionsansatz wenig stabil, da es einer chemischen Hydrolyse unterliegt (siehe Abschnitt 12.1). Weil sich Acetat und Pyruvat nach der Phosphatgruppenübertragung im Reaktionsansatz anreichern und u.a. den pH-Wert verschieben, ist es wichtig, das Energierегenerationssystem so zu dimensionieren, dass nur verbrauchte Energie ersetzt wird, bzw. Acetat und Pyruvat entfernt werden und so wenig NTPase-Aktivität wie möglich vorliegt. Darüber hinaus können 75% der Kosten pro Ansatz eingespart werden, wenn statt Nukleotidtriphosphaten direkt Nukleotiddi- oder monophosphate in einer zellfreien Reaktion mit intakter Energierегeneration eingesetzt werden (Anthony and Spector, 1972; Chapman and Atkinson, 1977; Fox and Roseman, 1986; Lipmann and Tuttle, 1944; Rose *et al.*, 1954; Russell and Cook, 1995; Ryabova *et al.*, 1995; Skarstedt and Silverstein, 1976; Thiele, 1999).

3.6. Faltung

Die Faltung von neu synthetisierten Proteinen kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* co- oder posttranslational ablaufen (Kolb *et al.*, 1995). Bei der cotranslationalen Faltung beginnt das Peptid schon während der Translation, wobei es also am Ribosom fixiert ist, mit tertiären Interaktionen und stellt ein Gleichgewicht zwischen unterschiedlichen Konformationen ein. Das Peptid besitzt im ungefalteten Zustand die höchste Konformationsenergie und begünstigt erst kovalente Bindungen, dann nicht-kovalente Interaktionen, um seine niedrigste Energiestufe zu erreichen, nämlich den gefalteten Zustand (Fedorov and Baldwin, 1997). In Experimenten mit gekoppelter Transkription/Translation in *Escherichia coli* Lysaten wurde gezeigt, dass das Protein Rhodanese, eine Thiosulfat-Schwefeltransferase, bereits kurz nach Beginn der Translation Kontakt mit den Chaperonen DnaJ und DnaK aufnimmt. Später kommt noch GrpE dazu. Nach Ende der Translation bleibt die naszierende Polypeptidkette

solange am Ribosom komplexiert, bis wiederum DnaJ und DnaK hinzutreten und den N-Terminus des neuen Proteins aus dem Ribosom herauslösen. Im *in vitro* Experiment wurde bestätigt, dass die endogenen Chaperone nicht ausreichen, um diese Komplexauflösung herbeizuführen, sondern hoch konzentrierte exogene Chaperone zugeführt werden mussten (Fedorov and Baldwin, 1997; Kudlicki *et al.*, 1996).

Ebenfalls in *in vitro* wurde gezeigt, dass GroEL benötigt wird, um aktives Rhodanese zu synthetisieren. Der Einfluss von GroEL ist nicht cotranslational, da das Chaperon nicht in Kontakt mit der naszierenden Polypeptidkette tritt (Tsalkova *et al.*, 1993). GroEL ist aber nicht nur an der Faltung von neuen Proteinen, sondern auch an der Aufrechterhaltung deren korrekter Struktur beteiligt. Für viele Proteine, darunter Teile des Transkription/Translationsapparats, wie z.B. einige ribosomale Proteine, tRNA-Synthetasen, Anti-Terminationsfaktoren und auch EF-Tu, wurde nachgewiesen, dass sie immer wieder mit GroEL in Kontakt treten, um ihre korrekte Konformation zu gewährleisten (Houry *et al.*, 1999). Darüber hinaus haben Chaperone wie DnaK oder GroEL auch eine degradierende Funktion: offensichtlich fehlgefaltete oder überflüssige Polypeptide werden von ihnen zum Abbau übermittelt (Kandror *et al.*, 1994; Sherman and Goldberg, 1992b; Sherman and Goldberg, 1996).

Die jeweilige Funktionalität dieser Chaperone hängt erwiesenermassen unter anderem von deren Phosphorylierungszustand ab (Panagiotidis *et al.*, 1994; Sherman and Goldberg, 1992a; Sherman and Goldberg, 1994; Sherman and Goldberg, 1993). Der Faktor DnaK wurde sogar als wichtiger externer Faktor im Assembly von Ribosomen beschrieben (Alix, 1993). Der Elongationsfaktor Tu übt ebenfalls Chaperon-ähnliche Aktivitäten aus: wenn EF-Tu GTP hydrolysieren und zwischen seiner offenen und seiner geschlossenen Form alternieren kann, vermittelt er die Renaturierung von Rhodanese *in vitro*. Dabei ist die Reaktivierung von EF-Tu durch EF-Ts nötig (Kudlicki *et al.*, 1997).

Für ribosomale 23S RNA wurde ebenfalls eine Chaperon-ähnliche Funktion gezeigt (Das *et al.*, 1996). Neben den Chaperonen beeinflussen die sogenannten Faltungskatalysatoren die Einnahme der korrekten Struktur. Zu dieser Klasse gehört das Enzym Protein Disulfid Isomerase (PDI). Es bewirkt die Bildung kovalenter Disulfidbrücken, welche für die Funktion vieler Polypeptide, z.B. Antikörper, notwendig sind. Nach Zugabe externer PDI konnten in einem gekoppelten Transkriptions/Translationssystem *in vitro* funktionelle Antikörper mit korrekten Disulfidbrücken hergestellt werden. Die PDI wirkte dabei cotranslational (Fedorov and Baldwin, 1997; Ryabova *et al.*, 1997).

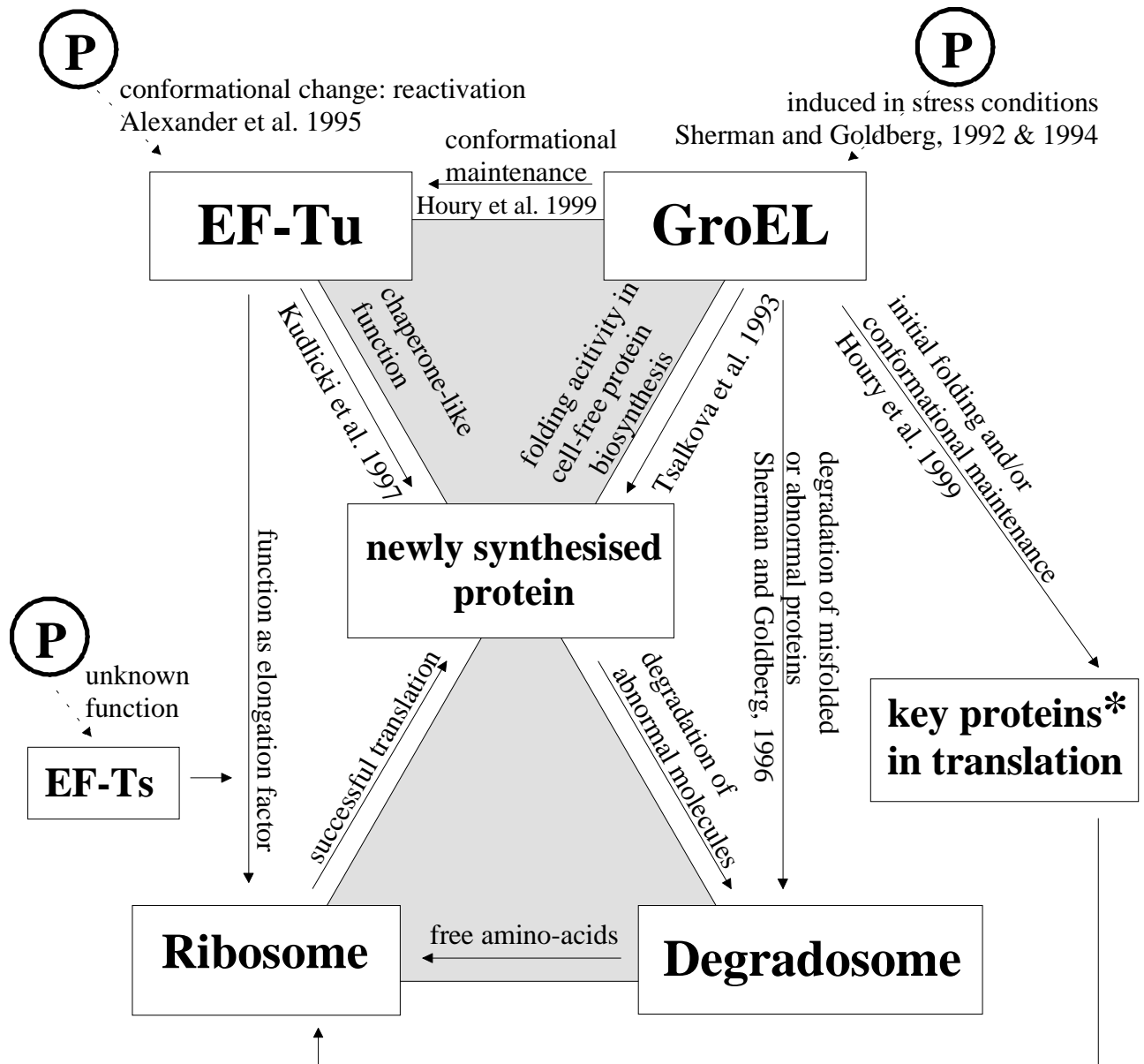
Zahlreiche Gründe sprechen dafür, den besonderen Einfluss der "Faltungskapazität" auf ein zellfreies System hervorzuheben. Dabei geht es nicht nur um die Faltung des zu synthetisierenden Proteins, sondern offenbar um die Aufrechterhaltung des Syntheseapparats an sich und zwar hinsichtlich Struktur und Degradation, siehe Publikation V (Siemann *et al.*, 2000).

Faltungsstudien dienen nicht nur der Erforschung der *in vitro* Proteinbiosynthese, sondern auch umgekehrt: Gene, welche mit dem Strukturgen von GFP fusioniert wurden, können in zellfreien Transkriptions/Translationssystemen bei der Faltung über die entwickelnde Fluoreszenz elegant beobachtet und studiert werden (King and Betts, 1999; Waldo *et al.*, 1999).

3.7. Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen, besonders Phosphorylierungen, sind als schnelle Regulationsmechanismen in physiologischen Vorgängen bekannt. Beispielsweise können Zellen nach Eintreten eines Stresszustandes durch Änderungen der Phosphorylierungszustände bestimmter Schlüsselproteine eine Anpassung in Sekundenschnelle erreichen, ohne die Expression dieser Proteine verändern zu müssen (Cortay *et al.*, 1986; Panagiotidis *et al.*, 1994; Seeger *et al.*, 1996; Sherman and Goldberg, 1994). Die zellfreie Umgebung für die *in vitro* Biosynthese stellt für die Proteine des S30 Extraktes ebenfalls eine Stresssituation dar. Viele der Auswirkungen der dadurch induzierten Veränderungen im Modifizierungsmuster auf den Biosynthesemechanismus sind derzeit noch unbekannt, jedoch sollen im Folgenden einige der bereits erforschten Effekte im Zusammenhang dargestellt werden.

Das GroEL-Protein wird unter Stresszustand phosphoryliert. Es ist sowohl zuständig für die Faltung, als auch für die Aufrechterhaltung der funktionalen Konformation von vielen Proteinen, die in der Biosynthese essentiell sind, darunter EF-Tu, ribosomale Proteine und tRNA-Synthetasen; siehe Figur 3.3.



* Ribosomal Proteins L7/L12, L9, S2
Phenylalanyl-, Glycyl-, Threonyl-tRNA Synthetases

(P) = phosphorylation

Figur 3.3 : Einfluss von Phosphorylierungen an drei unterschiedlichen Proteinen, die im Zusammenhang mit der zellfreien Proteinbiosynthese stehen und deren Bezug untereinander. Pfeile bezeichnen eine Funktion, welche ein Protein auf ein jeweils anderes ausübt. Die Quellenangaben sind zum Teil mit der Beschreibung der Funktion verknüpft (Alexander et al., 1995; Houry et al., 1999; Kudlicki et al., 1997; Sherman and Goldberg, 1992a; Sherman and Goldberg, 1994; Sherman and Goldberg, 1996; Tsalkova et al., 1993).

Unter zellfreien Bedingungen übt GroEL auch eine Faltungsaktivität auf das neu synthetisierte Protein aus. Weisen Proteine, darunter auch das Zielprotein, eine fehlerhafte Konformation auf, erkennt GroEL dies und führt diese Proteine der Degradation zu, damit die zersetzten Polypeptide wieder der Translation zu Verfügung gestellt werden können. Derzeit ist noch unbekannt, inwiefern die (stressbedingte) Phosphorylierung die einzelnen Funktionen dieses multifunktionalen Proteins beeinflusst, aber es ist bereits gesichert, dass eine Veränderung der Wirkweise induziert wird (Alexander *et al.*, 1995; Houry *et al.*, 1999; Kudlicki *et al.*, 1997; Sherman and Goldberg, 1992a; Sherman and Goldberg, 1994; Sherman and Goldberg, 1996; Tsalkova *et al.*, 1993).

Der Elongationsfaktor Tu wird durch die Phosphorylierung nach einem fertiggestellten Elongationszyklus reaktiviert, damit er von neuem mit dem ternären Komplex an das Ribosom binden kann. EF-Tu besitzt jedoch auch eine Faltungsaktivität gegenüber dem neu synthetisierten Protein in der zellfreien Biosynthese. Zwei verschiedenartige Phosphorylierungen an EF-Ts wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen, siehe Publikation V (Siemann *et al.*, 2000), jedoch ist ihre Wirkung bezüglich der Funktion von EF-Ts als Aktivatorprotein für EF-Tu noch gänzlich unbekannt.

3.8. Reaktoren und Prozessführungskonzepte

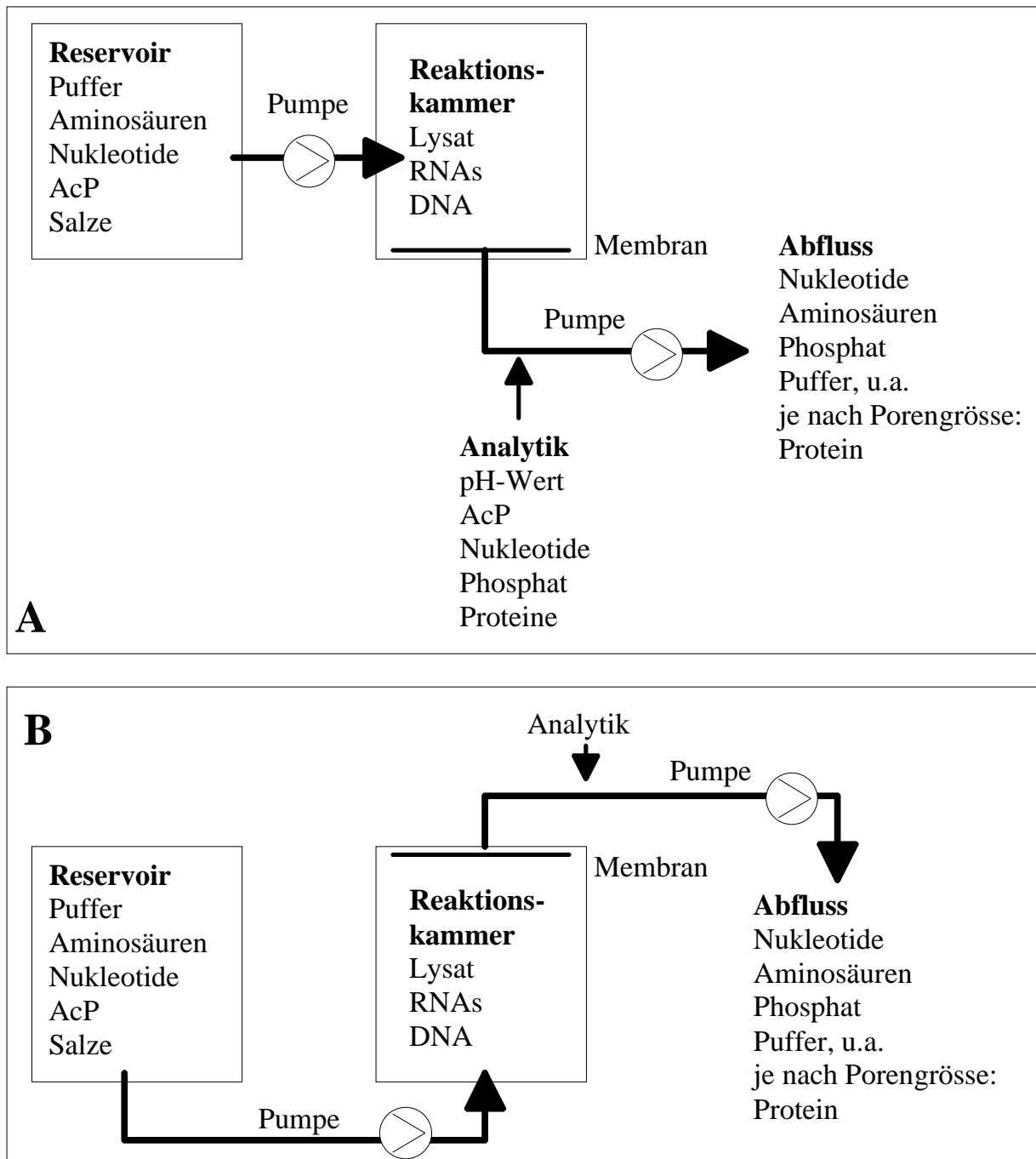
Wird eine zellfreie Reaktion als Batch-Ansatz ausgelegt, müssen alle dazu notwendigen Komponenten von Anfang an zugegeben werden. Störende Neben- oder Abfallprodukte können nicht entfernt werden und das Endprodukt liegt relativ verdünnt im Reaktionsansatz vor. Die Produktionsraten an Zielprotein sind zwar anfangs hoch, jedoch ist die Laufzeit der Batch-Verfahren sehr begrenzt, so dass die Endkonzentration an Zielprotein gering ist. Es wird vermutet, dass ein limitiertes Reservoir an Substrat- und Energiekomponenten, sowie im Reaktionsverlauf zunehmende Inhibierung durch Abbauprodukte, die zellfreie Proteinsynthese im Batch nach maximal 1-2h zusammenbrechen lassen (Erdmann *et al.*, 1994; Jermutus *et al.*, 1998; Spirin, 1990; Stiege and Erdmann, 1995).

Eine Erhöhung der Endkonzentration an Zielprotein durch eine Verlängerung der Reaktionsdauer, bringt ein kontinuierlicher Durchflussreaktor (Figur 3.4), bei dem Substrat- und Energiekomponenten beständig zugeführt und Abfallbestandteile, sowie das Produkt abgeführt werden (Spirin, 1990; Spirin *et al.*, 1988). Die Aufrechterhaltung einer *in vitro*

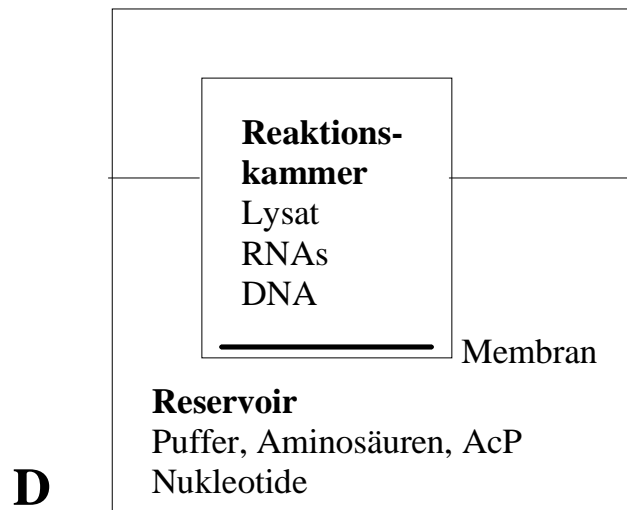
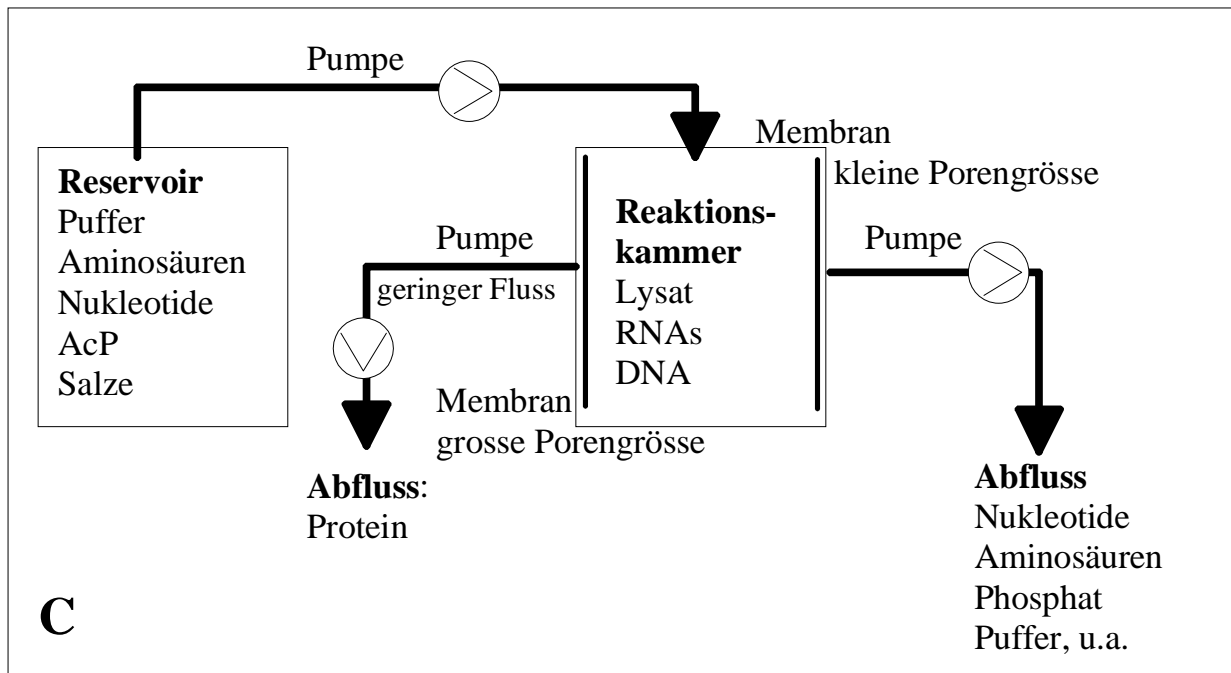
Translation bis zu 100h wurde in einem solchen System dokumentiert, allerdings sind aus noch unbekanntem Gründen die Produktbildungsraten niedriger als in einem Batch-Ansatz (Stiege and Erdmann, 1995).

Verschiedene Reaktortypen für eine kontinuierliche Prozessführung sind entwickelt worden (Figur 3.4). Neben dem konventionellen Typ, der über eine Ultrafiltrationsmembran den Ausfluss höher molekularer Komponenten aus dem Reaktionsgefäß verhindern soll, kann ein Reaktor mit zwei Membranen unterschiedlicher Ausschlussgrößen zwischen niedermolekularem "Abfall" und Produkt unterscheiden. Es wurden auch Reaktoren konstruiert, in denen sich die Reaktion der Proteinbiosynthese während des Durchflusses durch ein Hohlfasersystem abspielt (Erdmann *et al.*, 1994; Jermutus *et al.*, 1998; Stiege and Erdmann, 1995).

Ein Problem der kontinuierlichen Prozessführung stellt die Auswahl der richtigen Membranen dar. Diese können leicht verstopfen und bringen so den Durchfluss zum Erliegen, bzw. üben hohen mechanischen Druck auf die Reaktionskomponenten und die Membran selbst aus, was im allgemeinen die Zerstörung der Membran oder Undichtigkeit im Reaktor zur Folge hat. Der gleiche Effekt ergibt sich, wenn Protein aus dem Lysat auf der Membran präzipitiert. Man hat -nicht gänzlich erfolgreich- versucht, diese Probleme zu umgehen, indem man die Membranen seitlich oder an der Oberseite der Reaktoren anbrachte. Die Membranen dürfen nicht zu grossporig gewählt werden, da sonst wichtige Lysatbestandteile ausgetragen werden, andererseits begünstigt eine zu kleine Ausschlussgrenze das rasche Verstopfen (Nishimura *et al.*, 1995). Um einen Druckanstieg zu vermeiden, müssen Zu- und Abflussraten zu bzw. aus dem Reaktionsgefäß genau aufeinander abgeglichen werden, was bei Pumpgeschwindigkeiten von $\mu\text{l}/\text{min}$ ein technisches Problem für die Synchronisierung der Pumpen darstellt.



Figur 3.4: Überblick über verschiedene Reaktortypen für die zellfreie Biosynthese. (A) Das „Grundmodell“ des Durchflussreaktors nach Spirin (Spirin et al., 1988). Niedermolekulare Komponenten, sowohl verbrauchte, als auch unverbrauchte, werden aus der Reaktionskammer ausgetragen und ständig durch Neue ersetzt. Es kommt zu keinem Energiedefizit und keiner Anreicherung von Nebenprodukten. Durch ständigen Pufferaustausch sollte der pH-Wert konstant bleiben. Je nach Ausschlussgrösse der Membranporen und dem Molekulargewicht des Zielproteins befindet sich dieses im Ausfluss oder verbleibt im Reaktionsraum. (B) In einem verbesserten Modell wurde der Ausfluss aus der Reaktionskammer nach oben verlegt, so dass die Membran nicht mehr durch absinkende Präzipitate verstopft werden kann (Kigawa and Yokoyama, 1991).



Figur 3.4 (Fortsetzung): Im Reaktor (C) sind die Ultrafiltrationsmembranen ebenfalls seitlich angebracht, um Verstopfung durch Niederschläge zu verhindern. Über eine Membran mit einer kleinen Ausschlussgrenze, z.B. 10kD, werden niedermolekulare Komponenten abgetrennt. Über eine zweite Membran mit wesentlich höherer Porengrösse, z.B. 50kD, wird mit sehr geringer Pumprate das Proteinprodukt abgepumpt. Dabei gehen mit der Zeit auch Komponenten des Synthesearrangs aus dem Lysat verloren. Ein halbkontinuierliches System ist in (D) dargestellt: die Reaktionskammer wird durch eine Dialysemembran mit niedermolekularen Komponenten aus dem Reservoir versorgt und Nebenprodukte diffundieren aus dem Reaktor ohne die Konzentration des Reaktionsansatzes zu verdünnen (Kim and Choi, 1996).

Eine weitere Alternative stellt die Verwendung eines halbkontinuierlichen bzw. Dialyzer-Systems dar (Figur 3.4). Dabei wird das eigentliche Reaktionsgefäss, welches alle höhermolekularen Bestandteile enthält und an einer Seite mit einer Dialysemembran abgeschlossen ist, in ein Reservoirgefäss mit den niedermolekularen Bestandteilen gehängt. Die Substrat- und Energiekomponenten können so bei Bedarf durch die Dialysemembran diffundieren und im System aufgebrauchte Bestandteile ersetzen, ohne dass eine Verdünnung der Reaktionskomponenten stattfindet. Reaktions- und Abfallprodukte werden aufgrund des Konzentrationsgefälles in das Reservoirgefäss transportiert (Jermutus *et al.*, 1998; Kim and Choi, 1996). Obwohl es sich im Grunde genommen um eine Batch-Reaktion handelt, konnten längere Reaktionszeiten beobachtet werden, als im herkömmlichen Batch-Ansatz (Jermutus *et al.*, 1998). Dieser Effekt wurde darauf zurückgeführt, dass in diesem System eine längere Substrat- und Energieversorgung aufrecht erhalten und gleichzeitig die Anreicherung der Reaktionsprodukte vermieden wird. Allerdings treten bei dieser Methode ebenfalls Probleme mit Membranen auf, wie in den kontinuierlichen Reaktoren. In allen Membranreaktoren wurden bis dato fast ausschliesslich kleine Proteine bis zu 20kD synthetisiert, da die Membranprobleme mit Grösse des Proteins zunehmen und eine kontinuierliche Abtrennung schwieriger wird.

3.9. Offene Probleme

Die entscheidenden Beschränkungen der zellfreien Proteinbiosynthese sind die nach wie vor niedrigen Raum-Zeit-Ausbeuten und erzielten Endproduktkonzentrationen. Ein quantitativer Vergleich der mit den durch unterschiedliche Systeme erzielten Leistungen wird durch die mannigfaltigen Unterschiede in den Reaktionsbedingungen erschwert (siehe zusammenfassende Darstellung in Tabelle 3.1). In diesen Vergleich sollten mehr die verwendeten Reaktortypen, Reaktionsführungen, Lysate, Energie- und Substratversorgung, sowie Temperatur, pH-Wert usw. einfließen. Eine weitere Differenzierung ist durch das zu produzierende Protein, nebst den verwendeten Plasmiden, Replikations- bzw. Transkriptionssystemen, gegeben.

Vor dem Hintergrund der genannten Variationen, sind die in Tabelle 3.1 zusammengestellten Informationen von in verschiedenem Schrifttum bekannt gewordenen zellfreien Systemen, ausserordentlich distinkt zu bewerten. Häufig fehlt es an den detaillierten Informationen zu

den oben aufgeführten Einzelheiten, so dass ein permanenter Vergleich im Sinne einer Bewertung nicht möglich ist.

In aller Regel wird die begrenzende Leistung der zellfreien Proteinbiosynthese auf Limitierungen der Transkription oder Translation durch die eingeschränkte Verfügbarkeit essentieller Reaktionskomponenten, wie z.B. Energie und Substrate, zurückgeführt (Erdmann *et al.*, 1994; Jermutus *et al.*, 1998; Kawarasaki *et al.*, 1994; Kawarasaki *et al.*, 1998; Kigawa and Yokoyama, 1991; Kudlicki *et al.*, 1992; Nakano *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998; Spirin, 1990; Stiege and Erdmann, 1995; Yamane *et al.*, 1995). In keiner der zitierten Arbeiten werden diese Hypothesen durch quantitative analytische Untersuchungen der entscheidenden Systemkomponenten belegt.

TABELLE.3.1: Zusammenstellung der mit verschiedenen Systemen der zellfreien Proteinbiosynthese erzielten Ergebnisse. Die Membranbezeichnungen sind Typennummern der Firma Amicon. MS2: Phage Coat Protein; DHFR: Dihydrofolat Reduktase; FABP: Fatty Acid Binding Protein; CAT: Chloramphenicol Acetyltransferase; ALD: Rice Cytoplasmic Aldolase; IL-6: Interleukin 6. CFCF: Cell-Free Continuous Flow. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde auf die Darstellung von Ergebnissen mit aufkonzentrierten Lysaten verzichtet.

REAKTIONS ART	LYSAT	MEMBRAN	PROTEIN	DAUER (h)	RAUM-ZEIT-AUSBEUTE (µg/ml.h)	REFERENZ
CFCF: Translation	Wheat Germ S23	XM 50	DHFR	17	1,6	(Endo <i>et al.</i> , 1993)
CFCF: Translation	Wheat Germ S23	XM 50	IL-6	50	1,86	(Volyanik <i>et al.</i> , 1993)
CFCF: Translation	Wheat Germ S23	XM 50	ALD	30	8,5	(Tulin <i>et al.</i> , 1995)
CFCF: Translation	Wheat Germ S30	XM 50	BMV	20	6	(Spirin <i>et al.</i> , 1988)
CFCF: Translation	Wheat Germ S30	PM 10	Calcitonin	40	0,7	(Spirin <i>et al.</i> , 1988)
CFCF: Transkription /Translation	Wheat GermS23	XM 50	ALD	30	6,8	(Tulin <i>et al.</i> , 1995)
CFCF: Transkription /Translation	Escherichia coli S30	YM 100	CAT	20	7,15	(Kitaoka <i>et al.</i> , 1996)

REAKTIONS ART	LYSAT	MEMBRAN	PROTEIN	DAUER (h)	RAUM-ZEIT- AUSBEUTE ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	REFERENZ
CFCF: Translation	Escherichia coli S100	PM 30	MS2	20	4,3	(Spirin <i>et al.</i> , 1988)
CFCF: Translation	Escherichia coli S100	PM 10	Calcitonin	40	1,5	(Spirin <i>et al.</i> , 1988)
CFCF: Transkription /Translation	Escherichia coli S30	YM 100	DHFR	56	4	(Baranov <i>et al.</i> , 1989)
CFCF: Transkription /Translation	Escherichia coli S30	YM 100	CAT	17	5,9	(Kigawa and Yokoyama, 1991)
CFCF: Translation	Escherichia coli S100	PM 30	FABP	10	10	(Stiege and Erdmann, 1995)
Batch Translation	Escherichia coli S100	-	FABP	1	30	(Stiege and Erdmann, 1995)
Batch Translation	Wheat Germ S30	-	DHFR	4	4	(Kawarasaki <i>et al.</i> , 1995)
Batch Translation	Escherichia coli S30	-	MS2	0,6	23	(Katanaev <i>et al.</i> , 1996)
CFCF: Translation	Rabbit Reticulocytes	XM 100A	$\alpha+\beta$ Globin	100	40	(Ryabova <i>et al.</i> , 1989)
IN VIVO	Escherichia coli				>100.000	(Neidhardt, 1996)

4. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die vorstehende Zusammenstellung des Stands des Wissens zur zellfreien Proteinbiosynthese offenbart die ausserordentlich geringen Leistungen der bislang vorgeschlagenen und untersuchten Systeme bezüglich Raum-Zeit-Ausbeuten (spezifische und volumenbezogene Proteinbildungsraten) und erzielbaren Endproduktkonzentrationen. Trotz dieser Beschränkungen besteht nach wie vor grosses kommerzielles Interesse an der zellfreien Proteinbiosynthese. Aufgrund der geringen Leistung liegt der derzeitige Akzent der Nutzung der Systeme aber auf Fragestellungen des "Functional Genomics" und ggf. des evolutiven Screenings, wobei die begrenzten Konzentrationen der Zielproteine tolerabel sind.

Für die langfristig ins Auge gefassten Applikationen der zellfreien Proteinbiosynthese im präparativen Massstab kann man indes ohne systematische Analyse des Reaktionsgeschehens, mit der Zielsetzung einer Identifizierung der limitierenden Faktoren, keine signifikanten Fortschritte erwarten. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den methodischen Grundlagen einer hierfür notwendigen umfassenden Analyse der Dynamik der Schlüsselkomponenten der Synthese. Die Aufgabenstellung umfasst dabei zunächst die Analyse niedermolekularer Substanzen im Zusammenhang mit der Energieversorgung des Systems und den Poolkonzentrationen der Nukleotide und Aminosäuren für die Transkription und Translation. In weiteren Schritten sollen die Ergebnisse der Transkription (mRNA) als Funktion der Zeit verfolgt werden.

Im Zentrum der Arbeit steht die Anwendung der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese zur Identifizierung und Quantifizierung von an der Proteinbiosynthese beteiligten Proteinen. Durch diese systematische Anwendung der Proteomanalyse soll versucht werden, das dynamische Verhalten der makromolekularen Schlüsselkomponenten zu verfolgen und ggf. die für die Limitierung und den Abbruch der Proteinbiosynthese verantwortlichen Faktoren zu identifizieren und zu charakterisieren.

Die Untersuchungen der gekoppelten Transkription und Translation sollen mit S30-Zellextrakten von *Escherichia coli* durchgeführt werden. Als Modellprotein dient das Green-Fluorescence Protein (GFP).

Diese eingehenden Untersuchung der komplexen Zusammenhänge der zellfreien Biosynthese, mit den richtigen Schlussfolgerungen, welche daraus gezogen werden, sollen nicht nur eine verbesserte gekoppelte Transkriptions/Translationsreaktion ermöglichen, sondern auch die Herstellung eines verbesserten S30 Zellextraktes, welcher hinsichtlich der Lysatkomponenten eine optimale Zusammensetzung bietet.

5. Material und Methoden

In diesem Kapitel sind die verwendeten Methoden geschildert, die nicht ausführlich in den Publikationen (siehe Anhang) beschrieben sind.

5.1. Lysatherstellung

Die Lysatherstellung wurde durchgeführt nach einer Anleitung von Pratt (Pratt, 1984; Pratt, 1987), welche leicht modifiziert wurde. Zellen des *Escherichia coli* Stammes MSSCC3110 werden bei 37°C in einem Mineralmedium nach Neubauer (Neubauer *et al.*, 1995) kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase abgeerntet. Die Bedingungen sind zusammengefasst in Tabelle 5.1. Die Zellen einer 50% Zellsuspension werden 20min bei 4°C mit 3700g zentrifugiert; zur Verwendung kam eine J2/21M-Zentrifuge von Beckmann. Je 0,5 bis 1g Pellet werden in 90ml S30 Puffer (14mM Mg(Ac)₂, 60mM KAc, 1mM DTT, 10mM Tris/Ac pH 8.2 in ddH₂O) mit 4,5µl β-Mercaptoethanol resuspendiert und 30min bei 4°C auf 3700g zentrifugiert. Die ausgewogenen Pellets werden in 4,5ml S30 Puffer suspendiert und 15min auf Eis mit Stickstoff begast. Zum **Aufschluss** werden die 4,5ml Zellsuspension für 6x 30s mit Ultraschall (Bandelin Electronic, Berlin, Gerätetyp UW 2200-LS5) auf 50% Leistung behandelt, aber zwischen jeder Behandlung auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation 30min bei 4°C auf 35.000g werden die Überstände abgenommen und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt wird nochmals wiederholt. Danach werden die Proben aliquotiert und bei -80°C schockgefroren. Zum **“Run-Off”** werden pro 25ml Überstand 7,5ml Run-Off-Mix gegeben: 293mM Tris-Ac pH 8.2, 9,2mM Mg(Ac)₂, 3,3mM ATP, 3,3mM GTP, 84mM PEP, 44mM DTT, 0,04mM Aminosäuren, 16,7U/ml Pyruvatkinase, auffüllen mit ddH₂O. Es folgt eine Inkubation im Dunkeln bei 37°C für 90min, leicht schüttelnd. Für die anschließende **Dialyse** wird ein Dialyseschlauch (Thomapor® Standard, Typ RCT® 88-09, Fa. Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg) vorbereitet. Anschliessend werden die autoklavierten und in H₂O vorgekochten Dialyseschläuche 3x 20min in einem Puffer mit 0,1M NaHCO₃ und 10mM EDTA gekocht. Die Dialyse findet bei 4°C gegen das 50fache Volumen der Probe statt. Die gesamte Dauer beträgt 135min, wobei alle 45min der S30 Puffer gewechselt wird. 45min bei 4°C und 35.000g zentrifugieren. Der Proteingehalt der Endlysate wird mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) gegen eine jeweils neue Eichgerade mit BSA, bestimmt. Das Bradford-Reagenz wurde von der Fa. BioRad, München, bezogen.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Kultivierungsbedingungen für eine Batch-Fermentation zur Herstellung eines zellfreien Lysates.

Temperatur	37°C
Volumen	20l
pH (eingestellt mit NaOH)	7.0
pO ₂	50%
Rührer	500-700rpm
C _{Ernte}	2g/l
Ernte nach	260min
maximale Wachstumsrate	0,79 h ⁻¹

5.2. Gekoppelte Transkription/Translation im Batch

Für einen absatzweisen Reaktionsansatz wird auf ein Gesamtvolumen von 250µl pipettiert, von dem 200µl zur Synthese in eine Mikrotiterplatte eingesetzt werden. Als Plasmid fanden pIVEX-2.1.GFP, bzw. pM-GFP Verwendung, welche beide von pBR322 abstammen, das Strukturgen für Green Fluorescence Protein (GFP) tragen und mit dem Plasmidreinigungsverfahren der Fa. Quiagen, Hilden, aufgereinigt wurden. Beide Plasmide werden über einen T7 Promotor und pIVEX zusätzlich über einen T7 Terminator kontrolliert. Die folgenden Komponenten werden für die zellfreie Synthese in Tabelle 5.2 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Lysat gestartet.

Tabelle 5.2: Eingesetzte Komponenten in der zellfreien gekoppelten Transkription/Translation.

Komponente	Konzentration
Plasmid	5,6nM
T7 RNA Polymerase	2kU/ml
<i>E.coli</i> tRNA	48mg/ml
HEPES/KOH, pH 7.6	100mM
ATP	2mM
GTP	1,6mM
CTP	1mM
UTP	1mM
Alle 20 Aminosäuren	250µM
Leucovorin	18,8µM
Rifampicin	1mg/ml
KOAc	100mM
EDTA	1mM
DTT	2mM
AcP	40mM
Na-Azid	0,03%
Mg(OAc) ₂	18mM
Lysat	Proteinendkonz.: 5,94g/l
ddH ₂ O	ad 250µl

Die Synthese von GFP wurde über die Fluoreszenzentwicklung online, siehe Publikation I, (Schindler *et al.*, 1999c), bzw. durch Einbau von radioaktivem ¹⁴C oder durch densitometrische Vermessung eines SDS-PAGE Gels, siehe Publikation V, (Siemann *et al.*, 2000) gemessen. Alle Chemikalien stammen von SIGMA, Deisenhofen, ausser T7 Polymerase und RNAsin, Roche Molecular Diagnostics, Penzberg.

5.3. Gekoppelte Transkription/Translation im Dialyzer

Die gekoppelte Synthese im halbkontinuierlichen System wurde durchgeführt wie ausführlich beschrieben in der Publikation I, (Schindler *et al.*, 1999c). Als Plasmid wurde pM-GFP eingesetzt.

5.4. Gekoppelte Transkription/Translation im Durchflussreaktor

Die kontinuierliche Proteinbiosynthese wurde ausgeführt nach den Angaben in der Diplomarbeit von Claudia Thiele, IBVT, 1999; siehe auch Dissertation Sabine Arnold, IBVT, 2000. Die hier ausgewerteten Reaktorversuche hatten die folgenden Randbedingungen: Temperatur 30°C, Volumenstrom 1,0ml/h, 18mM MgCl₂, 4% Glycerin, 1,5ml Gesamtvolumen, Lysatkonzentration 20%, 100mM KCl, 50kD MWCO, 200mM Tris/Hcl pH 8.0, 30mM Acetylphosphat, je 1mM NMP.

5.5. Radioaktive Transkription

1x Transkriptionspuffer (Roche Molecular Diagnostics, Penzberg), 20ng/μl Plasmid, 500μM NTP (-UTP), 500μM ³H-UTP, 0,83U/μl T7 RNA-Polymerase, ddH₂O.

Fällen der Probe in 0,5ml 10% TCA , auf Filter giessen und mit 5% TCA spülen. Nach ca. 30min Dunkelinkubation im Szintillationszähler gegen einen Kontrollwert vermessen.

5.6. Nukleotidbestimmung mit HPLC

Nukleotide wurden in einer HPLC Anlage (Fa. TSP, Egelsbach) mit einer RP-C18 Grom-Sil Säule (Fa. Grom, Herrenberg) über Ionenpaar-Chromatographie getrennt. Als Laufmittel wurden hierbei verwendet:

FMA (1Liter): 2,04ml 85% Phosphorsäure; ddH₂O autoklaviert; pH-Wert mit Triethylamin eingestellt auf 6.50; ein Rücktitrieren ist nicht möglich.

FMB (1Liter): entspricht FMA plus 10ml einer 0,5M MgSO₄ Stammlösung.

Beide Fließmittel wurden 2x über eine 45µm Membran filtriert und mit Ultraschall für 30min entgast.

Vor Beginn einer Trennung wurde die HPLC Anlage mit den Anfangskonzentrationen der Fließmittel equilibriert und die Fließraten langsam angepasst. Da sich jedes Säulenmaterial etwas unterschiedlich verhält und seine Eigenschaften mit zunehmendem Alter geringfügig verändern kann, kann die in Tabelle 5.3 folgende Trennmethode als "Grundschema" gesehen werden, welches den jeweiligen Bedingungen angepasst werden konnte.

Tabelle 5.3: Methode zur Trennung der Nukleotide in der HPLC-Anlage.

Zeit (min)	FMA (%)	FMB (%)	ddH ₂ O (%)	Fließrate (ml/min)
0	90	0	10	1,1
6	90	0	10	1,1
10	100	0	0	1,1
13	35	65	0	1,3
25	20	80	0	1,3
26	100	0	0	1,3
30	90	10	10	1,3
35	90	10	10	1,1

Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254nm und Raumtemperatur. Der Säulendruck betrug >200bar.

Vor jeder Messung wurde die Anlage mit Hilfe einer Eichlösung von reinen Nukleotiden in Wasser überprüft. Die in Tabelle 5.4 folgenden Trennungen konnten erreicht werden.

Ausserhalb der Versuche wurde die HPLC-Anlage mit einer geringen Flussrate von >0,5ml/min mit Methanol betrieben. Alle eingesetzten Chemikalien stammen von FLUKA, Deisenhofen.

Tabelle 5.4: Retentionszeiten der nach der Methode in Tabelle 5.3 getrennten Substanzen.

Retentionszeit	Substanz
0,9	Orthophosphat
2,7	Hypoxanthin
3,0	Xanthin
3,01	CDP
4,2	G5MP + UDP
4,93	IMP
5,06	CTP
5,5	Adenin
7,6	GDP
8,09	Inosin
8,4	UTP
11,0	A5MP
11,9	GTP
12,9	G3MP
15,0	ADP
19,0	ATP
24,0	Adenosin
24,7	G2MP
39,8	A3MP
112,6	cAMP

5.7. Bestimmung freier Aminosäuren mit HPLC

Die freien aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin, bzw. deren modifizierte Derivate, wurden in einer HPLC Anlage (Fa. TSP, Egelsbach) mit einer RP-18 Grom-Sil Säule (Fa. Grom, Herrenberg) bestimmt. Das sterilfiltrierte Fliessmittel der isokratischen Trennmethode enthielt 10% Methanol und 0,3% einer 80% Phosphorsäure auf ddH₂O Basis.

Die Flussrate war auf 1,5ml/min festgelegt, der Säulendruck betrug 165 bar und die Säule war auf 40°C geheizt. Die Messwellenlänge war 210nm. Alle eingesetzten Chemikalien waren von FLUKA, Deisenhofen.

5.8. Photometrische Aminosäurebestimmung mit Ninhydrin

Natrium Acetat, pH 5.5: 21,33 g NaAc wasserfrei, 6,9ml Eisessig, mit Reinstwassser auf 100ml auffüllen.

Ninhydrinreagenz: 174mg Ninhydrin, 174mg Hydrindantin (*H₂O), 15ml Ethylenglycolmonomethylether. Dunkle Lagerung.

- 100µl Probe (0,1-1,0mM), bzw. 100µl Referenzpuffer
- 100µl NaAc pH 5.5 zugeben
- 5min mit geöffneten Cups bei 60°C schütteln
- 100µl Ninhydrinreagenz zugeben
- 20min mit geschlossenen Cups bei 60°C schütteln
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- 1ml 50% Isopropanol zugeben und vortexen
- Messung der Extinktion im Photometer bei 570nm Wellenlänge
- Eichgerade parallel anfertigen

Alle eingesetzten Chemikalien waren von FLUKA, Deisenhofen.

5.9. Nachweis von anorganischem Phosphat

Zur quantitativen Bestimmung des während der zellfreien Synthese anfallenden freien Phosphates (P_i) wurde der kommerziell erhältliche Kit EnzChekTM Phosphate Assay (E-6646) der Fa. Molecular Probes, Leiden, Holland, verwendet. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Eine Eichgerade wurde immer parallel mitgeführt.

5.10. Nachweis von Acetylphosphat

Da Acetylphosphat in Lösung chemisch sehr instabil und daher schwer quantifizierbar ist (eine Anwendung enzymatischer oder chromatographischer Methoden wurde experimentell ausgeschlossen), wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Bestimmung von AcP nach (Lipmann and Tuttle, 1944; Lipmann and Tuttle, 1945) für die Anwendung in zellfreien Systemen weiterentwickelt. Das Grundprinzip beruht darauf, dass das instabile AcP unter Zugabe von Hydroxylamin zu stabiler Hydroxylaminsäure umgewandelt wird, welche mit Hilfe dreiwertiger Eisenionen einen farbigen Komplex bilden, der photometrisch nachgewiesen werden kann. Nun aber zerfällt AcP bei Raumtemperatur und der Zellextrakt enthält AcP-umsetzende Enzyme, u.a. Acetatkinase, welche auch während der Nachweisreaktion aktiv sind. Deshalb wurde die Grundmethode so modifiziert, dass jede Probe sofort nach Entnahme aus dem zellfreien Reaktor mit 50% -20°C kaltem Methanol versetzt wurde, so dass die AcP-umsetzenden Enzyme abgestoppt wurden. Es wurde festgestellt, dass Methanol die nachfolgende chemische Umsetzung nicht beeinflusst. Alle folgenden Reaktionsschritte wurden nicht auf Raumtemperatur, sondern bei 0°C ausgeführt, was eine Verlängerung der Reaktionszeiten bedingt. Im Zellextrakt enthaltene Proteine wurden mit TCA gefällt und abzentrifugiert. Folgende Lösungen werden für die Nachweismethode verwendet, alle in ddH₂O:

- (1) 50% einer 28% Lösung aus 4M Hydroxylaminhydrochlorid + 50% einer 14% Lösung 3,5M NaOH. Ergibt einen pH von 6,4 und muss von Verwendung frisch hergestellt werden.
- (2) 20% einer 0,1M Essigsäure + 80% von 0,1M Natriumacetat. Ergibt einen pH von 5,4.
- (3) 25% konzentrierte HCl + 75% ddH₂O.
- (4) 5% Eisenchlorid-Hexahydrat in 0,1N HCL.
- (5) 12% TCA.

Zu 50µl Probe wurden 50µl -20°C MetOH gemischt. Von den Lösungen (1) und (2) wurden je 100µl zugegeben und das Ansatz 30min bei 0°C inkubiert. Danach wurden die Lösungen (3), (4) und (5) in dieser Reihenfolge zugegeben und kräftig gevortext. Die Proteinbestandteile wurden in einer Eppendorffzentrifuge bei 14.000rpm abzentrifugiert und der Überstand in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 540nm vermessen. War die

optische Dichte zu hoch, konnte der Ansatz mit ddH₂O verdünnt werden; die Standardlösungen für die Eichgerade wurden dann ebenfalls mit der entsprechenden Menge Wasser versetzt.

5.11. Nachweis proteolytischer Aktivitäten

Zur Bestimmung proteolytischer Aktivitäten in zellfreien Lysaten wurde der kommerzielle Testkit EnzChekTM, N° 6638, der Fa. Molecular Probes, Leiden, Holland, verwendet. Die Methode beruht auf einem Casein-Derivat, welches so stark mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff mit Namen BODIPY® -FL markiert ist, dass sich die Fluoreszenz nicht entwickeln kann. Dieses Casein wird als Substrat zum Lysat gegeben, wo es proteolytisch gespalten wird. Durch seine Spaltung in Polypeptidketten kann sich die Fluoreszenz ausbilden. So markiert die Zunahme der Fluoreszenz, welche in einem Fluorometer bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 485nm bzw. 530nm gemessen wurde, die Aktivität der Proteasen im zellfreien System. Eine Null-Kontrolle wurde immer mitgeführt. Bei der praktischen Durchführung wurden die Anleitungen des Herstellers befolgt.

5.12. Zweidimensionale Elektrophorese

Sämtliche Geräte und Chemikalien, sowie die Gelstrips für die erste Dimension wurden, falls nicht anders vermerkt, von der Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden, hergestellt. Um die Sicherheitsvorschriften bezüglich bestimmter Chemikalien einzuhalten und eine Kontamination mit humanem Keratin zu vermeiden, wurde mit entsprechender Schutzkleidung, bzw. unter einem Abzug gearbeitet. Die Abfälle wurden getrennt voneinander gesammelt und entsorgt. Die Verwendung hochreinen Wassers bester Qualität ist unbedingte Voraussetzung.

5.12.1. Strip Rehydrierung

Die Gelstrips der ersten Dimension wurden vor Gebrauch in 25ml der folgenden Lösung mindestens über Nacht auf Raumtemperatur rehydriert: 8M Harnstoff, 2% (w/v) CHAPS

(Fluka), 10mM DTE (Fluka), 2% (v/v) Ampholyte und etwas Bromphenolblau (BioRad) in ddH₂O. Der Vorgang wurde in einer Rehydrierungskammer durchgeführt.

5.12.2. Probenvorbereitung

Nach einer Proteinbestimmung mit der Methode von Bradford (Bradford, 1976) wurde das Probenvolumen, welches einer Proteinmenge von 100µg (falls nicht anders vermerkt) für analytische Gele entsprach, mit 2/3 ddH₂O verdünnt und bei 4°C mit einer Mikro-Ultrafiltrationszelle (MWCO: 10kD) der Fa. Amicon, USA, mit 14.000rpm abzentrifugiert. Nach 60min wurden die gereinigten und konzentrierten Proteine für 10min bei 4°C und 14.000rpm eluiert. Das entstehende Probevolumen von ca. 2-4µl wurde mit 2µl Resuspensions Puffer gut vermischt. Anschliessend wurden 120µl Lysis Puffer zugegeben. Die Bestandteile der Puffer sind in der folgenden Tabelle 5.5 angegeben.

Tabelle 5.5: Bestandteile der Puffer für die Probenvorbereitung in der 2DE.

Resuspensions Puffer:	Endkonzentration	Lysis Puffer:	Endkonzentration
Tris-HCl pH 8	10mM	Harnstoff	8M
KCl	10mM	CHAPS	4% (w/v)
MgCl ₂	1,5mM	Tris-Base	40mM
DTE	0,5mM	DTE	65mM
SDS	0,1mM	Bromphenolblau	Spuren
	In ddH ₂ O		In ddH ₂ O

5.12.3. Isoelektrische Fokkussierung

Die isoelektrische Fokkussierung wurde in einer Multiphor II Einheit durchgeführt, nachdem die vorbereiteten Proben auf die rehydrierten Strips mit Hilfe von Probenauftragungsbechern aufgegeben worden waren. Die Einstellungen an der Stromversorgung waren 2mA, 5W und ein Programm im Gradientenmodus, welches die Spannung folgendermassen erhöhte: 30min 150V, 60min 300V, 60min 1500V, 4h 3500V, 16h 3500V. Die Einheit wurde währenddessen ständig auf 20°C gekühlt.

5.12.4. Equilibrierung

Die beste Equilibrierungsmethode wurde experimentell ermittelt (Schindler *et al.*, 1998) und durchgeführt (Westermeier, 1997). Dabei wurden statt 2% SDS (w/v), 4% SDS (w/v) verwendet.

5.12.5. Herstellung der SDS-PAGE Gele für die zweite Dimension

Die homogenen Gele wurden entweder in einer IsoDalt Einheit (10 Gele) oder in einer MRE600 Anlage (2 Gele) angefertigt. Die verwendete Acrylamid/Bislösung 37,5:1 war von der Fa. ROTH, Karlsruhe. Die Komponenten für den eingesetzten Gelpuffer sind in der folgenden Tabelle 5.6 angegeben.

Tabelle 5.6: Zusammensetzung der Gelpuffer für die zweite Dimension.

Gelpuffer	IsoDalt	MRE 600	MRE 600
mit HCl auf pH 8.6	13%T 2,6% C	13%T 2,6% C	10,26%T 2,6% C
Tris-Base	55g	4,6g	4,6g
SDS	1,2g	0,1g	0,1g
Mit ddH ₂ O auf	300ml	25ml	25ml

T: Acrylamidkonzentration

C: Crosslinkerkonzentration (Bis)

Die Zusammensetzung der Gele für die zweite Dimension in unterschiedlichen Formaten ist in Tabelle 5.7 detailliert beschrieben.

Für den Betrieb der IsoDalt–Gelgiess-Einheit musste noch eine Displacing Solution aus 50% Glycerin mit einer Spur Bromphenolblau angefertigt werden. Nach dem Giessen wurden die Gele mit wasserfreiem Butanol überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur auspolymerisiert.

Tabelle 5.7: Zusammensetzung der Gele für die zweite Dimension.

	IsoDalt	MRE 600	MRE 600
	13%T 2,6% C	13%T 2,6% C	10,26%T 2,6% C
Bis/Acrylamid	506ml	42ml	33,2ml
Gelpuffer (s.o.)	300ml	25ml	25ml
Glycerin 100%	60g	5g	5g
Temed 100%	57µl	60µl	60µl
APS 10% (w/v)	6ml	500µl	500µl
Mit ddH ₂ O auf	1200ml	100ml	100ml

5.12.6. Lauf der zweiten Dimension

Es wurde jeweils Tris/Glycin/SDS Laufpuffer der Fa. BioRad, München, verwendet. Nach dem Equilibrieren wurden die Gelstrips der ersten Dimension auf die auspolymerisierten Gele der zweiten Dimension gelegt und mit einem heissen 0,5% Agarose Gel festgegossen. Nach dessen Erkalten wurden sie in die jeweilige Lafeinheit gebracht und während des Laufes auf 8°C gekühlt. Bei 200V und 600mA dauerte ein Lauf, je nach Alter des Laufpuffers, zwischen 12h und 24h. Ein Lauf wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front ca. 1cm vom Gel-Ende entfernt war.

5.12.7. Nachweis der Proteine im Gel

Analytische Gele wurden mit dem Silver Staining Kit von Amersham Pharmacia und präperative Gele mit kolloidalem Coomassie-Blau von ROTH, Karlsruhe nach den Anleitungen des Herstellers gefärbt. Präperative Gele wurden nicht fixiert.

5.12.8. Weitergehende Analysen

Die Immunoblot-Methode zum Nachweis bestimmter Epitope in Proteinmischungen, welche auf 2DE aufgetrennt wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und ist in Publikation IV (Schindler *et al.*, 1999d) detailliert beschrieben. N-terminaler Edman-Abbau von Proteinen wurde im Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart (Prof. Dr. R. Schmid) durchgeführt. Massenfingerprints im MALDI-TOF Massenspektrometer zur Identifizierung von Proteinen wurden nach den Methoden von (Kellner *et al.*, 1999; Link, 1999a) bei der Firma Roche Molecular Diagnostics, Penzberg, und der Firma Toplab, Martinsried, unternommen.

5.12.9. Computergestützte Auswertung

Zur rechnergesteuerten Auswertung der analytischen Gele wurde eine PC-Einheit, spezifiziert in (Schindler *et al.*, 1999c), verwendet. Die optimalen Einstellungen im Auswerteprogramm ImageMaster, Version 2.01, waren wie folgt:

Spot Detection:	Sensitivity	180
	Op. Size	51
	Noise Factor	15
	Background	5
Measurements:	Min. Area	3
	Split Factor	0
Spot Matching:	Vector Box	14
	Search Box	64
Calibrations:	Spline	
Background Subtraction:	Average of Boundary	

6. Computergestützte Auswertung von 2DE Gelen

6.1. Bildbearbeitung

Um die analytischen 2DE Gele auswerten zu können, wurden sie direkt nach der Silberfärbung eingescannt. Dabei wurde die in (Schindler *et al.*, 1999c) beschriebene PC-Konfiguration verwendet. Präparative Gele, die in der Regel Coomassie-Blau gefärbt und zur Extraktion von Spots vorgesehen waren, wurden nicht gescannt, um Kontaminationen, v.a. mit humanem Keratin zu vermeiden. Das Scannen der Gele musste unverzüglich nach dem Färben erfolgen, da die Gele mit der Zeit ihre Grösse änderten und nachdunkelten. Technische Probleme beim Einscannen der Gele wurden mit einer Erweiterung des Arbeitsspeichers des betreffenden PC auf 128MB weitgehend behoben. Der Durchlichtscanner, der zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit mit Hilfe einer Eicheinheit auf optische Dichte kalibriert wurde, produziert relativ grosse Datenmengen. Das File eines eingescannten Gels war zwischen 8 und 15MB gross. Das Bearbeiten der Files mit einem Arbeitsspeicher "üblicher" Grösse (z.B. 32 oder 64MB) war nicht nur sehr zeitaufwendig, sondern hatte mehrmals Datenverlust zur Folge, da der Rechner die anfallenden Datenmengen nicht mehr bewältigen konnte.

Nach dem Einscannen wurden die Gele oder ein daraus ausgewählter Bereich mit der Software "ImageMaster" Version 2.0 von Amersham Pharmacia Biotech, Schweden, bearbeitet. Nach dem Durchführen der automatischen Spoterkennung des Programms mussten die Gele allerdings aufwendig von Hand nacheditiert werden. Auch nach Modifikation der Einstellungen war das Programm nicht in der Lage, schwache Spots von Hintergrundrauschen zu unterscheiden, oder sich berührende Spots zu trennen. So musste bei allen Gelen (bis zu 700 Spots) Spot für Spot manuell begutachtet, bewertet und evtl. korrigiert werden. Nach dem anschliessenden Subtrahieren des Gel-Hintergrundes wurden die korrigierten Spots bezüglich ihrer Intensität vermessen. Die Intensität reflektiert die Pixelmenge pro Spot. Je grösser und je schwärzer (also optisch dichter) ein Spot ist, umso höher die Pixelmenge. Ab einer bestimmten Pixelmenge ist ein Spot jedoch in seiner optischen Dichte gesättigt, so dass eine relative Quantifizierung der Intensitäten nur im nicht-gesättigten Bereich erfolgen kann und darf. Mit Hilfe des Profiling-Tools der Software lässt sich abschätzen, ob eine Sättigung vorliegt, freilich nur manuell und für jeden Spot einzeln. Die erhaltenen Messwerte der Intensität lassen sich für die durchnummerierten Spots in Tabellenform auflisten und bewerten.

Das automatische Matchen, also Übereinanderlegen, zweier oder mehrerer Gele zum Feststellen von Unterschieden, funktionierte nur dann bedingt, wenn zusätzlich manuelle Landmarks gesetzt wurden, also der Software gezeigt wurde, welcher Spot in einem Gel zu diesem Spot im anderen Gel gehörte. Waren einige dieser Landmarks über die Gele verteilt, konnte die Software ermitteln, welche Spots gegenüber einem Referenzgel in ihrer Intensität zu- oder abgenommen hatten, bzw. fehlten. Der Algorithmus der Software ist programmiert, Spots in verschiedenen 2DE Gelen zu matchen, welche sich möglichst ähnlich sind in Lage, Form und Intensität. Diese Bedingung führte aber bei den dynamischen Versuchen zur zellfreien Biosynthese zu gravierenden Problemen.

Bei den zu definierten Zeiten dem Reaktionsansatz entnommenen Proben zeigten sich mit zunehmender Prozesszeit verstärkte Einflüsse proteolytischer Aktivitäten. Dies führte zu einer entsprechenden Abnahme der Intensität der Spots auf den 2DE-Gelen und schliesslich zu fehlerhaften Zuordnungen beim Matchen, wenn Spots vergleichbarer Intensität, aber mit unterschiedlichem proteolytischem Abbau im gleichen Planquadrat lagen. Bemühungen, diese fehlerhaften Zuordnungen durch Variation der Programm-Parameter zu beheben, waren ohne Erfolg, so dass schliesslich die Zuordnungen durch manuelles Matchen vorgenommen wurden.

Nach dem Matchen werden die Differenzen in den Intensitäten der Spots verschiedener Gele entweder in Tabellenform oder farbig markiert angezeigt. Der Schwellenwert für Differenzen der Spotintensität wurde auf 30% gegenüber dem Referenzgel festgelegt, da Änderungen die geringfügiger sind, angesichts der mangelnden Reproduzierbarkeit als nicht signifikant anzusehen sind. Ergebnisse dieser Auswertungen sind gezeigt in den Publikationen I und II (Schindler *et al.*, 1999a; Schindler *et al.*, 1999c) und werden in Abschnitt 7 aufgegriffen.

6.2. Einsatz von Datenbanken

Die wichtigste für Proteomanalysen im Internet zugängliche Datenbank ist Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>). Dort sind Daten von über 80.000 Proteinen prokaryotischer und eukaryotischer Organismen gesammelt. Sie umfassen Informationen zu Aminosäuresequenzen, bekannt gewordenen Modifizierungen, Funktionen, Gene, und die jeweiligen Quellenangaben zum Schrifttum. Die theoretischen pI-Werte der Peptide, berechnet auf Grundlage der Primärsequenz, sind unter http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool? zu

erhalten. Ist das gesuchte Protein bereits auf 2DE identifiziert, gibt es einen direkten Link zur Proteomdatenbank Swiss2D (<http://www.expasy.ch/ch2d/>) . Dort befinden sich Bilder von derzeit (Stand 12/99) insgesamt 24 2DE Gelen (von *Dictyostelium discoideum*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mus musculus* und *Homo sapiens*) mit den Koordinaten des jeweiligen Proteins und weiteren Informationen bezüglich der experimentell erhaltenen pH- und MW-Werte und der Sequenzierungsmethoden.

Eine Zusammenstellung mit Verweisen auf über 1000 Server mit biologischen Informationen befindet sich auf der Seite <http://www.expasy.ch/alinks.html>. Rund hundert dieser Server befassen sich mit dem Auswerten von Proteomics-Daten. Deren jeweilige Schwerpunkte lassen sich gliedern in:

- Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen
- Übersetzung von DNA in Aminosäuresequenzen und umgekehrt
- Homologiesuche
- Sequenz- und Strukturmotiv-Suche
- Primärstrukturanalyse
- Sekundärstruktur-Vorhersage
- Tertiärstruktur-Modelle
- Detektion von Transmembran-Domänen
- Sequenz-Alignment

Die in dieser Arbeit benutzten Programme sind hauptsächlich dem ersten Unterpunkt zuzuordnen: das Programm **MultiIdent** wurde verwendet, um mit Hilfe eines näherungsweise pI- und MW-Wertes und der über Edman-Abbau erhaltenen N-terminalen Sequenz das zugehörige Protein zu identifizieren. Mit Hilfe von **PeptIdent** wurden experimentell erhaltene Daten aus Massenfingerprints den theoretisch errechneten Werten für Peptide aus der Datenbank zugeordnet und damit bei ausreichenden Treffern ein Protein identifiziert (siehe Abschnitt 7). **TagIdent** lieferte Informationen darüber, wieviele Proteine des untersuchten Organismus in einem 2DE Gel ähnliche Koordinaten aufweisen könnten, wie das jeweils interessierende Protein. Wurde z.B nach dem Elongationsfaktor Ts von *E.coli*, mit einem theoretischen pI von 5.2 und einem MW von rund 32kD, mit vorgegebener Schwankung von 0.25 pH-Einheiten und 15% des Molekulargewichtes, gesucht (siehe Abschnitt "Calibrierung von 2DE-Gelen"), lassen sich zusätzlich 166 andere Proteine finden, deren Spots ebenfalls im gesuchten Ausschnitt des Gels auftauchen könnten. Bei einer derartigen Häufung von Proteinen in einem gesuchten Bereich ist eine gezielte Suche nach Spots über Calibrierung nicht mehr möglich. Das Programm **FindMod** wurde verwendet, um eventuelle Modifikationen an Peptiden des Massenfingerprints feststellen zu können. Eine

Phosphatgruppe entspricht beispielsweise +79.9Da. Werden Peptide gefunden, die genau um diesen Betrag von der vorhergesagten Masse abweichen, ist eine Phosphorylierung in diesem Segment wahrscheinlich. Da modifizierte Peptide jedoch häufig in der Masse der nicht-modifizierten verschwinden, ist ein Nachweis dieser Art eher unwahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit konnte keine der Phosphorylierungen auf diese einfache Weise identifiziert werden.

7. Auffinden von Proteinen in Proteom-Maps

7.1. Proteine des Biosynthese-Apparats

Mehr als 200 Protein-Komponenten sind an der Biosynthese beteiligt (Stiege and Erdmann, 1995). Um auf 2DE Maps, die das Proteom des zellfreien Lysates darstellen, eine systematische Suche nach spezifischen Komponenten dieses komplexen Systems durchführen zu können, wurden zunächst die wichtigsten Proteine zusammengestellt. Dabei handelt es sich um alle Translationsfaktoren, Ribosomale Proteine und tRNA-Synthetasen. Nach Sammlung der theoretischen Daten über Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt wurde überprüft, ob das entsprechende Protein bereits in einer Proteom-Datenbank vorliegt. Aus den zusammengetragenen Daten konnte darüber hinaus abgeschätzt werden, ob das entsprechende Protein mit Standardgelen überhaupt aufgetrennt werden könnte.

Normalerweise wurden 2DE Gele mit einem pH von 3-10 und einem MW von 13 bis ca. 80kD verwendet. Der pH-Bereich zwischen 5 und 7 ist nicht-linear vergrößert, was im Zusammenspiel mit der Tatsache, dass sich sehr saure -und besonders- sehr basische Proteine experimentell schwer in Lösung bringen und damit auftrennen lassen, dazu führt, dass diese Proteine auf einem 2DE Gel nicht aufzulösen sind. Es gibt zwar spezielle Solubilisierungs- oder Fraktionierungs-Methoden, um Proteine in extremen pH-Bereichen aufzutrennen und sichtbar zu machen (Corthals *et al.*, 1997; Herbert, 1999; Molloy *et al.*, 1998), jedoch gehen diese Methoden zu Lasten der Auftrennung der Proteine in moderaten pH-Bereichen.

Da in dieser Arbeit das komplette Proteom des zellfreien Lysates von *E. coli* charakterisiert werden sollte, konnte das Hauptziel nur in der Betrachtung der anteilmässig überwiegenden Mehrheit von Proteinen liegen, also zwischen einem pH von 4-8. Für spezielle Proteine (z.B.

tRNA-Synthetasen, s.u.) konnten zur besseren Auflösung des pH-Bereiches von 4-7 Gelstrips mit diesem pH-Bereich verwendet werden. Über die Einschränkungen der pH-Bereiche hinaus, sind auch die Bereiche der Molekulargewichte begrenzt: besonders kleine (unter ca.12-13kD) und besonders grosse (über 80kD) werden in den Standard-Gelen mit 13%T nicht erfasst. 10,2%T-Gele verschieben diesen Ausschnitt um ca. 10-15kD nach oben. Hierbei ist zu beachten, dass die Auflösung mit zunehmendem Molekulargewicht schlechter wird und die Spots somit ab ca. 75% der Trennstrecke äusserst schwierig zuzuordnen sind. Zudem gibt es bei sehr grossen Molekülen das Problem, dass sie zum Teil am Auftragungspunkt der Probe präzipitieren, d.h. gar nicht erst in das Gel einwandern.

Die folgenden Daten wurden aus den Datenbanken Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>), TrEmbl (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) und aus gedruckten Werken von Neidhard (Neidhardt, 1996) und Wittmann/Kaltschmitt (Kaltschmidt, 1971; Wittmann, 1982) gesammelt. Sofern sich die Angaben zu den Proteinen in den vorliegenden Quellen unterschieden, wurde entweder der aufgrund experimenteller Ergebnisse wahrscheinlichere Wert angenommen, oder ein Mittelwert gebildet. Im Regelfall variierten die pI-Werte für ein Protein aber nicht mehr als um 0.4 Einheiten und das Molekulargewicht um nicht mehr als 3kD. Eine Angabe der Daten auf mehrere Kommastellen genau ist somit hinfällig. Für eine spätere Calibrierung im Gel stellen diese Abweichungen jedoch ein gravierendes Problem dar (s.u.).

Bei allen genannten Werten handelt es sich ausschliesslich um *Escherichia coli* Daten. Die theoretische Erfassbarkeit, bezüglich MW und pI, bezieht sich auf Standard 2DE-Gele mit 13%T und pH3-10.

7.1.1. Translationsfaktoren

Die Funktionen der Translationsfaktoren wurden in Abschnitt 3.2. zusammengestellt und erläutert.

Sämtliche Initiationsfaktoren können aufgrund ihrer ausserordentlichen Grösse oder extremen pI-Wertes nicht auf Standard-2DE Gelen identifiziert werden. Zudem liegen sie, ebenso wie die Terminationsfaktoren, nur in wenigen Kopien pro Zelle vor, denn pro neu synthetisierter Polypeptidkette wird nur je ein Set dieser Faktoren benötigt. Um diese Faktoren also mittels 2DE im zellfreien Extrakt nachweisen zu können, müsste man spezielle Anreicherungsverfahren anwenden. Elongationsfaktoren jedoch sind *in vivo* sehr prominent,

da pro translatiertem mRNA Triplet ein Set an Elongationsfaktoren benötigt wird. EF-Tu ist sogar das meist exprimierteste Protein in *E.coli* überhaupt. Somit liegen Elongationsfaktoren auch im zellfreien Lysat in ausreichender Konzentration vor, so dass sie in einem 2DE Gel nachgewiesen werden können. Hier stellt sich jedoch das Problem, dass sie aufgrund verschiedener Modifizierungen und/oder Trunkierungen auf mehrere Spots verteilt vorkommen.

Tabelle 7.1: Translationsfaktoren von E.coli und ihre Detektierbarkeit in 2DE.

Protein	pI	MW (kD)	Bereits in 2DE Datenbank	Identifiziert in dieser Arbeit	Theoretisch erfassbar	Bemerkungen
IF-1	9.2	8	-	-	-	zu basisch zu klein
IF-2	5.8	97	-	-	-	zu gross
IF-3	9.5	20	-	-	-	zu basisch
EF-Tu	5.3	44	+	+	+	Verschiebung durch posttranslationale Modifizierungen
EF-Ts	5.2	32	+	+	+	Verschiebung durch posttranslationale Modifizierungen
EF-G	5.2	76	+	-	+	
RF-1	5.1	40	-	-	+	geringe Kopienzahl
RF-2	4.6	41	-	-	+	geringe Kopienzahl
RF-3	5.6	59	-	-	+	geringe Kopienzahl
RRF	6.2	21	+	+	+	

+: ja

-: nein

?: unsicher

7.1.2. tRNA-Synthetasen

tRNA-Synthetasen werden auch als tRNA-Ligasen bezeichnet und sind für eine jeweilige Aminosäure absolut spezifisch. Aufgrund dieser Spezifität wird in der folgenden Tabelle 7.2 nur die Aminosäure mit ihrer Standardabkürzung angegeben, um das Enzym zu charakterisieren.

Tabelle 7.2: tRNA-Synthetasen von E.coli und ihre Erfassbarkeit in 2DE-Gelen.

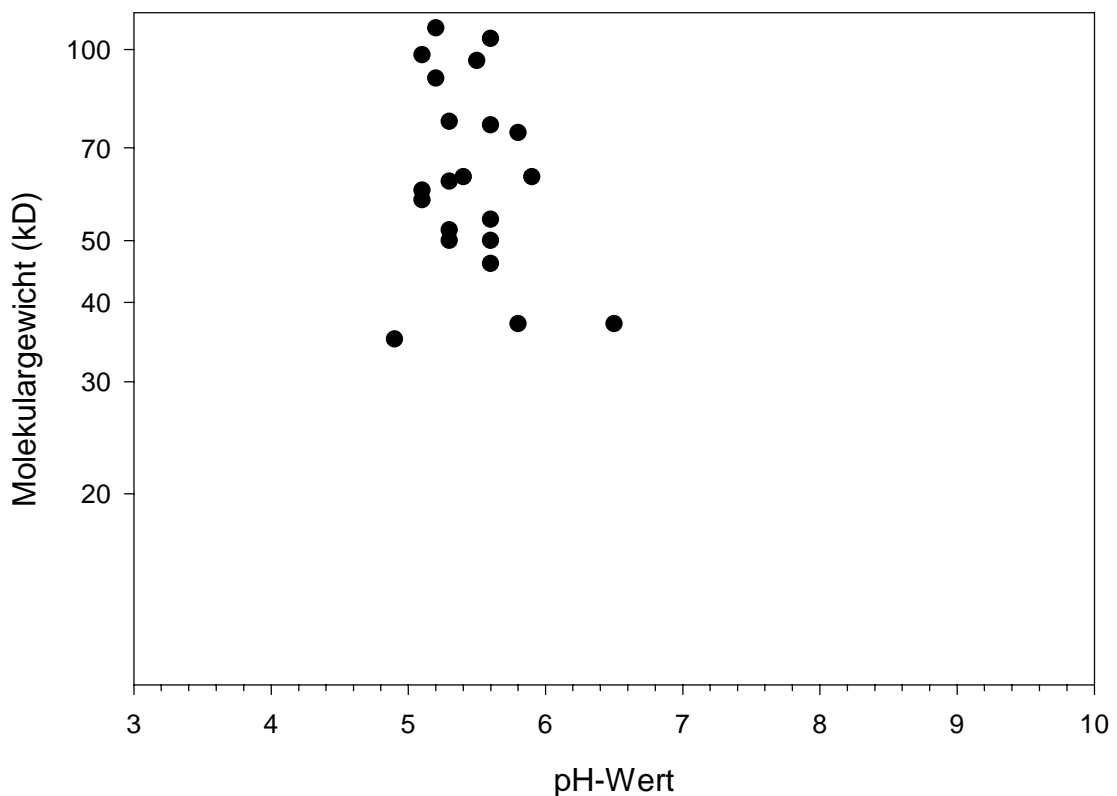
tRNA-Ligase	pI	MW (kD)	Bereits in 2DE Datenbank	Identifiziert in dieser Arbeit	Theoretisch erfassbar	Bemerkungen
Ala	5.5	96	+	-	?	Homotetramer
Cys	5.3	52	-	-	+	Monomer
Asp	5.4	63	+	-	+	Homodimer
Glu	5.6	54	-	-	+	Monomer
Phe	5.8	37	+	-	+	Heterotetramer
α-chain						
Phe	5.2	90	+	-	?	Heterotetramer
β-chain						
Gly	4.9	35	-	-	+	Heterotetramer
α-chain						
Gly	5.3	77	-	-	+	Heterotetramer
β-chain						
His	5.6	50	+	-	+	Homodimer
Ile	5.6	104	-	-	-	Monomer
Lys	5.1	58	+	-	+	Homodimer
Leu	5.1	98	+	-	-?	Monomer
Met	5.6	76	+	-	+	Homodimer
Asn	5.2	39-93?	+	-	?	Homodimer
?						
Pro	5.1	60	+	-	+	Homodimer
Gln	5.9	63	+	-	+	Monomer
Arg	5.3	62	+	-	+	Monomer
Ser	5.3	50	+	-	+	Homodimer
Thr	5.8	74	-	-	+?	Homodimer
Val	5.2	108	-	-	-	Monomer
Trp	6.5	37	-	-	+	Homodimer
Tyr	5.6	46	+	-	+	Homodimer

+: ja

-: nein

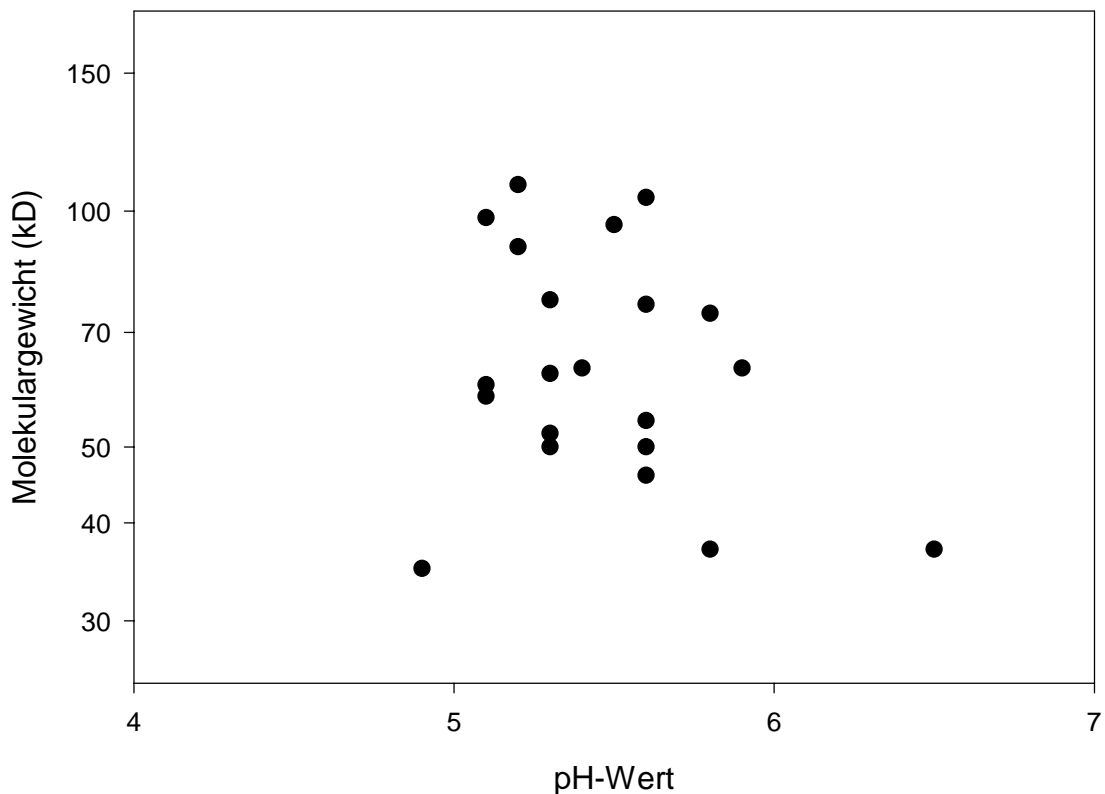
?: unsicher

20 tRNA-Synthetasen (eine für jede natürliche Aminosäure) verteilen sich auf 22 Proteine: die Ligasen für Phenylalanin und Glycin besitzen je 2 alpha und 2 beta-Untereinheiten. Die Daten für die Asparagin-tRNA-Synthetase sind mit grösster Unsicherheit behaftet, da ihr Molekulargewicht, je nach Quelle und Nachweisart, von 39-93kD schwankt. Da sich alle Angaben sehr auffällig zwischen pH-Werten zwischen fünf und sechs bewegen und die Molekulargewichte in der Regel eher höher sind, wurde ein "virtuelles" 2DE Bild angefertigt, welches die Lage der tRNA-Synthetasen anhand der angenommenen Koordinaten im 13%T und pH 3-10 Standardgel zeigt (Figur 7.1).



Figur 7.1: "Virtuelles" (berechnetes) 2DE Bild mit 21 von 22 tRNA Synthetase-Proteinen und ihrer vorausgesagten Lage in einem Standardgel mit 13%T und pH 3-10. Die Ligase für Asparagin wurde aufgrund der Datenunsicherheit nicht berücksichtigt. Spots über 70kD lassen sich in diesem Bereich zwar theoretisch darstellen, sind aber in der Praxis wegen der verringerten Auflösung sehr schwer bis gar nicht nachzuweisen.

Anhand des virtuellen 2DE Gels lässt sich bereits abschätzen, dass man für eine spezifische Suche nach tRNA-Synthetasen im zellfreien Lysat ein Gel benützen sollte, welches den pH-Wert zwischen 4 und 7 zoomt und grössere Proteine auf Kosten von den kleineren besser auftrennt. Für diese Aufgabe lässt sich ein 10,2%T-Gel heranziehen, welches wie in Figur 7.2 berechnet aussehen sollte.



Figur 7.2: Virtuelles 2DE-Gel mit 10,2%T und pH 4-7. Der Bereich mit den Spots der tRNA-Ligasen ist gegenüber einem Standardgel herausgezoomt. Die Zone über 100kD, welche in diesem Gel schwer aufzulösen ist, interessiert nicht mehr, da sich nun fast alle Spots darunter befinden.

Im Vergleich mit einem Standardgel ist bei einem solchen, für die spezielle Anwendung massgeschneiderten 2DE Gel, eine deutliche Verbesserung der Auflösung zu erkennen. Zur praktischen Durchführung siehe Kapitel 11.

7.1.3. Ribosomale Proteine

Die Molekulargewichte und pI-Werte für alle ribosomalen Proteinen von *Escherichia coli* sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Proteine der 30S Untereinheit tragen das Präfix S (small), während Komponenten der 50S Untereinheit mit L (large) bezeichnet sind.

Tabelle 7.3: Ribosomale Proteine mit ihren pI und MW-Werten. Nur vier der 55 Proteine sind in 2DE Datenbanken erfasst. In dieser Arbeit konnten drei identifiziert werden, davon ist Protein L10 noch nicht in 2DE Datenbanken vorhanden. Nur sieben aller 55 ribosomalen Proteine könnten bei ausreichender Konzentration überhaupt sicher nachgewiesen werden. Alle anderen liegen ausserhalb des Erfassungsbereiches der 2DE Gele.

Protein	pI	MW (kD)	Bereits in 2DE Datenbank	Identifiziert in dieser Arbeit	Theoretisch erfassbar	Bemerkungen
S1	<7.6	61	+	+	+	
S2	6.7	27	-	-	+	
S3	12	26	-	-	+	
S4	10.4	23	-	-	-	zu basisch
S5	~10	17	-	-	-	zu basisch
S6	4.9	15	-	-	+	
S7	12.2	19	-	-	-	zu basisch
S8	9.1	14	-	-	?	zu basisch
S9	>12	14	-	-	-	zu basisch
S10	7.9	12	-	-	-	zu klein
S11	>12	14	-	-	-	zu basisch
S12	>12	13	-	-	-	zu klein zu basisch
S13	>12	13	-	-	-	zu klein zu basisch
S14	>11	11	-	-	-	zu klein zu basisch
S15	>12	10	-	-	-	zu klein zu basisch
S16	11.6	9	-	-	-	zu klein zu basisch
S17	9.7	9	-	-	-	zu klein zu basisch
S18	>12	9	-	-	-	zu klein zu basisch
S19	>12	10	-	-	-	zu klein zu basisch

S20	>12	9	-	-	-	zu klein zu basisch
S21	>12	8	-	-	-	zu klein zu basisch
L1	9.2	24	-	-	?	zu basisch
L2	>12	30	-	-	-	zu basisch
L3	9.7	22	-	-	-	zu basisch
L4	7.6	22	-	-	+	
L5	9.4	20	-	-	?	zu basisch
L6	10	19	-	-	-	zu basisch
L7	4.8	12	-	-	?	zu klein
L8	6.3	?	-	-	?	
L9	6.4	16	+	+	+	
L10	9.0	17	-	+	+	
L11	9.7	15	-	-	-	zu basisch
L12	4.9	12	-	-	?	zu klein
L13	10.1	16	-	-	-	zu basisch
L14	12.3	13	-	-	-	zu klein zu basisch
L15	>12	15	-	-	-	zu basisch
L16	>12	15	-	-	-	zu basisch
L17	>11	14	-	-	-	zu basisch
L18	12	13	-	-	-	zu klein zu basisch
L19	>12	13	-	-	-	zu klein zu basisch
L20	>12	13	-	-	-	zu klein zu basisch
L21	8.2	11	-	-	-	zu klein
L22	11.5	12	-	-	-	zu klein zu basisch
L23	9.6	11	-	-	-	zu klein zu basisch
L24	10.7	11	-	-	-	zu klein zu basisch
L25	9.4	11	-	-	-	zu klein zu basisch
L26	?	9	-	-	-	zu klein
L27	>12	9	-	-	-	zu klein zu basisch
L28	?	9	-	-	-	zu klein
L29	10	7	-	-	-	zu klein zu basisch
L30	>12	6	-	-	-	zu klein

L31	?	7	-	-	-	zu basisch zu klein
L32	11.3	6	-	-	-	zu klein zu basisch
L33	>12	6	-	-	-	zu klein zu basisch
L34	?	5	-	-	-	zu klein

+: ja
-: nein
?: unsicher

Die vorgelegten Daten zeigen sehr deutlich, dass eine Auftrennung und Identifizierung eines Grossteils der ribosomalen Proteine auf 2DE Gelen nur mit speziellen Vorbereitungen zu erreichen wäre. Dazu gehört nicht nur die Anwendung spezieller Gele mit besonders basischen pH-Gradienten, sondern spezielle Behandlungsmethoden der ersten Dimension, um die besonders starken Auswirkungen des endosmotischen Drifts auf basische Proteine zu verringern und somit die Reproduzierbarkeit zu erhöhen (Gorg, 1999; Gorg *et al.*, 1997). Da basische Proteine aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften besonders schwer löslich sind, werden extreme Methoden zur Probenvorbereitung angewendet, um solche Moleküle zweidimensional darstellen zu können (Herbert, 1999; Molloy *et al.*, 1998; Molloy *et al.*, 1999). Proteine mit weniger extremen Parametern überstehen diese Prozeduren meist nicht unbeschadet, so dass sie weder vollständig, und auch nur noch ohne Modifizierungen, nachgewiesen werden können.

31 ribosomale Proteine sind zudem kleiner als 13kD und liegen damit unter der Aufsöschungsgrenze eines 2DE Gels. Knapp die Hälfte davon, nämlich 14 Proteine, sind sogar kleiner als 10kD. Da die Ausschlussgrenze der Ultrafiltrationsmembran, die in den meisten kontinuierlichen oder semi-kontinuierlichen Reaktoren eingesetzt wird, genauso wie in der Entsalzung während der Probenvorbereitung für die Elektrophorese, eben 10kD beträgt, ist davon auszugehen, dass diese Proteine bereits vor der Auftrennung aus dem Lysat verlorengehen. Aus genannten Gründen wäre es daher nicht sinnvoll, im Rahmen der zellfreien Proteinbiosynthese eine spezielle und offenbar sehr aufwendige Verfahrensweise zum Nachweis der ribosomalen Proteine anzuwenden. Die zur Verfügung stehenden Methoden würden indes nicht nur die Reproduzierbarkeit des Spot-Musters herabsetzen, sondern das dargestellte Muster würde u.U. auch nicht mehr den tatsächlichen Zustand der Proteine im Lysat reflektieren. Siehe auch Publikation I (Schindler *et al.*, 1999c).

7.2. Identifizierung von Proteinen

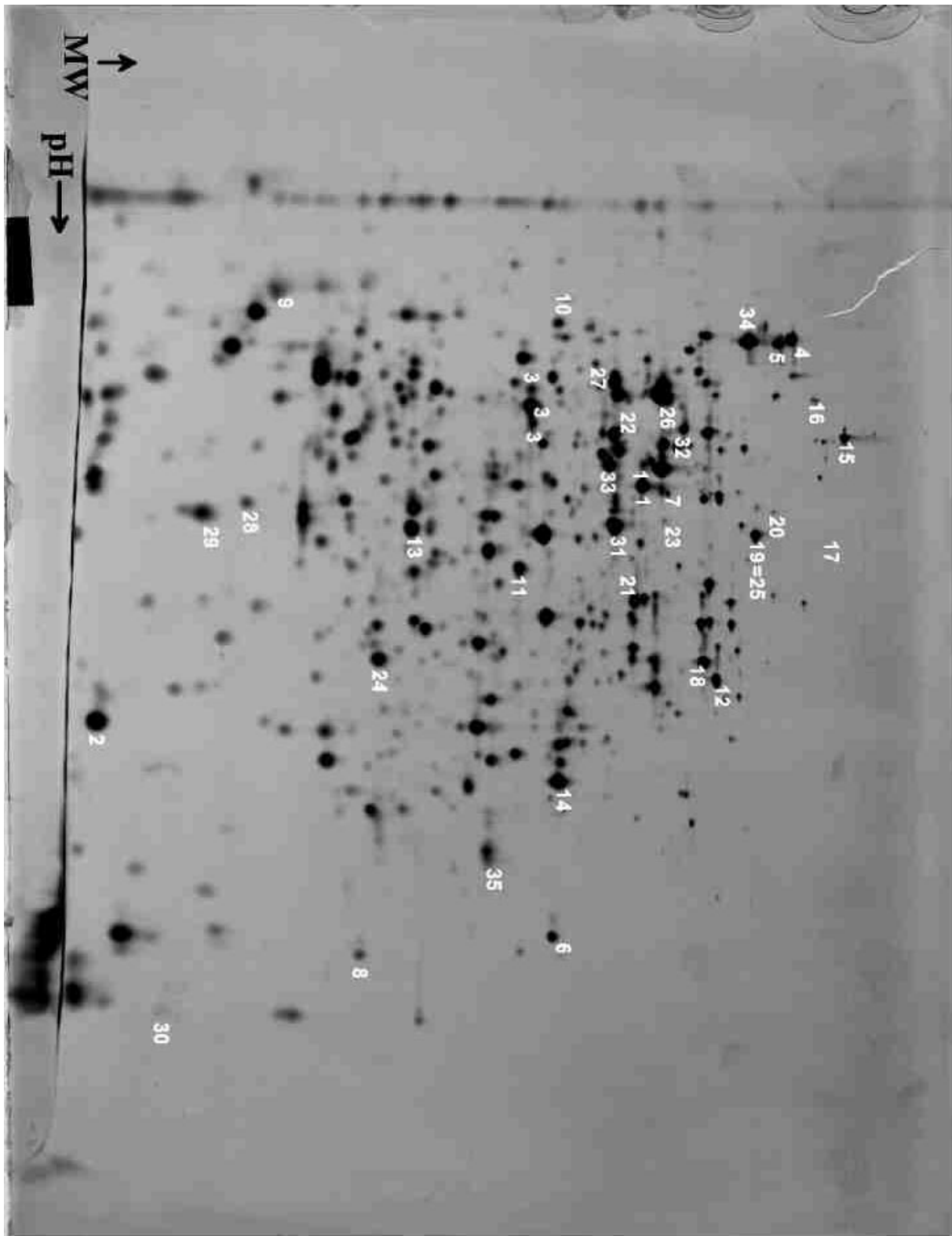
Zur sicheren Identifizierung wurden Proteinspots aus 2DE Gelen eluiert, bzw. aus Western-Blots extrahiert, welche aufgrund ihrer Koordinaten entweder als Schlüsselproteine für die Proteinbiosynthese in Frage kamen oder ein auffälliges Verhalten während der Reaktion zeigten, z.B. besonders schnell abgebaut wurden, bzw. offensichtlich ihre Modifizierungen änderten. Das ribosomale Protein L9, EF-Tu und EF-Ts, sowie GroEL konnten mit Edman-Abbau N-terminal sequenziert werden. EF-Tu war N-terminal blockiert, so dass dieses Protein vor der Sequenzierung chemisch deblockiert werden musste (Bergman *et al.*, 1996). Trotzdem diese Spots im Gel sehr prominent waren, reichte die Menge an Protein gerade aus, um jeweils die ersten 8-12 Aminosäuren zu identifizieren. Das genügte jedoch, um in der Datenbank SwissProt diese Anfangssequenz dem entsprechenden Protein eindeutig zuzuordnen zu können.

Alle anderen Proteine, ebenso nochmals EF-Tu und EF-Ts als Kontrolle, wurden über Fingerprint im Massenspektrometer identifiziert. Das erhaltene Spektrum nach einem tryptischen Verdau wurde mit dem Programm PeptIdent auf dem ExPasy-Server (<http://www.expasy.ch>) mit Daten bekannter Proteine in SwissProt und TrEMBL verglichen. Obwohl das Genom von *E.coli* vollständig bekannt ist, konnten auf diese Weise nur rund 90% der Proteinspots eindeutig identifiziert werden. Zum einen reicht manchmal die Konzentration des Proteins im Spot für eine Fingerprint-Analyse nicht vollständig aus. In solchen Fällen wäre eine aufwendigere Analyse von PSD-Spektren (Post-Source-Decay) notwendig, die aber aus Kostengründen hier nicht durchgeführt werden konnte. Zum anderen enthält ein Spot unter Umständen mehrere Proteine oder deren Fragmente, zum Teil auch Verunreinigungen mit humanem Keratin, welches sich als Staub in der Luft und auf Laborgeräten befindet und in den Gelen ablagert. Beinhaltet ein Fingerprint jedoch Massen von mehreren Proteinen, lassen sich die Spektren nicht mehr trennen (ausser mit PSD) und getrennt voneinander identifizieren. Dazu kommt, dass ein tryptischer Verdau, der vor einem Massenfingerprint durchgeführt wurde, um definierte Fragmente zu erhalten, nie vollständig abläuft. Das bedeutet, dass manche Polypeptide nicht gänzlich verdaut sind, während andere bereits unspezifisch gespalten worden sind. Das Durchschnittsergebnis an Fragmenten in einem Spektrum, die sich Datenbankeinträgen zuordnen lassen, beläuft sich deshalb auf 20-30% (Kellner *et al.*, 1999; Wilkins *et al.*, 1997). Rund 10-15% (je nach Proteingrösse) sind ausreichend für eine eindeutige Identifizierung des entsprechenden Proteins. Aufgrund der

z.T. hervorragenden Reinheit der Proteine konnten im Rahmen dieser Arbeit bis zu 90% Trefferwahrscheinlichkeit erzielt werden.

Abhängig von der Herkunft und Vorbehandlung der auf 2DE aufgetrennten Probe, waren bestimmte Spots nicht in allen Gelen nachzuweisen. Beispielsweise ist in Figur 7.3 der Spot 17 (Methionin Synthase) nur mit seiner Position eingezeichnet. Andere Spots, z.B. N° 3 (EF-Ts), traten unter verschiedenen Reaktionsbedingungen in einer unterschiedlichen Zahl von Isoformen auf. Die fast horizontale Linie 1cm vom unteren Rand markiert die Lauffront in der zweiten Dimension. Darunter sind keine Proteine zu finden.

Der grosse schwarze "Klecks" am rechten unteren Gelrand, knapp unter der Lauffront, stellt angefärbte, degradierte Peptid-Bruchstücke dar und ist somit auch ein qualitativer Indikator für das Mass an proteolytischen Aktivitäten vor und während der elektrophoretischen Analyse. Die unterbrochene vertikale Linie am linken und damit sauren Gelrand ist auf das Präzipitieren von Proteinen am Auftragungspunkt der Probe für die erste Dimension zurückzuführen. Da diese unlöslichen Proteine unterschiedliche Grössen haben und trotz ihrer Ausfällung in der ersten Dimension zum Teil mit der zweiten Dimension laufen, entsteht eine Art Linie. Diese stellt ebenfalls einen qualitativen Indikator für die Löslichkeit der Proteine im System dar. Die Ebenmässigkeit und der rechte Winkel zwischen dieser Präzipitatlinie und der Lauffront zeigen die Qualität des SDS-Geles der zweiten Dimension: sind die Linien schief oder gewellt ist das SDS-Gel meist nicht homogen auspolymerisiert und die Reproduzierbarkeit der gesamten Analyse fragwürdig.



Figur 7.3: Standard-2DE Gel mit 13%T und 2.6%C, pH 3-10 nicht-linear, mit den nummerierten Positionen aller über Sequenzanalyse eindeutig identifizierten Spots. Die zugehörigen Proteine sind in der nachfolgenden Tabelle 7.4 dargestellt.

Tabelle 7.4: Namen und Daten der Proteine aus Figur 7.3, welche über Sequenzanalyse identifiziert werden konnten. Der Spot N°6 wurde einer Peptidsequenz zugeordnet, für welche noch keine Proteinaktivität bekannt ist. Die in Klammern gesetzten Werte zeigen auf eine sehr grosse Diskrepanz zwischen den für dieses Protein erwarteten Parametern und der Position im 2DE Gel (Figur 7.3) hin, so dass es sich in jedem Fall nur um ein Teilpeptid des identifizierten Proteins handelt. Die angegebenen Daten stammen aus Datenbanken und der jeweiligen Literatur und sind an sich fehlerbehaftet (s.u.).

N°	PROTEIN	pI	MW (kD)
1	Elongation Factor TU	5.3	44
2	50S Ribosomal Protein L9	6.2	16
3	Elongation Factor TS	5.2	30
4	DnaK Protein	4.7	69
5	30S Ribosomal Protein S1	4.9	67
6	ECAE242_4	10	38
7	Gamma Glutamyl Phosphatase	5.8	44
8	Hypothetical 24kD Protein	10.2	24
9	Colicin 1A Protein	(9.9)	(69)
10	Spermidin/Putrescin Binding Periplasmic Protein	5.1	39
11	Excinuclease ABC Subunit	5.7	(76)
12	Inosine-5-Monophosphate DH	6.2	52
13	Triosephosphate Isomerase	5.6	27
14	Glycerin Aldehyde-3-Phosphate DH	7.1	35
15	Aconitate Hydratase 2	5.2	76
16	=15		
17	Methionin Synthase	5.6	84
18	Isopropylmalat Dehydratase	5.9	50
19	Dihydroxy-Acid Dehydratase	5.3	64
20	Glucosamin Fructose-6-Phosphat Aminotransferase	5.6	66

21	Acetylmethionin Aminotransferase	5.8	44
22	Leu/Ile/Val Binding Protein	5.5	39
23	Sigma-70 Faktor Fragment		
24	Arginine-Binding Periplasmic Protein 2	(6.8)	27
25	Dihydroxy-Acid Dehydratase	5.3	64
26	Isoitrat Dehydrogenase (NADP)	5.1	46
27	Histidinol-Phosphat Aminotransferase	5.0	39
28	Single Strand Binding Protein	5.4	19
29	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase B	5.5	18
30	Ribosomales Protein L10	9.0	17
31	Aspartat Aminotransferase	5.5	43
32	Argininosuccinate Synthetase	5.2	50
33	Phosphoserine Aminotransferase	5.4	40
34	GroEL Protein	4.9	57
35	Amino-Acid ABC Transporter Binding Protein	8.6	33

7.3. Calibrierungen in zweidimensionalen Gelen

Die Festlegung der Koordinaten in einem 2DE Gel ist schwierig, da die Abbildung des Proteoms im 2DE Gel den eingefrorenen Zustand eines dynamischen Systems reflektiert. Eine definitive Bindung determinierter Proteine an bestimmte pH und/oder MW-Werte würde der Dynamik nicht gerecht und sogar die Brauchbarkeit der gesamten Methodik in Frage stellen. Dennoch und gerade auch wegen der vielfältigen Bewegungen im Proteom müssen sogenannte "Landmarks" definiert werden: Proteinspots, die möglichst in allen Proben kontinuierlich nachzuweisen und über das Gel verteilt sind. Sie erlauben die Zuordnung von pH und MW-Daten anderer Spots im Gel, vorausgesetzt ihre eigenen Daten sind bekannt und variieren nicht zu stark. Grundsätzlich gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, die Achsen des Koordinatensystems (bestehend aus der X-Achse: pH-Wert und der Y-Achse: Molekulargewicht) in einem zweidimensionalen Gel zu definieren.

7.3.1. Molekulargewichtsmarker

Molekulargewichtsmarker werden für eindimensionale PAGE standardmässig zur Definition des MWs verwendet. In einem 1DE Gel können bis zu einem Dutzend Proben parallel aufgetragen werden, u.a. auch ein Marker, während ein zweidimensionales Gel immer nur Kapazität für eine einzige Probe bietet. Sollen Molekulargewichtsmarker in der 2DE zur Anwendung kommen, können sie also nicht zusammen mit der Probe gestartet werden, sondern müssen nachträglich, zu Beginn der zweiten Dimension, eingeführt werden. Aufgrund der dadurch entstandenen unterschiedlichen Vorgeschichte der Proteine in der Probe und im Marker kommt es zu schwer reproduzierbaren Verschiebungen der eigentlichen Koordinaten gegeneinander. Weiteren Einfluss hat die Positionierung des SDS-Markers an den extremen Aussenseiten der Gele (da sich in der Mitte des Gels die Probe befindet): der sogenannte "Smile-Effekt" resultiert u.U. in Verzerrungen der Markerproteine nach unten. Dazu kommt, dass Molekulargewichtsmarker normalerweise in 1DE Gelen mit Trennstrecken bis zu 10cm eingesetzt werden. Lässt man sie jedoch in 2DE Gelen über die (mindestens) doppelte Trennstrecke laufen, werden einige Banden so zerlaufen, dass sie nicht mehr zu erkennen und zuzuordnen sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SDS-Molekulargewichtsmarker eine äusserst ungenaue Methode zum Calibrieren von 2DE Gelen darstellen und damit nur eine grobe Einteilung der Grössen erfolgen kann. Die Calibrierung der X-Achse pH-Wert ist mit dieser Methode nicht möglich.

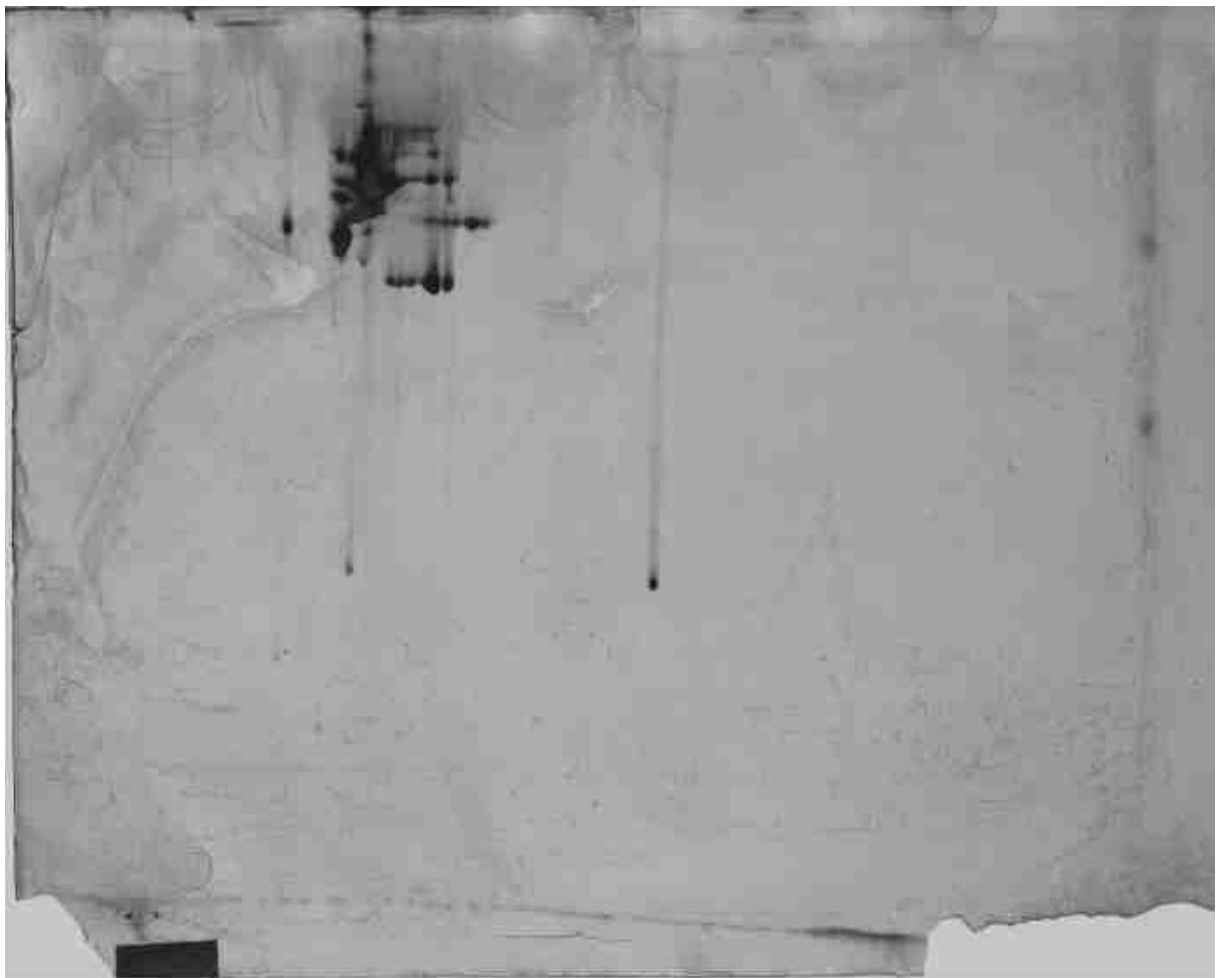
7.3.2. IEF-Marker

Für Isoelektrische Fokussierungen gibt es Marker, die aus jeweils einem bestimmten Protein abgeleitet wurde, welches durch chemische Modifizierungen, z.B. Carbamylierungen, unterschiedliche isoelektrische Punkte besitzt. Für eine de-novo Bestimmung von unbekanntem pH-Werten in einem Proteom ist die Anwendung solcher Marker nicht geeignet, da die Reihe von Spots, welche die verschiedenen Isoformen darstellen, zwar in ihren Differenzen definiert ist, jedoch nicht in ihren Anfangs- und Endpunkten. So lässt sich z.B. festlegen, dass zwischen zwei Spots eine Differenz von beispielsweise 0.1pH Einheiten liegt, aber nicht, ob sie bei pH 5 oder pH 6 vorkommen. Dazu kommt, dass diese IEF-Marker entweder auf ein separates 2DE Gel aufgetragen werden müssten, d.h. die Übertragung der

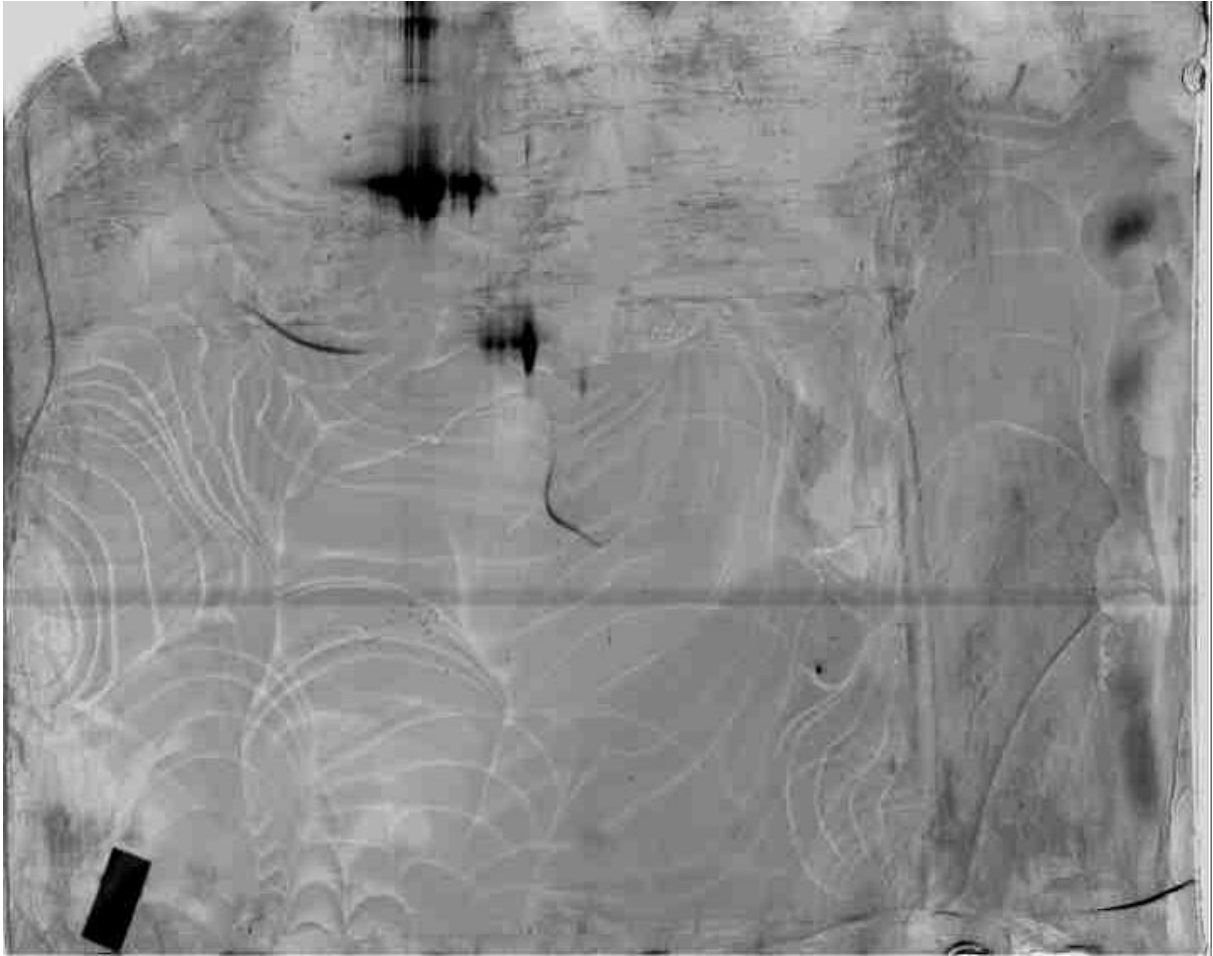
daraus gewonnenen Informationen auf ein Gel mit Probe fehlerträchtig ist, oder vom Proteinmuster im 2DE Gel überlagert werden.

7.3.3. Gereinigte Proteine als Standards

Da die Verwendung von Markern aus dem eindimensionalen Bereich für die 2DE wegen der diskutierten Gründe problematisch ist, wurde versucht, gereinigte Proteine als Landmarks in das Proteinmuster einzufügen. Das Ziel war dabei, über die Position und mit Hilfe der bekannten Daten der gereinigten Proteine, den entsprechenden Spot im 2DE Muster ausfindig zu machen und zugleich anderen Proteinen Koordinaten zuweisen zu können und damit deren Identifizierung zu erleichtern. Die folgenden beiden Gele zeigen zwei Beispiele von Auflösungen gereinigter Proteine auf 2DE.



Figur 7.4: Der hochgereinigte Elongationsfaktor G aus Escherichia coli (A. Spirin, Institute for Protein Research, Puchino, Russland): pI 5.2, 76kD.



Figur 7.5: Kommerziell erhältliche, gereinigte Acetatkinase (EC 2.7.2.1) aus Escherichia coli (Roche Molecular Diagnostics, Penzberg): pI 5.9, 43kD.

Aus den gezeigten Beispielen in den Figuren 7.4 + 7.5 wird deutlich, dass sich gereinigte Proteine nicht als Landmarks für 2DE Gele verwenden lassen. Unterschiedlich grosse Fragmente dieser Proteine, welche zudem jeweils mehrere Isoformen aufweisen, lassen eine Festlegung von Koordinaten nicht zu. Bei kommerziell erhältlichen Enzymen befinden sich z.T. noch Stabilisatoren in der Proteinfraction, welche die Auftrennung beeinflussen.

7.3.4. Datenbankvergleiche

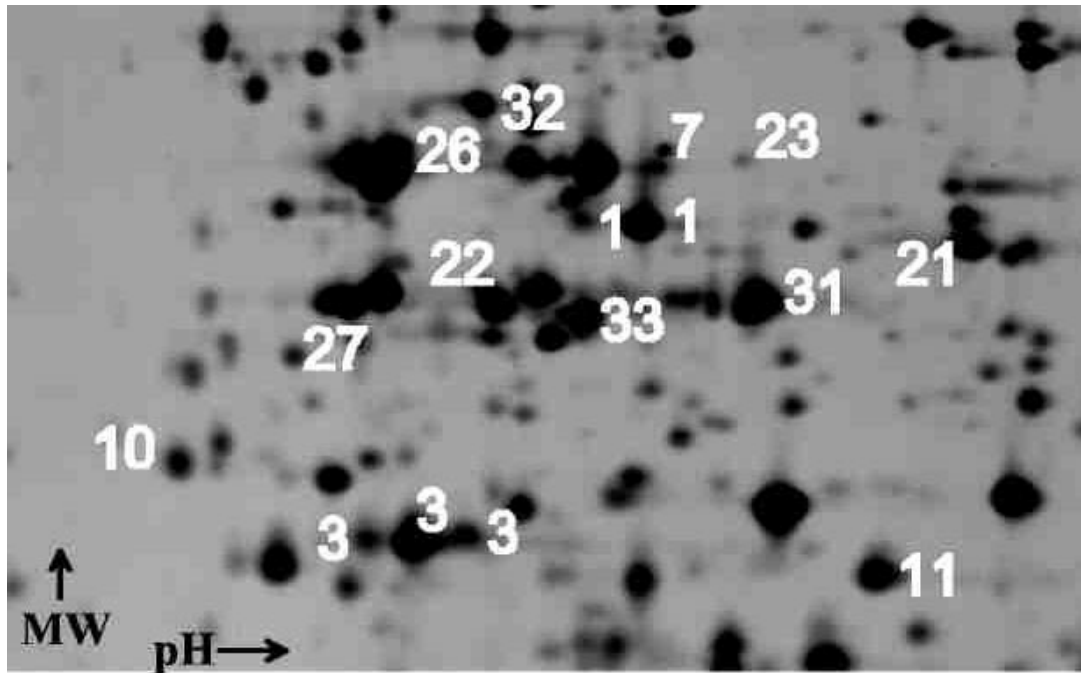
In Proteomdatenbanken des WWW sind 2DE Maps unterschiedlicher Organismen einsehbar. Identifizierte Spots sind unmittelbar mit der abrufbaren Information über das gesuchte Protein

verknüpft. Beim Versuch, eigene Gele mit denen in der Datenbank zum Zwecke der Identifizierung von Spots zu vergleichen, treten nun eine Reihe von Schwierigkeiten auf. Wie im Kapitel "Stand des Wissens: Proteomics" bereits erläutert, gibt es zunächst einmal keine allgemein gültige Standardmethode zur Durchführung der 2DE-Analytik. Je nach Zielsetzung des geplanten Experimentes werden Probenvorbereitung, erste Dimension, Equilibrierung, zweite Dimension und Färbung der Gele angepasst. Da meist auch unterschiedliche, bzw. häufig nicht nachvollziehbare pH- und MW-Gradienten Anwendung finden, lassen sich Vergleiche von 2DE Gelen aus zwei verschiedenen Laboratorien nicht durchführen.

Mit etwas Übung können allerdings gewisse markante Strukturen wie "Sternbilder" aus dem Datenbankgel auf dem eigenen Gel in verzerrter Form wiedererkannt werden. Dies ist eine sehr wertvolle Hilfe bei der groben Orientierung im Proteinmuster. Allerdings muss man bei der Bewertung der gewonnenen Informationen berücksichtigen, dass die Herkunft der Probe für das Datenbankgel unbekannt ist. Jeder Bakterienstamm weist aufgrund genetischer Polymorphismen ein anderes Proteinexpressionsmuster als ein weiterer Stamm der gleichen Art auf. Vor allem aber die physiologischen Bedingungen während des Wachstums, der Ernte- und Aufarbeitungsprozeduren beeinflussen die Lage der Proteinspots im Gel, so durch unterschiedliche Biosyntheseaktivität, fehlende oder zusätzliche Modifizierungen, Trunkierungen, Prozessierungen oder Degradation. So kann man bei Vergleichen von Proteinmustern mit Datenbankgelen einige Proteine mit der gebotenen Vorsicht zuordnen, aber nie sicher identifizieren.

7.3.5. Sequenzanalysen

Zur sicheren Identifizierung von Proteinspots in 2DE Gelen sind Sequenzanalysen in Form von N-terminaler Sequenzierung (Edman-Abbau), Massenspektrometrie oder Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung nötig. Solche Arbeiten wurden, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Eine Bestimmung der Proteine im Gel erlaubt aber erst eine Einordnung in ein Koordinatensystem, wenn die Daten eines Proteins tatsächlich mit der Lage im Gel in Einklang stehen. Beispiele für dabei auftretende Probleme, die daraus resultieren, seien anhand von Figur 7.6 erläutert.



Figur 7.6: Vergrößerter Ausschnitt aus Figur 7.3.

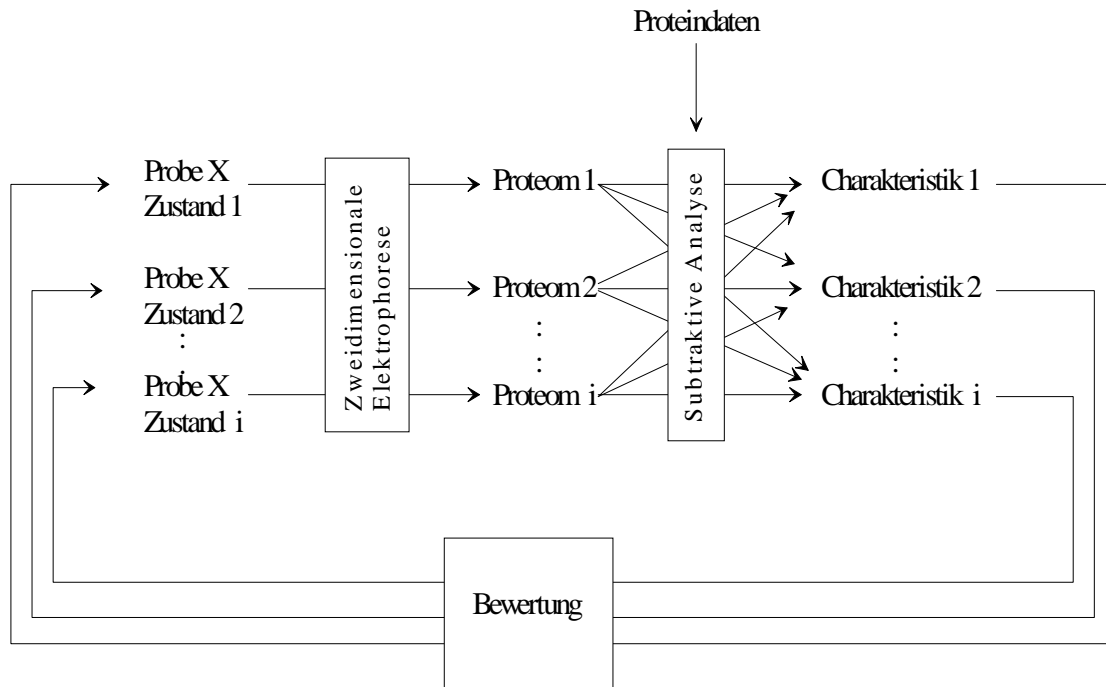
Die Proteine in den Spots mit den Nummern 1 (2x), 7 und 21 in Figur 7.6 sind gemäss den Angaben in Tabelle 7.4 44kD gross, müssten also theoretisch auf einer Horizontalen liegen. Da die Spots 32 und 26 50kD, bzw. 46 kD entsprechen und knapp über Spot 1 liegen, ist der tatsächliche 44kD Spot vermutlich die N°1. Die Spots mit den Nummern 22, 27 und 10 sind laut Datenbankangaben alle drei je 39kD schwer. Die drei Polypeptide in diesem Gel jedoch differieren um mindestens 10kD. Spot 31 und 33 sind in Übereinstimmung mit den Angaben in Tabelle 7.4 43kD, bzw. 40kD gross, so dass anzunehmen ist, dass der Spot mit der N°27 der "echte" 39kD Spot ist. Zwei weitere Probleme lassen sich an Spot N°3 verdeutlichen: die Angaben für die Grösse dieses Proteins schwanken zwischen 30 und 33kD. Da sich in der Nähe kein verlässlich zuzuordnendes Protein befindet (weder das MW von N°10 noch von N°11 kann als zuverlässig angesehen werden), kann die Angabe für die Lage in diesem Gel nicht genauer erfolgen. Der pI-Wert für den Spot N°3 wird in Datenbanken mit 5.15 angegeben. Da dieser Spot im vorliegenden Ausschnitt mit drei verschiedenen Isoformen vorliegt, kann nicht bestimmt werden, welcher der drei Spots den angegebenen pI-Wert tatsächlich besitzt.

In Figur 7.6 wurden die Probleme beim Calibrieren bereits identifizierter Proteine gezeigt: Vorhandene Daten über ein Protein können fehlerhaft sein oder für den interessierenden Fall nicht zutreffen. Eine Identifizierung über Sequenzierung erlaubt keinerlei Angaben über Trunkierungen, Prozessierungen, Modifikationen o.ä.. Erst ein relativ dichtes Netz an identifizierten Spots erlaubt eine Aussage über die Zuverlässigkeit der Angaben der Nachbarproteine. Diese Bewertungen, die das Anlegen eines Koordinatensystems erlauben, müssen aufwendig von Hand durchgeführt werden. Die derzeit verfügbare Bildbearbeitungssoftware kann nur "perfekte" Daten calibrieren: überschneiden sich Parameter von Proteinen, wie gezeigt in Figur 7.6, erscheint sofort eine Fehlermeldung und das File wird nicht weiter bearbeitet.

Aufgrund der Differenzen im vorhandenen Datenpool, der Schwierigkeit in der praktischen Reproduzierbarkeit der Gele und der vorstehend beschriebenen Probleme lassen sich Gele im optimalen Fall nur bis zu ca. 2-3kD und 0.2-0.3 pH-Einheiten genau calibrieren. Wollte man ein interessierendes Protein in einem 2DE Muster mit Hilfe dieser Calibrierung finden, könnte man nur einen groben Bereich angeben, in dem sich der gesuchte Spot vermutlich befinden sollte. Da in diesem Bereich auch viele andere Spots liegen werden, bleibt Sequenzanalyse die einzig verlässliche Möglichkeit zur Identifizierung von Proteinen in 2DE Gelen.

8. Praktischer Einsatz der 2DE in der zellfreien Proteinbiosynthese

Zur Visualisierung der Dynamik der Prozesse, die vor oder während der Reaktionen der zellfreien Proteinbiosynthese die Proteinkomponenten des Lysates betreffen, wurden unter definierten Versuchsbedingungen Proben entnommen und auf 2DE aufgetrennt. Die erhaltenen Proteinmuster wurden unter Berücksichtigung des Wissens aus der Identifizierung der Proteinspots, in einem subtraktiven Ansatz miteinander verglichen.



Figur 8.1: Vorgehensweise zur Bewertung der unterschiedlichen Zustände während der zellfreien Proteinbiosynthese.

8.1. Bewertung der Lysatherstellung

Während der Herstellung eines für die zellfreie Biosynthese vorgesehen S30 Lysates von *E.coli* (siehe Abschnitt “Methoden”) wird eine Inkubation des Rohlysates, die sogenannte Run-Off Prozedur, durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass ein Lysat ohne Run-Off keine Translationsaktivität besitzt; siehe Publikation III (Schindler *et al.*, 1999b). Unterzieht man jedoch nachfolgend das inaktive Lysat diesem Inkubations-Verfahren, findet die Biosynthese des Zielproteins GFP wieder statt. Um zu überprüfen, welche Auswirkungen der Run-Off auf die Proteinzusammensetzung im Lysat hat, wurden 2DE Gele von Lysaten jeweils vor und nach dem Run-Off angefertigt. Die folgende Bewertung nach Figur 8.1. liess den Schluss zu, dass zwischen beiden Zuständen die Beschaffenheit der Modifizierungen mancher Proteine verändert war. Deshalb wurden mit Hilfe der Methode des Immunoblots, siehe Publikation IV (Schindler *et al.*, 1999d), die Phosphorylierungen an Threonin-Resten im Proteom überprüft. Im inaktiven Zustand des Lysates, also vor dem Run-Off, waren keine Phosphorylierungen dieser Art zu erkennen, während nach der Aktivierung des Lysates durch Run-Off mehrere Phosphorylierungssignale, u.a. an für die Biosynthese essentiellen Elongationsfaktoren, gemessen wurden. Die Phosphorylierungszustände scheinen daher in ursächlichem

Zusammenhang mit der Translationsaktivität des zellfreien Lysates zu stehen. Die Einzelheiten dieser Versuche sind in Publikation V (Siemann *et al.*, 2000) ausführlich erläutert.

In Abhängigkeit von den Kultivierungs- bzw. Erntemethoden der *Escherichia coli*-Zellen und von der Art des Run-Off Verfahrens wurden Lysate mit unterschiedlicher Biosynthesekapazität erhalten. Die daraus resultierenden Proteinmuster wurden gemäss der in Figur 8.1 dargestellten Vorgehensweise analysiert. Die Ergebnisse sind in der Publikation III (Schindler *et al.*, 1999b) diskutiert.

8.2. Bewertung zellfreier Biosynthesereaktionen im Batch

Mit Hilfe von online-Messungen der Fluoreszenz des Targetproteins GFP und durch Bestimmung des Einbaus von radioaktivem ^{14}C -Leucin in synthetisiertes GFP (die Dynamik der Signale unterscheiden sich wegen der für die Reifung des GFP erforderlichen Zeit) wurde festgestellt, dass die Translation im verwendeten Batch-Format nach 50min Reaktionsdauer abbricht; siehe Publikation III und V (Schindler *et al.*, 1999b; Siemann *et al.*, 2000). Dabei wurde zusätzlich beobachtet, dass über die Zeitdauer der aktiven Synthese hinaus die Energieversorgung des Systems durch ATP und GTP gewährleistet ist und die Transkription nicht der limitierende Schritt ist, da genügend mRNA zur Translation vorhanden ist. Aus 2DE Gelen von Proben zu Beginn der Synthesereaktion, also bei $t=0$, und bei Abbruch der Reaktion, also bei $t=50\text{min}$ wurde festgestellt, dass sich nicht das Proteom selbst, sondern die Modifizierungszustände einzelner Proteine ändern. Mit Hilfe der Immunoblotmethode wurden Western-Blots von den 2DE Gelen bei $t=0$ und $t=50\text{min}$ nach Phosphorylierungen an Threonin bzw. Serin-Resten gescreent. Threonin und Serin-Phosphorylierungen wurden als Targets ausgewählt, da sie in Eukaryonten die häufigsten bekannten Modifizierungen zur Regulation der Proteinbiosynthese *in vivo* sind (Merrick, 1992; Morley, 1994; Yan *et al.*, 1998). In Prokaryonten, speziell *E.coli*, ist eine einzige Art dieser Regulation über eine Phosphorylierung an EF-Tu bisher bekannt, siehe Abschnitt 3.2. (Alexander *et al.*, 1995).

Die Ergebnisse der Immunoblotmethode zeigen, dass nicht nur diese essentielle Phosphorylierung an EF-Tu während der zellfreien Biosynthese verloren geht, sondern auch andere in die Biosynthese involvierte Proteine ihren Phosphorylierungsstatus -zum Teil dramatisch- ändern, so z.B. weitere Elongationsfaktoren, ribosomale Proteine und Chaperone.

Da die Energieversorgung und die Transkription als limitierende Faktoren bereits ausgeschlossen wurden, scheint die Änderung des Modifizierungszustandes bestimmter Proteine in ursächlichem Zusammenhang mit dem Abbruch der zellfreien Synthese zu stehen. Eine Zusammenstellung der durchgeführten Experimente und der daraus gewonnenen Resultate sind in Publikation V (Siemann *et al.*, 2000) zu finden.

8.3. Bewertung zellfreier Biosynthesereaktionen im halbkontinuierlichen Reaktor

In einem Dialyzer lässt sich eine halbkontinuierliche Reaktorführung für die zellfreie Biosynthesereaktion zur Produktion von GFP durchführen. Innerhalb eines Zeitfensters von 30 Stunden wurden sechs Proben aus dem in den Abschnitten 3.8. und 5.3. beschriebenen Dialyzer für die Proteomanalyse entnommen. Die Produktion von GFP wurde durch Fluoreszenz-Messungen verfolgt. Da der GFP Spot in den 2DE Gelen lokalisiert werden konnte, wurde durch densitometrische Intensitätsmessung (siehe Publikation I, (Schindler *et al.*, 1999c)) die Zunahme des Spots in den Gelen über der Zeit mit den Werten der Fluoreszenz-Messungen verglichen. Da über Fluoreszenz nur funktionell aktives Protein nachgewiesen werden kann, in den Gelen aber alle vollständig translatierten Polypeptide dargestellt werden, wurde die vorhandene Differenz der Ergebnisse beider Messmethoden dahingehend qualitativ gedeutet, dass nicht alle neu synthetisierten GFP-Moleküle (gleichzeitig) funktionell aktiv sind.

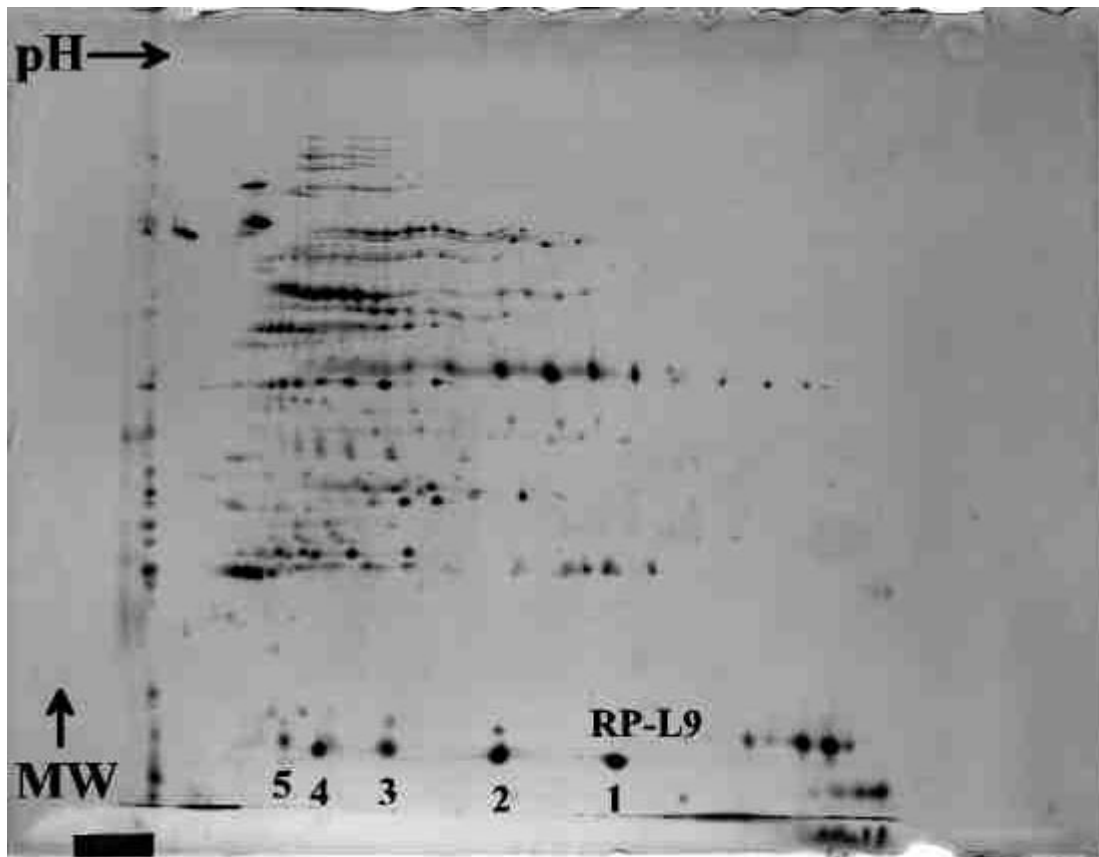
Wegen des langen Versuchszeitraumes im Dialyzer wurde die Dynamik im enthaltenen Proteom besonders gut beobachtbar: über die Zeit nimmt durch proteolytische Aktivitäten der Gesamtproteingehalt im System ab, während gleichzeitig neue, also zu einem früheren Zeitpunkt nicht lokalisierte, Spots erscheinen. Da keine Expression anderer Proteine im zellfreien System, ausser von GFP, möglich war, konnte es sich bei den neu erscheinenden Spots nur um definierte Abbauprodukte höhermolekularer Proteine oder um modifizierte Proteine handeln. Da die neuen Spots vor allem im basischen Bereich (pH 7-10) der 2DE Gele auftraten, konnte es sich kaum um Degradationsprodukte handeln, denn in diesem Fall hätten in sauren, bzw. neutralen Bereichen wesentlich mehr neue Spots hinzu kommen müssen, da die Gesamtverteilung aller Proteine ihren Schwerpunkt von pI 4-7 hat. Es ist anzunehmen, dass Modifizierungen an Proteinen -oder deren Entfernung- dazu führten, dass ursprünglich im 2DE Gel sichtbare Spots während des Ablaufes der zellfreien Reaktion durch Veränderung ihres pI-Wertes an anderen Stellen im 2DE Gel neu auftraten. Es liess sich

mittels Bildauswertung aber nicht nachverfolgen, welcher Spot das "Ausgangsmaterial" für einen neuen Spot bildete; dazu wären breit angelegte Sequenzierungen notwendig gewesen. Darüber hinaus wurde in diesen Versuchen festgestellt, dass die identifizierten Elongationsfaktoren und ribosomalen Proteine auch nach einer Versuchsdauer von 30h noch im Reaktionsansatz vorhanden waren. Die Ergebnisse der Dialyzer-Versuche sind dargestellt und erläutert in der Publikation I (Schindler *et al.*, 1999c).

8.4. Bewertung zellfreier Biosynthesereaktionen im kontinuierlich betriebenen Reaktor

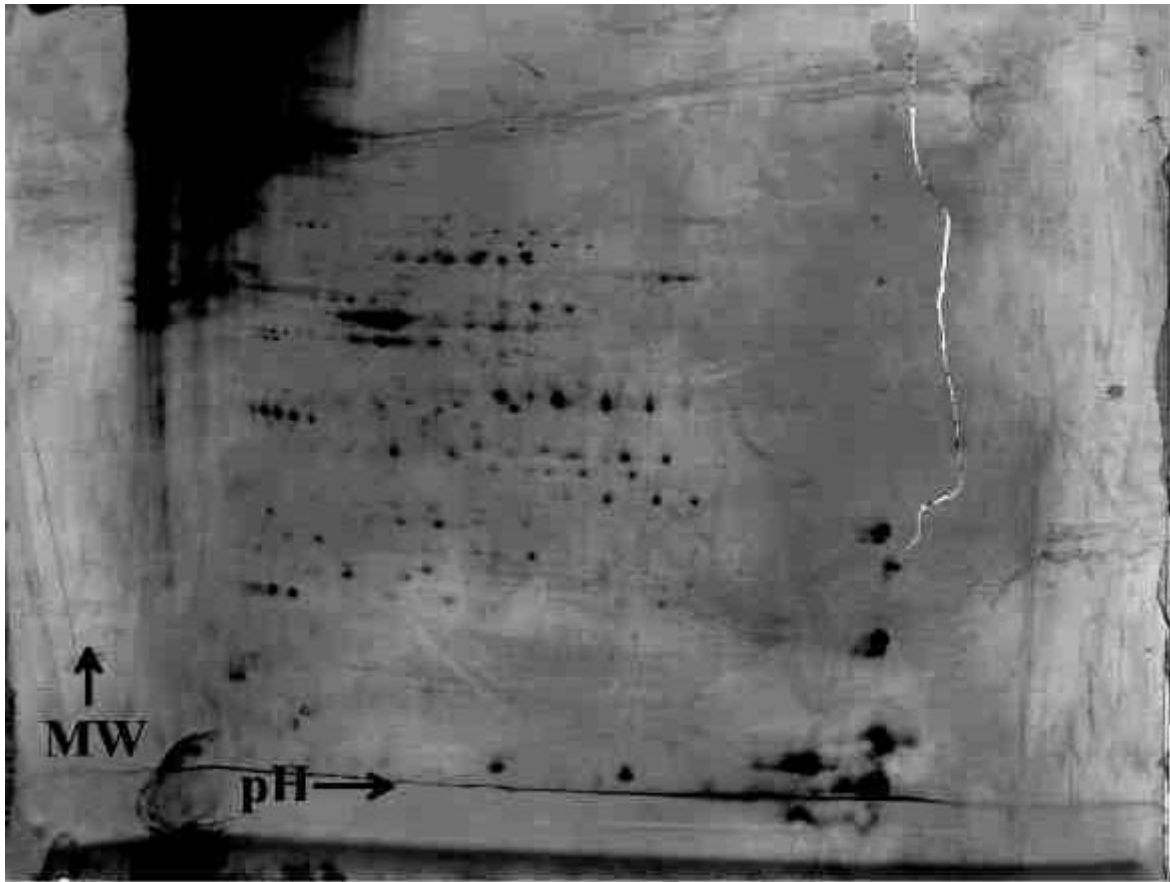
Der Inhalt eines kontinuierlich betriebenen Durchflussreaktors (CFCF, siehe Abschnitt 5) wurde nach Ablauf der Reaktionszeit von 50h auf 2DE Gelen aufgetrennt. Da sich während der Laufzeit ein Präzipitat im Reaktor abgelagert hatte, wurde dieser Niederschlag getrennt vom gelösten Reaktorinhalt elektrophoretisch analysiert. Die Versuche am CFCF wurden von Claudia Thiele im Rahmen ihrer Diplomarbeit im Jahre 1999 am IBVT durchgeführt (Thiele, 1999) und dienten vorrangig der Erforschung des Energieregenerierungssystems unter kontinuierlichen Bedingungen. Aus Kostengründen wurde deshalb auf die Zugabe von T7 Polymerase und Plasmid verzichtet, so dass im Reaktionssystem, welches im übrigen vollständig war, **keine Biosynthese** ablaufen konnte.

In Figur 8.2 sind keine definierten Spots mehr erkennbar, sondern nur noch sogenannte "Trains of Spots" (Wilkins *et al.*, 1997), also Proteine, die aufgrund chemischer Modifikationen als Reihe unterschiedlicher Isoformen erscheinen. Das Spotmuster, wie es im Lysat zu Beginn des Reaktorversuchs vorlag (vergleiche Figur 7.3) ist nicht mehr vorhanden und somit auch keine Zuordnung von Spots möglich. Durch seine exponierte Lage lässt sich allein noch das ribosomale Protein L9 (RP-L9) lokalisieren. Der ursprünglich im Lysat vorliegende Spot N°1 des RP-L9 wandert in definierten Schritten nach links, wird also zunehmend sauer (Spots N°2-5). Jedem Spot von N°2-5 entspricht die Addition von sauren Gruppen an das Protein, bzw. die Abspaltung von basischen. Obwohl die anderen Proteine im Gel nicht mehr zu identifizieren sind, zeigen sie alle die gleiche Tendenz wie RP-L9: sie driften in den sauren Bereich ab. Dass diese hochgradigen Modifikationen der Proteine während der Elektrophorese entstanden sind, z.B. durch Carbamylierungen aufgrund unsachgemäßer Anwendung von Harnstoff, wurde ausgeschlossen, da bei jedem Lauf mindestens ein Kontroll-Gel (meist ein Rohlysat) mitgeführt wurde.



Figur 8.2: Standard 2DE Gel mit 13%T und pH 3-10. 100 μ g Protein aus dem Überstand des Reaktorinhalts nach 50h Laufzeit wurden darauf aufgetrennt.

Obwohl nach Untersuchungen von Thiele (Thiele, 1999) das Energieregenerierungssystem, auf Basis der Acetatkinase und Acetylphosphat als Phosphatgruppendonor, nach 50h Betriebszeit des CFCF noch funktionsfähig war, darf man annehmen, dass bei derart prägnanten Veränderungen von Schlüsselproteinen die Proteinbiosynthese zum Erliegen kommt.



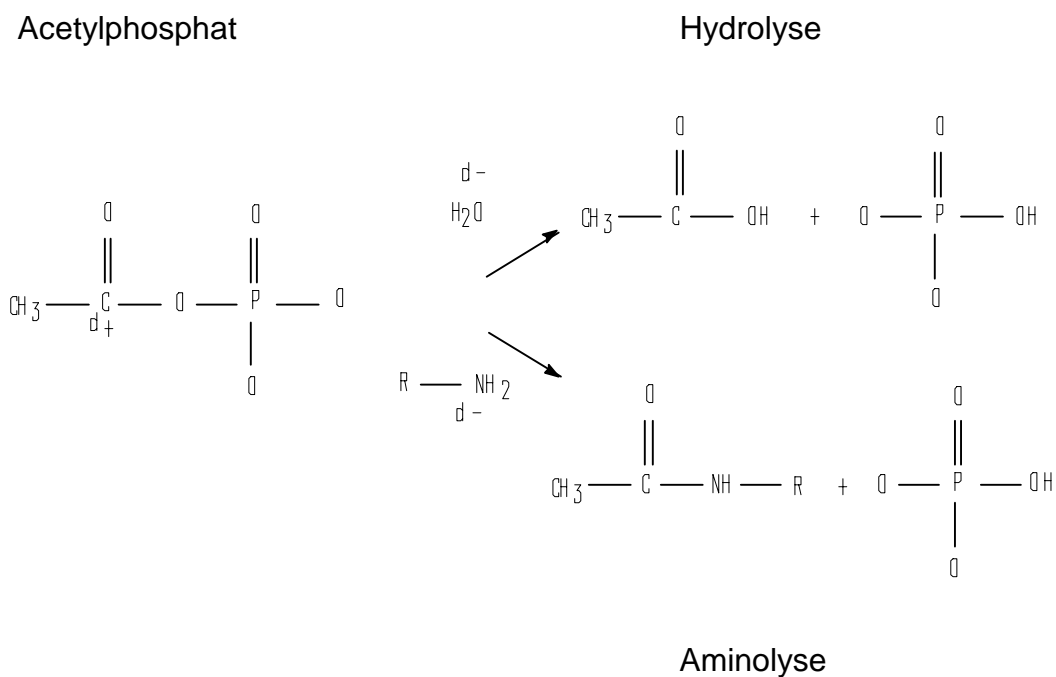
Figur 8.3: Standard 2DE Gel mit 13%T und pH 3-10. 100 μ g Protein aus dem Präzipitat des gelösten Reaktorinhalts (gezeigt in Figur 8.2) nach 50h Laufzeit wurden darauf aufgetrennt.

Da der Niederschlag sehr schwer löslich war, ist der Grossteil der Proteine am Auftragungspunkt der ersten Dimension (im Figur 8.3 links oben) ausgefallen und verursachte einen grossen verschmierten Bereich. Die wenigen Proteine, die dennoch aufgetrennt werden konnten, zeigen die gleiche Tendenz wie diejenigen im Überstand (Figur 8.2), nämlich ein Aufspalten der Proteine in immer saurer werdende Isoformen. Grundsätzlich konnte mit dieser Darstellung aber gezeigt werden, dass im Präzipitat des Reaktors Lysatkomponenten enthalten waren und damit die Vermutung von A. Spirin (Institute for Protein Research, Puchino, Russland; persönliche Mitteilung) nicht bestätigt werden, es handle sich bei solchen Präzipitaten um das reine Ausfällen von Salzen. Präzipitierte Proteine des Lysates sind in jedem Fall ihrer Funktion in der zellfreien Biosynthese entzogen.

Das Präzipitieren an sich könnte unter anderem eine Folge der starken Modifizierungen an den Proteinen sein. Weisen Proteine im System nämlich zu extreme pI-Werte auf, können sie ihren gelösten Zustand nicht mehr aufrecht erhalten und fallen schliesslich aus. Da aus den gezeigten Gelen ersichtlich war, dass es sich um Verschiebungen der pI-Werte zum Säuren

hin handelte, wurde untersucht, welche Art chemischer Modifikationen an Proteinen theoretisch möglich wären, die einen solchen Effekt bewirken würden. An Hand der bekannten Zusammensetzung des Reaktionsgemisches wurden dabei solche Modifizierungen ausgeschlossen, deren Reaktionspartner nicht im System enthalten waren.

Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen darf man vermuten, dass es sich bei den vorliegenden Modifikationen bevorzugt um Acetylierungen und/oder Phosphorylierungen handelt. Diese Annahme ist auch deshalb naheliegend, weil im Reaktionssystem zu Beginn des Prozesses 30mM Acetylphosphat vorgelegt wurde, so dass die entsprechenden chemischen oder enzymatischen Modifikationen ermöglicht werden.



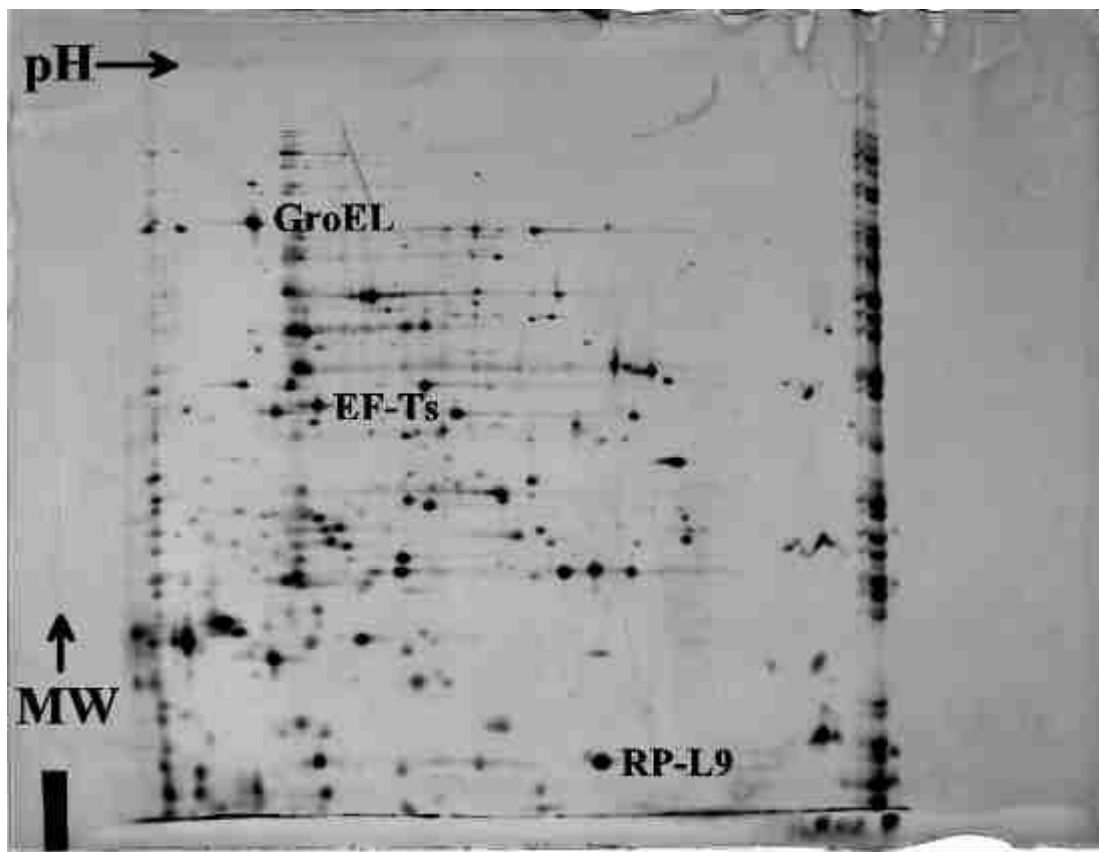
Figur 8.4: Das Molekül Acetylphosphat mit seinem elektrophilen Kohlenstoff und Reaktionsmöglichkeiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine chemische Hydrolyse (Figur 8.4) des AcP durch nukleophiles Wasser nachgewiesen (siehe Abschnitt 12.1.). Die chemisch bevorzugte Reaktion gegenüber einer Hydrolyse ist aber eine sogenannte Aminolyse (Figur 8.4), bei der die Acetylgruppe an den nukleophilen Stickstoffrest einer Aminosäure (R), z.B. Lysin oder

Arginin, bindet und eine Phosphatgruppe freisetzt. Die durch Hydrolyse oder Aminolyse freigewordene Phosphatgruppe kann ebenfalls an Aminosäurereste gebunden werden.

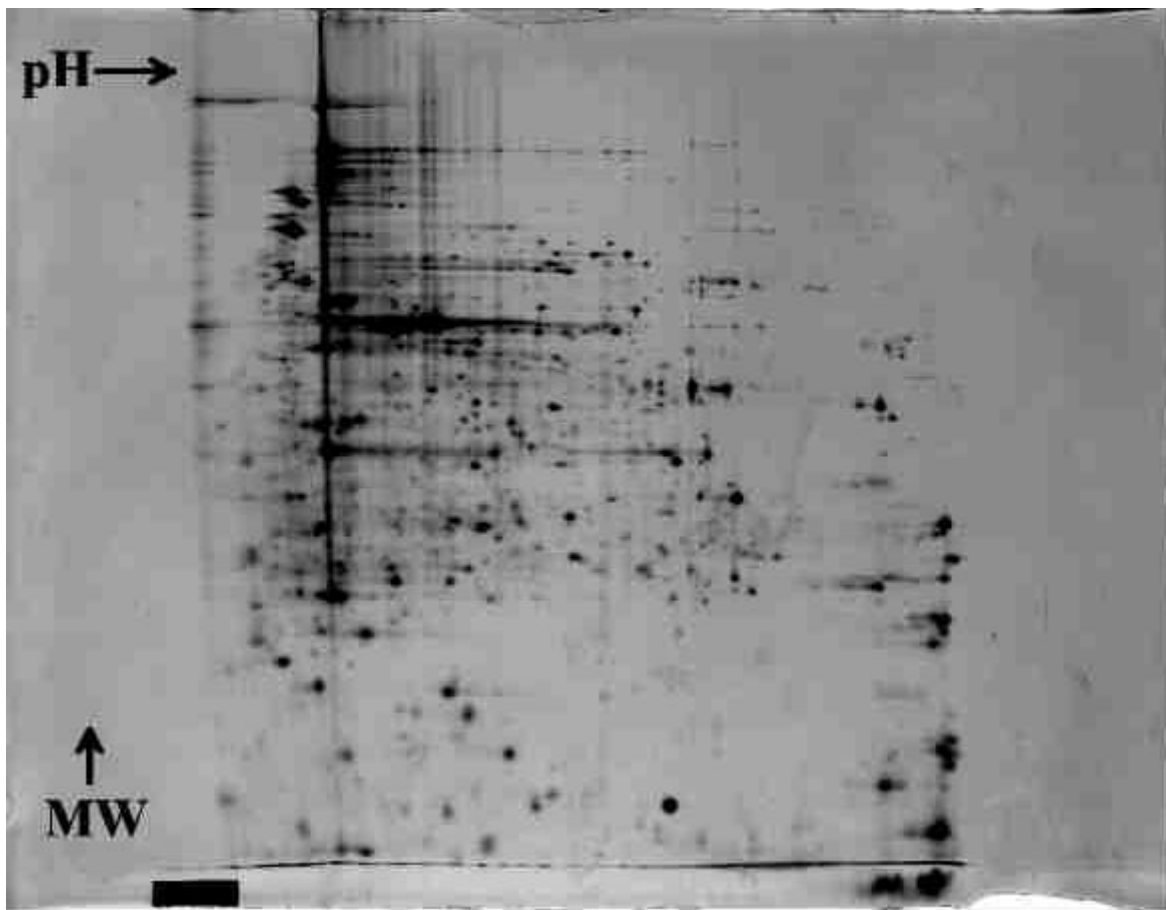
Neben den chemisch möglichen Modifizierungen der Proteine durch Acetyl- oder Phosphatgruppen ist auch an z.B. Kinasen oder andere modifizierende Enzyme im Zellextrakt zu denken, die unspezifisch Proteine enzymatisch modifizieren können.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten (chemischen oder enzymatischen) Modifizierungen überhaupt vom Acetylphosphat ausgingen, wurden die gleichen Reaktorversuche, wie dargestellt in Figur 8.2 + 8.3 jedoch ohne Zugabe von Acetylphosphat, wiederholt und jeweils Proben des gelösten und präzipitierten Reaktorinhaltes nach 50h Laufzeit mit 2DE aufgetrennt, siehe Figur 8.5 und 8.6.



Figur 8.5: Standard 2DE Gel mit 13%T und pH 3-10. 100 μ g Protein aus dem Überstand des gelösten Reaktorinhaltes nach 50h Laufzeit **ohne Acetylphosphat** wurden darauf aufgetrennt.

Das in Figur 8.5 dargestellte Gel entspricht also bis auf die Abwesenheit von AcP der Probe für das Gel aus Figur 8.2. Im Gegensatz zu Figur 8.2, wo aufgrund ausserordentlicher Modifizierungen keine Strukturen mehr im Proteinmuster zu erkennen waren, zeigt dieses Gel wieder die bekannten und identifizierten Spot-Muster der Rohlysate (siehe Figur 7.3). Einige lokalisierte Spots sind als Landmarks mit den Abkürzungen ihrer Namen bezeichnet. Modifizierungen der Spots zu sauren Isoformen sind keine mehr zu beobachten, jedoch sammeln sich Proteine, deren pI-Wert basischer ist als 10 am äussersten Rand der ersten Dimension und erscheinen in der zweiten Dimension als unterbrochene Linie am rechten Rand des Gels.



*Figur 8.6: Standard 2DE Gel mit 13%T und pH 3-10. 100 μ g Protein aus dem Präzipitat des Reaktorüberstands (gezeigt in Figur 8.5) nach 50h Laufzeit **ohne Acetylphosphat** wurden darauf aufgetrennt.*

Der in Figur 8.6 aufgetrennte Niederschlag enthält immer noch Lysatkomponenten. Trotz der immer noch bestehenden Schwierigkeiten bei der Auftrennung sind diese jedoch weit weniger schwer löslich, als in den Präzipitaten aus Reaktorversuchen mit AcP. Im Gegensatz zu den Gelen des Präzipitats aus den Reaktorversuchen mit AcP (Figur 8.3) lassen sich die bekannten Lysatstrukturen im Gel wiederfinden.

Dass Proteine nach vielen Stunden im Reaktor zum Teil in den sehr basischen Bereich wandern, ist ein Phänomen, welches auch bei gekoppelter Transkription/Translation im halbkontinuierlichen System beobachtet wurde, siehe Publikation I (Schindler *et al.*, 1999c). Diese Beobachtung ist mit dem Abhandenkommen von funktionellen Phosphorylierungen an bestimmten Proteinen, so wie es beim Zusammenbruch der Batch-Synthese nachgewiesen wurde (Publikation V (Siemann *et al.*, 2000)), im Einklang. Dieser Sachverhalt wurde aber bis dato für kontinuierliche und halbkontinuierliche Reaktionssysteme der zellfreien Biosynthese nicht überprüft.

9. Nachweis von Modifizierungen an Proteinen

Wie im vorangehenden Kapitel dargestellt, wurden aus den Versuchen mit dem Reaktorinhalt nach einer kontinuierlichen zellfreien Reaktion mittels 2DE Hinweise erhalten, dass viele Proteine chemisch oder enzymatisch modifiziert werden und somit aufgrund von Präzipitation oder Aktivitätsverlust nicht mehr zur Biosynthese beitragen können. Als mögliche Ausgangssubstanz dieser Modifikationen wurde das zur Energieregenerierung zugegebene Acetylphosphat ermittelt. Um diese essentielle Veränderungen an Proteinen im zellfreien Reaktor vermeiden zu können, muss die Art der Modifizierungen sowie ihr Verursacher und ihre Auswirkungen untersucht werden.

9.1. Untersuchungen zum Nachweis der chemischen Acetylierung an Aminosäuren

Um zu überprüfen, ob Aminosäuren mit primären Aminogruppen, als Komponenten der modifizierten Proteine, durch die in der zellfreien Reaktion vorliegende Acetylphosphatkonzentration acetyliert werden können, wurden Ninhydrintests durchgeführt (siehe Abschnitt 5) Das Testprinzip beruht darauf, dass primäre Aminogruppen an

Aminosäuren in einer colorimetrischen Reaktion reagieren und photometrisch bestimmt werden können. Somit kann die Menge an vorliegenden Aminosäuren gemessen werden. Wenn Aminosäuren durch Acetylphosphat an ihren Aminogruppen acetyliert werden, wird die Aminogruppe in der Ninhydrinreaktion nicht mehr colorimetrisch detektiert. Die Abnahme der freien primären Aminogruppen ist also gleichbedeutend mit der Zunahme an Modifizierungen. Zur Durchführbarkeit der Methode wurde eine einzelne Aminosäure eingesetzt und vorausgesetzt, dass die Modifizierung der freien Aminosäure ähnlich ablaufen würde, wie der gebundenen Aminosäuren in den Proteinen des zellfreien Extraktes. Der Extrakt konnte nicht direkt zum Nachweis eingesetzt werden, da viele enzymatische Reaktionen parallel ablaufen und interferieren würden. Legt man eine definierte Menge einer freien Aminosäure vor und inkubiert diese mit Acetylphosphat, sollte man im Falle einer chemischen Modifikation durch Acetylierung also eine Abnahme des Farbsignals während einer Inkubation beobachten. Eine eventuelle Phosphorylierung würde den Ninhydrintest nicht beeinflussen, da die Phosphatgruppen an OH-Gruppen binden und somit die NH-Gruppen nicht in der Reaktion stören.

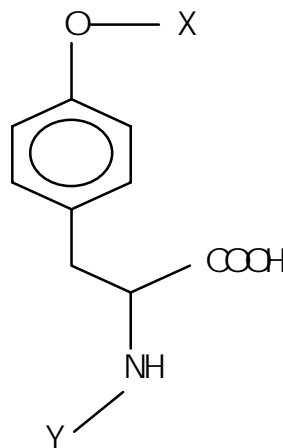
Für die Versuche wurde Lysin als freie Aminosäure in fünf verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,2 und 1,0mM vorgelegt, da über eine Eichung bestimmt wurde, dass das Signal der Ninhydrinreaktion im diesem Bereich eine lineare Funktion der Lysinkonzentration ist. Da TRIS-Puffer ebenfalls mit Acetylphosphat eine Verbindung eingehen könnte, wurde die Reaktion in 100mM HEPES-Puffer, pH 7.7 durchgeführt. HEPES basiert auf Piperidin, welches nur tertiäre Amine enthält, die nicht acetyliert werden können und nicht im Ninhydrintest interferieren. Ansonsten befanden sich noch $MgCl_2$, KCl und Glycerin in den gleichen Konzentrationen wie bei der zellfreien Biosynthese im Ansatz. Um einen deutlich nachweisbaren Effekt zu erzielen, wurden 100mM Acetylphosphat (statt 30mM im zellfreien Reaktor) zugegeben. Ein Kontrollansatz mit Wasser statt Acetylphosphat wurde mitgeführt. Der Ansatz wurde 24h bei 30°C inkubiert.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Konzentration des nicht acetylierten Lysin im Ansatz bestimmt. Die gemessene Menge an Lysin in der Kontrollreaktion ohne Acetylphosphat diente dabei als Standard. In mehreren Experimenten wurden Modifizierungen an 0,5% bis 14% der Gesamtmenge an eingesetztem Lysin gezeigt. Die Reproduzierbarkeit liess sich technisch nicht verbessern, da das Gesamtvolumen einer Reaktion 1ml betrug und viele nötige Pipettierschritte von geringen Volumina der Einzelkomponenten eine Fehlerquelle darstellten. In Anbetracht der hohen Fehlerrate und der

geringen Signifikanz der Abweichungen (maximal 14%) war die Aussagekraft dieser Versuche gering. Es konnte keine Acetylierung an primären Aminogruppen des Lysin eindeutig nachgewiesen oder quantifiziert werden.

9.2. Untersuchungen zum Nachweis der chemischen Phosphorylierung und Acetylierung an Aminosäuren

Freie Aminosäuren lassen sich in HPLC-Anlagen chromatographisch nachweisen (Lottspeich and Zorbas, 1998). Modifizierungen, die den Ladungszustand der Moleküle beeinflussen, so wie Acetylierungen und Phosphorylierungen, lassen sich in einer Reversed-Phase Chromatographie voneinander trennen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Aminosäuren wird für aromatische Aminosäuren keine aufwendige Probenvorbereitung benötigt, die die zu bestimmenden Modifikationen beeinflussen oder zerstören könnte. Mit den im Abschnitt 5 beschriebenen Bedingungen konnte freies, unmodifiziertes Tyrosin von O-Phospho-L-Tyrosin (beide Fa. Fluka, Deisenhofen) und N-Acetyl-L-Tyrosin (Fa. Sigma, Deisenhofen) getrennt werden (Molekülstruktur siehe Figur 9.1).



Figur 9.1: Die aromatische Aminosäure Tyrosin. Befindet sich X (= Phosphatgruppe) am Molekül, handelt es sich um O-Phospho-Tyrosin. Ist Y (= Acetylgruppe) ergänzt, erhält man N-Acetyl-Tyrosin.

Folgende Retentionszeiten wurden für Standardsubstanzen bestimmt (ca. Werte in Minuten):

Acetylphosphat	1.9
Phospho-Tyrosin	2.5
Tyrosin	4
Acetyl-Tyrosin	10

Zwischen 0,005g/l und 0,05g/l der eingesetzten Aminosäuren konnte jeweils eine lineare Eichgerade erstellt werden. Acetylphosphat ist sehr instabil und wurde zudem kurz hinter der Laufmittelfront des Chromatogramms detektiert, so dass es nur qualitativ erfasst werden konnte. Da TRIS- oder HEPES-Puffer freie OH-Gruppen haben, die die Messungen beeinflussen konnten, wurden die folgenden Reaktionen in 50mM Phosphatpuffer ausgeführt. Die Standardsubstanzen der modifizierten Aminosäuren waren geringfügig mit unmodifiziertem Tyrosin verunreinigt; gegenseitig beeinflussten sie sich nicht in ihren Trenneigenschaften durch Wechselwirkungen.

0,04g/l unmodifiziertes, reines Tyrosin wurde zusammen mit 100mM Acetylphosphat 20h bei 30°C inkubiert, um zu überprüfen, ob die Aminosäure durch Acetylphosphat ohne die Einwirkung von Enzymen, also rein chemisch, acetyliert und/oder phosphoryliert wurde. Nach Ende der Inkubationszeit war auf dem Chromatogramm der Acetylphosphat-Peak fast verschwunden, der Tyrosin-Peak hatte sehr stark abgenommen. Der dominierende Peak war jetzt Phospho-Tyrosin, während Acetyl-Tyrosin nur in Spuren zu finden war. In einer parallelen Kontrolle ohne Acetylphosphat war dies nicht der Fall.

Da durch anderweitige Reaktionen der Komponenten mehrere undefinierbare Peaks und damit ein hoher Hintergrund entstand, konnten die Aminosäuren nicht mehr quantifiziert werden. Eine Aussage, wieviel Prozent des ursprünglich unmodifizierten Tyrosin phosphoryliert worden war, war somit nicht möglich. Andererseits hätte man von einer Quantifizierung der Modifikationen an freiem Tyrosin nicht unmittelbar einen Schluss auf die Konzentration der modifizierten Proteine in der zellfreien Biosynthese herleiten können, da sich andere Aminosäuren, und auch Tyrosin im Polypeptid, unter Umständen anders verhalten. Die entscheidende Aussage dieser Versuche ist aber, dass in der Tat freie Aminosäuren durch Inkubation mit Acetylphosphat chemisch und ohne Einwirkung von Enzymen, phosphoryliert werden können. Eine ebenfalls stattfindende Acetylierung war gering. Geht man davon aus, dass dieser Prozess auch mit Aminosäuren abläuft, welche nicht frei, sondern in Polypeptidketten vorliegen, werden Protein-Komponenten des S30 Extraktes

durch die Zugabe des für die Energieregenerierung benötigten Acetylphosphates modifiziert und dadurch die Biosynthesekapazität beeinflusst.

Durch diese Veränderungen in den Proteinmolekülen wird deren Präzipitation im zellfreien System gefördert. Hier konnte gezeigt werden, dass die im kontinuierlich betriebenen zellfreien Reaktor entstandenen Isoformen von Proteinen, die in Abschnitt 8.4 dargestellt sind, tatsächlich auf Phosphorylierungen zurückzuführen sind, welche vom Acetylphosphat ausgingen. Ob enzymatische Vorgänge noch zusätzlich eine Rolle spielen, kann mit den vorliegenden Untersuchungen nicht belegt werden.

Die beschriebenen, vom Acetylphosphat ausgehenden Proteinmodifikationen, wurden im kontinuierlichen Reaktor festgestellt. Es bleibt die Frage, ob diese Beobachtungen auch für Reaktionssysteme mit kürzerer Synthesedauer von Bedeutung sind. Da einem kontinuierlichen System während der gesamten Reaktionsdauer ständig Acetylphosphat zum Zweck der Energieregenerierung zugeführt wird, muss durch Modellierung der Biosynthese eine exakte Dimensionierung der Zufuhr an Acetylphosphat bzw. auch anderen phosphathaltigen Komponenten erfolgen. Damit könnte gewährleistet werden, dass genug Acetylphosphat zur Verfügung steht, um die Energieversorgung der Reaktion aufrecht zu erhalten, aber andererseits Acetylphosphat nicht im Überschuss zugegeben wird, so dass es zu unspezifischen Reaktionen kommt.

Bei Batch-Reaktionen dürfte sich das Problem weniger gravierend auswirken, da die Konzentration an Acetylphosphat im Laufe der Zeit abnimmt. Längerfristig sollte jedoch getestet werden, ob zur Vermeidung der hier geschilderten Phänomene nicht unter Umständen auf ein alternatives Energie-Regenerierungssystem zurückgegriffen werden kann.

9.3. Nachweis von Phosphorylierungen an Proteinen in der zellfreien Biosynthese

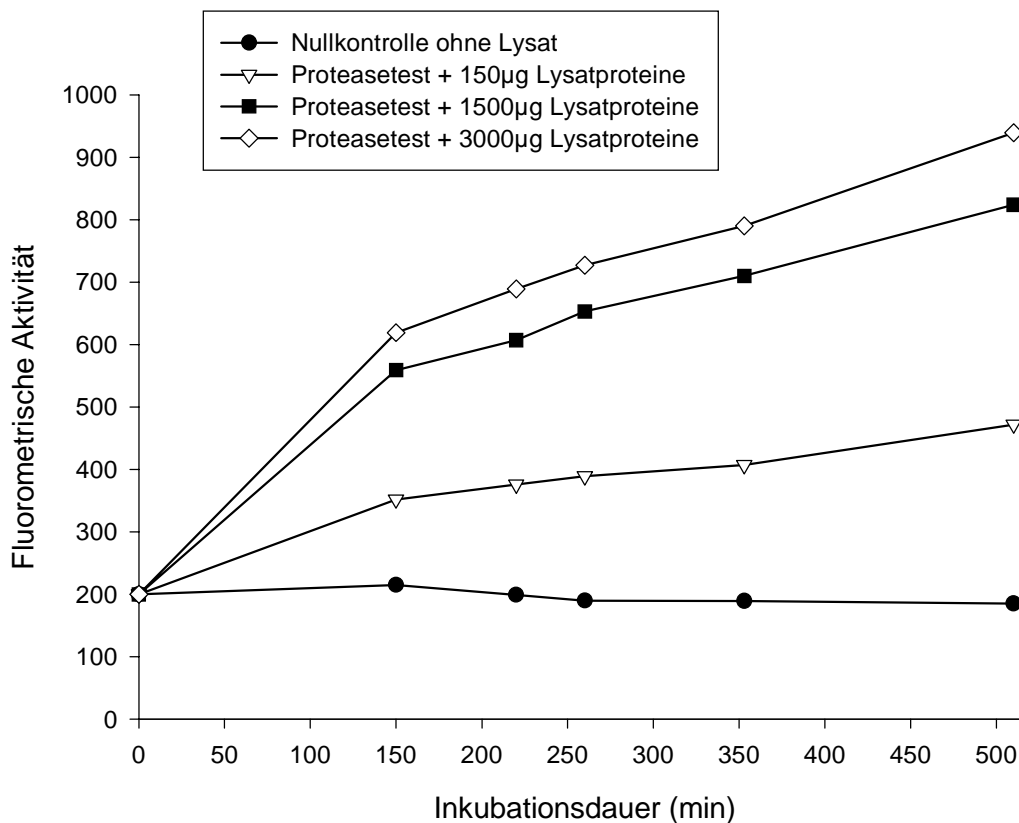
Auf die Analyse der zeitabhängigen Phosphorylierungen während des Batchprozesses mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Immunoblotmethode (Trennung der Proteine mit 2DE und Detektierung der phosphorylierten Epitope mit monoklonalen Antikörpern), siehe Publikation IV (Schindler *et al.*, 1999d), wurde in der Publikation V (Siemann *et al.*, 2000) detailliert eingegangen.

10. Proteaseaktivität im zellfreien System

Proteasen in *E.coli* dienen nicht nur dazu, fehlgefaltete und defekte Proteine abzubauen, sondern greifen über die induzierbare Degradation von Schlüsselenzymen direkt in die Regulation von physiologischen Vorgängen ein. Einige Proteasen sind sogar essentiell für das Zellwachstum (Gottesman, 1996; Gottesman and Maurizi, 1992). Da Proteasen auch im S30 Lysat enthalten sind, entfalten sie während der zellfreien Biosynthese ihre proteolytischen Aktivitäten und bauen so u.U. auch das Zielprotein und an der Synthese beteiligte Proteine (ca. 200!) ab, welche ja -im Gegensatz zur *in vivo* Proteinbiosynthese- nicht durch ständige Neusynthese ersetzt werden können. Um den negativen Einfluss dieser proteinabbauenden Enzyme auf die *in vitro* Biosynthese beurteilen zu können, wurde die gesamte proteolytische Kapazität des zellfreien Lysates gemessen, siehe Figur 10.1. Die Vorgehensweise ist beschrieben im Abschnitt 5.11 und beruht darauf, dass ein Casein-Derivat mit dem Lysat inkubiert wird. Wird das Casein durch im Lysat enthaltene Proteasen zersetzt, wird Fluoreszenz emittiert. Über die Zunahme der Fluoreszenz wird also der fortschreitende Abbau des Caseins und damit die Aktivität der Proteasen im Ansatz ermittelt. Es lassen sich mit diesem Test keine absoluten, sondern nur relative Werte (Differenz zu einer Referenzaktivität) bestimmen.

Zur jeweils gleichen Menge des Casein-Substrates wurde einmal als Kontrolle nur Wasser, und dreimal verschiedene Mengen an Lysat gegeben und 8,5h bei 30°C inkubiert. Die zugegebenen Volumina bezogen sich auf die durch Bradford ermittelte Proteinkonzentration.

Bei der Kontrolle wurde nur Wasser zum Substrat gegeben. Wie erwartet, entstand dabei keine Zunahme an Fluoreszenz während der Inkubation, da keine Proteaseaktivität messbar war. Die leichte Abnahme liegt im Bereich der Messwertschwankungen. Die gemessene Proteaseaktivität nach Inkubation des Substrates mit 150µg Lysatproteinen verdoppelte sich ungefähr nach Verzehnfachung der eingesetzten Lysatmenge. Einen weiteren Anstieg wurde nach Zugabe von 3000µg Lysatproteinen beobachtet.



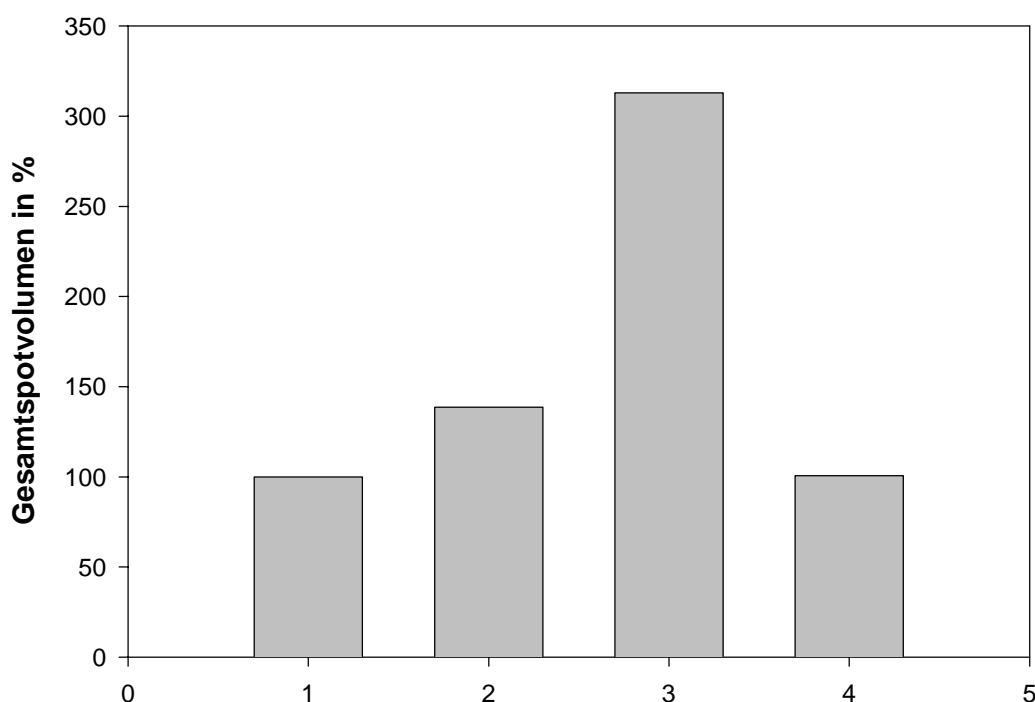
Figur 10.1: Inkubation des Casein-Substrates für die fluorometrische Proteasedetektion mit unterschiedlichen Konzentrationen an zellfreiem Lysat aus *E.coli* A19.

Die Proteaseaktivität im zellfreien Lysat hielt während der Versuchsdauer von über 8h an, d.h. eine Abschwächung z.B. durch Inaktivierung der proteolytischen Enzyme war nicht zu beobachten. Der gemessene Degradationsgrad des Casein-Substrates ist nicht äquivalent der Lysat- und damit Proteasemenge. Das liegt daran, dass das Casein nur eines von vielen möglichen Substraten für die Proteasen in diesem Ansatz ist; d.h., erhöht man die Lysatmenge, steigt gleichzeitig die Zahl der möglichen Targets für die proteolytischen Enzyme.

Es wurde gezeigt, dass im zellfreien Extrakt viele Proteasen vorhanden und aktiv sind. Je mehr Lysat in einer Biosynthesereaktion verwendet wird, umso mehr proteolytische Aktivität wird in den Ansatz eingebracht werden. Sowohl das neu synthetisierte Protein, als vor allem auch an der Biosynthese beteiligte, essentielle Proteine, wie Transkriptions-, Translationsfaktoren und Ribosomen, werden ganz oder teilweise degradiert und stehen für

die Synthese nicht mehr zur Verfügung. Um die Proteasen an ihrer negativen Wirkung auf die Biosynthese zu hindern, sollten Proteaseinhibitoren eingesetzt werden. Kommerziell erhältliche Inhibitoren zeigten jedoch in fluorometrischen Tests keinerlei Wirkung. Von der Firma Roche Molecular Diagnostics, Penzberg, wurden ca. 20 verschiedene, neuartige Proteaseinhibitoren mit dem fluorometrischen Test auf ihre Wirksamkeit im zellfreien Extrakt geprüft (Dr. Fernholz, persönliche Mitteilung). Die drei wirksamsten Inhibitoren zeigten mit dieser Methode ungefähr die gleichen Aktivitäten. Bei der Zusammensetzung der Inhibitoren handelt es sich um ein Firmengeheimnis der Fa. Roche. Da in einem Zellextrakt aber viele verschiedenartige und in ihrer Spezifität unbekannt Proteasen enthalten sind, ist die fluorometrische Bestimmung ihrer Aktivität alleine durch das Casein-Substrat unvollständig, weil keine Proteasen erfasst werden, die Casein nicht als Substrat akzeptieren. Deshalb wurde jeder der drei Proteaseinhibitoren der Fa. Roche, 2,5µl (nach Angaben von Roche) mit je einer Probe zellfreiem Lysat, dessen Proteinmenge 100µg betrug, für 6h bei 30°C inkubiert. Eine Nullprobe ohne Proteaseinhibitor diente dabei als Vergleichswert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Proben je auf einem 2DE Gel aufgetrennt und die Gele densitometrisch ausgewertet (Figur 10.2). Je weniger intensive Spots nach Inkubation auf einem Gel noch vorhanden waren, umso mehr Proteasen mussten aktiv gewesen sein, was auf eine geringere Wirksamkeit des entsprechenden Proteaseinhibitors schliessen lässt. Die Gesamtintensität aller Spots auf einem Gel und deren Differenz zum Nullwert wurde ermittelt.

Wie in Figur 10.2 zu sehen, ist bei der Inkubation reinen Lysates, ohne Zugabe von Proteaseinhibitoren, der maximale proteolytische Abbau erfolgt. Die verbleibende Intensität aller Spots im 2DE Gel ist der Referenzwert, wurde als 100% definiert und ist zu sehen in Bahn 1. Bahn 2-4 zeigen die Gesamtpotintensität nach paralleler Inkubation gleicher Proben mit unterschiedlichen Proteaseinhibitoren. Die eingesetzten Inhibitoren auf Bahn 2 und 4 zeigen kaum Wirksamkeit. Das resultierende Gesamtpotvolumen auf 2DE beträgt auf Bahn 2: 138% und auf Bahn 4: 100,7%. Nach Inkubation des Extraktes mit dem Inhibitor, der auf Bahn 3 dargestellt ist, konnte mehr als dreimal soviel Gesamtpotvolumen (312%) gemessen werden als in der Kontrolle: dieser Proteaseinhibitor war also hochwirksam.



Figur 10.2: Über 2DE Analyse ermitteltes Gesamtproteinvolumen nach 6h Inkubation von 100 μ g zellfreiem Lysat bei 30°C.

Diese Versuche zeigen, dass der kommerziell erhältliche fluorometrische Proteasetestkit nur einen sehr groben Anhaltspunkt über die proteolytische Aktivität im zellfreien Extrakt liefern kann, da nur ein spezielles Casein-Substrat zum Nachweis eines komplexen Proteasesystems eingesetzt wird. Die drei in Figur 10.2 dargestellten Proteaseinhibitoren wiesen im fluorometrischen Test die gleiche Wirksamkeit auf, während ihre Aktivität nach genauerer Analyse durch 2DE sehr unterschiedlich war. Der Zellextrakt enthält viele Proteasen, die Casein nicht als Substrat verwerten können; deren Aktivität, also auch ihre Inhibierung, kann mit dem kommerziellen Test also nicht erfasst werden. Der hochaktive Proteaseinhibitor (Figur 10.2, Bahn 3) erwies sich jedoch in weiteren Untersuchungen nicht nur als Inhibitor für Proteasen, sondern auch als Inhibitor für die Translation, so dass sein Einsatz in der zellfreien Proteinbiosynthese nicht in Frage kommt. Eine Verhinderung des enormen Proteinabbaus während der *in vitro* Proteinbiosynthese birgt jedoch ein Potential für wesentliche Verbesserungen bezüglich der Gesamtkonzentrationen und der Laufzeit, so dass

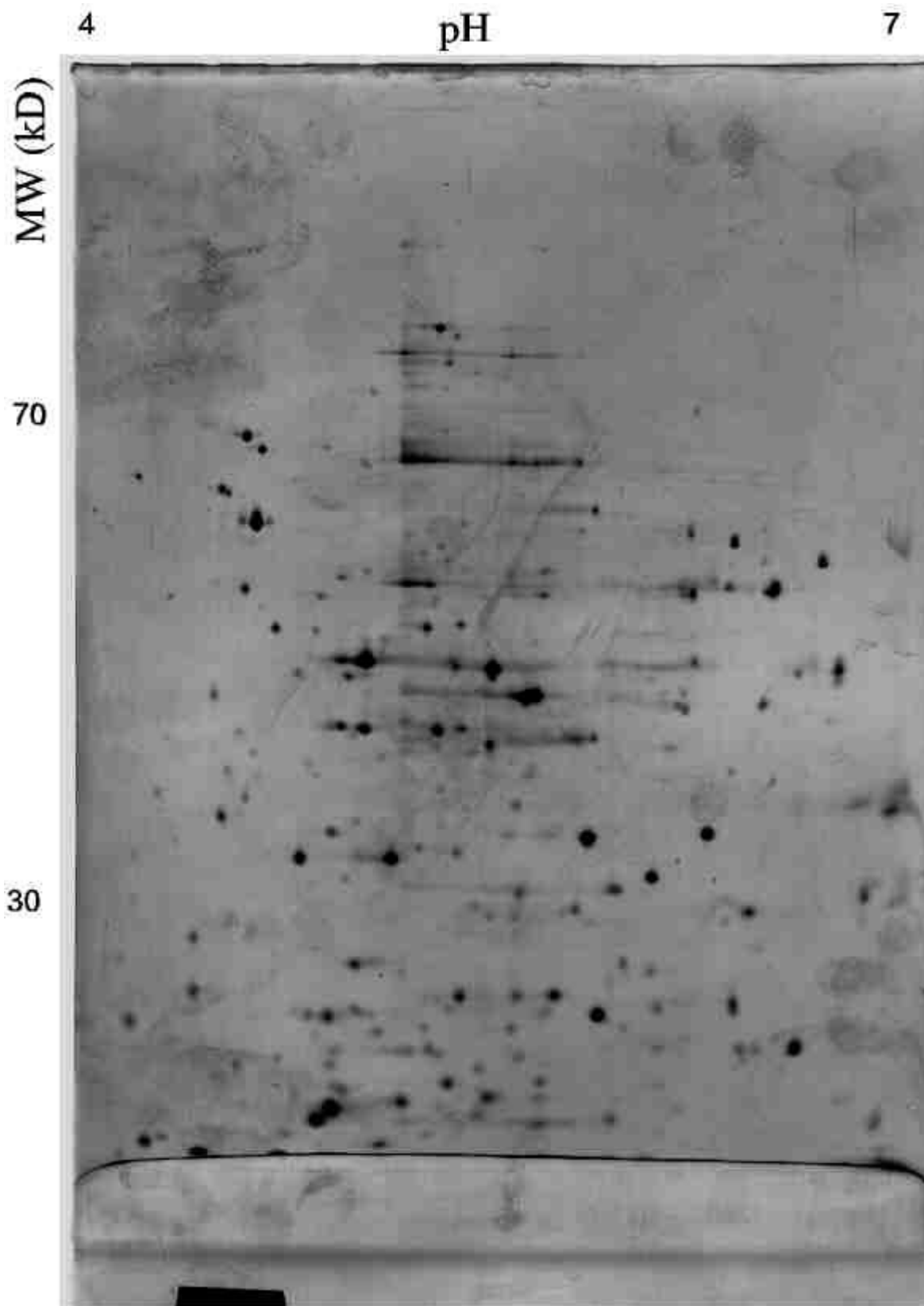
Forschungsbedarf für die Entwicklung wirksamer Proteaseinhibitoren ohne negative Effekte auf die Biosynthese besteht.

11. Lokalisierung von tRNA-Synthetasen

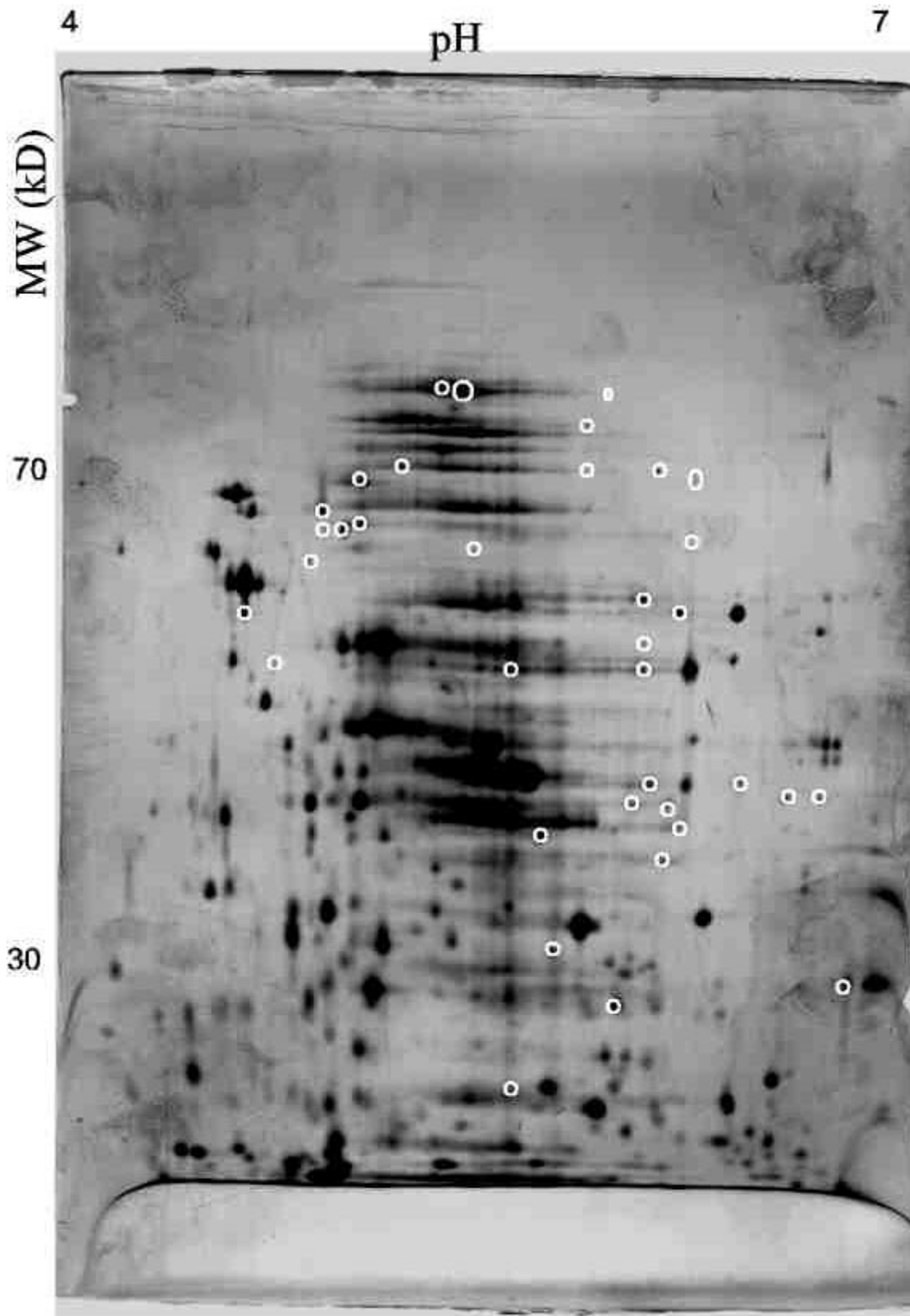
tRNA-Synthetasen, die essentiell sind für die Beladung der tRNAs mit Aminosäuren während der Elongation, sollen im zellfreien Extrakt nachgewiesen werden, um ihre Anwesenheit zu demonstrieren. Liesse sich ein Fehlen nur eines dieser Enzyme zeigen, wäre dies eine Erklärung für einen Zusammenbruch der Biosynthese. Man könnte diesem mit einer Aufstockung der entsprechenden Synthetase während der Reaktion entgegenwirken.

Um tRNA-Synthetasen in 2DE Gelen zu lokalisieren, wurde entsprechend der in Abschnitt 7.1.2. beschriebenen Methoden vorgegangen. Nachdem alle Daten über die 20 Synthetasen, welche auf dem Gel als 22 Proteine erscheinen, da z.T. unterschiedliche Untereinheiten vorliegen, gesammelt waren, wurden die Gradienten der 2DE Gele angepasst. Die Gele für die optimale Auflösung des Bereiches, in dem die tRNA-Synthetasen theoretisch lokalisiert sind, haben einen linearen pH-Gradienten von 4-7 und für die zweite Dimension 10,2%T. In solchen Gelen wurden 100µg Lysatproteine aufgetrennt (Figur 11.1) und parallel dazu 100µg einer Lysatfraktion, die von Dr. Metzler, Roche Molecular Diagnostics, Penzberg, chromatographisch mit tRNA-Synthetasen angereichert worden war (Figur 11.2). Diejenigen Spots, die in der angereicherten Fraktion neu oder vermehrt vorlagen, könnten mit hoher Wahrscheinlichkeit tRNA-Synthetasen sein.

Im Vergleich von Figur 11.1 zu Figur 7.3 sieht man deutlich die veränderte Auflösung und den anderen Ausschnitt durch die geänderten Gradienten. Trotzdem lassen sich die in Figur 7.3 gezeigten Landmarks noch zuordnen, vorausgesetzt sie befinden sich im Auflösungsbereich. Das Gel in Figur 11.1 diente als Referenz gegenüber dem Gel in Figur 11.2, welches die angereicherte Fraktion mit tRNA-Synthetasen zeigt.



Figur 11.1: Standardlysate aufgetrennt auf pH4-7 und 10,2%T; 100µg Protein.



Figur 11.2: *E.coli* S30 Lysat mit angereicherten tRNA-Synthetasen. pH4-7, 10,2%T, 100 μ g Protein. Diejenigen Spots, die in den Bereichen der vermuteten tRNA-Synthetasen liegen und ihr Erscheinen im Gel gegenüber Figur 11.1 bedeutend verändert haben, sind gekennzeichnet. Proteinspots, die im Volumen zunehmen, sind vermutlich die gesuchten

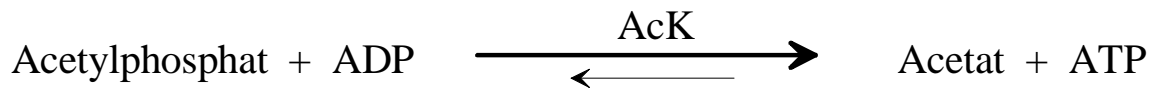
Enzyme. Einige Bereiche in dem hier gezeigten Gel sind so vehement verstärkt, dass die Spots ineinander verlaufen. Diese Proteine wurden nicht berücksichtigt, da sie sich als Spots nicht definitiv lokalisieren lassen.

Spots, welche in Figur 11.2 nicht eindeutig lokalisierbar waren, weil sie ineinander verlaufen waren könnten durch zusätzliche Methoden, wie eine Abreicherung in der Probenvorbereitung, getrennt werden. In weiterführenden Analysen sollten die nach der dargestellten Vorgehensweise interessierenden Spots sequenziert werden, um eine eindeutige Identifizierung sicherzustellen. Anschliessend lässt sich visuell analysieren, ob eine oder mehrere der dann identifizierten tRNA-Synthetasen während einer zellfreien Proteinbiosynthesereaktion abnimmt oder komplett verschwindet.

Zur Identifizierung dieser für die Biosynthese so wichtigen Enzyme sollte geprüft werden, ob alle, oder Teilgruppen, konservierte, homologe Sequenzbereiche haben. Nach Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein solches Epitop, könnte man die in Publikation IV (Schindler *et al.*, 1999d) beschriebene Methode des Immunoblots anwenden, um tRNA-Synthetasen zu detektieren, wenn sie aufgrund zu geringer Konzentrationen nicht mehr im 2DE Gel anzufärben sind.

12. Energieregenerierung

Für die Zellfreie Transkription bzw. Translation wird ein System benötigt, welches der Reaktion kontinuierlich Energie in Form von ATP zuführt. Aufgrund der Untersuchungen von Ryabova et al. (Ryabova *et al.*, 1995) wurde als energielieferndes System die Acetatkinase (E.C.2.7.2.1.) gewählt, welche die Phosphatgruppe des Substrates Acetylphosphat auf ADP, bzw. AMP überträgt; dadurch entstehen Acetat und der Energieträger ATP; siehe Figur 12.1. Während die Acetatkinase als Enzym im zellfreien S30 Extrakt vorkommt, muss Acetylphosphat in angemessener Konzentration der zellfreien Reaktion zugeführt werden.



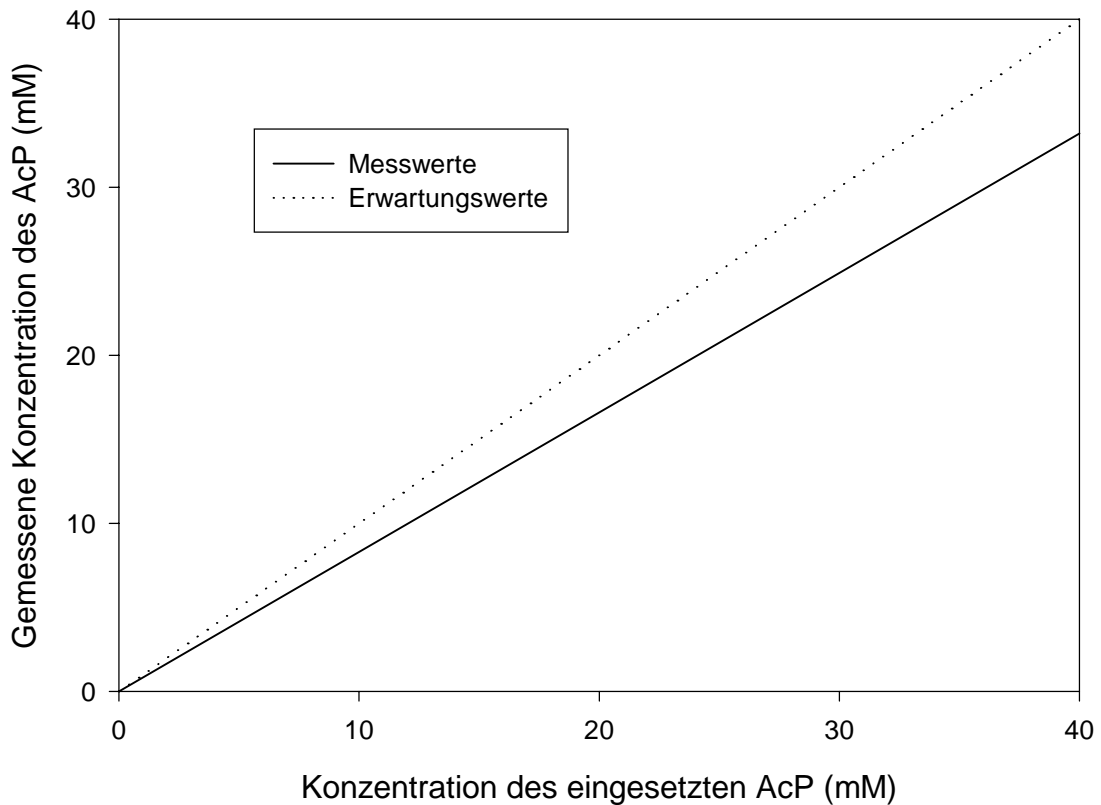
Figur 12.1: Die Reaktion der Acetatkinase ist schematisch dargestellt. Bei Überschuss von Acetylphosphat und ADP ist die ATP-spaltende Rückreaktion zu vernachlässigen (AcK = Acetatkinase).

Um Untersuchungen bezüglich der Energieregenerierungsreaktion im zellfreien System durchführen zu können, wurden ausreichend sensitive Analytikmethoden für die beteiligten Reaktanden benötigt. Während sich die Bestimmungen von Acetat und Acetylphosphat mittels einer HPLC-Messung als ungenügend erwiesen, konnten für die Analytik der Adenosin-Nukleotide Bedingungen etabliert werden, welche einen quantitativen Nachweis bis 10µM AXP erlauben (s.u.).

12.1. Verwendung von Acetylphosphat als Phosphatdonor

Eine Quantifizierung des Acetats durch gängige enzymatische Testmethoden war nicht möglich, da keine Bedingungen zu etablieren waren, unter denen die Acetatkinase inaktiv, die Hilfsenzyme für die Nachweisreaktion dagegen aktiv sind. Eine Inaktivierung der Acetatkinase war für eine Messung der Enzymkinetik aber unabdingbar, da ansonsten die Nachweisreaktion zur Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes der Acetatkinase-Reaktion führte und womit die Messergebnisse signifikant verfälscht würden. Nach einer modifizierten Methode von Lipmann et al. (Lipmann and Tuttle, 1945) wurde eine anorganische Quantifizierung von Acetylphosphat bei 0°C möglich, da die Acetatkinase kälte-labil und in diesem Zustand inaktiv ist. Der Nachweis beruht auf einer stöchiometrischen Umsetzung von Acetylphosphat mit Hydroxylamin zu Hydroxamat. Die Detektion von Hydroxamat erfolgt photometrisch nach einer Komplexbildung mit dreiwertigem Eisen (siehe Abschnitt 5.10). Der Test ist mindestens sensitiv bis zu einer Konzentration von 50µM Acetylphosphat und unempfindlich gegenüber Lösungsmitteln, welche zum Denaturieren von Lysatproteinen und damit zum Abstoppen der Reaktion, eingesetzt werden können. Zudem wird bei 0°C die chemische Hydrolyse des Acetylphosphates, die zur weiteren Verfälschung der Messwerte führen würde, während der Nachweisreaktion verhindert.

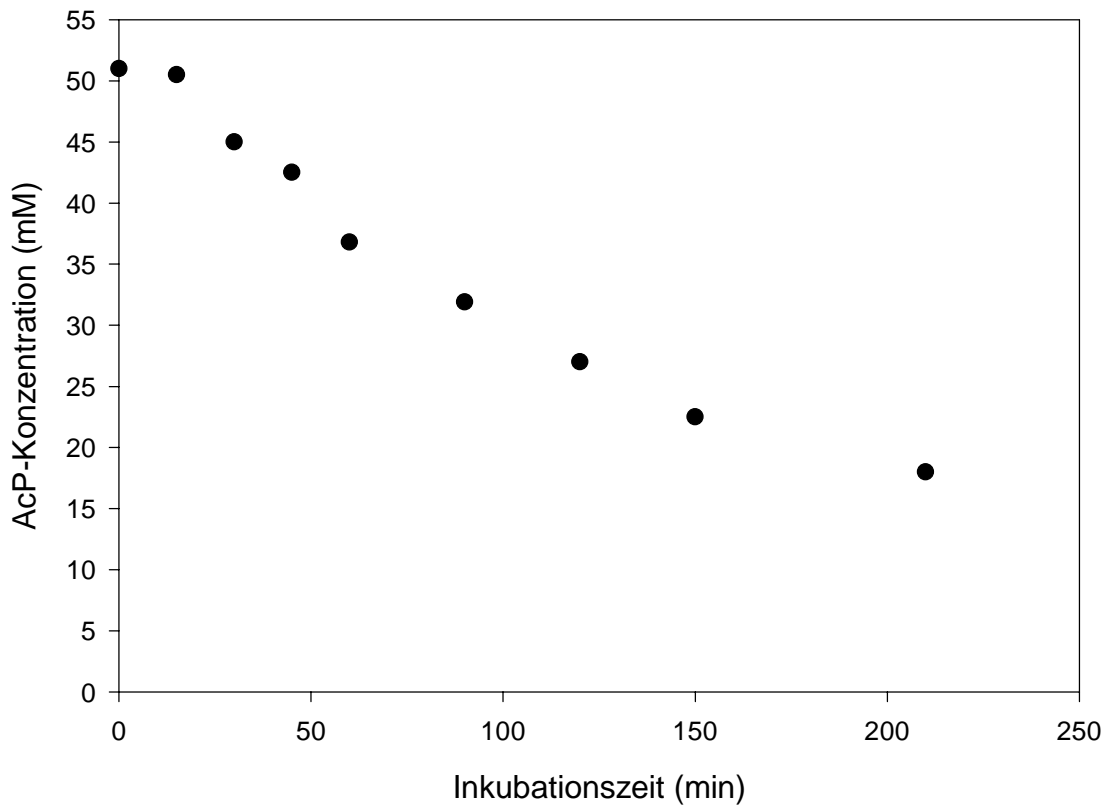
Es wurde festgestellt (Figur 12.2), dass die eingesetzte Acetylphosphat-Substanz der Firma Sigma, Deisenhofen, nur zu maximal 83% durch das Enzym umsetzbar ist.



Figur 12.2: Bei einer Überprüfung der Ausgangssubstanz Acetylphosphat wurde festgestellt, dass die nach Herstellerangaben berechneten Werte an eingesetztem Acetylphosphat nicht mit den tatsächlich gemessenen Konzentrationen übereinstimmten. Tatsächlich sind nur ca. 83% der Ausgangssubstanz als Acetylphosphat vorhanden bzw. verwertbar. Rund 17% der Chemikalie sind Verunreinigungen oder Abbauprodukte.

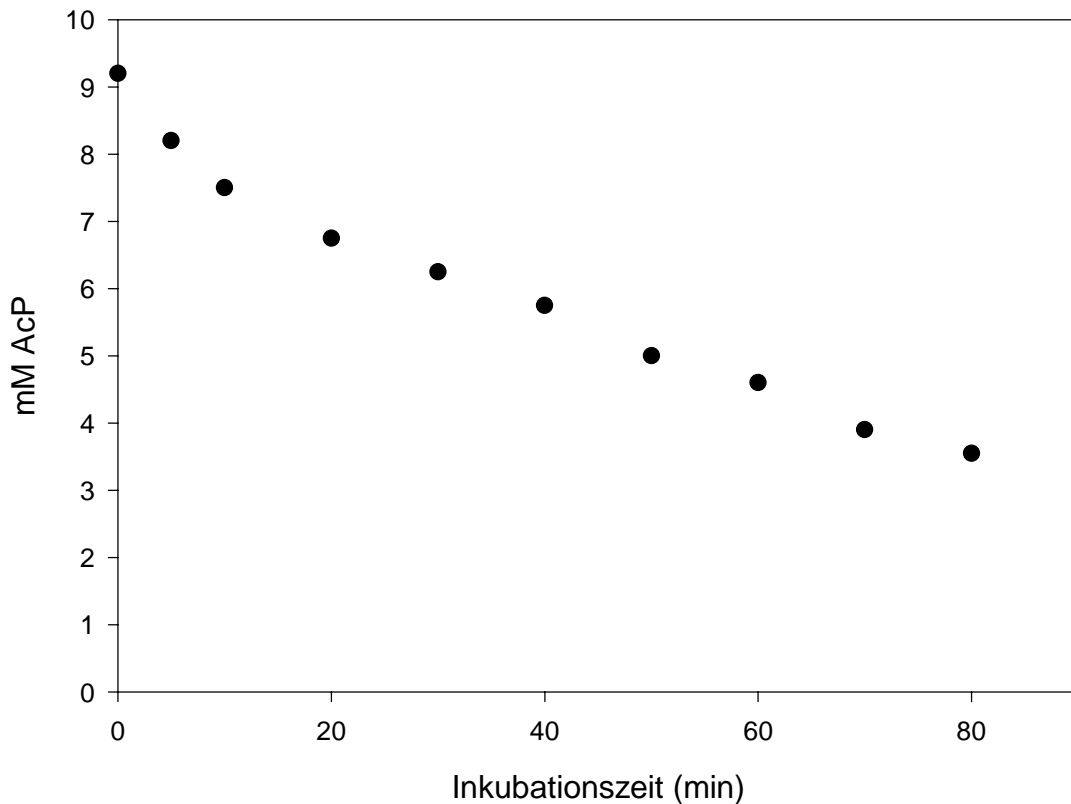
Mit dem Nachweis, dass nur 83% der eingesetzten Substanz tatsächlich auch als Acetylphosphat vorliegen, erhöht sich die Genauigkeit der Konzentrations- und Mengenerrechnungen für die zellfreie Biosynthesereaktion.

Zusätzlich ist eine thermische Hydrolyse des Acetylphosphats bei 37°C, mit einer Halbwertszeit von circa zwei Stunden, zu beobachten (Figur 12.3).



Figur 12.3: Thermische Hydrolyse des Acetylphosphates während einer Inkubation mit Reinstwasser bei 37°C. Die Bestimmung der Werte erfolgte mit der Hydroxylamin-Methode. Nach rund zwei Stunden ist nur noch die Hälfte der eingesetzten Substanz nachweisbar.

Da neben der thermischen Hydrolyse des Acetylphosphates auch eine spezifische oder unspezifische Spaltung durch Enzyme des Lysates erfolgt, verringert sich die Halbwertszeit der Substanz auf unter eine Stunde (siehe Figur 12.4). Bei dem gezeigten Versuch wurden gleichzeitig die entstandenen Nukleotide gemessen (s.u.) und festgestellt, dass nur rund 500 μ M des Acetylphosphates, also unter 10% der gespaltenen Substanz während der Inkubationsdauer, für den Aufbau von Phosphatnukleotiden verbraucht wurde.



Figur 12.4: Inkubation von Acetylphosphat mit 10% S30 Lysat und 560 μ M Adenosin als Phosphatgruppenacceptor bei 37°C.

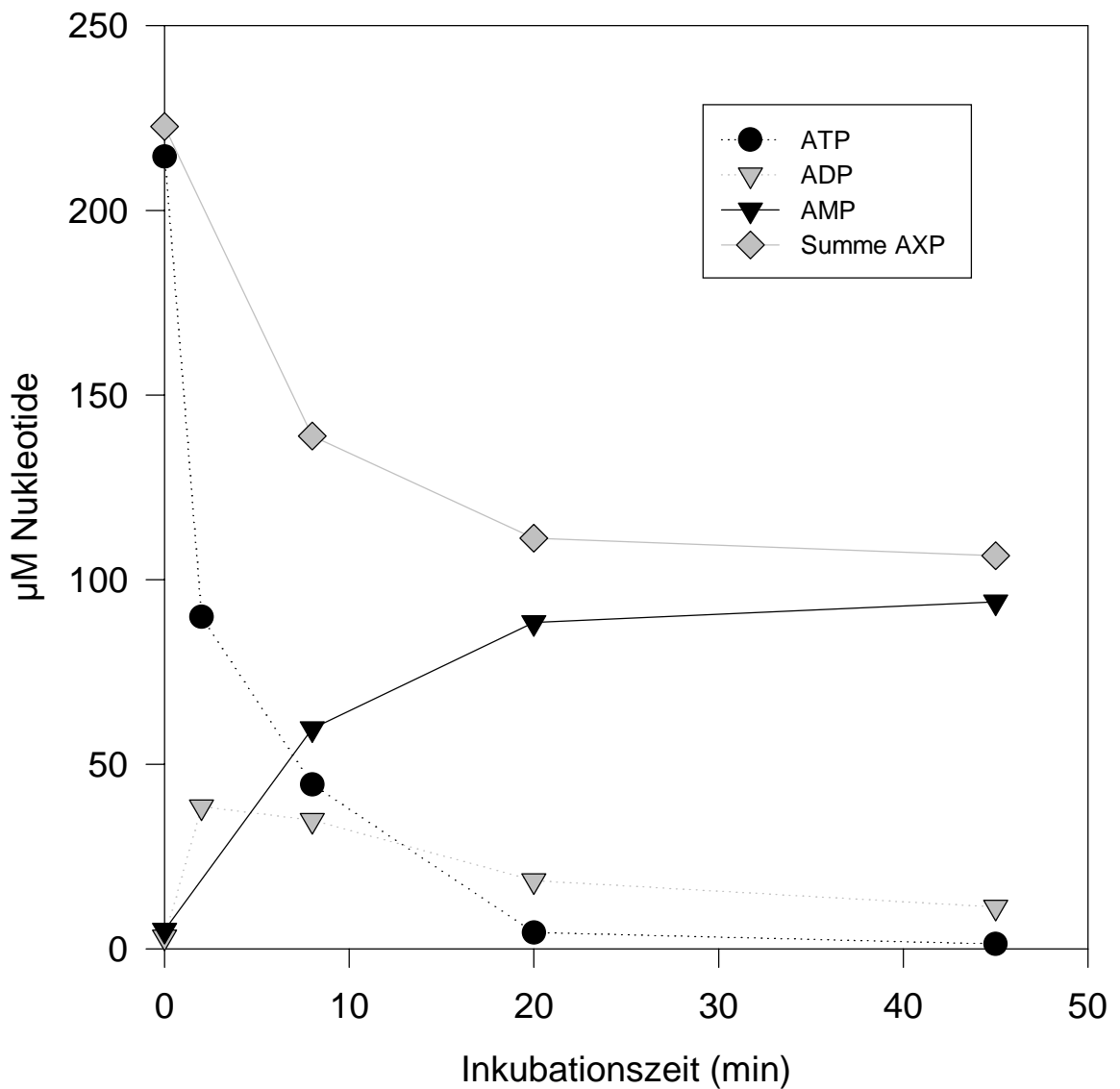
Acetylphosphat ist eine relativ instabile Substanz. Bereits bei einer Inkubation in Reinstwasser wird sie hydrolysiert. Zusätzlich wird Acetylphosphat durch die Enzyme eines *in vitro* Zellextraktes gespalten, wobei unter 10% des Phosphates für die erwünschten Phosphorylierungsreaktionen an Nukleotiden eingesetzt wird. Die entstehenden Abbauprodukte Acetat und Phosphat können eine zellfreie Reaktion negativ beeinflussen, unter anderem durch pH-Wert Veränderungen und Phosphorylierungen von Proteinkomponenten (siehe Abschnitt 9.). Deshalb kann Acetylphosphat nicht in so hoher Konzentration für die zellfreie Biosynthese vorgelegt werden, dass eine Energieregenerierungsreaktion über einen längeren Zeitraum gesättigt ist. Unter Berücksichtigung der Halbwertszeit ist in einer Batch-Reaktion mit einer Dauer von 50min die Versorgung mit dem Phosphatdonor gesichert, siehe Publikation V (Siemann *et al.*, 2000).

Für ein kontinuierliches und halbkontinuierliches Biosynthesystem mit mehrstündiger Laufzeit ist jedoch eine exakte Dimensionierung des Energieregenerierungssystems notwendig. Eine ausführliche rechnergestützte Optimierung findet sich in der Diplomarbeit von Claudia Thiele (Thiele, 1999) und in den Arbeiten von Sabine Arnold (to be published) der Arbeitsgruppe "Zellfreie Proteinbiosynthese" des IBVT.

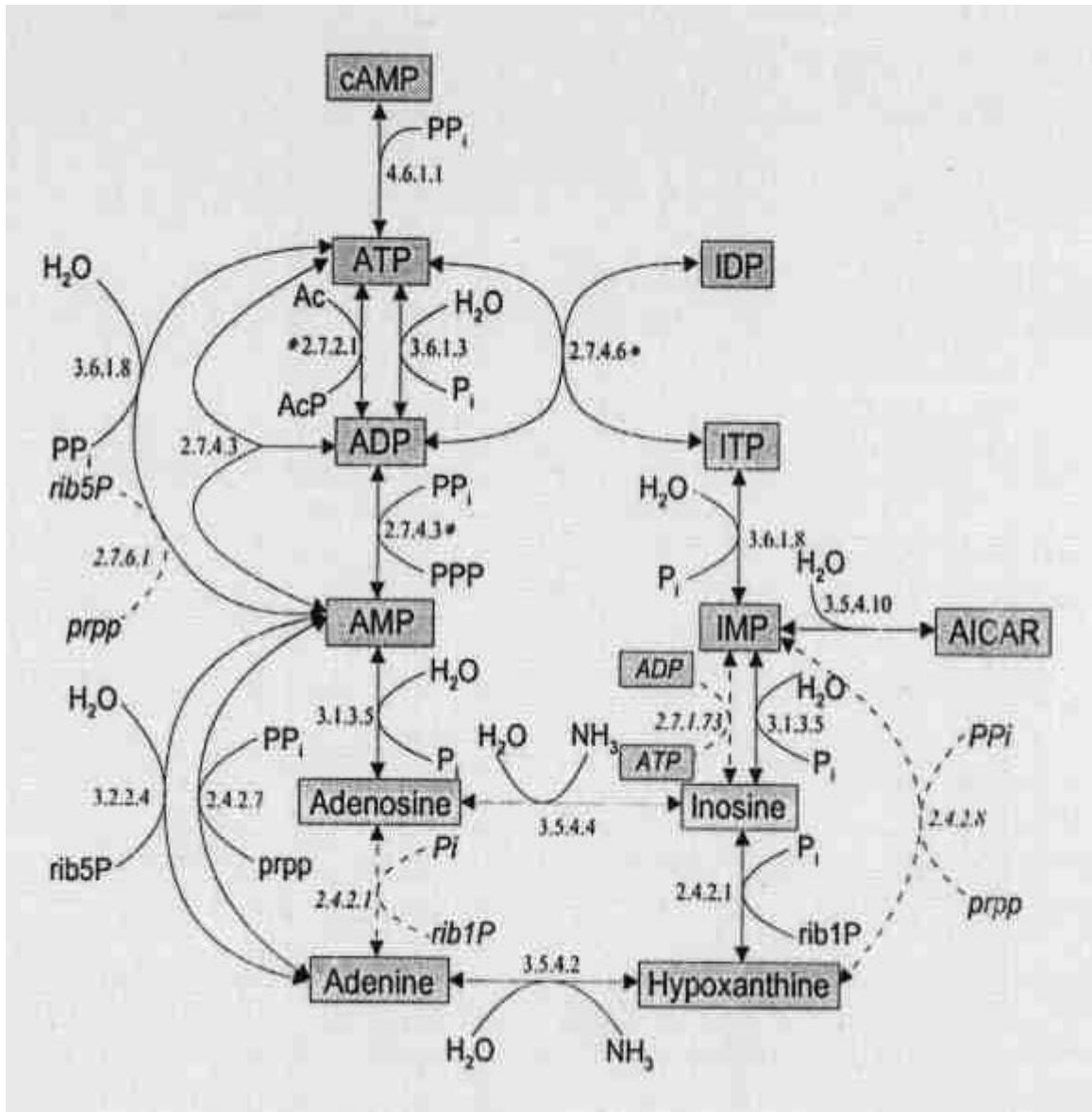
12.2. Nukleotidmessung mit HPLC

Es wurde eine chromatographische Methode etabliert, die es erlaubt, nicht nur 12 Nukleotide (Mono-, Di- und Trinukleotid jeder Nukleotidart) während einer einzigen Messung zu trennen, sondern auch deren Vorläufer, bzw. Abbauprodukte (siehe Abschnitt 5.6.). Die Erfassung der Nukleotide in der zellfreien Biosynthese ist nicht nur wichtig, da es sich um Energieträger handelt. Nukleotide dienen auch als Bausteine für die neu synthetisierte mRNA, deren Verfügbarkeit gewährleistet sein muss. Zusätzlich fungieren manche Nukleotide, vor allem GTP, als eine Art Cofaktor für manche Proteine, die in der Biosynthese eine essentielle Rolle übernehmen. Dies ist z.B. der Fall bei allen drei Elongationsfaktoren in *E.coli*, die ohne GTP ihre Funktion in der Translation nicht mehr ausüben könnten (siehe Abschnitt 3.2.). Nukleotide werden trotz ihrer zentralen Rolle in der Biosynthese sehr schnell abgebaut (siehe Figur 12.5). Da *in vivo* die zersetzten Nukleotide durch Neusynthese ständig ersetzt werden, ist ein System der Regenerierung auch für die *in vitro* Biosynthese vonnöten.

Der Halbwertszeit von ATP im zellfreien Lysat ohne Energieregenerierungssystem beträgt unter fünf Minuten. Eine Energieregenerierung ist für die Biosynthese also dringend erforderlich. Die Degradation des ATP endet nicht beim AMP, sondern AMP wird weiter abgebaut. Die Abbauewege sind in Figur 12.6 dargestellt.



Figur 12.5: Inkubation von ATP bei 37°C mit 10% Lysat unter Translationsbedingungen, aber **ohne Energieregenerierung**. Dabei wird ATP durch Nukleasen rasch abgebaut. ADP entsteht, wird aber zu AMP weiter degradiert, so dass es sich nicht anreichern kann. Das entstehende AMP ist aber nicht äquivalent zur eingesetzten Gesamtmenge an abgebautem ATP. Die aufgetragene Summe aller nach 45min vorhandenen Nucleotide beträgt nur rund die Hälfte der Anfangskonzentration.

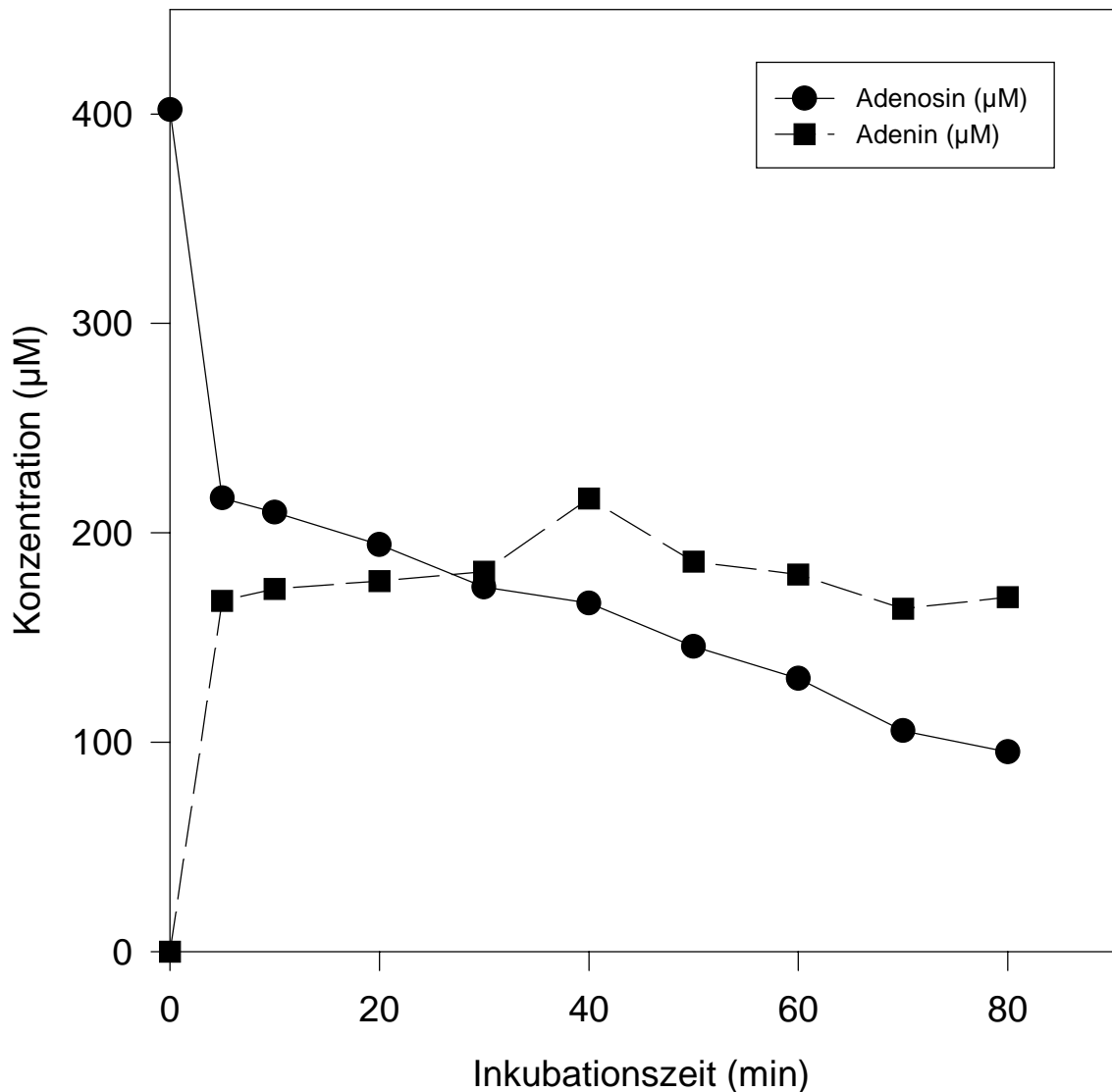


Figur 12.6: Netzwerk der Adenin-Nukleotid Synthese- und Abbauege *in vivo* von *Escherichia coli*. Die Zahlen geben die E.C.-Nummern der beteiligten Enzyme an. Alle Reaktionen sind in beide Richtungen möglich.

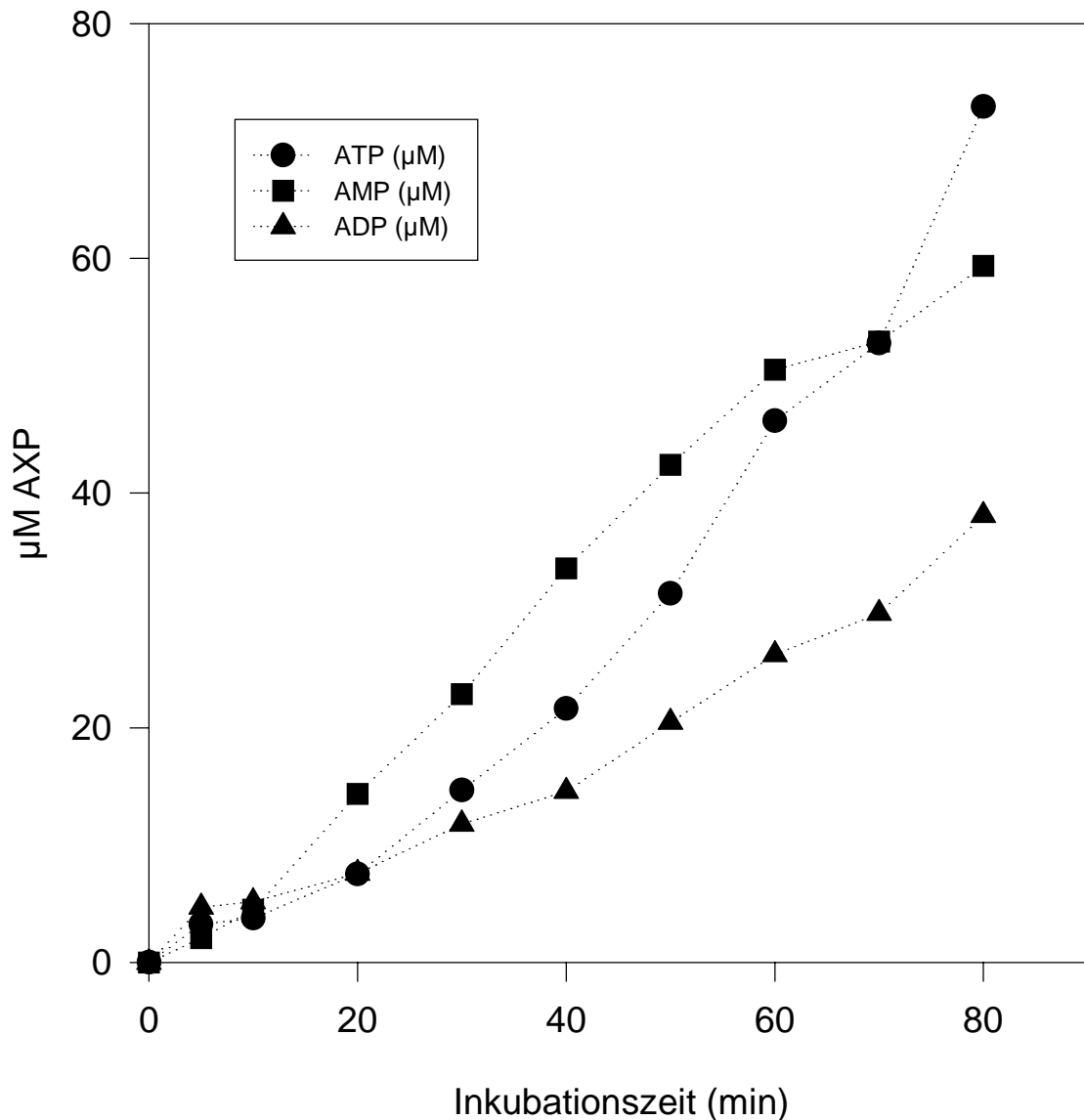
Beim Abbau des Energieträgers ATP im zellfreien System lassen sich mittels HPLC die Abbauprodukte ADP, AMP, Adenosin, Adenin, aber auch Inosin und Hypoxanthin nachweisen. Die jeweilige Identifizierung und Eichung erfolgte über Standardsubstanzen (Fa. Sigma, Deisenhofen), siehe Abschnitt 5.6.. Die komplizierten *in vivo* Abbauege des ATP finden *in vitro* also ebenso statt.

Da die Degradation der Nucleotide *in vitro* den Abbauegen *in vivo* folgt, wurde überprüft, ob dies auch für die Rückreaktionen, also die Synthese von ATP gilt. Nach Zugabe von Acetylphosphat sollte der Aufbau von ATP auch *in vitro* möglich sein. Tatsächlich wurde im

Experiment gezeigt (Figur 12.8), dass ausgehend vom Adenosin eine Synthese der Nukleotide erfolgte, aber ebenso ein weiterer Abbau zum Adenin (Figuren 12.7 und 12.8).



Figur 12.7: 10% Extrakt, 560µM Adenosin und 40mM AcP wurden unter Translationsbedingungen bei 37°C inkubiert. Die Konzentration des Adenosin nahm sehr schnell ab, bedingt durch Aufbau zu Nukleotiden, als auch durch Abbau zu Adenin, dessen Konzentration anfangs sehr rasch zunimmt. Die gemessene Anfangskonzentration des Adenosin stimmt nicht mit der eingesetzten Menge überein, da während des Mischens der Probe (ca. 1-2min) und des Abstoppens bereits ein Teil der Substanz zersetzt ist.



Figur 12.8.: Konzentration der Nukleotide als Funktion der Zeit während des in Figur 12.7 dargestellten Experimentes. Da vor allem ADP einem ständigen Turn-over unterliegt, reichert es sich nicht so stark an, wie ATP und AMP.

Die Halbwertszeit des eingesetzten Acetylphosphates betrug in diesem Experiment ca. 50min. Die Abweichung der Gesamtbilanz, bei welcher Adenin, Adenosin, AMP, ADP und ATP berücksichtigt wurden, betrug unter 8%. Weitere Peaks erschienen in den Chromatogrammen, darunter noch identifizierbar Inosin und Hypoxanthin, und bildeten einen Hintergrund, welcher sich nicht mehr quantitativ auswerten liess. Dieser Hintergrund stellt die Abweichung von der Bilanzsumme dar.

Die Figuren 12.5 bis 12.8 zeigen, dass Nukleasen im zellfreien Extrakt die eingesetzten Energieträger sehr schnell zerstören. Andererseits kann aber durch ein funktionelles Energieregenerierungssystem die Konzentration der eingesetzten Trinukleotide nicht nur erhalten, sondern sogar erhöht werden. Da Adenosin oder AMP kommerziell wesentlich billiger zu erhalten sind, als ADP oder erst recht ATP, bedeutet der Einsatz von Adenosin oder AMP in der zellfreien Biosynthese eine wesentliche Kostenersparnis (Thiele, 1999). Eine exakte Modellierung des Energieregenerierungsnetzwerkes ist Teil der Dissertation von Sabine Arnold (Arnold, 2000).

Mit Hilfe dieser HPLC-Methode liess sich ermitteln, dass während einer zellfreien Biosynthese im Batch sowohl GTP als auch ATP als Energie- und Reaktionskomponenten auch nach dem Zusammenbruch der Translation noch in ausreichender Menge vorhanden sind. Das bedeutet, dass die Energieversorgung bei der *in vitro* Proteinsynthese nicht der limitierende Faktor ist (Siemann *et al.*, 2000). Für den kontinuierlichen Reaktor wurde ebenfalls festgestellt, dass die Energieregenerierungsreaktion auch nach 48h noch aktiv war (Arnold, 2000; Thiele, 1999).

13. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Wie in Publikation V ausführlich dargestellt und diskutiert (Siemann *et al.*, 2000), wurde mit Hilfe der 2DE festgestellt, dass einige, z.T. als essentiell bekannte Phosphorylierungen an Proteinen, die in die Proteinbiosynthese involviert sind, nur im aktiven Zustand des zellfreien Lysates vorhanden sind. Ist das Lysat inaktiv, d.h. kann es keine Synthese des Zielproteins mehr durchführen, stellt man charakteristische Veränderungen des Phosphorylierungsmusters fest; viele der Modifizierungen fehlen. Das ist nicht nur der Fall nach einem Zusammenbruch der *in vitro* Biosynthese, sondern auch nach einer unvollständigen oder fehlerhaften Herstellung des S30 Extraktes. Mutmasslich spiegeln diese Effekte das Wechselspiel zwischen Phosphatasen und Kinasen im regulatorischen System des Lysates wider. Phosphorylierungen als Regulationsmechanismen in der Proteinbiosynthese bei Eukaryonten sind seit langer Zeit bekannt (Merrick, 1992; Michal, 1999; Morley, 1994). Unter anderem stimuliert die Phosphorylierung von EF-1 (dem eukaryotischen Analog zu EF-Tu) und des 40S ribosomalen Protein S6, die Elongation. Erste Hinweise, dass

Phosphorylierungsmechanismen auch an prokaryotischer Translation beteiligt sind, ergaben sich 1992. Robertson und Nicholson stellten fest, dass *in vivo* das ribosomale Protein S1 und alle drei Initiationsfaktoren von *E.coli* nach einer Infektion mit dem Bakteriophagen T7 phosphoryliert wurden. Wenig später entdeckten sie den gleichen Effekt an Elongationsfaktor G und dem ribosomalen Protein S6 (Robertson *et al.*, 1994; Robertson and Nicholson, 1992). Die Modifikationen wurden an Serinen und/oder Threoninen der jeweiligen Proteine festgestellt. Die Autoren schlossen auf eine Translations-Kontrolle der bakteriellen Proteine durch den Phagen.

T7 Bakteriophagen regulieren die Proteinexpression ihres Wirts innerhalb von 4-12 Minuten vollkommen um. Die Phagen induzieren Kontrollmechanismen, welche sowohl auf dem Level der Transkription als auch der Translation wirken, und sie besitzen hoch promotorspezifische Polymerasen. Die Synthese der Phagenproteine durch den Biosyntheseapparat der Wirtszelle wird verstärkt, während sich die Synthese der Wirtsproteine stark verringert, jedoch nur soweit, dass die Zellen während der Phagenentwicklung nicht absterben (Herrlich *et al.*, 1974; Klaus *et al.*, 1992; Rahmsdorf *et al.*, 1974; Studier, 1972).

T7 ist ein virulenter DNA-Doppelstrang Phage. Er besteht aus einem polyedrischen Kopf mit 30nm und einem Schwanz mit 20nm Länge. Sein Genom ist knapp 40kBasen lang und codiert für 50 Gene. Die Genprodukte sind eingeteilt in drei Klassen. Klasse I, die frühen Proteine, codiert von 0-20% der Genomlänge, sind das Ocr-Protein, Proteinkinase, RNA-Polymerase, DNA-Replikation-Maturation und DNA-Ligase. Klasse II, von ca. 20-45%, bilden die Enzyme des DNA-Metabolismus (z.B. DNA-Polymerase), während Klasse III, die späten Gene, die Strukturproteine zur Maturation des Virions synthetisieren (Klaus *et al.*, 1992). Bereits an Position 0.7 des Genoms wird eine Proteinkinase (ATP:Protein-Phosphotransferase) codiert. Nur rund 4min nach Phageninfektion überträgt diese die terminale Phosphatgruppe von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP auf Proteine des *E.coli* Wirtsstammes, unter anderem auch auf ribosomale Proteine. Dieser Prozess ist sowohl *in vivo*, als auch in einer zellfreien Reaktion beschrieben (Rahmsdorf *et al.*, 1974). Die Kinase phosphoryliert Polypeptide an Serin oder Threonin, ist aber *in vivo* instabil (Zillig *et al.*, 1975). Auch bei dem DNA Phagen M13 wurde eine spezifische Phosphorylierung von *E.coli* Proteinen nach Phageninfektion *in vivo* beobachtet, jedoch konnten die Proteine meist nicht identifiziert werden (Rieul *et al.*, 1987).

Betrachtet man die zellfreie Proteinbiosynthese mit dem Wissen, dass sie durch Verlust offensichtlich essentieller Phosphorylierungen limitiert wird, während Phagen augenscheinlich gezielt Proteine phosphorylieren, um eine Biosynthesekontrolle zu erreichen, drängt sich der Gedanke auf, die phageneigene Proteinkinase zur Erhaltung oder Verstärkung der zellfreien Synthese einzusetzen. Die Spezifität des Enzyms, nämlich Serin und Threonin, entspricht dem Charakter der in der *in vitro* Biosynthese verlorenen Modifizierungen. Einer der Kontrollmechanismen der Phagentranskription wird bereits *in vitro* verwendet: die Spezifität einer hinzugegebenen T7 RNA-Polymerase wird ausgenutzt, indem das zu synthetisierende Strukturgen hinter einen T7 Promotor kloniert wurde. Die Funktion der T7 Kinase hingegen scheint die Synthese der Klasse II und vor allem der Klasse III-Proteine zu stimulieren, die sich ab ca. 20% bzw. 45% der Genomlänge nach dem T7 Promotor befinden (Robertson and Nicholson, 1992; Zillig *et al.*, 1975).

Diese Tatsachen sollten für die Verbesserung der zellfreien Biosynthese auszunutzen sein: kloniert man zwischen den bereits vorhandenen T7 Promotor und dem Strukturgen des Zielproteins das Gen für die T7 Proteinkinase, wobei man ungefähr die natürlichen Abstände auf dem Phagen genom berücksichtigen sollte, dürfte eine funktionell aktive T7 Kinase *in vitro* co-exprimiert werden. Die schnelle Degradation der Kinase ist nicht mehr relevant, da sie ständig neu synthetisiert wird. Diese Kinase sollte Proteine des *E.coli* Lysates phosphorylieren, deren Modifizierungen bisher im Laufe der zellfreien Synthese verloren gingen; natürlich vor allem aber an der Biosynthese beteiligte Faktoren. Das daraufhin erhaltene Phosphorylierungsmuster könnte in etwa demjenigen in aktiven Lysaten entsprechen. Ist dies der Fall, dürfte die Translationsaktivität bedeutend länger anhalten als in herkömmlichen *in vitro* Synthesen. Durch die Co-Expression von T7 Kinase mit dem Zielprotein in der zellfreien Biosynthese könnte man vor allem eine Verlängerung der Synthesedauer erreichen, was wesentlich erhöhte Endkonzentrationen zur Folge hätte. Ob die Koexpression dieses einzigen Enzyms ausreicht, oder ob noch andere Proteinfaktoren oder evtl. DNA-Signal-Sequenzen (in cis oder trans) benötigt werden, bedarf der experimentellen Überprüfung. Eine Zugabe von aufgereinigter T7 Kinase zur zellfreien Reaktion ist vermutlich nicht sinnvoll, da das Enzym instabil ist. Vorversuche zur Herstellung eines S30 Extraktes mit infizierten *E.coli* Zellen scheiterten an der geringen Zellmasse. Da der verwendete Titer des T7-Phagen maximal 10^8 betrug, mussten die *E.coli* Zellen bereits bei einer OD von 0.8 (600nm) geerntet werden, damit mindestens ein Phage auf eine Wirtszelle kam. Die daraus gewonnene Zellmasse reichte für eine Lysatherstellung nicht aus.

In den vorstehend dargelegten Vorstellungen bezüglich der Kontrolle der Phosphorylierungen lässt sich eine gewisse Analogie zwischen der Strategie des Phagen, den Proteinsyntheseapparat der Wirtszelle für die eigenen Belange zu nutzen, und der gezielten Beeinflussung bei der zellfreien Proteinbiosynthese zur Produktion von Fremdproteinen, erkennen. In beiden Fällen besteht das Ziel, die Syntheseleistungen auf ein oder mehrere Targetproteine zu fokussieren.

Das natürliche System des Phagen zeigt uns, dass für die erfolgreiche “Übernahme” der Kontrollfunktionen der Synthese Phosphorylierungen an Schlüsselproteinen von grosser Bedeutung sind. Eine Anwendung dieser faszinierenden Strategie sollte der wünschenswerten und notwendigen Verbesserung der Leistung der zellfreien Proteinbiosynthese neue und erfolgversprechende Impulse geben.

14. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1DE	Eindimensionale Elektrophorese	ORF	Open Reading Frame
2DE	Zweidimensionale Elektrophorese	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
aa-tRNA	Aminoacylierte tRNA	PDI	Protein Disulfid Isomerase
AcK	Acetatkinase	PEG	Polyethylenglycol
AcP	Acetylphosphat	PEP	Phosphoenolpyruvat
AICAR	5`-Phosphoribosyl-5-Amino-4- Imidazole Carboxamide	P _i	Anorganisches Phosphat
APS	Amoniumpersulfat	PP _i	Pyrophosphat
BSA	Rinderserum Albumin	prpp	Phospho-Ribosyl-Pyrophosphat
cAMP	Circuläres Adenosinmonophosphat	PSD	Post-Source-Decay
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase	RF	Translations Terminationsfaktor
cDNA	Complementäre DNA	Rib1P	Ribose-1-Phosphat
CFCF	Cell-Free Continous-Flow	Rib5P	Ribose-5-Phosphat
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)- Dimethylammonio) Propansulfonat	RRF	Ribosomaler Recycling Faktor
CSCF	Cell-Free SemiContinous Flow	SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
ddH ₂ O	Reinstwasser	TCA	Trichloressigsäure
DTE	Dithioerithrol	tRNA	Transfer-RNA
DTT	Dithiotreitol	WWW	World Wide Web
EF	Elongationsfaktor		
ESI	Elektrospray Ionisierung		
EST	Expressed Sequence Tag		
fMET	Formyl-Methionin		
GFP	Green Fluorescence Protein		
IBVT	Institut für Bioverfahrenstechnik		
IDP	Inosindiphosphat		
IEF	Isoelektrische Fokkussierung		
IF	Translations Initiationsfaktor		
IMP	Inosinmonophosphat		
IPG	Immobilisierter pH-Gradient		
ITP	Inosintriphosphat		
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption- Ionization Time-of-Flight Massenspektrometer		
MB	Mega Bytes		
MW	Molekulargewicht		
MWCO	Molecular Weight Cut-Off (Molekulare Ausschlussgrenze)		
NDP	Nukleotiddiphosphat		
NMP	Nukleotidmonophosphat		
NTP	Nukleotidtriphosphat		
NTPasen	Nucleotidtriphosphat Nucleasen		

Symbole für natürliche Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Asparagin oder Aspartat	Asx	B
Cystein	Cys	C
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Glutamin oder Glutamat	Glx	Z

15. Literaturverzeichnis

- Alexander, C., Bilgin, N., Lindschau, C., Mesters, J.R., Kraal, B., Hilgenfeld, R., Erdmann, V.A. and Lippmann, C. (1995) Phosphorylation of elongation factor Tu prevents ternary complex formation. *J Biol Chem*, **270**, 14541-7.
- Alix, J.-H. (1993) Extrinsic Factors in Ribosome Assembly. In Nierhaus, K.H., Franceschi, F., Subramanian, A.R., Erdmann, V.A. and Wittmann-Liebold, B. (eds.), *The Translational Apparatus*. Plenum Press, New York, pp. 173-184.
- Anderson, C.W., Straus, J.W. and Dudock, B.S. (1983) Preparation of a cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. *Methods Enzymol*, **101**, 635-44.
- Anthony, R.S. and Spector, L.B. (1972) Phosphorylated acetate kinase. Its isolation and reactivity. *J Biol Chem*, **247**, 2120-5.
- Arnold, R.J. and Reilly, J.P. (1999) Observation of Escherichia coli ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal Biochem*, **269**, 105-12.
- Arnold, S. (2000) Dissertation: laufende Arbeit. *Institut für Bioverfahrenstechnik*. Stuttgart, Stuttgart.
- Baranov, V.I., Morozov, I., Ortlepp, S.A. and Spirin, A.S. (1989) Gene expression in a cell-free system on the preparative scale. *Gene*, **84**, 463-6.
- Baranov, V.I. and Spirin, A.S. (1993) Gene expression in cell-free system on preparative scale. *Methods Enzymol*, **217**, 123-42.
- Bergman, T., Gheorghe, M.T., Hjelmqvist, L. and Jornvall, H. (1996) Alcoholic deblocking of N-terminally acetylated peptides and proteins for sequence analysis. *FEBS Lett*, **390**, 199-202.
- Bork, P. and Bairoch, A. (1996) Go hunting in sequence databases but watch out for the traps. *Trends Genet*, **12**, 425-7.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Bremer, H. and Ehrenberg, M. (1995) Guanosine tetraphosphate as a global regulator of bacterial RNA synthesis: a model involving RNA polymerase pausing and queuing. *Biochim Biophys Acta*, **1262**, 15-36.
- Burbaum, J.J. and Schimmel, P. (1991) Structural relationships and the classification of aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem*, **266**, 16965-8.
- Castellanos-Serra, L., Proenza, W., Huerta, V., Moritz, R.L. and Simpson, R.J. (1999) Proteome analysis of polyacrylamide gel-separated proteins visualized by reversible negative staining using imidazole-zinc salts. *Electrophoresis*, **20**, 732-7.

- Chapman, A.G. and Atkinson, D.E. (1977) Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. *Adv Microb Physiol*, **15**, 253-306.
- Chen, H.Z. and Zubay, G. (1983) Prokaryotic coupled transcription-translation. *Methods Enzymol*, **101**, 674-90.
- Chevallet, M., Procaccio, V. and Rabilloud, T. (1997) A nonradioactive double detection method for the assignment of spots in two-dimensional blots. *Anal Biochem*, **251**, 69-72.
- Chevrier-Miller, M., Jacques, N., Raibaud, O. and Dreyfus, M. (1990) Transcription of single-copy hybrid lacZ genes by T7 RNA polymerase in Escherichia coli: mRNA synthesis and degradation can be uncoupled from translation. *Nucleic Acids Res*, **18**, 5787-92.
- Clark, B.F. and Nyborg, J. (1997) The ternary complex of EF-Tu and its role in protein biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 110-6.
- Clark, B.F., Thirup, S., Kjeldgaard, M. and Nyborg, J. (1999) Structural information for explaining the molecular mechanism of protein biosynthesis. *FEBS Lett*, **452**, 41-6.
- Cornish, V.W., Mendel, D. and Schultz, P.G. (1995) Untersuchungen von Struktur und Funktion von Proteinen mit einem erweiterten genetischen code. *Angewandte Chemie*, **107**, 677-690.
- Cortay, J.C., Rieul, C., Duclos, B. and Cozzone, A.J. (1986) Characterization of the phosphoproteins of Escherichia coli cells by electrophoretic analysis. *Eur J Biochem*, **159**, 227-37.
- Corthals, G.L., Molloy, M.P., Herbert, B.R., Williams, K.L. and Gooley, A.A. (1997) Prefractionation of protein samples prior to two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, **18**, 317-23.
- Craig, D., Howell, M.T., Gibbs, C.L., Hunt, T. and Jackson, R.J. (1992) Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system. *Nucleic Acids Res*, **20**, 4987-95.
- Das, B., Chattopadhyay, S., Bera, A.K. and Dasgupta, C. (1996) In vitro protein folding by ribosomes from Escherichia coli, wheat germ and rat liver: the role of the 50S particle and its 23S rRNA. *Eur J Biochem*, **235**, 613-21.
- Ehretsmann, C.P., Carpousis, A.J. and Krisch, H.M. (1992) mRNA degradation in procaryotes. *Faseb J*, **6**, 3186-92.
- Endo, Y., Oka, T., Ogata, K. and Natori, Y. (1993) Production of dihydrofolate reductase by an improved continuous flow cell-free translation system using wheat germ extract. *Tokushima J Exp Med*, **40**, 13-17.
- Erdmann, V.A., Fuchs, U. and Stiege, W. (1994) The Protein Bioreactor: Its potentials for the synthesis of proteins in biotechnology, medicine and molecular biology. *Biotech 2000*, 57-70.

- Faxen, M. and Isaksson, L.A. (1994) Functional interactions between translation, transcription and ppGpp in growing *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1219**, 425-34.
- Fedorov, A.N. and Baldwin, T.O. (1997) Cotranslational protein folding. *J Biol Chem*, **272**, 32715-8.
- Fichmann, J. (1999) Advantages of immobilized pH gradients. *Methods Mol Biol*, **112**, 173-4.
- Fox, D.K. and Roseman, S. (1986) Isolation and characterization of homogeneous acetate kinase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **261**, 13487-97.
- Gatti, A. and Traugh, J.A. (1999) A two-dimensional peptide gel electrophoresis system for phosphopeptide mapping and amino acid sequencing. *Anal Biochem*, **266**, 198-204.
- Goldman, E. and Jakubowski, H. (1990) Uncharged tRNA, protein synthesis, and the bacterial stringent response. *Mol Microbiol*, **4**, 2035-40.
- Gorg, A. (1999) IPG-Dalt of very alkaline proteins. *Methods Mol Biol*, **112**, 197-209.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A., Diaz, J.J. and Madjar, J.J. (1997) Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis*, **18**, 328-37.
- Gorg, A., Postel, W. and Gunther, S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **9**, 531-46.
- Gorg, A. and Weiss, W. (1999) Horizontal SDS-PAGE for IPG-Dalt. *Methods Mol Biol*, **112**, 235-44.
- Gottesman, S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*, **30**, 465-506.
- Gottesman, S. and Maurizi, M.R. (1992) Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev*, **56**, 592-621.
- Hanes, J. and Pluckthun, A. (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4937-42.
- Herbert, B. (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, **20**, 660-3.
- Herendeen, D.R., Williams, K.P., Kassavetis, G.A. and Geiduschek, E.P. (1990) An RNA polymerase-binding protein that is required for communication between an enhancer and a promoter. *Science*, **248**, 573-8.
- Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J., Pai, S.H. and Schweigher, M. (1974) Translational control induced by bacteriophage T7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1088-92.
- Higgins, C.F., Peltz, S.W. and Jacobson, A. (1992) Turnover of mRNA in prokaryotes and lower eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, **2**, 739-47.

- Hochstrasser, D. and Tissot, J. (1993) Clinical applications of 2-D page. In A, C., MJ, D. and BJ, R. (eds.), *Advances in Electrophoresis*. VCH, Weinheim, Germany, Vol. 6, pp. 270-375.
- Houen, G., Bruun, L. and Barkholt, V. (1997) Combined immunostaining and Coomassie Brilliant Blue staining of polyvinylidene difluoride membranes without organic solvent. *Electrophoresis*, **18**, 701-5.
- Houry, W.A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. and Hartl, F.U. (1999) Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature*, **402**, 147-154.
- Jermutus, L., Ryabova, L.A. and Pluckthun, A. (1998) Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation. *Curr Opin Biotechnol*, **9**, 534-48.
- Jorgensen, E.D., Durbin, R.K., Risman, S.S. and McAllister, W.T. (1991) Specific contacts between the bacteriophage T3, T7, and SP6 RNA polymerases and their promoters. *J Biol Chem*, **266**, 645-51.
- Kaltschmidt, E. (1971) Ribosomal proteins. XIV. Isoelectric points of ribosomal proteins of *E. coli* as determined by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **43**, 25-31.
- Kaltschmidt, E. and Wittmann, H.G. (1970) Ribosomal proteins. XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of *Escherichia coli* as determined by two-dimensional gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **67**, 1276-82.
- Kandror, O., Busconi, L., Sherman, M. and Goldberg, A.L. (1994) Rapid degradation of an abnormal protein in *Escherichia coli* involves the chaperones GroEL and GroES. *J Biol Chem*, **269**, 23575-82.
- Katanaev, V.L., Kurnasov, O.V. and Spirin, A.S. (1995) Viral Q beta RNA as a high expression vector for mRNA translation in a cell-free system. *FEBS Lett*, **359**, 89-92.
- Katanaev, V.L., Spirin, A.S., Reuss, M. and Siemann, M. (1996) Formation of bacteriophage MS2 infectious units in a cell-free translation system. *FEBS Lett*, **397**, 143-8.
- Kawarasaki, Y., Kawai, T., Nakano, H. and Yamane, T. (1995) A long-lived batch reaction system of cell-free protein synthesis. *Anal Biochem*, **226**, 320-4.
- Kawarasaki, Y., Nakano, H. and Yamane, T. (1994) Prolonged cell-free protein synthesis in a batch system using wheat germ extract. *Biosci Biotechnol Biochem*, **58**, 1911-3.
- Kawarasaki, Y., Nakano, H. and Yamane, T. (1998) Phosphatase-immunodepleted cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol*, **61**, 199-208.
- Kellner, R., Lottspeich, F. and Meyer, H.E. (1999) *Microcharacterization of Proteins*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Kigawa, T. and Yokoyama, S. (1991) A continuous cell-free protein synthesis system for coupled transcription-translation. *J Biochem (Tokyo)*, **110**, 166-8.

- Kim, D.M., Kigawa, T., Choi, C.Y. and Yokoyama, S. (1996) A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, **239**, 881-6.
- Kim, D.-M. and Choi, C.-Y. (1996) A Semicontinuous Prokaryotic Coupled Transcription/Translation System Using a Dialysis Membrane. *Biotechnol. Prog.*, **12**, 645-649.
- King, J. and Betts, S. (1999) A green light for protein folding [news; comment]. *Nat Biotechnol*, **17**, 637-8.
- Kitaoka, Y., Nishimura, N. and Niwano, M. (1996) Cooperativity of stabilized mRNA and enhanced translation activity in the cell-free system. *J Biotechnol*, **48**, 1-8.
- Klaus, S., Krüger, D.H. and Meyer, J. (1992) *Bakterienviren*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- Klose, J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, **26**, 231-43.
- Klose, J. (1999a) Genotypes and phenotypes. *Electrophoresis*, **20**, 643-52.
- Klose, J. (1999b) Large-gel 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol*, **112**, 147-72.
- Kohrer, C., Mayer, C., Grobner, P. and Piendl, W. (1996) Use of T7 RNA polymerase in an optimized *Escherichia coli* coupled in vitro transcription-translation system. Application in regulatory studies and expression of long transcription units. *Eur J Biochem*, **236**, 234-9.
- Kolb, V.A., Makeyev, E.V., Kommer, A. and Spirin, A.S. (1995) Cotranslational folding of proteins. *Biochem Cell Biol*, **73**, 1217-20.
- Krivankova, L. and Bocek, P. (1998) Continuous free-flow electrophoresis. *Electrophoresis*, **19**, 1064-74.
- Kudlicki, W., Coffman, A., Kramer, G. and Hardesty, B. (1997) Renaturation of rhodanese by translational elongation factor (EF) Tu. Protein refolding by EF-Tu flexing. *J Biol Chem*, **272**, 32206-10.
- Kudlicki, W., Kramer, G. and Hardesty, B. (1992) High efficiency cell-free synthesis of proteins: refinement of the coupled transcription/translation system. *Anal Biochem*, **206**, 389-93.
- Kudlicki, W., Odom, O.W., Kramer, G. and Hardesty, B. (1996) Binding of an N-terminal rhodanese peptide to DnaJ and to ribosomes. *J Biol Chem*, **271**, 31160-5.
- Liberatori, S., Bini, L., De Felice, C., Magi, B., Marzocchi, B., Raggiaschi, R., Pallini, V. and Bracci, R. (1997) Acute-phase proteins in perinatal human plasma. *Electrophoresis*, **18**, 520-6.
- Liljas, A. and Garber, M. (1995) Ribosomal proteins and elongation factors. *Curr Opin Struct Biol*, **5**, 721-7.

- Lindahl, L. and Hinnebusch, A. (1992) Diversity of mechanisms in the regulation of translation in prokaryotes and lower eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, **2**, 720-6.
- Link, A.J. (ed.) (1999a) *2-D Proteome Analysis Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Link, A.J. (1999b) Autoradiography of 2-D gels. *Methods Mol Biol*, **112**, 285-90.
- Lipmann, F. and Tuttle, L.C. (1944) Acetyl phosphate: chemistry, determination and synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **155**, 571-582.
- Lipmann, F. and Tuttle, L.C. (1945) A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. *Journal of Biological Chemistry*, **156**, 21-28.
- Lippmann, C., Lindschau, C., Vijgenboom, E., Schroder, W., Bosch, L. and Erdmann, V.A. (1993) Prokaryotic elongation factor Tu is phosphorylated in vivo. *J Biol Chem*, **268**, 601-7.
- Lloyd, A.J., Thomann, H.U., Ibba, M. and Soll, D. (1995) A broadly applicable continuous spectrophotometric assay for measuring aminoacyl-tRNA synthetase activity. *Nucleic Acids Res*, **23**, 2886-92.
- Lottspeich, F. (1999) Proteomanalyse - ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen. *Angewandte Chemie*, **111**, 2630-2647.
- Lottspeich, F. and Zorbas, H. (eds.) (1998) *Bioanalytik*. Springer, Heidelberg.
- Matsui, N.M., Smith-Beckerman, D.M. and Epstein, L.B. (1999a) Staining of preparative 2-D gels. Coomassie blue and imidazole-zinc negative staining. *Methods Mol Biol*, **112**, 307-11.
- Matsui, N.M., Smith-Beckerman, D.M., Fichmann, J. and Epstein, L.B. (1999b) Running preparative carrier ampholyte and immobilized pH gradient IEF gels for 2-D. *Methods Mol Biol*, **112**, 211-9.
- Matveev, S.V., Illarionov, B.A., Vysotski, E.S., Bondar, V.S., Markova, S.V. and Alakhov, Y.B. (1995) Obelin mRNA--a new tool for studies of translation in cell-free systems. *Anal Biochem*, **231**, 34-9.
- McClure, W.R. (1985) Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*, **54**, 171-204.
- Merk, H., Stiege, W., Tsumoto, K., Kumagai, I. and Erdmann, V.A. (1999) Cell-free expression of two single-chain monoclonal antibodies against lysozyme: effect of domain arrangement on the expression. *J Biochem (Tokyo)*, **125**, 328-33.
- Merrick, W.C. (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev*, **56**, 291-315.
- Mesters, J.R., Zeef, L.A., Hilgenfeld, R., de Graaf, J.M., Kraal, B. and Bosch, L. (1994) The structural and functional basis for the kirromycin resistance of mutant EF-Tu species in *Escherichia coli*. *Embo J*, **13**, 4877-85.

- Michal, G. (ed.) (1999) *Biochemical Pathways: Biochemie Atlas*. Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Walsh, B.J., Tyler, M.I., Traini, M., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. and Gooley, A.A. (1998) Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **19**, 837-44.
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Williams, K.L. and Gooley, A.A. (1999) Extraction of *Escherichia coli* proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, **20**, 701-4.
- Morley, S.J. (1994) Signal transduction mechanisms in the regulation of protein synthesis. *Mol Biol Rep*, **19**, 221-31.
- Morris, C.E., McGraw, N.J., Joho, K., Brown, J.E., Klement, J.F., Ling, M.L. and McAllister, W.T. (1986) Mechanisms of promotor recognition by the Bacteriophage T3 and T7 RNA Polymerases. In Reznikoff, W.S., Burgess, R.R., Dahlberg, J.E., Gross, C.A., Record, M.T. and Wickens, M.P. (eds.), *RNA polymerase and the regulation of transcription*. Elsevier, New York, pp. 47-58.
- Nakano, H., Kawarasaki, Y. and Yamane, T. (1996) Recent advances in cell-free protein synthesis towards a protein biosynthesizer. *Annals New York Academy of Sciences*, 406-412.
- Neidhardt, F.C. (1996) *Escherichia coli and salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Neubauer, P., Häggström, L. and Enfors, S.-O.-. (1995) Influence of Substrate Oscillations on acetate Formation and Growth Yield in *Escherichia coli* Glucose Limited Fed-Batch Cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, **47**, 139-146.
- Nevin, D.E. and Pratt, J.M. (1991) A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter. *FEBS Lett*, **291**, 259-63.
- Nierhaus, K.H., Franceschi, F., Subramanian, A.R., Erdmann, V.A. and Wittmann-Liebold, B. (eds.) (1993) *The Translational Apparatus: Structure, Function, Regulation, Evolution*. Plenum Press, New York.
- Nishimura, N., Kitaoka, Y. and Niwano, M. (1995) Enhancement of protein synthesis in continuous-flow, cell-free system by improvement of membrane permeation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**, 403-405.
- Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C. and Schultz, P.G. (1989) A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science*, **244**, 182-8.
- Nyborg, J. and Kjeldgaard, M. (1996) Elongation in bacterial protein biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol*, **7**, 369-75.

- Nyborg, J., Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G. and Clark, B.F. (1996) Structure of the ternary complex of EF-Tu: macromolecular mimicry in translation. *Trends Biochem Sci*, **21**, 81-2.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, **250**, 4007-21.
- Ostergaard, P., Phan, H., Johansen, L.B., Egebjerg, J., Ostergaard, L., Porse, B.T. and Garrett, R.A. (1998) Assembly of proteins and 5 S rRNA to transcripts of the major structural domains of 23 S rRNA. *J Mol Biol*, **284**, 227-40.
- Panagiotidis, C.A., Burkholder, W.F., Gaitanaris, G.A., Gragerov, A., Gottesman, M.E. and Silverstein, S.J. (1994) Inhibition of DnaK autophosphorylation by heat shock proteins and polypeptide substrates. *J Biol Chem*, **269**, 16643-7.
- Patton, W.F., Lim, M.J. and Shepro, D. (1999a) Image acquisition in 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol*, **112**, 353-62.
- Patton, W.F., Lim, M.J. and Shepro, D. (1999b) Protein detection using reversible metal chelate stains. *Methods Mol Biol*, **112**, 331-9.
- Platt, T. (1986) Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem*, **55**, 339-72.
- Posch, A., Chen, Z., Wheeler, C., Dunn, M.J., Raulf-Heimsoth, M. and Baur, X. (1997) Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *J Allergy Clin Immunol*, **99**, 385-95.
- Pratt, J.M. (1984) Coupled Transcription-Translation in Procaryotic Cell-Free Systems. In Hames, B. and Higgins, S. (eds.), *Transcription and Translation: a practical approach*. IRL Press, Oxford, England, pp. 179-209.
- Pratt, J.M. (1987) Coupled transcription-translation in procaryotic cell-free systems. In Hames, B.D. (ed.) *Transcription and Translation*. IRL Press, Oxford, pp. 179-209.
- Pruss, G.J. and Drlica, K. (1989) DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell*, **56**, 521-3.
- Rabilloud, T. (1999) Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol*, **112**, 297-305.
- Rahmsdorf, H.J., Pai, S.H., Ponta, H., Herrlich, P., Roskoski, R., Jr., Schweiger, M. and Studier, F.W. (1974) Protein kinase induction in Escherichia coli by bacteriophage T7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 586-9.
- Ramakrishnan, V. and White, S.W. (1998) Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome. *Trends Biochem Sci*, **23**, 208-12.
- Richardson, J.P. (1990) Rho-dependent transcription termination. *Biochim Biophys Acta*, **1048**, 127-38.

- Richardson, J.P. (1991) Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor. *Cell*, **64**, 1047-9.
- Rieul, C., Cortay, J.C., Bleicher, F. and Cozzzone, A.J. (1987) Effect of bacteriophage M13 infection on phosphorylation of dnaK protein and other Escherichia coli proteins. *Eur J Biochem*, **168**, 621-7.
- Robertson, E.S., Aggison, L.A. and Nicholson, A.W. (1994) Phosphorylation of elongation factor G and ribosomal protein S6 in bacteriophage T7-infected Escherichia coli. *Mol Microbiol*, **11**, 1045-57.
- Robertson, E.S. and Nicholson, A.W. (1992) Phosphorylation of Escherichia coli translation initiation factors by the bacteriophage T7 protein kinase. *Biochemistry*, **31**, 4822-7.
- Rose, I.A., Grunberg-Manago, M., Korey, S.R. and Ochoa, S. (1954) Enzymatic phosphorylation of Acetate. *J Biol Chem*, **102**, 737-756.
- Russell, J.B. and Cook, G.M. (1995) Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol Rev*, **59**, 48-62.
- Ryabova, L., Volianik, E., Kurnasov, O., Spirin, A., Wu, Y. and Kramer, F.R. (1994) Coupled replication-translation of amplifiable messenger RNA. A cell-free protein synthesis system that mimics viral infection. *J Biol Chem*, **269**, 1501-5.
- Ryabova, L.A., Desplancq, D., Spirin, A.S. and Pluckthun, A. (1997) Functional antibody production using cell-free translation: effects of protein disulfide isomerase and chaperones. *Nat Biotechnol*, **15**, 79-84.
- Ryabova, L.A., Morozov, I. and Spirin, A.S. (1998) Continuous-flow cell-free translation, transcription-translation, and replication-translation systems. *Methods Mol Biol*, **77**, 179-93.
- Ryabova, L.A., Ortlepp, S.A. and Baranov, V.I. (1989) Preparative synthesis of globin in a continuous cell-free translation system from rabbit reticulocytes. *Nucleic Acids Res*, **17**, 4412.
- Ryabova, L.A., Vinokurov, L.M., Shekhovtsova, E.A., Alakhov, Y.B. and Spirin, A.S. (1995) Acetyl phosphate as an energy source for bacterial cell-free translation systems. *Anal Biochem*, **226**, 184-6.
- Sanchez, J.C., Wirth, P., Jaccoud, S., Appel, R.D., Sarto, C., Wilkins, M.R. and Hochstrasser, D.F. (1997) Simultaneous analysis of cyclin and oncogene expression using multiple monoclonal antibody immunoblots. *Electrophoresis*, **18**, 638-41.
- Schindler, P.T., Baumann, S., Reuss, M. and Siemann, M. (1999a) Evaluating Cell-Free Protein Biosynthesis by High-Resolution 2D-Electrophoresis. *BIO TECH international*, **11**, 12-14.
- Schindler, P.T., Baumann, S., Reuss, M. and Siemann, M. (1999b) *In Vitro* Coupled Transcription/Translation: Effects of Modification in Lysate Preparation on Protein Composition and Biosynthesis Activity. *Electrophoresis*, **-submitted-**.

- Schindler, P.T., Macherhammer, F., Arnold, S., Reuss, M. and Siemann, M. (1999c) Investigation of translation dynamics under cell-free protein biosynthesis conditions using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis [In Process Citation]. *Electrophoresis*, **20**, 806-12.
- Schindler, P.T., Macherhammer, F., Siemann, M. and Reuss, M. (1998) Quantitative comparison of equilibration methods in high-resolution two-dimensional gel-electrophoresis. *International Symposium on Separation of Proteins and Polypeptides, ISPPP*, Vienna, Austria.
- Schindler, P.T., Reuss, M. and Siemann, M. (1999d) Non-radioactive screening technique for phosphoproteins in proteome analysis for application in high resolution two dimensional electrophoresis. *BioTechniques*, **-submitted-**.
- Schweiger, M. and Herrlich, P. (1974) DNA-directed enzyme synthesis in vitro. *Curr Top Microbiol Immunol*, **65**, 59-132.
- Seeger, M., Osorio, G. and Jerez, C.A. (1996) Phosphorylation of GroEL, DnaK and other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. *FEMS Microbiol Lett*, **138**, 129-34.
- Shen, X.-C., Yao, S.-L., Terada, S., Nagamune, T. and Suzuki, E. (1998) Protein productivity of cell-free translation was improved removing phosphatase from wheat germ extract with immunoprecipitation. *Biochemical Engineering Journal* **2**, 23-28.
- Sherman, M. and Goldberg, A.L. (1992a) Heat shock in *Escherichia coli* alters the protein-binding properties of the chaperonin groEL by inducing its phosphorylation. *Nature*, **357**, 167-9.
- Sherman, M. and Goldberg, A.L. (1992b) Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. *Embo J*, **11**, 71-7.
- Sherman, M. and Goldberg, A.L. (1994) Heat shock-induced phosphorylation of GroEL alters its binding and dissociation from unfolded proteins. *J Biol Chem*, **269**, 31479-83.
- Sherman, M.Y. and Goldberg, A.L. (1993) Heat shock of *Escherichia coli* increases binding of dnaK (the hsp70 homolog) to polypeptides by promoting its phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8648-52.
- Sherman, M.Y. and Goldberg, A.L. (1996) Involvement of molecular chaperones in intracellular protein breakdown. *Exs*, **77**, 57-78.
- Short, G.F., 3rd, Golovine, S.Y. and Hecht, S.M. (1999) Effects of release factor 1 on in vitro protein translation and the elaboration of proteins containing unnatural amino acids. *Biochemistry*, **38**, 8808-19.
- Siemann, M., Schindler, P.T., Arnold, S., Baumann, S., Scharnweber, K. and Reuss, M. (2000) State of protein phosphorylation among limitations in cell-free protein biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, **-submitted-**.
- Skarstedt, M.T. and Silverstein, E. (1976) *Escherichia coli* acetate kinase mechanism studied by net initial rate, equilibrium, and independent isotopic exchange kinetics. *J Biol Chem*, **251**, 6775-83.

- Spirin, A.S. (1990) Cell-free protein synthesis bioreactor. In Todd, P., Sikdar, S.K. and Bier, M. (eds.), *Frontiers in Bioprocessing II*. American Chemical Society, Washington DC, Boulder, Colorado, pp. 31-43.
- Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y. and Alakhov, Y.B. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science*, **242**, 1162-4.
- Stiege, W. and Erdmann, V.A. (1995) The potentials of the in vitro protein biosynthesis system. *J Biotechnol*, **41**, 81-90.
- Strohman, R.C. (1994) Epigenesis: the missing beat in biotechnology? *Bio/Technology*, **12**, 156-164.
- Studier, F.W. (1972) Bacteriophage T7. *Science*, **176**, 367-76.
- Tawfik, D.S. and Griffiths, A.D. (1998) Man-made cell-like compartments for molecular evolution [see comments]. *Nat Biotechnol*, **16**, 652-6.
- Thiele, C. (1999) Untersuchungen zur Dimensionierung eines zellfreien Energieregenerierungssystems. *Institut für Bioverfahrenstechnik*. Stuttgart, Stuttgart.
- Treier, M. and Bohmann, D. (1996) Phosphorylation of Transcription Factors. In Marks, F. (ed.) *Protein Phosphorylation*. VCH, Weinheim, pp. 297-327.
- Tsalkova, T., Zardeneta, G., Kudlicki, W., Kramer, G., Horowitz, P.M. and Hardesty, B. (1993) GroEL and GroES increase the specific enzymatic activity of newly-synthesized rhodanese if present during in vitro transcription/translation. *Biochemistry*, **32**, 3377-80.
- Tulin, E.E., Ken-Ichi, T. and Shin-Ichiro, E. (1995) Continuously coupled transcription-translation system for the production of rice cytoplasmic aldolase. *Biotechnol Bioeng*, **45**, 511-516.
- Unlu, M., Morgan, M.E. and Minden, J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, **18**, 2071-7.
- Volynik, E.V., Dalley, A., McKay, I.A., Leigh, I., Williams, N.S. and Bustin, S.A. (1993) Synthesis of preparative amounts of biologically active interleukin-6 using a continuous-flow cell-free translation system. *Anal Biochem*, **214**, 289-94.
- von der Haar, F. (1979) Purification of aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods Enzymol*, **59**, 257-67.
- von Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D. and McSwiggen, J.A. (1984) Protein-nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. *Annu Rev Biochem*, **53**, 389-446.
- Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J. and Terwilliger, T.C. (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein [see comments]. *Nat Biotechnol*, **17**, 691-5.

- Walsh, B.J. and Herbert, B.R. (1999) Casting and running vertical slab-gel electrophoresis for 2D-PAGE. *Methods Mol Biol*, **112**, 245-53.
- Westermeier, R. (1997) *Electrophoresis in Practice*. VCH, Weinheim.
- Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel, R.D. and Hochstrasser, D.F. (1997) *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer, Berlin.
- Wittmann, H.G. (1982) Components of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem*, **51**, 155-83.
- Wittmann, H.G. (1989) [Ribosomes and protein biosynthesis]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **370**, 87-99.
- Woodward, W.R., Ivey, J.L. and Herbert, E. (1974) Protein synthesis with rabbit reticulocyte preparations. *Methods Enzymol*, **30**, 724-31.
- Yamane, T., Kawarasaki, Y. and Nakano, H. (1995) In vitro protein biosynthesis using ribosome and foreign mRNA. An approach to construct a protein biosynthesizer. *Ann N Y Acad Sci*, **750**, 146-57.
- Yan, J.X., Packer, N.H., Gooley, A.A. and Williams, K.L. (1998) Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *Journal of Chromatography A*, **808**, 23-41.
- Yanofsky, C. (1988) Transcription attenuation. *J Biol Chem*, **263**, 609-12.
- Zhang, Y., Yu, N.J. and Spemulli, L.L. (1998) Mutational analysis of the roles of residues in Escherichia coli elongation factor Ts in the interaction with elongation factor Tu. *J Biol Chem*, **273**, 4556-62.
- Zillig, W., Fujiki, H., Blum, W., Janekovic, D., Schweiger, M., Rahmsdorf, H., Ponta, H. and Hirsch-Kauffmann, M. (1975) In vivo and in vitro phosphorylation of DNA-dependent RNA polymerase of Escherichia coli by bacteriophage-T7-induced protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 2506-10.
- Zubay, G. (1973) In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet*, **7**, 267-87.

18. Danksagung

Mein Dank gilt dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Förderung des Projektes A310U und den angegliederten Projektteilnehmern des Institutes für Biochemie der Freien Universität Berlin, der Firma IBA, Göttingen, dem Institut für Proteinforschung in Puschino, Russland und der Firma Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, vor allem Dr. T. Metzler, R. Reichhuber, Dr. E. Fernholz und Dr. H. Koll.

Professor Dr.-Ing. M. Reuss möchte ich danken für das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine umfassende Unterstützung und Motivation, ohne die diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre.

Dr. Martin Siemann danke ich für seine Hilfe, Diskussionsbereitschaft und Anregungen, sowie für die Koordination des Projektes.

Professor Dr. C. Syldatk danke ich für die Berichterstattung über diese Arbeit und viele Gespräche.

Ich danke **allen** ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Bioverfahrenstechnik für Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Um niemanden zu vergessen, werde ich hier keine Namen nennen, sondern jeder sollte sich persönlich angesprochen fühlen. Darüber hinaus hoffe ich, dass mir mein "bayrischer Sturschädel" nicht allzu übel genommen wurde. Schliesslich brauchte ich eine Wand, wo ich mir denselben einrennen konnte.

Ich danke insbesondere meinen Kollegen Dipl.-Ing. Sabine Arnold und Dipl.-Ing. Franz Macherhammer dafür, dass ich eine vollkommen neue Dimension der Zusammenarbeit erfahren durfte.

Claus und Claudine, ich danke Euch für Eure Liebe und dafür, dass Ihr da seid!

Michael, ich danke Dir für Deinen Glauben an mich (auch wenn`s manchmal schwierig ist), Deine Liebe und Dein grenzenlose Vertrauen in jeder Situation. Du gibst mir das nötige Selbstvertrauen, den Willen und den "Biss", den ich nicht nur für diese Arbeit brauchte und auch in Zukunft brauchen werde.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die letzten 29 Jahre.

17. Anhang

Publikation I

Investigation of Translation Dynamics under Cell-Free Protein Biosynthesis Conditions Using High Resolution Two-Dimensional Gel Electrophoresis

Petra Theresia Schindler, Franz Macherhammer, Sabine Arnold, Matthias Reuss and Martin
Siemann*

Electrophoresis, **20**, 806-812 (1999)

**Investigation of Translation Dynamics under Cell-Free Protein
Biosynthesis Conditions Using High Resolution Two-Dimensional
Gel Electrophoresis**

Petra Theresia Schindler, Franz Macherhammer, Sabine Arnold, Matthias Reuss
and Martin Siemann*

Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Allmandring 31, D-70569
Stuttgart, Germany

Running title: Investigation of Cell-Free Protein Biosynthesis by High
Resolution-2DE

Correspondence to: Dr. Martin Siemann
Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart,
Allmandring 31, D-70569 Stuttgart, Germany
Tel.: +49-(0)711-685-5161; Fax: +49-(0)711-685-5164
e-mail: siemann@ibvt.uni-stuttgart.de

Keywords: Green fluorescent protein, *in vitro* transcription/translation,
Escherichia coli, S30-extract, cell-free protein biosynthesis,
elongation factors.

SUMMARY

A cell-free extract from *Escherichia coli*, generated through a routine procedure according to Chen and Zubay (*Methods Enzymol.* 1983, 101, 674-690), was used for an *in vitro* protein synthesis. High resolution two-dimensional gel electrophoresis (HR-2DE) was exploited to investigate the protein composition of the cell-extract and its dynamic development during a 24-hour-period of cell-free protein synthesis performed in a membrane reactor device. Green fluorescent protein (GFP) was chosen as a target protein to be produced in a cell-free reactor, since its functional activity can easily be monitored by measurement of fluorescence and due to its high sensitivity. GFP synthesis was observed by a standard fluorescence assay and was correlated to a quantitative assessment of the silver-stained GFP-spot appearing on 2DE-gel maps. A constant protein synthesis rate was obtained for at least eight hours of process operation. While declining continuously, protein synthesis stopped entirely after 24 hours. Both total protein content and total number of detectable spots were found to decrease over the reaction time, due to proteolytic digestion and protein precipitation. Certain proteins taking part in the translation process, like the elongation factors (EF-Tu, EF-Ts) and the ribosomal protein RP-L9, were identified by Edman N-terminal sequencing and have thus been considered for reaction evaluation. The obtained dynamics during the entire process suggest that these translational factors were likewise affected by proteolytic decay.

1. INTRODUCTION

Cell-free transcription/translation - the *in vitro* synthesis of proteins using cellular extracts - has been a routine synthesis technique in molecular biology laboratories for several decades [1-3]. Most advantageous applications of this method include the production of toxic proteins, incorporation of amino acid derivatives into newly synthesized proteins or directed evolution, based on ribosomal or polysomal display [4, 5]. Above that, cell-free synthesis systems comprise accessible model systems for investigations on protein maturation, genome/proteome research and cell therapy (e.g., using antisense technology). However, despite its usefulness, the *in vitro* technique is inherently afflicted with a number of counter-productive reactions, like RNase, DNase and protease activity or the problem of sufficient energy charge maintenance, which can all – if not dealt with - lead to a decreased productivity and eventually to a collapse of the synthesis reaction. The cause of product limitations can be pinpointed and quantified using the tools of stoichiometric network analysis together with metabolic flux investigations, and dynamic modeling combined with sensitivity analysis [6]. The identification of key reactants and their interactions during cell-free transcription/translation allows to derive model-based construction rules for the assembly of a tailored protein synthesizing machinery. High resolution 2D-electrophoresis has been shown to be a powerful tool for proteome analysis (proteomics). We have thus applied this technology for reaction analysis of the complex cell-free protein synthesis system, in order to identify system immanent bottlenecks limiting the efficiency of *in vitro* protein synthesis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell-free biosynthesis reaction

Cells from *Escherichia coli* (strain A19) [10] were disrupted using a French press. S30-lysate was prepared according to Zubay [7]. Protein concentration was determined as described by Bradford [11]. The biosynthesis reaction was carried out following the protocol described by Spirin [8] and Metzler [Roche

Diagnostics, Germany, personal communications] in a DispoDialyzer membrane reactor (Spectra-Pore, USA) with a reaction volume of 1 ml (the dialysis volume was 5 ml) and a molecular weight cut-off of 10 kDa. Lysate concentration in the reaction volume was 20 % (v/v), which corresponded to 5.4 mg total protein. Plasmid pMGFP, which was a kind gift from A. Spirin (Institute of Protein Research, Pushchino, Russia), containing the structural gene for green fluorescence protein (GFP) was added to obtain a final concentration of 15 µg/ml. After 0, 2, 4, 8, and 24 hours of incubation, respectively, two identical samples of 20 µl were removed from the system for further analysis. After storage at 4 °C for at least 12 hours, the first sample volume was used for activity determination of GFP in a fluorometer (Contron instruments, Fluorometer SMF 25) at the excitation of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. For quantification, the measured activities were correlated against a GFP-standard of known concentration (Standard recombinant GFP; Roche Diagnostics, Cat. No 1814524).

The second sample volume was immediately frozen at -80 °C for later use in High resolution-2DE. All samples for 2DE-gel analysis were collected, thawed on ice, and afterwards desalted in Microcon Microconcentrators (molecular weight cut-off 10 kDa, Millipore, Bedford, MA, USA). Samples were resuspended in an appropriate buffer according to Bjellqvist et al. [12]. Equal volumes of 124 µl were loaded onto first dimension gels. The protein amount loaded on the initial gel was 70 µg for the sample taken at 0 hours of reaction time.

2.2 HR-2D-Electrophoresis

HR-2D-electrophoresis was performed as described by Görg et al. [13]. The equipment for electrophoresis (Multiphor II electrophoresis unit, IsoDalt system, EPS 2A200 & 3500XL power supplies, automated gel stainer, MultiTemp thermostatic circulator, PlusOne silver staining kit, Immobiline dry strip kit) was supplied from Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden. Precast Immobiline dry strip gels used for the first dimension were 18 cm long, exhibiting a non-linear pH gradient reaching from 3.5 to 10. The equilibration procedure was performed according to Westermeier [14]. The dimensions used for homogenous 13 % SDS-

page gels were 25 cm x 20 cm with 1.5 mm spacers. An automated gel-stainer was used according to the instructions supplied by the manufacturer, in order to obtain a most reproducible silver-staining procedure.

2.3 Image Analysis

Silver-stained gels were scanned with a Sharp JX-330 color image scanner at 400 dpi using the software LabScan 2.01 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The scanner was calibrated by use of a DeskTop scanning package (Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden) including the film scanning unit JX-3F6 (Sharp corporation) and the photographic step tablet No 2 (21 steps, density range approximately 0.05-3.05, Eastman Kodak Company, USA). Analysis of the digitalized gel images, including spot identification, editing, and volumetric quantification, was performed using ImageMaster 2D Elite Software, version 2.00 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

2.4 Identification of spots

Proteins were identified on the 2DE-gels by blotting and subsequent N-terminal sequencing (Edman degradation) or MALDI-MS fingerprinting (calibration standards). For additional calibration of gel maps according to their molecular weight and pI-values, 15 proteins, which were evenly distributed on the gel, were isolated from the gel and identified by MALDI-MS fingerprinting (data not shown). Amino acid sequences were aligned using the TagIdent data base (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/tagident.html>) The analyzed N-terminal sequence obtained for EF-Tu was KEKFERTKPF (aligned to ID-No P02990, SwissProt). For EF-Ts it was ITASLVKELR (ID-No P02997, SwissProt), while RP-L9 gave an N-terminal sequence of MQVILLDKVAN (ID-No P02418, SwissProt).

2.5 Detection of proteolytic activity

For demonstration of the proteolytic potency of the lysate, a commercially available protease activity detection system based on a protease-sensitive fluorescent label was applied, following the manufacturers manual (EnzChek-Kit, Molecular Probes, Leiden, Netherlands). At room temperature, cell extracts with final protein concentrations of 5 µg/ml to 1500 µg/ml were incubated for 0, 2 and 6 hours, respectively. The increase of fluorescence due to proteolysis was measured at 485 nm excitation and 530 nm emission.

The reduction of proteolytic decay was investigated using two different protease inhibitor mixes (BM1 and BM2), which have both been a kind gift from Roche Diagnostics (Penzberg, Germany). To the reaction mixture described in section 2.1, which had a total volume of 200 µl, 10 µl of the respective protease inhibitor was added. A reference experiment was carried out without any addition of protease inhibitors. After 6 hours of incubation at 30 °C, samples were taken for 2DE-image analysis.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Cell-free synthesis of GFP

The cell-free system studied in this work was based on an S30-extract from *Escherichia coli*, performed according to a routine procedure described by Chen and Zubay [7]. The cell-extract was supplied with a feeding solution containing all necessary nucleotides (ATP, CTP, GTP, and UTP), all natural amino acids, all species of tRNAs and an endogenous energy-regenerating system (acetylphosphate/acetate kinase) that recovers nucleoside triphosphates from the corresponding diphosphates [1, 8]. Plasmid pMGFP containing the structural gene for Green Fluorescent protein (GFP) [9] was added to this reaction mixture as a template for transcription. Since the structural gene is under the control of a T7-promoter, *in vitro* transcription was initiated by the addition of T7-RNA polymerase. Samples from the coupled transcription/translation reaction were taken over a period of 24 hours and separated on 2DE-gels. These gels were

examined according to the dynamics of key factors involved in cell-free protein biosynthesis.

GFP was used as a model protein, because the product activity can be sensitively monitored in a standard fluorometric assay. Together with the proteins present in the complete reaction system, the concentration of GFP could be calculated also from the size, shape and optical density of silver-stained protein spots on the respective 2DE-gel map. Quantification of protein concentration was subsequently performed by use of a commercially available image analysis software. These results were compared with a standard fluorometric measurement of GFP, aiming at the quantitative correlation between these two analytical tools.

The coordinates characteristic for GFP on the corresponding silver-stained 2DE-gel maps are given by the SwissProt database to a molecular weight of 26.9 kDa and an isoelectric point of 5.7. This information was used for identification of the GFP spot in Figures 1 and 3. A purified external standard of GFP was additionally used to support the identification of the *in vitro* synthesized protein. Experimentally determined values of the molecular weight of GFP from three independent gel-maps were in a range of 24.6 to 27.8 kDa and showed a pI of 5.7 to 6.0.

The time-dependent optical density change of the GFP spot reflected the time-dependent GFP formation. Optical density of spots is further termed 'spot volume'. The obtained data from image software analysis are given in Table 1 and Figure 2. It is shown that GFP concentration continuously increased until at least 24 hours of the cell-free synthesis process (Figure 2A). A significant but rather low initial signal of 2 % (initial GFP spot-volume) was nonetheless obtained, which was presumably caused by a respective time delay during sampling and preservation. However, measurements from replica plates (reaction performed with omission of a GFP-encoding plasmid) indicated a rather negligible background signal of 0.02 % at this very spot position (data not shown).

3.2 Comparison of detection methods for GFP

Fully matured GFP shows sensitive fluorescence activity, and thus its functional activity can easily be monitored over the course of *in vitro* translation. Fluorescence activity can be correlated with protein concentration by use of a purified external GFP-standard of known protein concentration.

Measured protein concentration was correlated to the estimated corresponding spot-volume obtained from the 2DE-gel maps. The respective values from fluorescence measurements and spot-volume determination are found to correlate sufficiently well during the 24 hours of synthesis (Figure 2A and B). A correlation factor of 0.42 $\mu\text{g/ml}$ GFP per units of spot-volume with a regression coefficient $r^2 = 0.97$ was obtained in Figure 2B. Systematic errors of spot-volumes, which might be due to slight variations of performance during the 2DE- process [15], were minimized, since all gels of one experiment were simultaneously made from the same stock solution and subsequently run in parallel using the IsoDalt system and automated gel-staining procedure (see also section 3.5 and Table 2).

The maturation time of GFP is known to last rather long, independent from *in vivo* [16] or *in vitro* conditions. According to Kolb (Institute of Protein Research, Pushchino, Russia) the GFP encoded on the plasmid pMGFP is fully functionally active after at least 4 hours (unpublished data). Thus, all samples had to be preincubated for more than 4 hours at moderately (4 °C) low temperature, in order to ensure full maturation of the protein before measurement. This inevitable prolonged incubation of GFP seemed nonetheless surprisingly unproblematic, since preliminary data revealed a sufficient resistance of GFP against, for instance, proteolytic decay (unpublished results). Nonetheless, for quantification of the total synthesis of GFP under *in vitro* conditions, maturation rate, proteolytic decay and the amount of fully active protein have to be balanced. The quantification of spot-volumes might bear additional sources of variation due to possible occurrence of non-linearity in the silver-staining process [15, 17]. However, Giometti et al. [18] previously described a linear relationship between the absolute amount of proteins loaded on a 2DE-gel and the respective final spot-volume for at least 80 % of human leucocyte proteins. Similar findings are - to the

best of our knowledge - not described for prokaryotic systems, and thus it is yet unclear, whether these findings are equally valid for *Escherichia coli* proteins. Since most of the above discussed parameters are unknown for the described system, further investigations are needed aiming at their quantitative determination.

3.3 Dynamic proteome development during cell-free biosynthesis

After initiating cell-free biosynthesis, a considerable sample volume was taken from the reactor device and was later subjected to HR-2D electrophoresis. The received total amount of proteins (660 spots) served as a reference for the evaluation of all samples taken over the course of the GFP-synthesis reaction (see Table 1 and Figure 3A). After 2 hours of incubation, 290 spots out of 521 remaining spots were already reduced to 75 % of their initial intensity. After 4 hours, the intensity of 205 spots had even dropped to 50 % of their initial value (Table 1). Obviously a vast protein decay occurred during the first hours of incubation, which might have been caused partly due to protein precipitation (data not shown) and proteolytic decay. After 8 hours of incubation, the total number of initial spots decreased again to nearly half of the initial value, while some novel spots appeared mainly in the alkaline region of the gel-map (see also marked zone in Figure 3B). This phenomenon is further reflected by a rise of total number of spots from 432 at 8 hours to 516 after at least 24 hours of incubation. This increase is significant, since it is greater than can be explained by plain measurement uncertainty.

Only proteins within a range of 10 to 100 kDa could be resolved on the 2DE-gel. Since an increasing occurrence of high molecular weight spots over the entire process time was obtained, this might suggest that in the functionally active crude extract, a significant amount of proteins greater than 100 kDa was originally present, but was beyond the resolution range of the prepared gel. These proteins might have been digested to lower size during prolonged incubation, and were thus finally appearing on the gel map. Polypeptides of low molecular weight (especially those smaller than 10 kDa), which might occur during proteolytic

decay, will not appear on the gel, since these will be removed either during the process (cut-off of the dialyzer membrane was 10 kDa) or sample preparation (ultrafiltration by use of a 10 kDa membrane).

The proteolytic potency of the lysate was qualitatively determined using a commercially available protease activity detection system based on a protease-sensitive fluorescent label. According to the test procedure described in section 2.5, a respective high proteolytic activity of the tested S30-lysate used for *in vitro* protein biosynthesis was obtained (data not shown). The addition of two different kinds of protease inhibitor mixtures both reduced, but not entirely prevented the general proteolytic potency of the cell extract.

3.4 Consideration of proteins directly involved in protein biosynthesis

The dynamic behavior of three proteins particularly involved in translation were observed during the entire process. These were the elongation factors Tu (EF-Tu, 44 kDa, pI 5.4), Ts (EF-Ts, 30 kDa, pI 5.1), and the ribosomal protein L9 of the 50S-subunit (RP-L9, 16 kDa, pI 6.2). These proteins have been further identified on the gel map by blotting, subsequent N-terminal sequencing and final sequence alignment (see also Figures 3 A and 3B).

Relative units of spot-volume, which are defined as the ratio of the absolute value of spot-volume to the initial spot-volume, are summarized in Table 1. Due to the proteolytic decay, all values of the above mentioned proteins decreased over the time course of the process. EF-Tu, which is responsible for the association of amino-acylated tRNAs to the ribosomal complex, was equally reduced by proteolytic decay (68 % of the initial EF-Tu concentration remained in the system), and thus behaved similarly to the majority of the investigated lysate proteins (specific spot-volume of EF-Tu, $V_{spec} = 1$). The same was true for EF-Ts, which catalyses the regeneration of EF-Tu during protein synthesis. V_{spec} is defined as the relation of the spot volume of an individual protein related to the total spot volume. Thus, a value equal to 1 indicates that none of the proteins is selectively removed, while values below 1 would indicate a specific

disappearance of the individual protein. In contrast, a relation greater than 1 denotes a further concentration of a certain protein. This, however, was only obtained for the ribosomal protein L9, which might be stabilized in the complex ribosomal structure itself, and might thus be protected from proteolysis (remaining specific spot-volume of RP-L9, $V_{spec} = 1.4$).

3.5 Reproducibility

As already stated in sections 2.2 and 3.2, systematic errors (mainly caused by incorrect pipetting, or general handling of the procedure) can be reduced to a minimum when the measurements are performed from simultaneously prepared gels. In order to estimate these standard errors, three samples of the same crude S30-lysate have been independently prepared and afterwards simultaneously separated on three different 2DE gels using the IsoDalt device. These gels have been matched and evaluated by use of the ImageMaster software. The standard errors given in Table 2 were below 5 %, and thus demonstrated a sufficient reproducibility of the procedure.

4. CONCLUDING REMARKS

- (1) Green fluorescent protein (GFP), which was chosen as target protein due to its high sensitivity and the ease of measurement, was successfully synthesized under *in vitro* conditions over a period of 24 hours by use of a dialyzer membrane reactor device. The synthesized functional protein was quantified according to its fluorescence abilities. These data correlated well with values received from quantification by use of silver-stained high resolution 2D-electrophoresis gel-maps. Despite of this analytical advantage, the application of GFP as a reporter protein, seemed to be unfavorable, particularly for the purpose of reaction analysis and reaction engineering as long as GFP is afflicted with a prolonged maturation time.
- (2) Most critical for the performance of *in vitro* protein synthesis is the occurrence of proteolytic decay and precipitation during the entire reaction process. This was both confirmed from analysis using high resolution-2D gel electrophoresis and from proteolytic assays. Both phenomena will lead to reduced productivity of the *in vitro* reaction system and should thus obviously be avoided for further system optimization.
- (3) The obtained dynamic behavior of the identified ribosomal protein L9 and both elongation factors Tu and Ts did not indicate to be a limiting step during *in vitro* synthesis, since these seemed to be maintained over the course of the synthesis process. Obviously these initially identified proteins cannot represent all of the majority of important factors of the *in vitro* protein biosynthesis. Nonetheless, since high resolution 2D-gel electrophoresis is a powerful analytical tool for observing the dynamics of translation (proteomics), a more extended view, mainly concentrated on further identification of the majority of ribosomal proteins, translation factors (i.e., all initiation, elongation and release factors) and aminoacyl-tRNA-synthetases, will be taken into account in future investigations. Especially the analysis and establishment of a well-balanced, stoichiometric relation of all these factors might be helpful for further improvement of the *in vitro* protein synthesis machinery.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors like to honor all members of participating groups in a joint project on '*In vitro* protein biosynthesis by use of bioreactors', project number FKZ 0 311 302, represented by Dr. Gerd Kleinhammer, Roche Diagnostics (RD), Germany, Prof. Dr. Alexander Spirin from the Institute of Protein Research, Pushchino, Russia, and Prof. Dr. Volker Erdmann from the Institute of Biochemistry, 'Freie Universität Berlin', Germany. Special thanks are addressed to Dr. Thomas Metzler and Rolf Reichhuber from RD for their assistance in cell-free GFP-synthesis. The project was supported by the German Ministry of Research, BMBF.

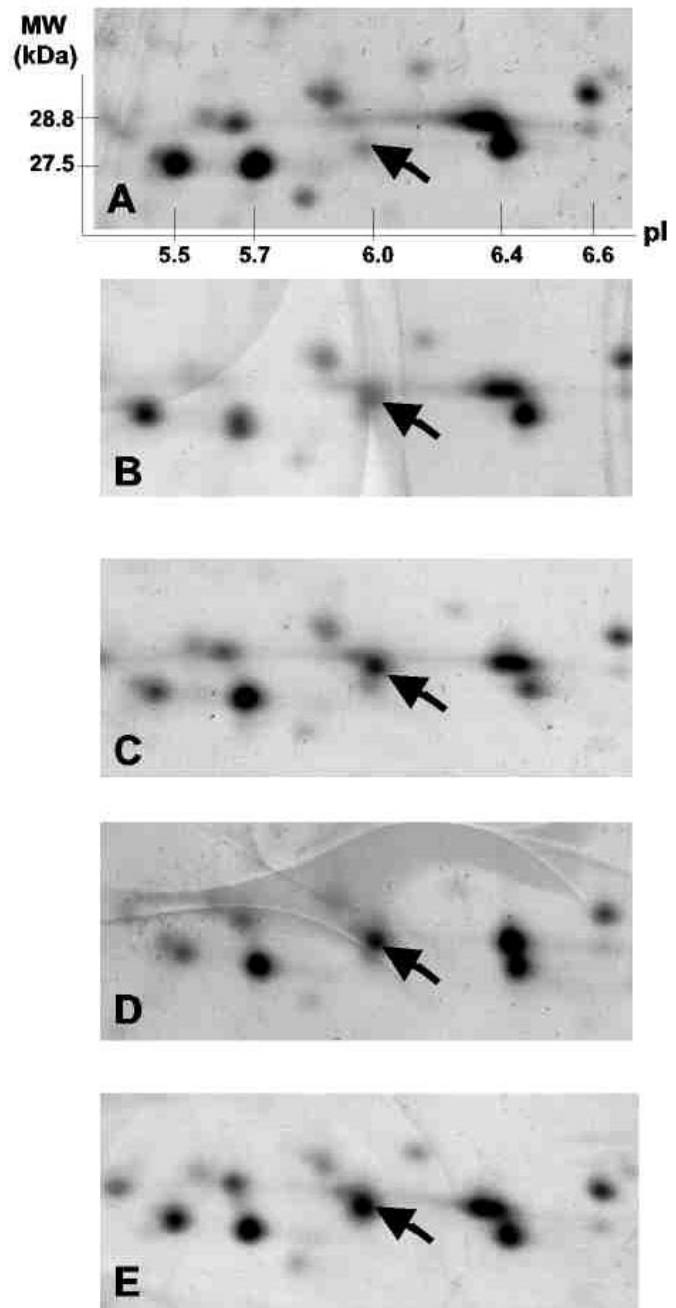


Figure 1: Cell-free biosynthesis of green fluorescent protein (GFP) in a protein bioreactor and observation of its production dynamics through identification in a silver-stained 2DE-gel map. The respective GFP-spot is indicated by an arrow. (A) reaction beginning at 0 hours, (B) after 2 hours, (C) 4 hours, (D) 8 hours, and (E) 24 hours of incubation at 30 °C, respectively. In contrast to the majority of proteins, a permanent increase of this product spot

could qualitatively be observed during the entire incubation period (see also Table 1). Data of the quantitative evaluation of GFP-spot intensities (spot-volumes) are given in Figure 2 and Table 1.

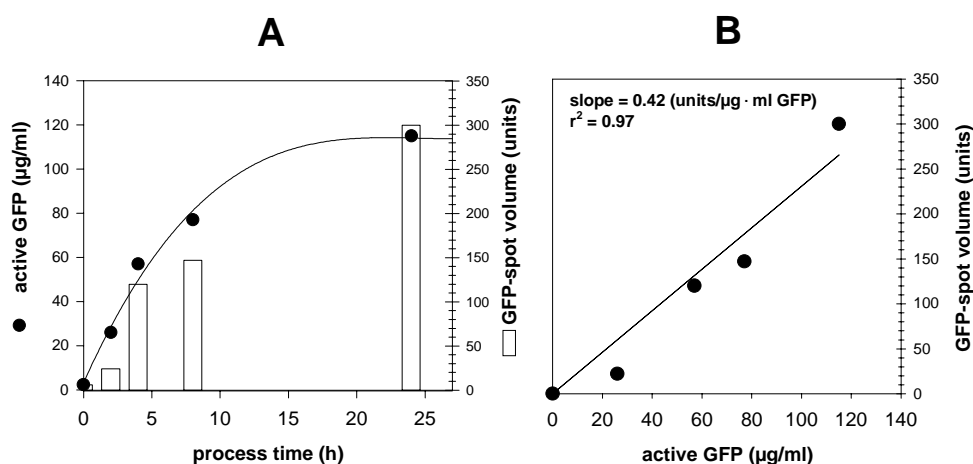


Figure 2: Comparison of two analytical methods for the detection of GFP. **A:** Vertical white bars represent the total spot-volume of GFP in the 2DE-gel, measured as raw spot-volume in pixels with background subtracted. The black symbols reveal the time-dependent occurrence of fluorometric activity of GFP measured at 530 nm, which was correlated to an external GFP-standard in order to give concentrations of active protein (µg/ml). **B:** Correlation between GFP concentration and GFP-spot-volume within a reaction time of 24 hours. The correlation was estimated from linear regression and was 0.42 µg/ml GFP per unit spot-volume with a regression coefficient $r^2 = 0.97$.

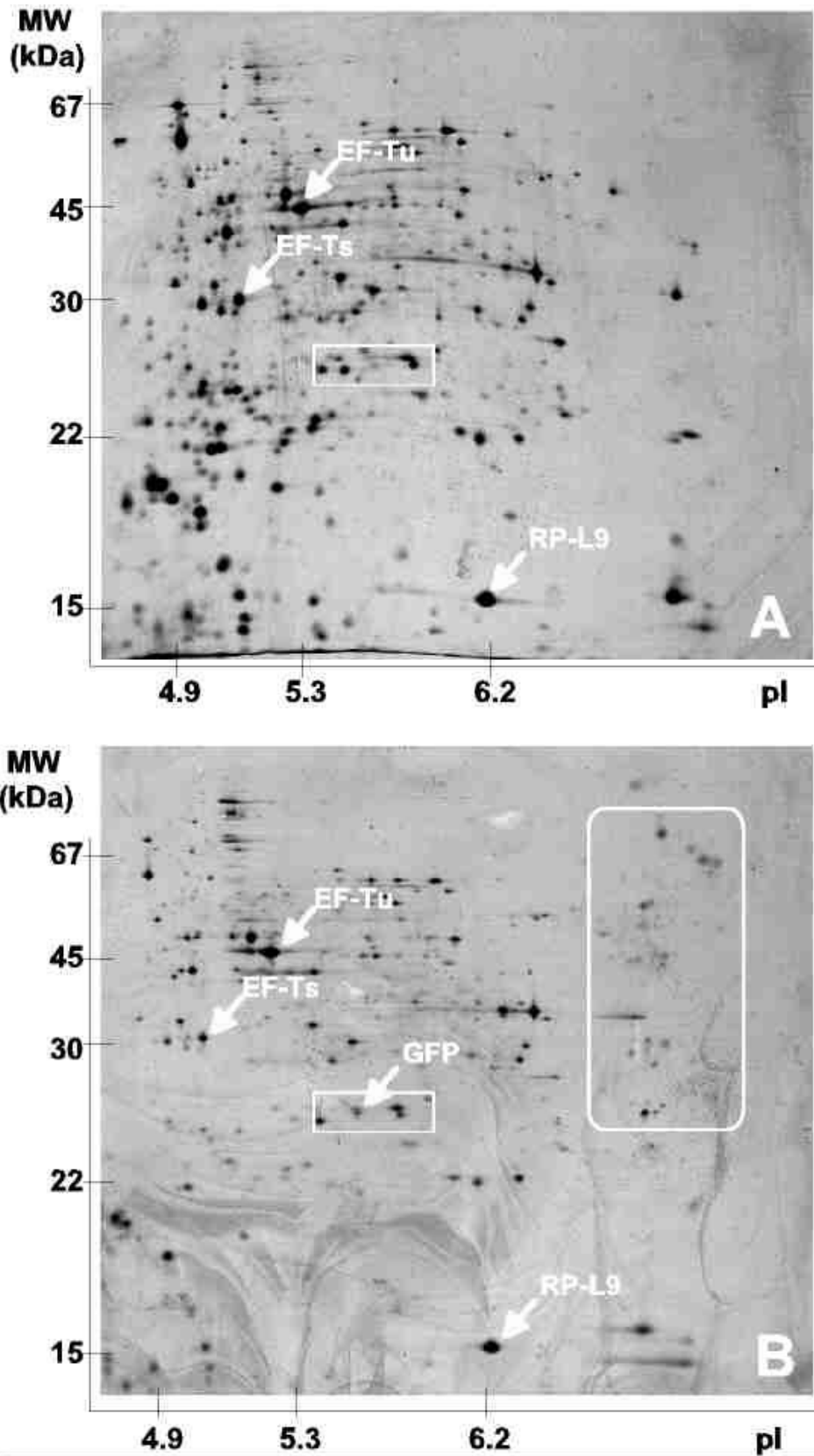


Figure 3: Silver-stained HR-2DE-gel map protein patterns of the lysate from *Escherichia coli* strain A19 used for cell-free protein biosynthesis of green

fluorescent protein (GFP) in a protein bioreactor. **A:** Protein pattern immediately after initiation of protein synthesis (0 hours of incubation). The marked section indicates the region around the GFP-spot, especially highlighted in Figure 1. **B:** Protein pattern after 24 hours of prolonged incubation under process conditions. Presentation of respective gels-maps after 2, 4, and 8 hours is omitted. The marked section shows a region covering the appearance of new spots. Identified spots are denoted with an arrow and were: GFP (26.9 kDa / pI 5.7), elongation factors EF-Tu (44 kDa, pI 5.4) and EF-Ts (33 kDa, pI 5.1), and ribosomal protein RP-L9 (14 kDa, pI 6.22), respectively.

Table 2: Estimation of standard errors from independent measurements.

Three independent samples of the same crude S30-lysate have been simultaneously separated on three different 2DE gels, matched and evaluated by use of the ImageMaster software. Systematic errors were minimized since the entire procedure for gel preparation, separation and staining was performed simultaneously using the IsoDalt device. The average standard errors were all below 5 %, and are thus demonstrating a sufficient reproducibility of the procedure.

Protein	Spot volume	Mean spot volume	Standard deviation	
			absolute	(%)
Ribosomal Protein L9 (RP-L9)	Gel No 1: 3706	3568	136	3.8
	Gel No 2: 3563			
	Gel No 3: 3434			
Elongation Factor Ts (EF-Ts)	Gel No 1: 1649	1682	58	3.4
	Gel No 2: 1648			
	Gel No 3: 1749			
Elongation Factor Tu (EF-Tu)	Gel No 1: 2665	2697	31	1.1
	Gel No 2: 2726			
	Gel No 3: 2699			

Table 1: Evaluation of silver-stained spots on HR-2DE-gel maps during cell-free synthesis of GFP by use of a DispoDialyzer membrane reactor. Identification and quantification of spots were performed using ImageMaster software (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and were calculated according to their respective optical density (spot-volume, units).

Reaction time (h)	Total number of spots	Total spot-volume (%)	Spot-volume of GFP (%)	Spot-volume of EF-Tu		Spot-volume of EF-Ts		Spot-volume of RP-L9	
				(%)	V_{spec}	(%)	V_{spec}	(%)	V_{spec}
0	660	100	2	100	1.0	100	1.0	100	1.0
2	521	76	8	97	1.3	i.r.		96	1.3
4	541	67	40	i.r.		77	1.2	87	1.3
8	432	64	49	79	1.2	71	1.1	92	1.4
24	516	68	100	68	1.0	72	1.1	i.r.	

GFP: Green fluorescent protein; EF-Tu/Ts: Elongation factor Tu/Ts; RP-L9: Ribosomal protein L9.

V_{spec} : specific spot-volume (spot volume of protein species per respective total spot volume).

i.r.: insufficient resolution due to interference with other protein spots; values were omitted

5. REFERENCES

- [1] Chen, H. Z., Zubay, G., *Methods. Enzymol.* 1983, *101*, 674-690.
- [2] Kameyama, T., and Novelli, G.D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1960, *2*, 292-396.
- [3] Patnaik, R. and Swartz, J.R., *BioTechniques* 1998, *24*, 862-868.
- [4] Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R., Dower, W.J., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, *91*, 9022-9026.
- [5] Tawfik, D.S. and Griffiths, A., *Nature Biotechnol.* 1998, *16*, 652-656.
- [6] Mauch, K., Arnold, S., Reuss, M., *Chem. Eng. Sci.* 1997, *52*, 2589-2598.
- [7] Zubay, G., *Annu. Rev. Genet.* 1973, *7*, 267-287.
- [8] Spirin, A. S., in: Todd, P., Sidkar, S. K., Bier, M. (Eds.), *Frontiers in Bioprocessing II*, American Chemical Society, Washington D.C. 1992, pp. 31-43.
- [9] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C., *Science* 1994, *263*, 802-805.
- [10] Gesteland, R.F. *J. Mol. Biol.* 1966, *16*, 67-84.
- [11] Bradford, M.M., *Anal. Biochem.* 1976, *72*, 248-254.
- [12] Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D., *Electrophoresis* 1993, *14*, 1357-1365.
- [13] Görg, A., Postel, W., Gunther, S., *Electrophoresis* 1988, *9*, 531-546.
- [14] Westermeier, R., *Electrophoresis in Practice*, VCH, Weinheim, 1997.
- [15] Lottspeich, F., in: Lottspeich, F., Zorbach, H. (Eds.), *Bioanalytik*, Spektrum Verlag, Heidelberg, 1998, pp.815-827.
- [16] Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S., *Gene*, 1996, *173*, 33-38

- [17] Herbert, B. R., Sanchez, J. C., Bini, L., in: Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D., Hochstrasser, D. F. (Eds.), *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer, Berlin, 1997, pp.13-30.
- [18] Giometti, C. S., Gemmell, M. A., Tollaksen, S. L., Taylor, J., *Electrophoresis*, 1991, 12, 536-543.

Publikation II

From Gene to Protein:

Evaluation of Cell-Free Protein Biosynthesis by High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis (HR-2DE)

Petra T. Schindler, S. Baumann, M. Reuss and M. Siemann

BIO TECH international, **11**, 12-14 (1999)

INTRODUCTION

E. coli-based *in vitro* transcription/translation systems have been used for several decades and have been applied to production of toxic rDNA proteins, incorporation of amino acid derivatives into newly synthesised proteins or directed evolution based on ribosomal display (1-3). Even functional enzymes have been evolved in `man-made cell like compartments for molecular evolution` by the use of cell free biosynthesis (4). Despite to its usefulness, the *in vitro* technique is afflicted with lots of problems, such as RNase, DNase and protease activities or energy charge maintenance, which all leads to a decreased productivity.

Based on a cell extract from *Escherichia coli* a protein biosynthesis reaction was carried out *in vitro* in a suitable reactor device. Target DNA, here containing the structural gene for Green Fluorescence Protein (GFP), was transcribed into mRNA and finally translated into functional GFP in analytical amounts. In addition to "conventional" analytical methods for compounds like energy-rich phosphates or nucleotides, the dynamic development of the protein map was visualised by High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis (2DE) during a 24-hours cell-free biosynthesis.

METHODS

A cell-free extract was prepared from *E. coli* strain A19 according to Zubay et al. (5) and used in a DispoDialyzer (SpectraPor, USA) device -with a MWCO of 10 kD and a volume of 5 ml- for cell-free protein biosynthesis in a coupled transcription/translation reaction (Spirin et al. (6); Metzler et al. (personal communication)). After 0 /0.5 /1 /1.5 /2 /3 /6 and 24 hours of incubation at 30°C, 25µl of reaction mixture were sampled. The samples were desalted, then separated on non-linear immobilized pH-gradient gel strips (pH 3-10) for first dimension. Homogenous 13% acrylamide SDS-page gels were run as a second dimension and silver stained (8).

2D-maps were analysed with respect to dynamic changes in the pattern during biosynthesis (8). The resulting values are given as a raw spot volume in pixels with background subtracted (7).

RESULTS

The variation of protein composition in the reactor was monitored in comparison to the expression level of GFP. In order to raise the yield of active protein to preparative scale and to extend the time of active biosynthesis, special attention was drawn to the level of Elongation Factors and Ribosomal Proteins. The quantitative exploitation of the gels and on-line measurements (8) suggested a delay of maturation of the target protein GFP during synthesis. Thus, not all of the synthesised protein is active in the meantime.

Spots occurring on the 2DE map of cell-free reaction mixture were identified by mass-spectrometry (MALDI-TOF fingerprint) and/or by Edmann degradation. Some proteins that are responsible for the functioning of translational processes are picked out and shown in figure 1.

It is observed that protein biosynthesis is a dynamic process, because most of the spots are decreasing in intensity over time but at different rates (data not shown). This is due to proteolytic activity present in the S30 lysate (8) and/or partial chemical or enzymatic modifications of proteins like phosphorylation or acetylation and others (9). Some spots are increasing in intensity suggesting that they are defined degradation products of proteins or a modified isoforms that accumulate during protein synthesis. Due to the same reasons even completely new spots are appearing. Though there is a turn-over of proteins present in the system of *in vitro* biosynthesis, predominately proteolytical decay is occurring. Total protein content is diminishing more than 50% after 24h reaction time (8).

2D-Electrophoresis is a suitable tool for the evaluation of cell-free synthesis since it offers the opportunity to visualise the product of interest (GFP) simultaneously to the dynamic behaviour of proteins covering protein biosynthesis.

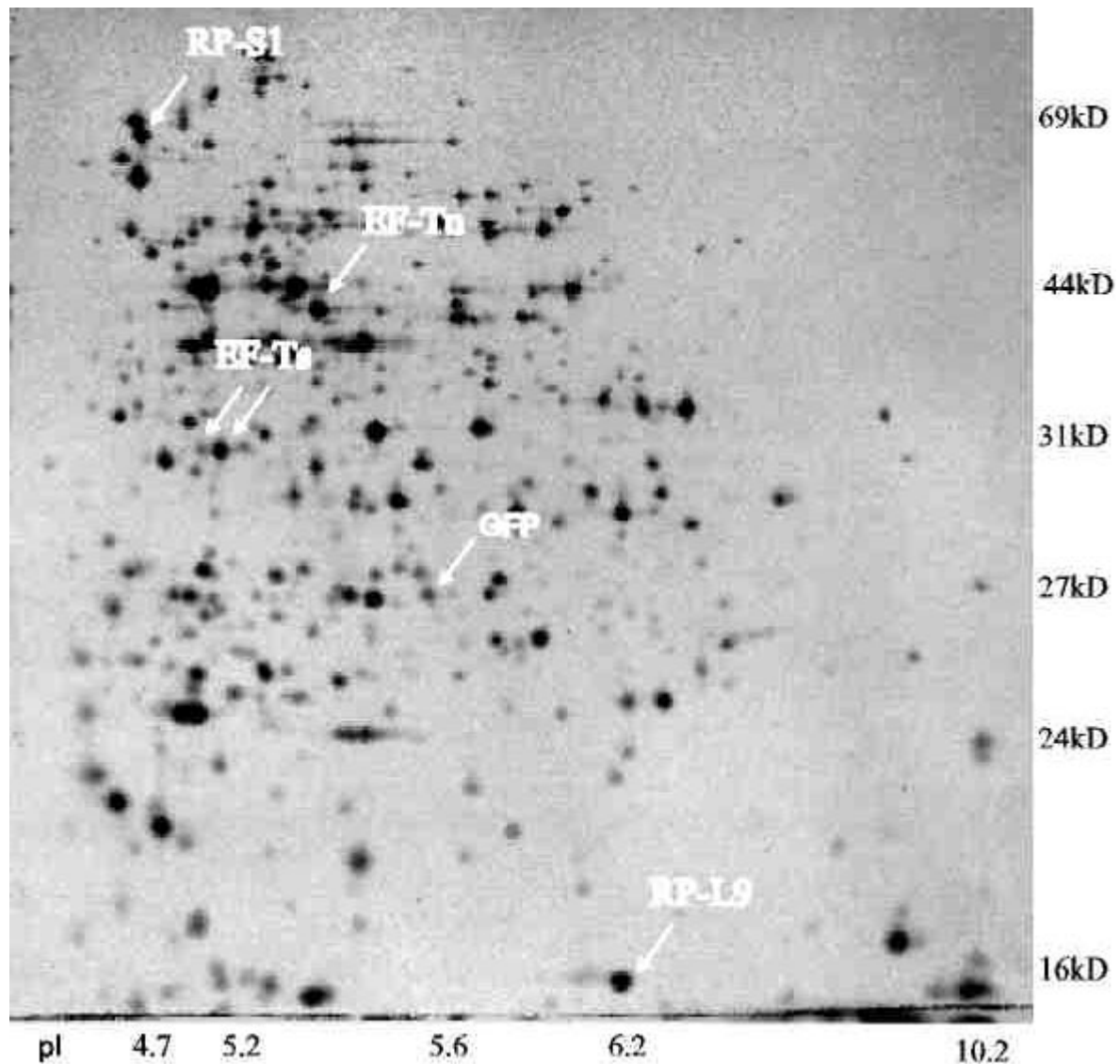


Fig.1: One out of eight gels (original size 18x18cm) made during reaction process of cell-free protein biosynthesis.

	FULL NAME	PI	MW (KD)	FUNCTION
RP-S1	small subunit ribosomal protein 1	4.9	67	part of the small ribosomal subunit
RP-L9	large subunit ribosomal protein 9	6.2	16	part of the large ribosomal subunit
EF-Ts	elongation factor Ts	5.1 5.2	33	hydrolysis of GTP to GDP during elongation
EF-Tu	elongation factor Tu	5.3	44	complexes aminoacyl-tRNA and GTP during elongation
GFP	green fluorescence protein	5.7	28	target protein for cell-free protein biosynthesis

REFERENCES

- (1) Patnaik, R. and Swartz, J.R.: E.coli-based in vitro transcription/translation: in vivo-specific synthesis rates and high yields in a batch system. *BioTechniques*, **24**, 862-68 (1998).
- (2) Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. and Dower, W.J.: An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 9022-26 (1994).

- (3) Hanes, J. and Plückthun, A. : In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 4937-42 (1997).
- (4) Tawfik, D.S. and Griffiths, A.: Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnol.*, **16**, 652 (1998).
- (5) Zubay, G.: In vitro synthesis of protein in microbial system. *Annu. Rev. Genet.*, **7**, 267-287 (1973).
- (6) Spirin, A. S.: Cell-free protein synthesis bioreactor. *Frontiers in Bioprocessing II* (31-43) 1991; eds: Todd, P., Sikdar, S. K. and Bier, M..
- (7) Software used: ImageMaster 2D Elite; Version 2.00. Amersham Pharmacia Biotech.
- (8) Schindler, P.T., Macherhammer, F., Arnold, S., Reuss, M. and Siemann, M.: Investigation of Translation Dynamics under Cell-Free Protein Biosynthesis Conditions Using High Resolution Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Electrophoresis*, **20**, 806-812 (1999).
- (9) Gooley, A.A. and Packer, N.H.: The Importance of Protein Co- and Posttranslational Modifications in Proteome Projects. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics* (65-91) 1997; eds: Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel, R.D. and Hochstrasser, D.F..

Publikation III

***In Vitro* Coupled Transcription/Translation:**

**Effects of Modification in Lysate Preparation on Protein Composition
and Biosynthesis Activity**

Petra Theresia Schindler, Sandra Baumann, Matthias Reuss, Martin Siemann*

Electrophoresis; submitted.

***In Vitro* Coupled Transcription/Translation:
Effects of Modification in Lysate Preparation on Protein
Composition and Biosynthesis Activity**

Petra Theresia Schindler, Sandra Baumann, Matthias Reuss, Martin Siemann*

Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Allmandring 31, D-70569 Stuttgart,
Germany

Running title: Investigation of Cell-Free Protein Biosynthesis by HR-2DE

Correspondence to: Dr. Martin Siemann

Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart,

Allmandring 31, D-70569 Stuttgart, Germany,

Tel.: +49-(0)711-685-5161; Fax: +49-(0)711-685-5164,

e-mail: siemann@ibvt.uni-stuttgart.de

Keywords: *Escherichia coli*, S30-extract, cell-free protein biosynthesis, Green Fluorescent Protein, elongation factor, protein modification

In vitro protein biosynthesis resting upon cell-derived extracts is a suitable analytical tool to overcome problems of cell-based protein expression, like toxicity or insolubility of target proteins in micro-organisms [1]. Moreover, this technique offers even more tricky applications, like the incorporation of unnatural amino acids, the production of functional monoclonal antibodies or directed evolution, based on ribosomal or polysomal display [2-4]. Although cell-free coupled transcription/translation has been used as a standard procedure since decades, this technique suffers from low productivity of the target protein compared to productivity obtained *in vivo*.

The most important component of *in vitro* protein biosynthesis is a cell lysate [5], an extract derived from *Escherichia coli* cells, containing - among others - all cellular proteins necessary for translational processes. Following a routine procedure published by Pratt et al. [5] and pursuing the goal to improve protein productivity during biosynthesis, alterations concerning growth conditions and lysate preparation (the so called 'pre-incubation' or 'run-off' procedure) have been investigated. These changes had partly drastic effects on *in vitro* transcription/translation activity. Two-dimensional gel electrophoresis analysis has been performed on the variably manufactured lysates to determine whether these modifications in the lysate preparation have caused an alteration in the protein composition of the final lysate. Thus, protein compositions from lysates with either negligible, medium and high translational activity are presented and analytically compared.

Cultivation

For production of **lysate A**, *Escherichia coli* MSCC3010 was batch-wise grown on LB complex medium under controlled reaction conditions in a 30 l bioreactor. In the end of exponential growth, the cells were harvested at a cell concentration c_x of 2.2 g/l ($OD_{500nm} = 7.4$).

For production of **lysates B** and **C**, the same strain was batch-wise propagated on a mineral medium according to Neubauer et al. [7]. During the exponential growth phase, cells were harvested at a concentration of 2.4 g/l; the maximum specific growth rate μ_{max} was 0.8 h^{-1} .

Lysate preparation

Lysate preparations were carried out as described by Pratt et al. [5]. This procedure includes a so called 'pre-incubation' step, as well termed "run-off procedure", due to the believed necessity of releasing polysomes from endogenous mRNA. This can be performed by the addition of all amino acids (except methionine, since a further initiation of translation should be prevented), all nucleotides necessary for energy regeneration and translation, followed by an incubation of 90 minutes.

This routine procedure was altered in the following mode: to **lysate A** and **B** three aliquots of the entire pre-incubation mixture was added every 30 min, whereas to **lysate C** the entire volume of preincubation mixture was added at once and incubated for 90 min at the same reaction temperature of 37°C. In the end, all lysates contained the same total concentration of preincubation mixture (containing ATP, GTP, PEP, pyruvate kinase and amino acids).

Analysis of *in vitro* protein biosynthesis reaction

Completed lysates were analysed for their biosynthesis capacity following our previously published [6] on-line standard assay using GFP as target protein (Fig.1). Secondly, the lysates were separated on 2D electrophoresis to screen for characteristic changes in the protein pattern, reflecting the differently performed preparations (Fig.2).

As an example for pI shifts concerning the elongation factor Ts (EF-Ts), one of the most challenging findings is described in Figure 3. Depending on lysate activity, some proteins varied in their isoelectric point. That is most probably due to different (iso)forms of protein modifications or truncations of these enzymes. An important example is the elongation factor Ts, which activity is indispensable for operating the elongation procedure. EF-Ts showed, however, more isoforms in the inactive lysate (A) than in the active ones (B and C). Thus, translational activity might depend on activation of the respective isoforms and in case of EF-Ts, we were at least able to identify one isoform to be specifically phosphorylated (studies in progress).

Depending on biosynthesis activity, variations in the protein content of respective different lysates were found. Proteins appeared with increasing activity of the lysate, others disappeared in this case (Fig. 4 and 5). Identification of these spots might reveal the finding,

which proteins are helpful or necessary for biosynthesis activity and which ones are counterproductive. Basing on this knowledge, further improvement of lysate preparation should be possible to obtain.

From these experiments we conclude that either proper cultivation conditions as well as the 'pre-incubation' procedure are essential steps necessary for propagating functionally active lysates, following routine *in vitro* preparation procedures. Only minor variations have tremendous effects on translational performance, thus, optimising the preparation procedure should have the potential to improve cell-free protein biosynthesis reactions.

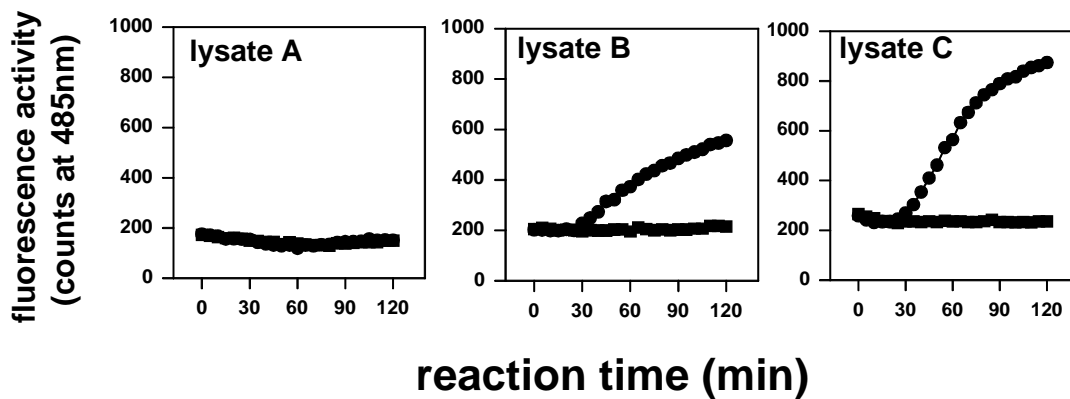


Figure 1: *In vitro* Protein Biosynthesis Reaction

To determine the biosynthesis capacity of the different lysates, a plasmid containing the structural gene for Green Fluorescence Protein (GFP) was used as a template to be transcribed and translated. Reactions were carried out in microplate wells in batch reactions of 200 μ l at 30°C as described previously [6]. Active GFP formation was measured by fluorescence development (1000 fluorescence counts at 485 nm excitation and 535 nm emission equals to 26.5 μ g/ml active GFP). Accumulation of newly synthesised GFP in the *in vitro* transcription/translation reaction is shown. Since the reaction itself is highly reproducible

(data not shown), the slight differences in lysate preparation procedure had tremendous effects: using lysate A, there was no formation of functional GFP at all, whereas the use of lysate B promoted only moderate and lysate C of high activity in protein synthesis.

Lysate A: cultivation on complex media; harvest at stationary phase (end-log-phase). Lysate preparation according to Pratt et al. [5]. **Lysate B/C:** cultivation on mineral media; harvest from log-phase at $\mu_{max} = 0.8 \text{ h}^{-1}$. Lysate B: step-wise addition of preincubation mixture every 30 min. Lysate C: like Lysate A according to [5].

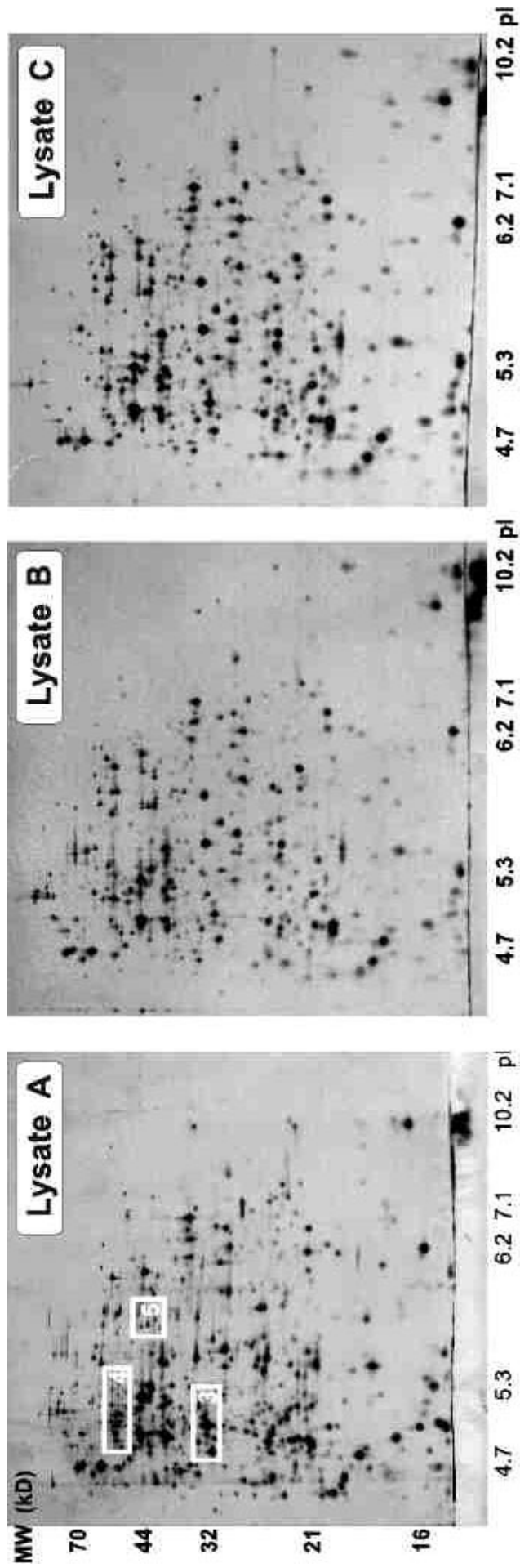
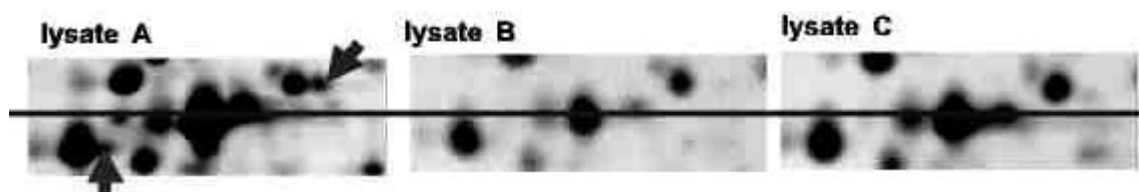


Figure 2: 2D Electrophoresis

Samples from lysates A, B and C with 100 μg total protein content each, were desalted and separated on non-linear immobilized pH-gradient gel strips (pH 3-10) for first dimension. Homogenous 13 % acrylamide SDS-page gels were simultaneously run as a second dimension and silver stained afterwards. Details of calibration and identification of spots were described previously [6]. The indicated areas within the 2-DE map are shown enlarged in figures 3, 4 and 5, respectively.

**Figure 3: Elongation Factor Ts**

The central spot corresponds to Elongation Factor Ts (EF-Ts) and the smaller spots on the line are modifications of the same protein. Four to seven isoforms were present in the inactive lysate (A), whereas in case of the slightly (B) and highly (C) active lysates only three forms of EF-Ts appeared on the gel map. EF-Ts is involved in the exchange of GDP to GTP onto elongation factor Tu (EF-Tu) after completing an elongation circle. The reactivation of EF-Tu requires its successful liberation from the ternary ribosomal complex through the exchange of GDP/GTP, which is catalysed by a functionally active EF-Ts. Alexander et al. [8] determined a phosphorylation on EF-Tu that is required prior to reactivation. Phosphorylation for altering the enzymatic activity of EF-Ts is not yet described, however, we were able to demonstrate that at least one isoform of this elongation factor is specifically phosphorylated on two different sites of the protein (further studies under investigation). Possibly not all isoforms of EF-Ts found on 2DE gels are active proteins. An increase of isoforms, as it is in the case the completely inactive lysate A, might be a hint that the amount of active EF-Ts decreases while the number of isoforms increases. Starting from the central EF-Ts, isoforms were drifting to

either the more acidic as well as to the more alkaline side of the gel map. Phosphorylation, in fact, could only be verified for the central spot. The arrows indicate two yet unknown spots, which both are drifting to the alkaline side in case of the inactive lysate.

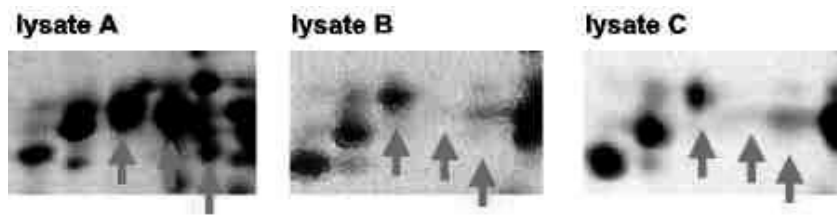


Figure 4: New spots in the inactive lysate

Some very prominent spots, indicated by arrows, are only found in the inactive lysate A and not in case of the active lysates B and C. Unless to date these spots are not identified so far, further studies should verify whether the presence of these proteins (or forms of proteins) is connected to deprivation of translational activity or not.

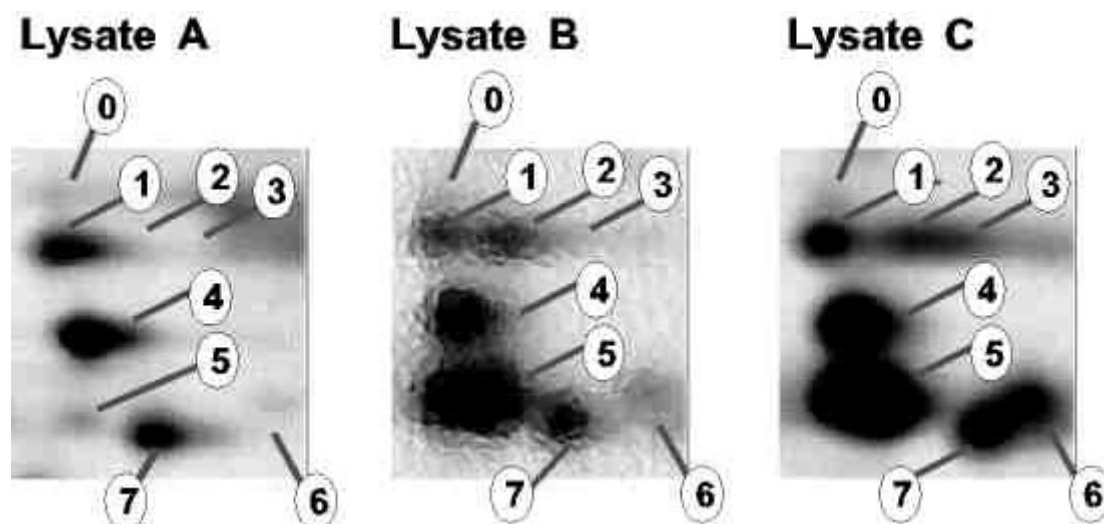


Figure 5: New spots in the active lysates

An example for a region in the 2DE map is presented where new spots appear in the active lysates. Spots 2, 3, 5 and 6 are not, or only weakly present in the translationally inactive lysate A, and increase in intensity in lysate B and C, which both are active. To find out about a coherence between the increased intensity of these spots and higher protein productivity, these proteins have to be identified by sequencing.

References

1. Spirin, A. S., in: Todd, P., Sikdar, S. K., and Bier, M., (Eds.), *Frontiers in Bioprocessing II*, American Chemical Society, Washington DC, Boulder, Colorado 1990, pp. 31-43.
2. Short, G. F., 3rd, Golovine, S. Y., and Hecht, S. M. *Biochemistry*. 1999, 38, 8808-19.
3. Jermutus, L., Ryabova, L. A., and Pluckthun, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998, 9, 534-48.

4. Merk, H., Stiege, W., Tsumoto, K., Kumagai, I., and Erdmann, V. A. *J Biochem. (Tokyo)*. 1999, 125, 328-33.
5. Pratt, J. M., in: Hames, B., and Higgins, S., (Eds.) *Transcription and Translation: a practical approach*, IRL Press, Oxford, England 1984, pp. 179-209.
6. Schindler, P. T., Macherhammer, F., Arnold, S., Reuss, M., and Siemann, M. *Electrophoresis*. 1999, 20, 806-12.
7. Neubauer, P., Häggström, L., and Enfors, S.-O. *Biotechnol. Bioeng.* 1995, 47, 139-146.
8. Alexander, C., Bilgin, N., Lindschau, C., Mesters, J. R., Kraal, B., Hilgenfeld, R., Erdmann, V. A., and Lippmann, C. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 14541-7.

Publikation IV

Non-radioactive Screening for Phosphoproteins in Proteome Analysis: An Immunoblot Technique for Application in High Resolution Two Dimensional Electrophoresis

Petra Theresia Schindler, Matthias Reuss and Martin Siemann*

BioTechniques; submitted.

Non-radioactive Screening for Phosphoproteins in Proteome Analysis: An Immunoblot Technique for Application in High Resolution Two Dimensional Electrophoresis

Petra Theresia Schindler, Matthias Reuss and Martin Siemann*

Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Allmandring 31, D-70569 Stuttgart, Germany

Running title: Non-radioactive screening for phosphoproteins

Correspondence to: Dr. Martin Siemann

Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart,
Allmandring 31, D-70569 Stuttgart, Germany,
Tel.: +49-(0)711-685-5161; Fax: +49-(0)711-685-5164,
e-mail: siemann@ibvt.uni-stuttgart.de

Keywords: Post translational modification, anti-phosphothreonine/anti-phosphoserine-antibody, Enzyme Linked Immuno Electro-Transfer Blot (EITB), *Escherichia coli*, cell-free protein biosynthesis.

Protein modification is considered to be a central tool in physiology to alter biochemical structures and functions. From numbers of publications throughout the last years, the most attractive modification being investigated is protein phosphorylation [1]. Herein, one of the most prominently used technique for detection of protein phosphorylation on 2DE-gels is labelling the sample with radioactive 32 -phosphate [2]. This method is quick and sensitive, but is affected with all negative features of working with radioactivity, like providing extra hardware, hazardous handling and elevated price.

Once separated on 2DE-gels, identification of protein phosphorylation has been performed also using various spectrometric techniques, which are known to be very sensitive and reliable. In practice, these techniques are very time consuming as well as equipment intensive, since they exclusively allow the analysis of a single protein at a time [3, 4].

The use of Enzyme-linked immuno electro-transfer blot (EITB) for the detection of protein epitopes onto immuno-blot based on 2D-electrophoresis is an up to date technique [5, 6]. However, several requirements have to be fulfilled for application, like the availability of specific antibodies [7, 8], as well as intactness and accessibility of the epitopes of interest during the entire detection procedure. Monoclonal antibodies which are described to be highly specific for phosphorylated sites of proteins and non-specific for unphosphorylated amino acid residues have become commercially available. Thus, immunodetection should provide an ideal tool for screening the entire proteome regarding phosphorylated proteins prior to further analysis.

With regard to the most common protein phosphorylation sites, i.e. serine-, threonine- and tyrosine residues, we introduce a novel method for screening western blots of 2DE-gels, using the respective specific monoclonal antibodies. Several protein patterns, either deduced from consecutive physiological states using the same antibody or from the same physiological state but using different antibody species, have been processed simultaneously. Apart from time and price aspects, further advantages of this method appear, since the detection sensitivity is described to be in the fmol range [1].

Used materials: Blotting apparatus for semidry blots (Multiphor II) and a power-supply were from Amersham Pharmacia Biotech, Sweden. Glass hybridisation tubes (inner diameter 5.1 mm, length 270 mm) with a boltable lock were from Merck Eurolab, Germany. A headlong rotating shaker, suitable for hybridisation tubes or hybridisation

oven and an orbital shaker were used at ambient temperature or at 4°C. Several plastic basins, to some extent bigger than the western blots were utilised. Nitro-cellulose membrane (Hybond-C Super) was from Amersham Life Science, and filter paper from Whatman. The used X-ray film (18 x 24 cm) was obtained from Cronex, Sterling Diagnostic Imaging, USA. Cellulose foil was from Amersham Pharmacia Biotech.

Antibody fractions: Primary mouse monoclonal antibody against phosphothreonine (No P3555) and phosphoserine (P3430) residues were obtained from Sigma, USA. Antibody solutions were aliquoted in appropriate portions with 50 % glycerol and stored at -20°C. As recommended by the manufacturer, several freeze and thaw cycles were omitted. Secondary peroxidase-conjugated anti-mouse antibody was from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA. The product was restored following the instructions of the manufacturer.

Reagents: For all preparations double distilled water (ddH₂O) was exclusively used. *Chemoluminescence blotting substrate kit* was supplied from Boehringer Mannheim, Germany, containing luminescence solution and starting reagent. The solution was stored at 4 °C. *Transfer buffer:* 2.9 g glycine, 5.8 g Tris-base, 100 ml methanol, 3.7 ml 10 % (w/v) solution sodium dodecyl sulphate (SDS) in ddH₂O, filled up to 1 litre with ddH₂O. *10 x Tris-buffered saline (TBS):* 24.2 g Tris-base, 80 g NaCl, pH 7.6 by HCl. Before use, this stock solution was diluted to 1 x with ddH₂O. The use of phosphate buffered saline (PBS) as buffer system for this application is not recommended. *Blocking buffer:* 100 ml 10 x TBS, 50 g non-fat dry milk, 1 ml Tween-20 (100 %), filled up to 1 litre with ddH₂O and stirred well. The suspension was stored at 4°C and should be freshly prepared every week. *Washing buffer:* 100 ml 10 x TBS, 1 ml Tween-20 (100 %), filled up to 1 litre. *Ponceau rouge staining solution:* 0.2 % (w/v) ponceau rouge powder (Biorad, Germany), 3 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA); this solution can be reused after recovery. *Fixing and developing solution* for negative films were prepared according to manufacturers manual (Tetenal, Germany).

Electroblotting: Prior to the end of the second dimension of the electrophoresis, filter paper, cellulose foil and nitro-cellulose membrane were cut to the exact size of the respective gel(-section) that had to be transferred. Before use, the nitro-cellulose membrane was soaked 10 minutes into transfer buffer.

After completion of second dimension, the asymmetrically marked gels were rinsed with ddH₂O. To prevent swelling, soaking of the gel in water is not recommended. During the assembly of the blotting sandwich, the gels were stored in transfer buffer. Cathode, anode and filter papers were soaked in transfer buffer. The electro-blot sandwich is assembled as follows: onto the anode two layers of filter paper, the nitro-cellulose membrane, the 2DE-gel and another two filter papers were stacked. The sandwich was covered with the cathode. For blotting more than one gel at a time, a cellulose foil is placed between the filters within the gels to prevent an eventual transition of proteins from the upper onto the lower gel. Likewise it was possible to blot up to four gels in one sandwich without quality loss in contrast to a single gel blot. The settings of the power supply remain independent of the number of gels in the sandwich.

The transfer was performed for 80 - 90 min at an electric amperage of 150 mA (gel sizes were 200 – 250 cm² and 1.5 mm thickness; the numbers of gels did not influence the settings).

Reversible staining of membranes: After transfer, each of the nitro-cellulose membranes was collected separately in one basin, containing enough ponceau rouge solution for allowing the membranes to float while gently shaken for 15 min in an arbitrary mode. The membranes were revolved every 5 min. For controlling the transfer efficiency, the gels were stained with colloidal coomassie blue, following routine protocols (Roth, Germany). The membranes were washed two times in distilled water for 1 - 5 minutes until the spot pattern appeared. The ponceau rouge solution was recovered for further use. For the purpose of later assignment, the most prominent spots, serving afterwards as landmarks, were gently marked with a pencil. In addition, the blots could be scanned by avoiding the membranes to dry out. Finally, the membranes were washed for 5 to 10 min in distilled water until the stain was completely reversed.

Immunodetection: *Primary antibodies:* Each membrane was incubated in a basin with blocking buffer two times for 30 min at room temperature. While gently shaken, the membranes were revolved several times. Afterwards, each membrane was transferred in one hybridisation tube by using long tweezers. The membrane entirely covered the inner wall of the tube without air bubbles between the wall and the surface of the membrane while the protein bearing side faced the solvent. After 1:200 dilution of the primary

monoclonal antibody into blocking buffer, 10 ml of this solution was added in each hybridisation tube. The tubes were closed, horizontally fixed in an headlong rotating shaker and incubated gently rotating at 4 °C over night. Afterwards, the antibody containing solution was recovered from the hybridisation tubes. While stored at 4 °C, the solution can be reused for up to three weeks. Finally, the membranes were removed from the tubes and separately transferred into basins and gently washed two times for 10 min with washing buffer and one time with 1 x TBS by repeated revolving of the membranes.

Secondary antibody: Again, all blots were transferred in hybridisation tubes like described above. According to the manufacturers manual, the secondary antibody was diluted 1:4000 into the blocking buffer. 20 ml of the solution was added to every blot. The tubes were closed, horizontally fixed in the headlong rotating shaker and incubated at room temperature for 90 min by gentle rotation. The secondary antibody solution was subsequently removed and discarded. The membranes were washed one time for 10 min with washing buffer while gently floating and repeated revolving. Finally, the membranes were washed two times with 1 x TBS as stated above. For the last washing step, the use of the Tween-20 containing washing buffer is not recommended, because the detergent may inhibit the peroxidase reaction during signal detection.

Signal detection: Per blot, 4 ml of the chemoluminescence substrate containing solution was mixed with 40 µl of the starter solution and warmed up to room temperature (detection fluid). Under dark light conditions (photographic laboratory) the membranes were transferred onto a photocopy transparency facing the protein containing side upwards. After the remove of abundant liquid, the blot was entirely covered with the detection fluid. The peroxidase-catalysed chemoluminescence reaction immediately started and last for approximately 10 – 15 min before light emission entirely faded. Subsequently after initialising the reaction, the blot was covered by a second photocopy transparency. After having removed air bubbles, a properly marked X-ray film was precisely superimposed onto the transparency/blot/transparency-sandwich, so that the upper left corners of the film and of the membrane stoke together. In dependence of the final signal/background relation, several X-ray films were exposed for 0.5 up to 4 minutes. Fixing and developing of the exposed films were performed according to standard procedures.

The membranes were air dried and the pencil-made landmarks were used for assignment of signals obtained either on the X-ray films and gel-maps conventionally stained.

Two different kinds of S30-*Escherichia coli* lysates, prepared and used for cell free protein biosynthesis according to our previously published procedure [9] were separated on 2DE-gels and afterwards blotted according to the above described method. Either anti-phosphothreonine or phosphoserine-antibodies were used for the identification of the respective phosphoproteins according to the before described EITB-technique. Figure 1 shows an example of two X-ray films of the different lysates being exposed against the anti-phosphothreonine-antibody. The lysate used for Figure 1 B is routinely used as S30-extract for *in vitro* protein biosynthesis and has previously been shown to be translationally active for the production of recombinant Green Fluorescent Protein. In contrast, we demonstrated that the lysate used for Figure 1 A was completely inactive due to unfavourable lysate preparation conditions (Schindler, Baumann, Reuss and Siemann, submitted for publication).

Blot A shows a lysate with no protein phosphorylation signals. Some small, very black and sharp-zoned spots appeared which were identified as 'false positives'. The 'real positive' signals are present in blot B. These appear bigger than the 'false positives', more grey than black, fading on the edge and were - in contrast to 'false positives' spots - all reproducible. The two big signals in the lower left corners of both blots are small phosphorylated peptides or degradation fragments and thus are running with the front of the second electrophoretic dimension. Prominent signals on immunoblots were isolated from the corresponding gels and identified by sequencing. Some detected spots, like Ribosomal Protein S1 or Elongation Factor Tu, are already known as phosphoproteins. These findings are, however, currently under investigation and will be published soon.

The presented method allows the screening of proteome maps for either phosphorylation on serine and/or threonine residues. In dependence of the scope of the experiment, the antibodies might also be used in combination, or together with phosphotyrosine antibody (New England Biolabs, USA) and thus might even reflect a more global state of phosphorylation in the proteome. The most important requirement is, nonetheless, the ability to produce 2DE-gel maps of respectively good quality and reproducibility. Only this

ensures that antibody signals can precisely be assigned to certain proteins in the stained 2DE-gel patterns. For this purpose, an electrophoretic system is of advantage that allows the simultaneous performance of two or even more gels for each sample (i.e. four samples are run in eight gels, the first four gels will be silver- or coomassie blue stained, the second half of it will undergo immunoblotting).

The described procedure of using hybridisation tubes instead of 'sealed plastic bags' or basins - as recommended in standard protocols - renders the procedure cheap since only 5 – 10 % of the volume of antibody solutions is needed to obtain excellent quality of detection.

Crucial points of the described technique are the blocking and washing steps. High resolution 2DE-blotting are much bigger than "normal" sized blots of one-dimensional gels, so that a sufficient distribution and upheaval of the liquid all around the membrane might not be necessarily given. Elevated background appearance or a "one-big-square-signal"-effect were prevented by realising the membrane to 'swim and float' within the basin. Thus, it is strongly recommended to use one basin per blot. On the other hand, washing too extensively and/or shaking too vigorously made not only the background but also the signals fading.

Apart from the described chemoluminescence reaction, the use of peroxidase coupled secondary antibodies should allow standard colorimetric 'one-shot' reactions, where the membrane itself might be stained (in case, no photographic laboratory is available). In fact, the advantage of the chemoluminescence detection by means of peroxidase reaction is obvious: several films with different exposition times can be obtained from one single blot. Thus, this technique is comparable to radioactivity; nonetheless the described chemoluminescence method is definitively cheaper and not hazardous. Once the respected spots are detected, they can - if desired - be immediately isolated from accompanying coomassie gels and further identified by spectrometric techniques or amino acid analysis [3].

In summary we conclude that the presented method is a cheap, most sensitive and reliable technique for analysis in proteomics.

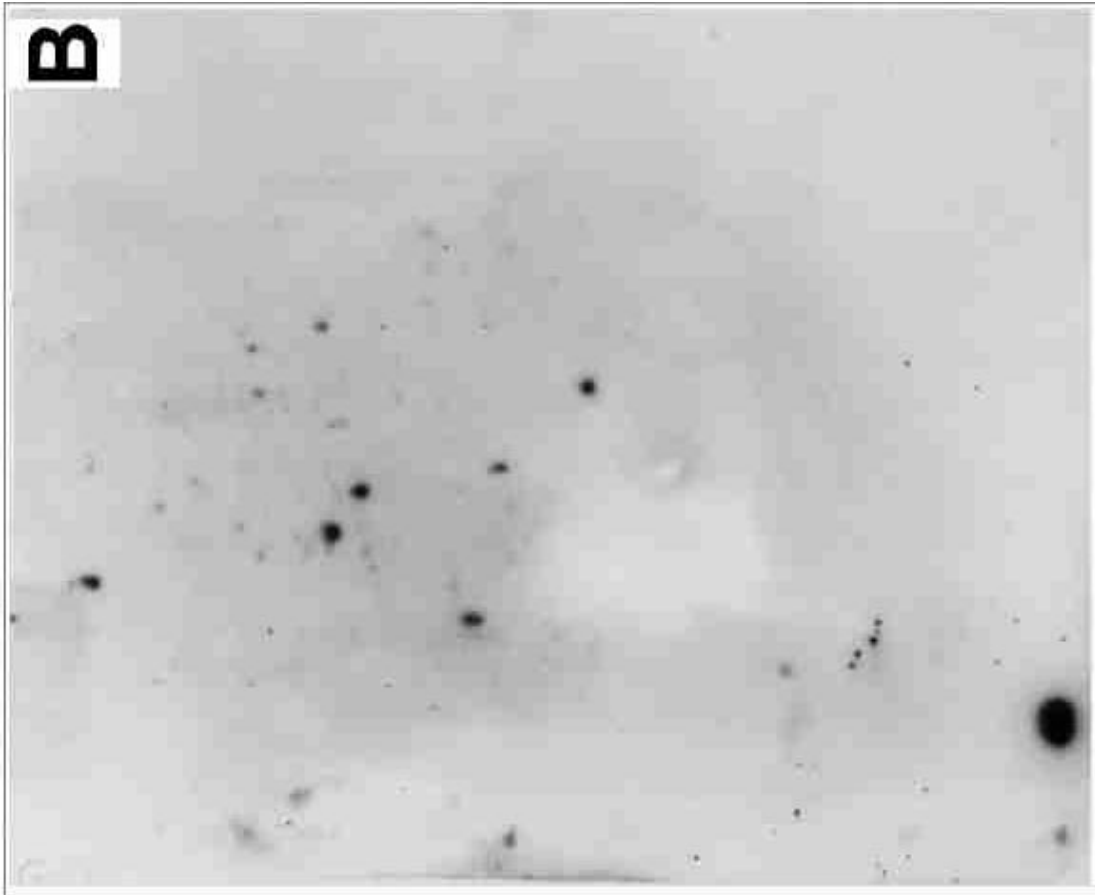


Figure 1

Detection of phosphothreonine-residues by use of the EITB-based technique in two different cell free extracts of *Escherichia coli*. The S30-lysates, which are commonly used for *in vitro* protein biosynthesis, were separated on 2DE-gels, blotted and the respective phosphorylations on the threonine residues were detected with the described method, using the anti-phosphothreonine antibody purchased from SIGMA. Immunodetection was performed on X-ray films by a secondary peroxidase-conjugated anti-mouse antibody chemoluminescence kit purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories. Blot A , shows a lysate with no protein phosphorylations. In contrast to that, typical phosphorylation patterns have been obtained for another lysate system, demonstrated in Blot B (for more details see text). Similar results, but obtaining respectively different phosphorylation patterns, were obtained for the phosphoserine antibody.

References

- [1] Yan, J. X., Packer, N. H., Gooley, A. A., and Williams, K. L. *Journal of Chromatography A*. 1998, 808, 23-41.
- [2] Nagahara, H., Latek, R. R., Ezhevsky, S. A., and Dowdy, S. F. *Methods Mol Biol*. 1999, 112, 271-9.
- [3] Kellner, R., Lottspeich, F., and Meyer, H. E. , *Microcharacterization of Proteins*, Wiley-VCH, Weinheim 1999.
- [4] Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D., and Hochstrasser, D. F. , *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer, Berlin 1997.
- [5] Magi, B., Bini, L., Marzocchi, B., Liberatori, S., Raggiaschi, R., and Pallini, V. *Methods Mol Biol*. 1999, 112, 431-43.
- [6] Mason, G. G., Murray, R. Z., Pappin, D., and Rivett, A. J. *FEBS Lett*. 1998, 430, 269-74.
- [7] Kamps, M. P. *Methods Enzymol*. 1991, 201, 101-10.
- [8] Heffetz, D., Fridkin, M., and Zick, Y. *Methods Enzymol*. 1991, 201, 44-53.
- [9] Schindler, P. T., Macherhammer, F., Arnold, S., Reuss, M., and Siemann, M. *Electrophoresis*. 1999, 20, 806-12.

Publikation V

State of Protein Phosphorylation Among Limitations in Cell-Free Protein Biosynthesis

Martin Siemann, Petra T. Schindler, Sabine Arnold, Sandra Baumann, Kai Scharnweber and
Matthias Reuss*

European Journal of Biochemistry; submitted.

State of Protein Phosphorylation Among Limitations in Cell-Free Protein Biosynthesis

Martin Siemann, Petra T. Schindler, Sabine Arnold, Sandra Baumann, Kai Scharnweber and
Matthias Reuss*

Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Allmandring 31, D-70569 Stuttgart,
Germany

Running title: Limitations in cell free translation

Correspondence to: Prof. Dr.-Ing. Matthias Reuss

Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart,

Allmandring 31, D-70569 Stuttgart, Germany,

Tel.: +49-(0)711-685-5161; Fax: +49-(0)711-685-5164,

e-mail: reuss@ibvt.uni-stuttgart.de

Summary

Prokaryotic *in vitro* protein expression systems, originally developed decades ago as a helpful tool for the elucidation of genetic code, have recently become more focussed on tackling fundamental problems in protein engineering. The extension of genetic code by incorporation of unnatural amino acids and *in vitro* display techniques for application in directed evolution are only a few of the examples published so far. In contrast to these remarkable innovations, the productivity of cell-free protein synthesis remained low, despite the many attempts to detect the molecular causes for these limitations. A key requirement for future application on preparative scale is therefore still a significant improvement of system performance. We report here a crucial alteration of protein-phosphorylation over the course of protein synthesis *in vitro*, especially of those proteins being directly involved in protein synthesis like the translation factors or ribosomal proteins. Furthermore, the state of protein-phosphorylation of translationally inactive crude cell extracts, obtained immediately after cell disintegration, were shown to be completely devoid of specific phosphothreonine modifications. Surprisingly, these phosphorylations could be restored during standard lysate preparation, all along with the recovery of functional activity. The lack of specific phosphorylation was not caused by an insufficient energy supply, which was demonstrated by respective measurements. These findings need certainly be considered in future for the development of novel lysate preparation concepts.

Keywords

in vitro transcription/translation; proteome; translation factors; chaperone; *Escherichia coli*

Introduction

The particular importance of cell-free protein biosynthesis systems arises from their ability to produce sensitive gene products, such as e.g. artificial proteins containing unnatural amino acids [1] and toxins, whose production may be limited or impossible under *in vivo* conditions [2]. Moreover, for the purpose of enzyme engineering, this technique has been proven as an ideal tool for directed evolution concepts based on ribosomal or polysomal display (for a review see [3]). Despite their high potential for industrial exploitation and although cell-free coupled transcription/translation systems have been used as a standard procedure since decades [4-6], low productivity and poor long-term operational stability have as of yet prevented their full application for production purposes and commercialisation.

Reasonably productive cell-free protein synthesis systems have been, for example, derived from *Escherichia coli* (for a recent review see [3]). Following standard procedures - which have in principle not undergone great changes during the last decades [4-6] -, cell-free systems are based on crude cell extracts (lysates), containing all biocatalysts necessary for protein expression (ribosomes, translation factors, aminoacyl-tRNA synthetases), and enzymes for energy regeneration. In addition, it is necessary to consider that these crude lysates contain counterproductive proteins like, DNAses, RNAses, general nucleases and proteases, etc., since these are not specifically removed during the preparation procedure. Thus severe causes leading to termination of protein synthesis, are usually sought in mRNA degradation [7], a fast depletion of energy sources resulting in nucleoside triphosphate starvation [8], or general inactivation due to proteolysis.

Many attempts have been made in the past to improve the productivity of cell-free protein biosynthesis: Tremendous decay of functional mRNA was successfully accounted for by coupling protein expression to *in vitro* transcription with exogenous phage RNA-polymerase [9], requiring a properly controlled DNA-template. For ATP and GTP regeneration, the combination of acetyl phosphate and endogenous acetate kinase was shown to be practical [8]. Further approaches were made from post-treated lysates: Increased protein synthesis due to specific removal of cellular phosphatases (by means of nucleotide degrading enzymes) by immuno-precipitation was interpreted as to be caused by an enhanced energy level [10,11]. Condensed extracts of *E. coli* were prepared from ultrafiltration resulting in

lysates [12], globally enriched with all necessary (but as well counterproductive) factors. Above all, modifications in process operation and bioreactor design were introduced replenishing the classical batch-wise reaction performance [13-17]. In fact, all of these attempts have lead to only marginal improvement of protein production *in vitro*, and thus a more general limitation factor not being considered so far might be concluded.

Specific phosphorylation in terms of a reversible modification of proteins is a well-known and important mechanism for global regulation of eukaryotic gene expression [18]. For prokaryotes, the specific role of phosphorylation of elongation factor Tu (EF-Tu) as a regulatory element in translation was recognised [19,20]. We report here that a partial phosphorylation of EF-Tu during initiation of cell-free protein expression disappeared at breakdown of protein synthesis *in vitro*. Furthermore, changes in the phosphorylation state of other proteins being crucial for regulation of translational processes are demonstrated. Based on these findings, novel lysate preparation concepts, particularly taking into account proper physiological conditions and global regulation patterns, should be considered for an improved *in vitro* protein production.

Experimental Procedures

Lysate preparation

Preparation of the S30-cell extract from *E. coli* A19 was performed according to Pratt [5] with minor modifications described previously [21]. Protein concentration of the final lysate was 29.5 mg/l, measured by the Bradford assay (Bio-Rad, Munich, Germany). Total ribosome concentration of the lysate was 7.5 μ M, which was estimated from adsorption units AU_{260 nm} of 290 (personal communication Prof. Dr. K. H. Nierhaus, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, Germany).

Coupled *in vitro* transcription/translation system

Plasmid pIVEX-2.1, coding for recombinant GFP_{UV}, which is controlled by both T7-promoter and T7-terminator, was a kind gift from ROCHE Molecular Diagnostics, Germany. The molecular size of the plasmid is 4355 bp, the total length of the mRNA was calculated to 1041 bases. Batchwise cell-free transcription/translation was performed in a 96-multiplate array (reaction volume was 200 µl each) at a temperature of 30 °C as described previously [21]. The composition of the reaction mixture was: pIVEX2.1-GFP, 5 µg/ml (=5.6 nM); T7-RNA polymerase, 2 kU/ml; *E. coli*-tRNA, 48 mg/ml; HEPES/KOH, pH 7.6, 100 mM; ATP, 2 mM; GTP, 1.6 mM; CTP, 1 mM; UTP, 1 mM; all 20 amino acids, 250 µM each; folinic acid, 18.8 µM; rifampicin, 1 mg/l; KOAc, 100 mM; Mg(OAc)₂, 18 mM; EDTA, 1 mM; dithiothreitol, 2 mM; sodium azide, 0.03 %; and *E. coli* S30 extract with a final protein concentration of 5.9 g/l (equal to 1.5 µM total ribosome concentration). 40 mM acetyl phosphate together with the internal acetate kinase were used as an energy regeneration system.

Bioanalytical methods

The production of active GFP was fluorometrically monitored *on-line* (SpectraFluor, Tecan, Austria; excitation at 485 nm, emission at 535 nm) as described previously [21]. Fluorescence activity was calibrated with a purified GFP-standard of known protein concentration (recombinant GFP_{UV}, Clontech, Germany). Total protein synthesised *in vitro* was estimated from incorporation of ¹⁴C-leucine: 66.7 µM of ¹⁴C-leucine (11.7 GBq/mmol; Amersham Pharmacia Biotech, UK) was added to the standard mixture. At respective times, aliquots of 4 µl were taken, and the concentration of synthesised protein was estimated by counting the radioactivity of precipitated material in 500 µl of hot trichloroacetic acid (10 %) and independently by 12 % PAGE in the presence of SDS followed by fluorography [22]. The fluorographs were scanned and further analysed by the software package ImageMaster 1D, version 2.0, Pharmacia, Sweden. For separation of soluble and insoluble protein fractions, the entire reaction mixture was centrifuged at 10.000 g for 20 min prior to analysis, according to [23] and [24]. Molar concentration of GFP synthesised *in vitro* was calculated based on its specific leucine contents of 3.7 % (9 leu/239 aa).

Measurement of mRNA concentration

Total mRNA synthesised in the coupled system was estimated from incorporation of ¹⁴C-ATP. 200 μM of ¹⁴C-ATP (1.92 GBq/mmol; Amersham Pharmacia Biotech, UK) were added to the standard mixture. At respective times, aliquots of 20 μl were taken, and the concentration of synthesised mRNA was estimated from the liquid scintillation assay as described above. The determination of molar concentration was carried out considering the molecular size of synthesised mRNA, the respective amount of adenosine per specific mRNA and the specific radioactivity of ATP. The quality of synthesised mRNA was further analysed on denaturing polyacrylamide gels (5 % PAGE, 6 M urea). 10 μl of the solution were taken, loaded on the gel and further analysed as described in [22].

Energy supply

Ionic Pair Chromatography on Reversed Phase RP18-column (GROM-SIL, GROM, Herrenberg, Germany/SpectraPhysics, San Jose, CA) was used with minor modifications according to [25] for measurements of all nucleotide concentrations (NXP). 30 μl of the reaction mixture were pipetted into 120 μl of hot (95 °C) 0.2 vol % phosphoric acid. After centrifugation, 100 μl of the clear supernatant was used for HPLC-analysis. The concentration of acetyl phosphate was determined according to Lipmann and Tuttle [26]. In order to prevent spontaneous chemical hydrolysis, all reactions were handled on ice.

High-resolution two-dimensional electrophoresis (HR-2DE) and immuno-blotting

HR-2DE and protein identification was performed as described previously [21]. Gels provided for mass spectrometry analysis were stained with colloidal coomassie blue (ROTH, Karlsruhe, Germany). Western blotting and immuno-affinity detection were carried out following the previously protocol published elsewhere (Schindler, P.T., Reuss, M., & Siemann, M. (1999) Non-radioactive screening for phosphoproteins in proteome analysis: An immunoblot technique for application in High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis, *J. Electrophoresis*, submitted). Immuno-blots of the obtained HR-2DE-gels were performed

using monoclonal antibodies (Sigma) against phosphothreonine and phosphoserine residues, respectively. Signals were developed in a chemoluminescent reaction with a horseradish-peroxidase-coupled secondary antibody finally exposed to X-ray films.

Results

Protein expression *in vitro*

Time-dependent development of key reactants involved in the coupled transcription/translation for synthesis of recombinant GFP_{UV} is displayed in Figure 1. All measurements were taken from the same experiment or under identical reaction conditions as stated in Figure 1. Three different analytical methods were used to monitor GFP concentration: Functionally active GFP was measured on-line due to its highly sensitive fluorescent abilities and further quantified in comparison to a GFP-standard of known protein concentration (Figure 1 A). After a time delay of approximately 20 min, the fluorescence activity instantly increased. A maximum concentration of active GFP of about 450 nM was obtained after 100 minutes of reaction time. Since the activity profile is known to be superimposed by maturation [21,27], time-dependent protein synthesis was additionally investigated by using an incorporative radioligand, which was ¹⁴C-leucine in this case. As can be seen from liquid scintillation measurements, protein synthesis was instantly initiated with an initial translation rate of 1.6 μM/h. After only 50 min, protein synthesis rate declined to zero, resulting in a total GFP concentration of 650 nM.

The difference between concentration of totally synthesised protein (650 nM) and active GFP concentration (450 nM measured by fluorescence activity, which accounted to 70 % of total GFP synthesis) was due to formation of insoluble and thus inactive GFP fragments, which could quantified as well from PAGE-fluorograms. Totally synthesised protein can be distinguished between a soluble fraction consisting primarily of active GFP, and an insoluble contribution accumulated in the pellet, which appears to be enriched with an unknown protein fragment of 5 kDa. Summarising the pellet fraction (both bands for GFP and 5 kDa protein) together with the soluble 5 kDa protein in the supernatant, leads to 27 % of the totally synthesised protein. Thus about 73 % of all protein synthesised are found as active GFP,

which is in very good agreement with the measurements of on-line fluorescence and radioactive protein labeling.

Coupled *in vitro* transcription/translation

The structural gene is controlled by T7-promoter, while transcription termination occurs after 1041 nucleotide bases. The use of radiolabeled ATP enabled the specific detection of synthesised mRNA in the coupled *in vitro* system. In Figure 1 B, the time course of functionally active mRNA containing the structural gene of GFP is shown, which was calculated with the information that T7-terminator exhibits an approximately 70 % termination efficiency (data not shown). Similar to GFP synthesis, formation of mRNA was instantly initiated, however, with a higher rate of 2.5 $\mu\text{M}/\text{h}$ than was obtained for protein synthesis. While translation rate slowed down after only 50 min, transcription rate was maintained for at least 120 min. It should be recognised that the increase of mRNA concentration reflects the counterbalance between both transcript formation and mRNA decay. Even after 120 min of reaction, a maximum concentration of 1800 nM of functionally active mRNA (molecular size of 1.0 kb) was detected. An investigation of mRNA quality through denaturing PAGE confirmed that the mRNA concentration measured for $t = 120$ min consisted primarily of functional mRNA (Fluorogram in Figure 1 B). Thus, since an excess of functionally active mRNA was even detectable after translation had already stopped, cell-free protein synthesis was in this case not limited by underestimated or malfunctioned *in vitro* transcription.

Energy supply

In order to investigate the energy charge during protein synthesis, concentrations of all pyrimidine and purine nucleotides (NXP) were measured by HPLC. Since translation is believed to be exclusively dependent on both ATP (aminoacylation reaction) and GTP (elongation cycle) [28], main focus was placed on the concentration profiles of either adenine and guanine nucleotides (Figure 1 C). Using endogenous acetate kinase in combination with acetyl phosphate for energy regeneration the levels of nucleoside triphosphates ATP and GTP

remained sufficiently high during experiment duration, and were still 1.6 mM and 1.9 mM, respectively, at breakdown of protein synthesis. The observed reduction as compared to their respective initial concentrations was, however, due to specific incorporation into the synthesised mRNA. As long as GFP synthesis proceeded, the used endogenous energy regeneration system enabled a more than sufficient energy supply and thus cannot be considered as a limiting factor for cell-free protein synthesis under the applied conditions.

Proteome analysis during cell-free protein synthesis

Identification of proteins by HR-2DE. For detection and evaluation of proteins especially involved in protein biosynthesis, the entire cell-free protein biosynthesis reaction mix was subjected to HR-2DE. A respective silver-stained gel-map, reflecting the physiological situation at the very beginning of *in vitro* protein synthesis, is shown in Figure 2. Most prominent protein spots, putatively involved in protein biosynthesis, were isolated and further analysed by MALDI-MS to obtain specific mass fingerprints or were N-terminally sequenced by Edman-degradation. Herein, elongation factors EF-Tu (spot No 1) and EF-Ts (spot No 2) were both detected in pairs of two distinct isoforms of identical molecular weights but slightly different isoelectric points. In both cases, the spot-volume and thus concentration of the more acidic isoform appears to be smaller than the more alkaline isoform.

Phosphorylation patterns of proteins during cell-free protein synthesis. 2DE-analysis was performed from samples directly taken both after initiating protein biosynthesis (0 minutes) and after 50 minutes at the breakdown of translation (Figure 1 A). Gels were blotted and further screened for specific protein phosphorylation sites, especially focussing on serine- and on threonine residues, by use of monoclonal antibodies. It should be stated that each immunoblot, shown in Figure 3, had an original size of approximately 250 cm², which was difficult to handle and thus the observed background appearance could not be avoided. The respective signals were, nonetheless, all reproducible and could be clearly determined and assigned to corresponding proteins on the 2DE-maps.

At the beginning of cell-free protein biosynthesis, ribosomal protein RP-S1, the 60 kDa chaperonine GroEL, elongation factor EF-Ts and ribosomal protein RP-L9 were all found to

be phosphorylated on serine residues (Figure 3 A). After protein synthesis had significantly slowed down, all of these proteins maintained their phosphorylation state, except for ribosomal protein RP-S1 (spot No 4), which appeared to be dephosphorylated (Figure 3 B).

On western blots treated with phosphothreonine specific antibodies, both of the elongation factors EF-Ts and EF-Tu, ribosomal protein RP-L10 and a 45 kDa fragment, supposedly a degradation product of the sigma factor, were shown to be specifically phosphorylated at the beginning of cell-free protein synthesis (Figure 3 C). All of these proteins lost their modifications during protein synthesis, since neither of these specific phosphorylations could be immunologically detected after 50 min of cell-free reaction (Figure 3 D).

Protein phosphorylation patterns of translationally active S30-lysates and inactive crude cell extracts. Standard protocols for preparation of S30 lysates according to Zubay [4], Pratt [5], and Ryabova et al. [6] all include a so-called preincubation step, often termed ‘run-off’-procedure. Herein, starting from crude cell extract, lysate preparation is carried out for 90 min in the presence of all amino acids, ATP, phosphoenol pyruvate (PEP) and pyruvate kinase, the latter of which is added for energy regeneration. As a matter of fact, this preincubation step was shown to be inevitably necessary for translational reactivation of crude cell extract and thus for recovery of fully active S30 lysates (Figure 4 C). Furthermore, from immuno-blot analysis on phosphothreonine residues it could be demonstrated that specific protein phosphorylations, namely for elongation factors Tu and Ts, can be detected only in the case of active S30 lysate (Figure 4 A, but were not visible for the crude cell extract in Figure 4 B).

Discussion

The causes for termination of protein synthesis are typically alleged in fast depletion of energy sources, resulting in starvation of nucleoside triphosphates [8], inhibition of protein synthesis by respective by-products [29, 30] and mRNA-degradation due to endogenous RNAses [7, 31]. We found, however, neither of these effects plays a limiting role in bacterial protein synthesis *in vitro*. Complete recovery of all purine and pyrimidine triphosphates over the course of protein expression proved the employed energy regeneration system based on

acetyl phosphate and endogenous acetate kinase as highly efficient. In fact, concentrations of previously described putative inhibitors of protein expression, like nucleoside di- and monophosphates [29, 30], were all found to be at negligible concentrations and therefore cannot serve responsible for termination of protein synthesis *in vitro* under the used conditions.

Functionally active mRNA was found in a slight excess over the determined protein in the *in vitro* transcription/translation system (1.8 μM mRNA_{GFP}/0.65 μM GFP after 120 min reaction time). The same was true for the estimated initial transcription and translation rates (2.2 and 1.6 $\mu\text{M}/\text{h}$, respectively) thus reflecting that mRNA accumulated slightly faster than it gets processed in translation. In addition, from determination of total ribosomes in the reaction system (1.5 μM) and assuming full functional activity of all ribosomes, it might be considered that at most one active ribosome was positioned on one mRNA molecule. Apart from the equi-molar situation, it is more likely that only a very minor part of these ribosomes was functionally active and underwent reinitiating cycles to synthesise the 0.6 μM GFP in total.

Secondary and tertiary structure of some mRNA was reported to decrease the ability of ribosomes to bind to the translation initiation site [32]. Therefore the ratio of mRNA to the amount of ribosomes was optimised by varying the concentration of T7-RNA polymerase added exogenously to the reaction system. Herein, initial translation rates of 2 $\mu\text{M}/\text{h}$ were determined at an RNA polymerase concentration of 2 U/ μl , while further increase of transcription rates significantly diminished protein expression ([3] and own results not shown).

For *in vivo* conditions, a maximum protein expression rate of *E. coli* can be calculated as 80 mg of total synthesised protein per ml cell volume per hour for a specific growth rate μ of 1/h [33]. During the preparation procedure of S30-cell extracts, cellular content was diluted 20-fold. In the case that *in vitro* protein synthesis proceeded without any further loss, a maximum synthesis rate of 4 mg/ml reaction volume per hour should be expected in the diluted system. In fact, a maximum synthesis rate of only 50 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$ was obtained for GFP synthesis in this study. Even in the case of the best ever published system, a protein expression rate of at least one order of magnitude lower than the expected rate in the diluted system (0.4 mg/ml/h) was described [15] and thus further stresses the limitations of *in vitro*

systems compared to the potential of living cells. Above that, it is very unlikely that limitations are caused by amino acid depletion. From material balances it can be estimated that for the synthesis of 0.65 μM GFP, 14.3 μM glycine (which is the most frequent amino acid in this protein) are necessary. Therefore a 17-fold initial excess of this substrate was realised, since initial concentrations of all amino acids were fixed to 250 μM . The same is true for formyl-tetrahydrofolinic acid (18 μM), a precursor inevitably necessary for translation initiation as already stated by Patnaik and Swartz [15].

Recently [10, 11] it was reported that specific removal of phosphatases from a eukaryotic cell-free protein synthesis system by immuno-precipitation resulted in an increase of protein productivity up to 5-fold, while the synthesis rate was enhanced up to 8-fold and a prolonged process stability up to 1.5-fold was obtained. The authors claimed that this effect was due to an improved energy supply. Contrarily to their belief our results for the used bacterial system suggest that the used energy regeneration system is able to maintain a sufficiently high energy level before termination of translation reaction. It is most likely that phosphatases have additional effects on protein biosynthesis *in vitro* apart from depletion of energy sources.

Formerly [21] we described a shift of certain proteins monitored during GFP synthesis in cell-free continuous-flow operation to a more alkaline pH-value on 2DE-gels. Such changes in the isoelectric point can be caused by the loss of acidic protein modifications, like it may be the case for phosphorylated proteins. In fact, both protein phosphorylation and dephosphorylation are vital mechanisms for regulation of protein biosynthesis particularly described for eukaryotic systems: 30 to 40 different phosphorylation sites seem to be involved in the stimulation of eukaryotic translation [18]. Examples for protein phosphorylations as a general physiological tool in prokaryotes have been published earlier [34, 35], namely the requirement of specific serine/threonine kinases for cell growth and development [36]. Specific phosphorylations during protein expression have thus far been reported for elongation factor Tu [19, 20]. Alexander et al. [19] showed that a specific phosphorylation of threonine residue 382 (which is a highly conserved motif in all prokaryotes) prevents the ability of EF-Tu to bind aminoacylated transfer RNA. These authors stated that a conformational change during elongation process allows protein kinases to have access to thr-382, which is essentially modulated by phosphorylation. The introduction of a negative

charge introduced by phosphorylation was found to loose the binding of EF-Tu/GDP to the ribosome and finally to promote its liberation from the ribosomal complex.

During initiation of coupled *in vitro* transcription/translation, we observed a phosphorylation of threonine residues of EF-Tu. After termination of protein synthesis reaction, these phosphorylations on threonine residues of EF-Tu were not detectable any more, although the elongation factor was still present in the reaction system, which was confirmed by identification on silver-stained 2DE gels. The fact that no phosphorylation of EF-Tu could be detected after breakdown of protein synthesis seems to indicated that the formerly active EF-Tu molecule remains bound to the ribosome and subsequently does not become reactivated after one elongation cycle is completed. The lack of the vital phosphorylation of tyrosine(382)-residue was shown to be not caused by an insufficient energy supply, as already stated above. It might be due to an imbalanced relation between protein phosphatases and protein kinase activity in the cell-free S30 lysate. In this context, the specific removal of phosphatases must have an additional positive influence on the *in vitro* synthesis system than only affecting energy charge as stated in [10, 11].

Phosphorylations of EF-Ts have not been described to date, yet such modifications were observed in this study for serine- and on threonine-residues, both at the very beginning of cell-free protein synthesis. After termination of protein expression *in vitro*, the phosphoserine signal of EF-Ts seemed to be less prominent as compared to reaction start, while the phosphothreonine signal had vanished completely after 50 min. The eukaryotic counterpart to EF-Ts, the EF-1 $\beta\gamma$ complex, had been shown earlier to be phosphorylated at least at a serine residue [18]. A positive or negative regulation effect, however, seems to depend on the kind of protein kinase acting on EF-1 $\beta\gamma$. Both, EF-Ts and EF-1 $\beta\gamma$ catalyse the nucleotide exchange reaction of bound GDP to GTP on EF-Tu and EF-1 α , respectively. EF-Ts does not only promote the transfer of GTP on phosphorylation of EF-Tu, but seems to exhibit also a chaperone-like function of EF-Tu [37].

At the beginning of cell-free gene expression both ribosomal proteins RP-S1 and RP-L9 are found to be phosphorylated at serine residues. While ribosomal protein L9 still kept its modification, RP-S1 lost its specific serine-phosphorylation after breakdown of protein synthesis. RP-S1 is known to be phosphorylated by ATP [35], most probably at a serine-

residue, which can be confirmed from the measurements presented here. The physiological function of this finding remains unknown for both RP-L9 and RP-S1. Ribosomal protein L10 was separated accordingly well on 2DE gels, despite of its isoelectric point far above 9. An as of yet unknown specific threonine phosphorylation of RP-L10 was detected, but the modification was found to be lost after termination of cell-free protein synthesis.

As a subsequent (and reversible) response to stress-conditions, GroEL protein - a 60 kDa chaperonine - was shown to be phosphorylated on yet unknown amino acid residues [34]. A threonine residue of GroEL of *Thiobacillus ferrooxidans* was found to be phosphorylated [38], whereas we show a serine-specific phosphorylation of GroEL *in vitro* for *Escherichia coli*. Since phosphorylated GroEL was suggested to change its catalytic properties under stress conditions [34, 38], it might act as a kind of stress sensor. Exclusively the phosphorylated GroEL-isoform was detected under the conditions of *in vitro* protein synthesis, which might be considered as 'stressful' and thus mediated by the chaperone *in vitro*. Most recently, Houry et al. [39] reported GroEL to be involved in the conformational maintenance of EF-Tu. It can thus be concluded that GroEL is directly involved in translational regulation, such that the activity of EF-Tu, which is essential for elongation, is adjusted via its conformational switch between the open and closed isoform.

Thus, the chaperonine GroEL appears to cover a variety of complex physiological functions spanning from initial folding, conformational maintenance of translational key proteins [39], degradation of abnormal or misfolded proteins [40] and folding of newly synthesised proteins [41]. The mechanism of phosphorylation of this putative global regulator remains, nonetheless, unclear.

Acknowledgements

We like to thank Dr. Ruth Menßen from the Institute for Industrial Genetics, University of Stuttgart, for kind advice and for providing the photographic laboratory. This work was supported by the German Ministry of Education and Research (BMBF) and by ROCHE Molecular Diagnostics, Penzberg, Germany.

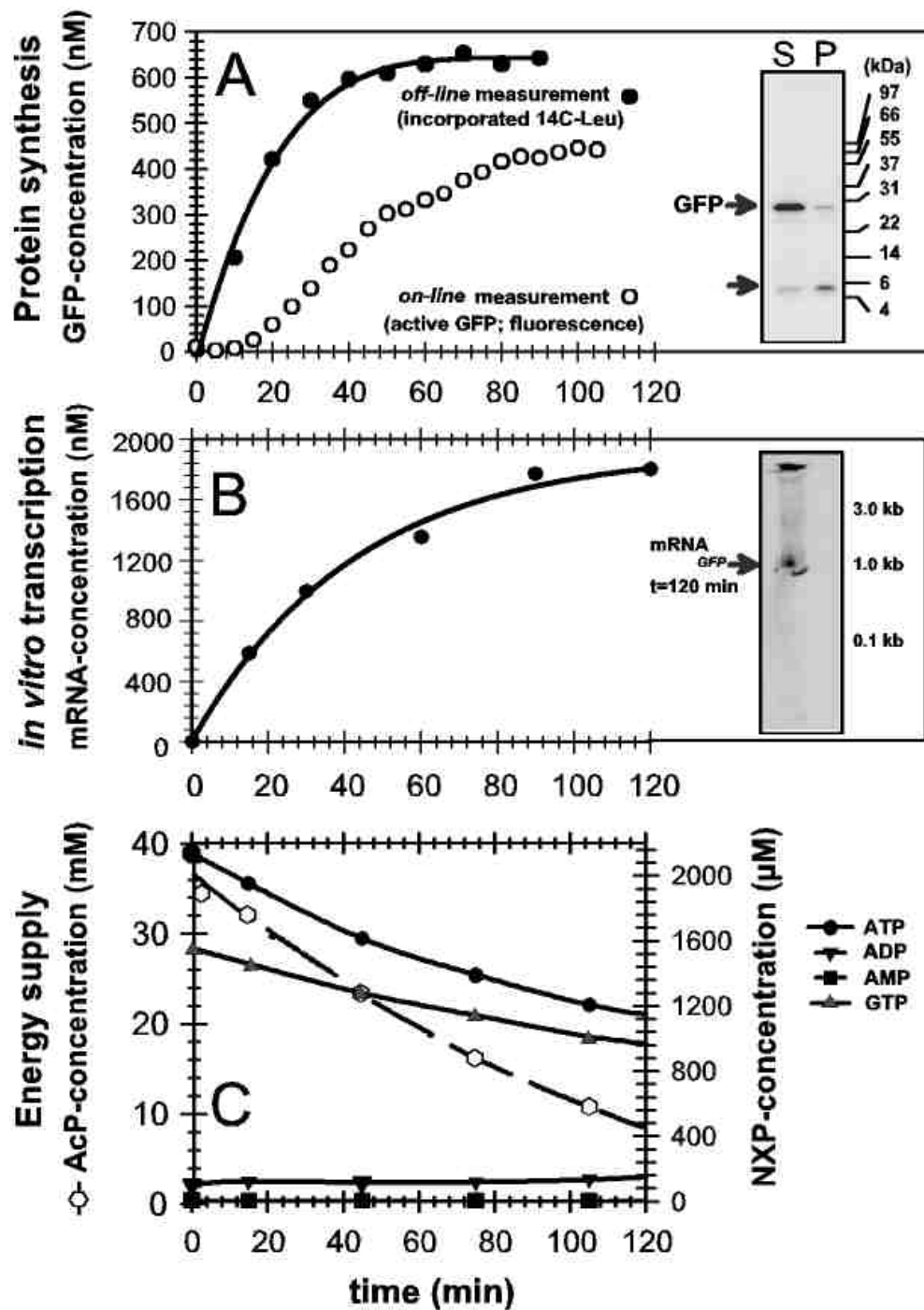


Figure 1

Time courses of key reactants involved in batch-wise expression of recombinant GFP_{UV} in a coupled *in vitro* transcription/translation. Measurements of GFP formation, energy supply and

proteomics (see also Figures 2, 3) were taken from the same experiment. For analysis of mRNA formation, the reaction was performed under identical conditions.

(A) Time-dependent protein production *in vitro*. The formation of active GFP was determined on-line by fluorescence at 535 nm (empty circles). Total protein synthesis was estimated from incorporation of radioactively labeled ¹⁴C-leucine (filled circles). Insert: Fluorogram of the SDS-PAGE after 120 min of reaction time, including the synthesised radiolabeled proteins. (P) Pellet, (S) Supernatant fraction. GFP: green fluorescent protein; unknown protein fraction at 5 kDa is indicated by the arrow,

(B) Time-dependent concentration of mRNA synthesised during coupled *in vitro* protein synthesis. Measurement of mRNA from incorporation of radiolabeled ¹⁴C-ATP using a scintillation assay. The quality of synthesised radiolabeled mRNA was determined from the fluorogram of denaturing PAGE (Insert). mRNA coding for GFP (size: 1.0 kb) is indicated by the arrow.

(C) Energy supply during cell-free synthesis of GFP. Measurements of all nucleotides (NXP) were performed by ionic pair chromatography. Time dependent profiles of AXP and GTP are given. Similar profiles were obtained for GDP/GMP, CXP and UXP (data not shown). The time-dependent hydrolysis of AcP was photometrically determined.

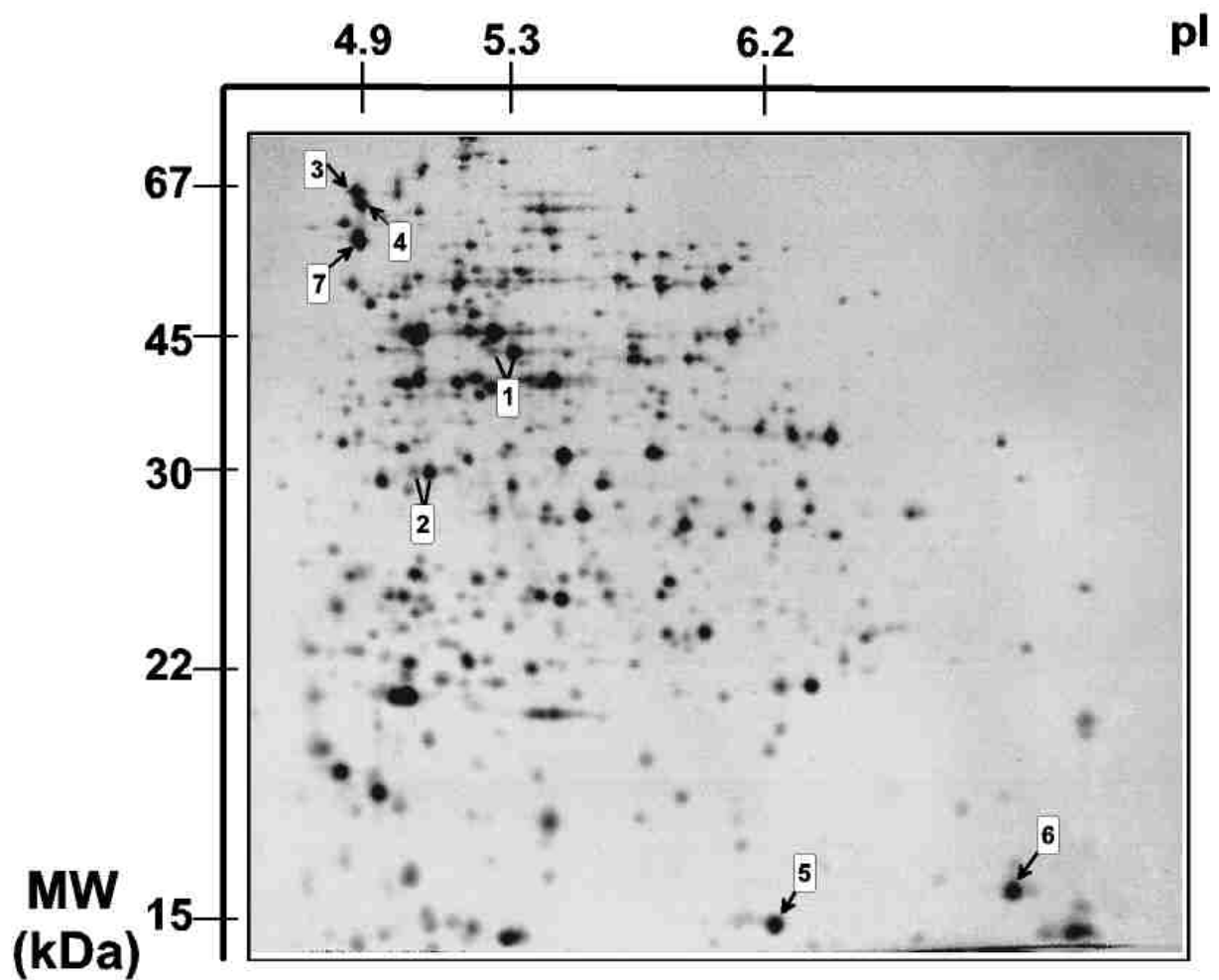


Figure 2

Silver-stained two-dimensional electrophoresis gel-map of *Escherichia coli* S30-lysate at the beginning of cell-free protein biosynthesis. Marked spots are proteins directly involved in protein expression. Code numbers are consecutive throughout all figures. All proteins have been identified either by N-terminal sequencing or mass spectroscopy.

No	Identified protein	MW (kDa)	pI	Function
1	EF-Tu	43	5.3	elongation factor Tu; performs GTP-dependent binding of aminoacyl-tRNA to ribosomes
2	EF-Ts	31	5.1	elongation factor Ts; promotes liberation of GDP from EF-Tu
3	DnaK	69	4.8	molecular chaperone and extrinsic factor in ribosome assembly
4	RP-S1	67	4.9	ribosomal protein S1; facilitates translation initiation by binding of mRNA
5	RP-L9	16	6.2	ribosomal protein L9; binds ribosomal 23S rRNA
6	RP-L10	17	9.0	ribosomal protein L10; part of the large ribosomal subunit
7	GroEL	57	4.9	molecular chaperone; folding, degradation and conformational maintenance

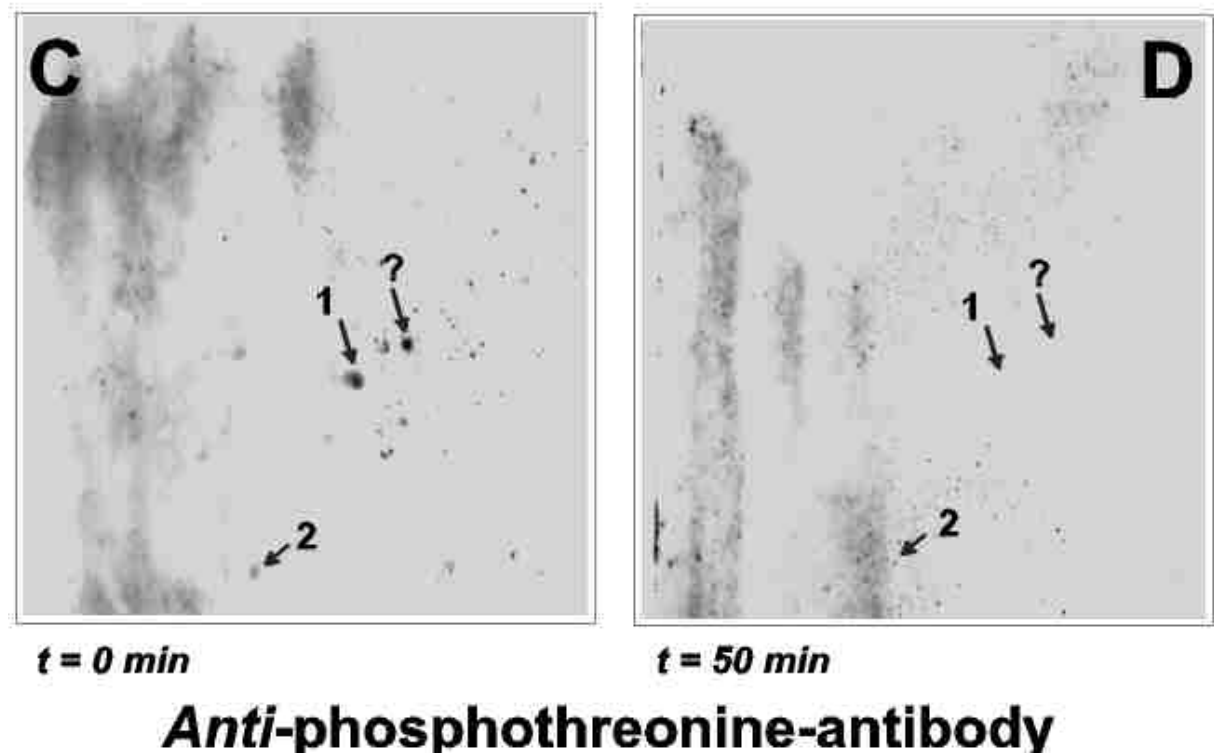
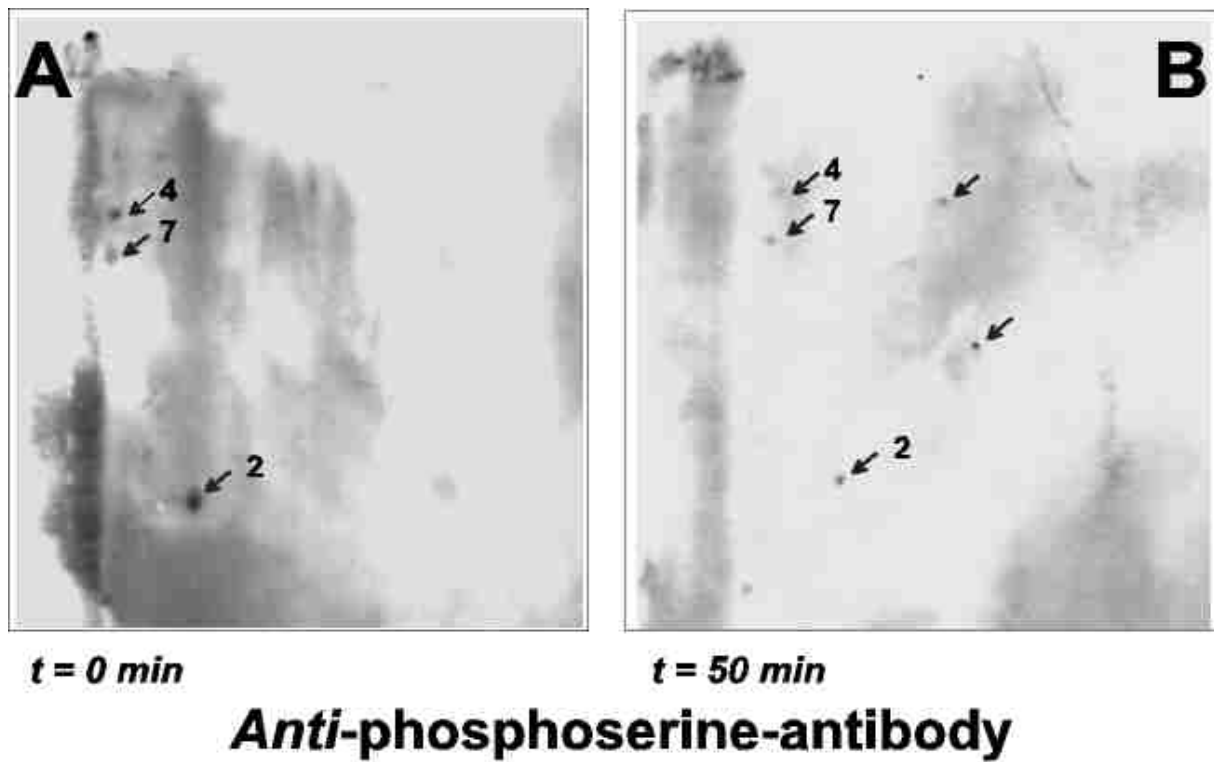


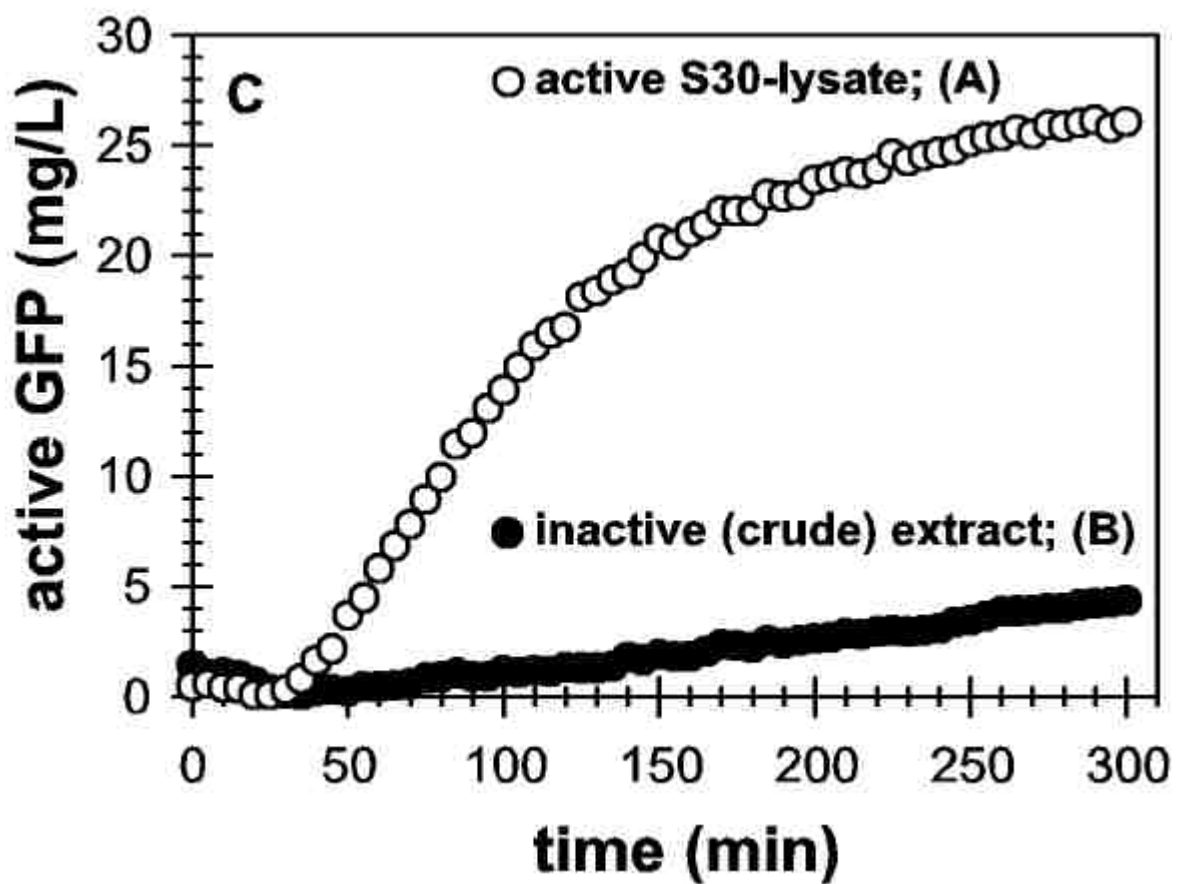
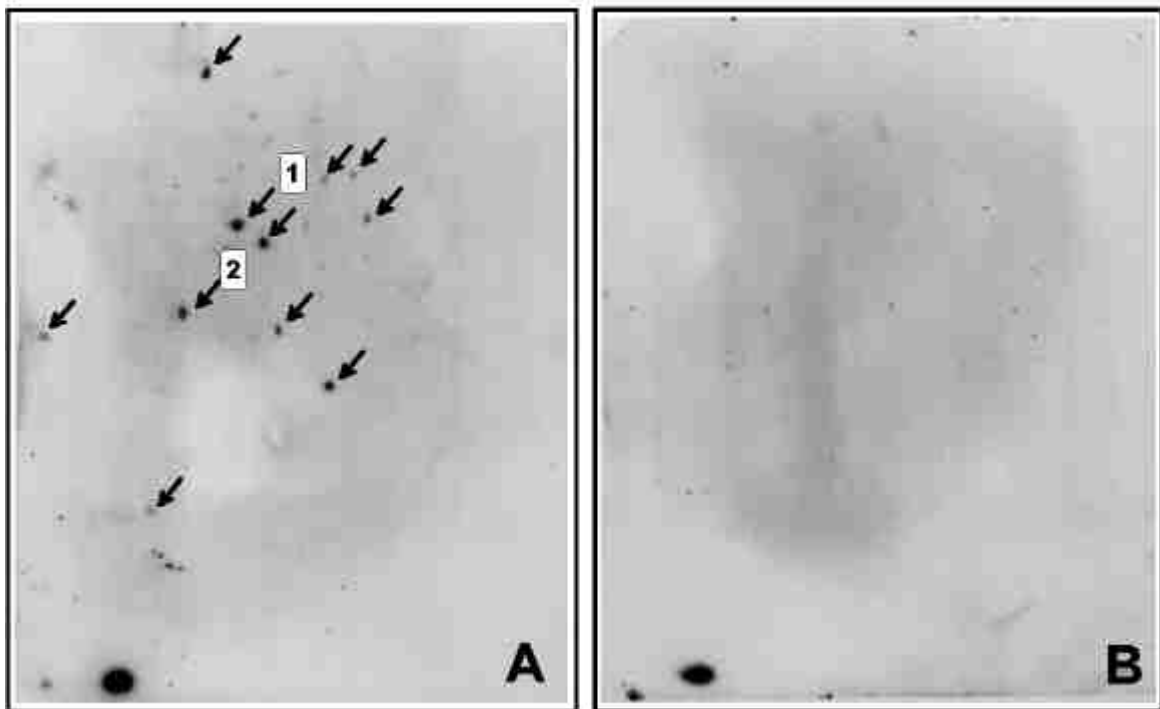
Figure 3

Figure 3

X-ray films of immuno-blotted 2DE-gels stained with monoclonal antibodies against phosphorylated serine (A and B) and threonine (C and D) residues. Signals of phosphorylated proteins were detected by chemoluminescence. The samples for blot A and C were taken from the cell-free protein biosynthesis system at process start ($t= 0 \text{ min}$) while samples for blot B and D were taken after 50 minutes of reaction time, when protein synthesis had virtually stopped.

A: Detected phosphoserine proteins at 0 min: elongation factor Ts (2), GroEL-chaperonin (7) and ribosomal protein S1 (4), and ribosomal protein L9 (5), (data not shown). **B:** Detected phosphoserine proteins at 50 min: (2), (5) and (7) remained (partially) phosphorylated, whereas the signal for phosphorylation of the ribosomal protein S1 (4) had disappeared. Two new signals appeared at 66 kDa and 45 kDa, which are most probably fragments of the 70 kDa sigma factor.

C: Detected phosphothreonine proteins at 0 min: elongation factor EF-Ts (2), elongation factor Tu (1), ribosomal protein L10 (6) (data not shown) and the supposed 45 kDa fragment of the sigma factor. **D:** Detected phosphothreonine proteins at 50 min: none of the initial signals displayed in Figure 3 C could be retrieved here.

phosphothreonine-residues

Determination of protein phosphorylation state of a translationally active S30 lysate (A) and inactive crude extract (B). (C) Time course of in vitro synthesised GFP for translationally active S30 lysate (empty circles) and inactive crude extract (filled circles). Both extracts were received from one (identical) lysate preparation procedure. Recovery of translational activity was gained from a standard preincubation procedure according to Pratt [5]. Only in the case of the translationally active S30 lysate (A), significant protein phosphorylations were detected on threonine residues (A), whereas the inactive crude extract (B) appeared to be unphosphorylated (B). (1) EF-Tu, (2) EF-Ts, arrows indicate non-identified phosphorylated proteins.

References

- [1] Cornish, V.W. & Schultz, P.G. (1995) Site-directed mutagenesis with an expanded genetic code *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 435-462.
- [2] Spirin, A.S. (1990) Title. In *Frontiers in Bioprocessing II* (Todd, P., Sikdar, S.K. & Bier, M., eds), pp. 31-43. American Chemical Society, Washington DC, Boulder, Colorado.
- [3] Jermutus, L., Ryabova, L.A. & Pluckthun, A. (1998) Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**, 534-548.
- [4] Zubay, G. (1974) In vitro synthesis of protein in microbial system. *Annu. Rev. Genet.*, **7**, 267-287.
- [5] Pratt, J.M. (1984) Coupled transcription translation in prokaryotic cell-free systems. In *Transcription and Translation. A Practical Approach*. (Hames B.D. & Higgins S.J, eds), pp. 179-209. RL Press, Oxford.
- [6] Ryabova, L.A., Morozov, I.Y. & Spirin, A.S (1998) Continuous-Flow Cell-Free Translation, Transcription-Translation and Replication-Translation Systems. In *Protein Synthesis: Methods and Protocols*. (Martin, R., ed.), pp. 179-193. Human Press, Towata, New Jersey.
- [7] Fuchs, U., Stiege, W. & Erdmann, V.A. (1997) Ribonucleolytic activities in the *Escherichia coli* in vitro translation system and in its separate components. *FEBS Lett.*, **414**, 362-364.

-
- [8] Ryabova, L.A., Vinokurov, L.M., Shekhovtsova, E.A., Alakhov, Y.B. & Spirin, A.S. (1995) Acetyl phosphate as an energy source for bacterial cell-free translation systems. *Anal. Biochem.*, **226**, 184-186.
- [9] Baranov, V.I. & Spirin, A.S. (1993) Gene expression in cell-free systems on preparative scale. *Methods Enzymol.*, **217**, 123-142.
- [10] Kawarasaki, Y., Nakano, H. & Yamane, T. (1998) Phosphatase-immunodepleted cell-free protein synthesis system. *J. Biotechnol.*, **61**, 199-208.
- [11] Shen, X.-C., Yao, S.-L., Terada, S., Nagamune, T. & Suzuki, E. (1998) Protein productivity of cell-free translation was improved removing phosphatase from wheat germ extract with immunoprecipitation. *Biochem. Eng. J.*, **2**, 23-28
- [12] Kim, D.-M., Kigawa, T., Choi, C.-Y. & Yokoyama, S. (1996) A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **239**, 881-886.
- [13] Kim, D.-M. & Choi, C.-Y. (1996) A semi-continuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnol. Prog.*, **12**, 645-649.
- [14] Kim, D.M., & Swartz, J.R. (1999) Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol. Bioeng.*, **66**, 180-188.
- [15] Patnaik, R. & Swartz, J.R. (1998) *E. coli*-based in vitro Transcription/Translation: In vivo-specific synthesis rates and high yields in a batch system. *BioTechniques*, **24**, 862-868.
- [16] Nakano, H., Shinbata, T., Okumara, R., Sekiguchi, S., Fujishiro, M. & Yamane, T. (1999) Efficient Coupled Transcription/Translation from PCR Template by a Hollow-Fiber Membrane Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 194-199.
- [17] Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y. & Alkhov, Y.B. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science*, **242**, 1162-1164.
- [18] Merrick, W.C. (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.*, **56**, 291-315.C
- [19] Alexander, C., Bilgin, N., Lindschau, C., Mesters, J. R., Kraal, B., Hilgenfeld, R., Erdmann, V. A., Lippmann, C. (1995) Phosphorylation of elongation factor Tu prevents ternary complex formation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14541-14547.
- [20] Lippmann, C., Lindschau, C., Vijgenboom, E., Schroder, W., Bosch, L., Erdmann, V. A. (1993) Prokaryotic elongation factor Tu is phosphorylated in vivo. *J. Biol. Chem.*, **268**, 601-607.
- [21] Schindler, P.T., Macherhammer, F., Arnold, S., Reuss, M. & Siemann, M. (1999) Investigation of translation dynamics under cell-free protein biosynthesis conditions

- using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J. Electrophoresis*, **20**, 806-812.
- [22] Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- [23] Merk, H., Stiege, W., Tsumoto, K., Kumagai, I. & Erdmann, V.A. (1999) Cell-free expression of two single-chain monoclonal antibodies against lysozyme: effect of domain arrangement on the expression. *J. Biochem (Tokyo)*, **125**, 328-233.
- [24] Katanaev, V.L., Spirin, A.S., Reuss, M., & Siemann, M. (1996) Formation of bacteriophage MS2 infectious units in a cell-free translation system. *FEBS Lett.*, **397**, 143-148.
- [25] Mailinger, W., Baumeister, A., Reuss, M. & Rizzi, M. (1998) Rapid and highly automated determination of adenine and pyridine nucleotides in extracts of *Saccharomyces cerevisiae* using a micro robotic sample preparation-HPLC system. *J. Biotechnol.*, **63**, 155-157.
- [26] Lipmann, F. & Tuttle, L.C. (1945) A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-28.
- [27] Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J. & Terwilliger, T. (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnol.*, **17**, 691-695.
- [28] Spirin, A.S. (1990) *The Ribosome: Structure Function and Evolution*. (Hill, E.H., Dahlberg, A., Garott, R.A., Moore, .B., Schlessinger, D. & Marner, J.R., eds). American Society of Microbiology, Washington, DC.
- [29] Hucui, J.A., Henshaw, E.C. & Young, D.A. (1985) Nucleoside diphosphate regulation of overall rates of protein biosynthesis acting on the level of initiation. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15585-15591.
- [30] Felipo, V. & Grisolia, S. (1987) 5`-adenosin monophosphate inhibits ternary complex formation by rat liver eIF. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **146**, 1079-1083.
- [31] Kitaoka, Y., Nishimura, N. & Niwano, M. (1996) Cooperativity of stabilized mRNA and enhanced translational activity in the cell-free system. *J. Biotechnol.*, **48**, 1-8.
- [32] Jacques, N. & Dreyfus, M. (1990) Translation initiation in *Escherichia coli*: old and new questions *Mol. Microbiol.*, **4**, 1063-1067.
- [33] Neidhardt. F.C. (1996) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. American Society of Microbiology, Washington, DC.
- [34] Sherman, M. & Goldberg, A.L. (1992) Heat shock in *Escherichia coli* alters the protein-binding properties of the chaperonin GroEL by inducing its phosphorylation. *Nature*, **357**, 167-169.

- [35] Freestone, P., Grant, S., Toth, I. & Norris, V. (1995) Identification of phosphoproteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **15**, 573-580.
- [36] Munoz-Dorado, J., Inouye, S. & Inouye, M. (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell*, **67**, 995-1006.
- [37] Kudlicki, W., Coffman, A., Kramer, G. & Hardesty, B. (1997) Renaturation of rhodanese by translational elongation factor (EF) Tu. Protein refolding by EF-Tu-flexing. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32206-32210.
- [38] Seeger, M., Osorio, G. & Jerez, C.A. (1996) Phosphorylation of GroEL, DnaK and other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. *FEMS Microbiol. Lett.*, **138**, 129-134.
- [39] Houry, W. A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Hartl, U. (1999) Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature*, **402**, 147-154.
- [40] Sherman, M.Y. & Goldberg, A.L. (1996) Involvement of molecular chaperones in intracellular protein breakdown. *Exs.*, **77**, 57-78.
- [41] Tsalkova, T., Zardeneta, G., Kudlicki, W., Kramer, G., Horowitz, P.M. & Hardesty, B. (1993) GroEL and GroES increase enzymatic activity of newly-synthesized rhodanese if present during in vitro transcription/translation. *Biochemistry*, **32**, 3377-3380.

Tagungsbeiträge

- **Use of High Resolution Two-Dimensional Gel-Electrophoresis as analytical tool for evaluation of in vitro protein biosynthesis.** Petra T. Schindler, F. Macherhammer, M. Siemann, M. Reuss. From Gene to Proteome, Siena 1998.
- **Quantitative comparison of equilibration methods in High Resolution Two-Dimensional Gel-Electrophoresis.** Petra T. Schindler, F. Macherhammer, M. Siemann, M. Reuss. ISPPP, Wien 1998.
- **From gene to protein: evaluation of cell-free protein biosynthesis by High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis.** Petra T. Schindler, S. Baumann, M. Siemann, M. Reuss. Dechema, Wiesbaden 1999.
- ***In vitro* coupled transcription/translation: effects of modification in lysate preparation on protein composition and biosynthesis activity.** Petra T. Schindler, S. Baumann, M. Siemann, M. Reuss. Electrophorese Forum, München 1999.
- **Two-Dimensional Gel Electrophoresis as analytical tool for the study of *in vivo* metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*.** F. Macherhammer, P.T. Schindler, M. Siemann, S. Vaseghi, M. Rizzi, M. Reuss. From Gene to Proteome, Siena 1998.
- **Metabolic engineering of cell-free protein biosynthesis: a basis for protein reactor design.** S. Arnold, S. Baumann, S. Knapp, K. Scharnweber, P. Schindler, J. Schmid, C. Thiele, M. Siemann, M. Reuss. Metabolic Engineering II, Elmau, 1998.
- **Application of Proteome Analysis for Identification of Bottlenecks during Cell-Free Protein Biosynthesis.** Petra T. Schindler, Sandra Baumann, Martin Siemann-Herzberg and Matthias Reuss. 4th International Congress on Biochemical Engineering, Stuttgart, 2000.