

Spezifische Bindung von Proteinen an Telomere

Praktikumsbericht
zum Praktikum
am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
in der Abteilung „Proteomics und Signaltransduktion“
vom 4. August bis zum 29. August 2008
von Charlott-Amélie Teutsch

I. Einleitung

Durch den Förderverein der Biologieolympiade e.V. hatte ich in diesem Sommer die Gelegenheit, vier Wochen in der Abteilung Proteomics und Signaltransduktion am Max-Planck-Institut für Biochemie bei München zu verbringen.

Die Arbeitsgruppe untersucht unter anderem Proteininteraktionen mit Hilfe von Massenspektrometrie unter Verwendung von SILAC (stable isotope labeling of amino acids in cell culture).

Während meines Praktikums beschäftigte ich mich mit spezifischen Bindungen zwischen Telomeren und Proteinen. Zur Untersuchung dieser Bindungen habe ich DNA-Pulldowns durchgeführt. Zunächst habe ich doppelsträngige DNA-Moleküle mit Telomerasequenz hergestellt, anschließend mit Proteinextrakt inkubiert und die bindenden Proteine wurden zuletzt mit Hilfe eines Massenspektrometers identifiziert.

II. Projektinformationen

Die Untersuchung der Interaktionen zwischen Telomeren und Proteinen lässt sich sowohl der Genetik als auch der Proteomik zuordnen.

Um den Inhalt des Projektes verständlich zu machen, möchte ich zunächst erklären, worum es sich bei Telomeren handelt und anschließend, worin das SILAC-Verfahren besteht.

Telomere

Die Enden linearer Chromosomen bestehen aus repetitiven Sequenzen von DNA, die als Telomere bezeichnet werden. Durch die Telomere wird die in der DNA gespeicherte Information geschützt. Bei jeder Zellteilung werden die Enden der DNA verkürzt, da die DNA-Polymerase den Folgestrang nicht mehr vollständig replizieren kann. Wegen der Telomere geht jedoch nur Länge verloren und nicht DNA mit wertvoller Information. Sobald die Telomere eine bestimmte Länge unterschritten haben, teilt sich die Zelle nicht mehr und verfällt entweder in einen Ruhezustand oder tritt in die Apoptose ein.

In manchen Zellen ist das Enzym Telomerase aktiv, das die Telomere wieder verlängert und somit mehr Zellteilungen ermöglicht. In höheren eukaryotischen Zellen ist das jedoch nur selten der Fall, zum Beispiel bei den meisten Tumorzellen.

SILAC

SILAC steht für Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture. Dafür werden zwei Zellkulturen parallel gehalten. Eine Kultur erhält normales Medium mit normalen, „leichten“ Aminosäuren, die andere erhält Medium mit „schweren“ Aminosäuren. Diese nicht-radioaktiven schweren Aminosäuren enthalten entweder ^2H statt H , ^{13}C statt ^{12}C oder ^{15}N statt ^{14}N .

Um sicher zu stellen, dass nur die gewünschten Aminosäuren in die Proteine eingebaut werden, werden vorzugsweise essentielle Aminosäuren ersetzt, die mit speziellen Proteasen geschnitten werden können, e.g. Lysin und Arginin durch Trypsin. Nach fünf Zellteilungen sind für gewöhnlich alle Aminosäuren durch die markierten ersetzt.

Der Einbau der schweren Aminosäuren in die Proteine führt zu einer bekannten Gewichtsveränderung im Vergleich zu den normalen Proteinen, wodurch später im Massenspektrometer erkennbar ist, von welcher Kultur welche Proteine stammten.

Nun können entweder die Proteine, die exprimiert wurden direkt verglichen werden, um Unterschiede zwischen den Zellkulturen festzustellen oder sie werden extrahiert und anderweitig verwendet, beispielsweise zur Untersuchung von spezifischen Bindungen.

Um die spezifische Proteinbindung an Telomere zu untersuchen, habe ich die Bindungsfähigkeit von Proteinen an Telomere im Vergleich zu einer geeigneten Kontroll-DNA analysiert. Dafür habe ich DNA-Pulldowns durchgeführt, bei denen die Telomere mit

dem schweren und die Kontroll-DNA mit dem leichten Proteinextrakt inkubiert wurde. Anschließend wurden die nicht gebundenen Proteine abgetrennt und beide Ansätze gemischt, da der Ursprung der Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert werden kann. Für die Bestimmung der Proteine im Massenspektrometer werden die Proteine mit spezifischen Proteasen gespalten, die Masse der Peptide wird auf ppm Genauigkeit bestimmt und anschließend die Peptide nochmals in die Aminosäuresequenz fragmentiert. Durch bioinformatische Methoden wird den Peptiden wieder ihr entsprechendes Protein zugeordnet.

Die Analyse im Massenspektrometer ergab dann für jedes Peptid ein Verhältnis zwischen leichten und schweren Variante, die mit der Proteinmenge korreliert werden kann, welche der Bindung an beliebige DNA und Bindung an Telomere beschreibt. Anhand dieses Verhältnisses kann die Spezifität der Bindung beurteilt werden.

III. Material und Methoden

1. Anlagerung

Für den Versuch müssen zunächst die Telomere und die normalen DNA-Stränge hergestellt werden. Dafür werden jeweils 25µg des Vorwärts- und des Rückwärtsstrangs zu 5µl Pufferlösung (200mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 1M KCl) gegeben und auf 50µl mit Wasser aufgefüllt. Das Gemisch wird anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt und dann wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

2. Phosphorylierung und Polymerisation

Bevor die Oligonukleotide polymerisiert werden können, müssen sie phosphoryliert werden. Dafür gibt man zu den 50µl Nukleotiden 20µl Ligasepuffer, 5µl 100mM ATP, 5µl T4 Kinase, 5µl PEG 6000, 1µl DTT und 15µl Wasser und inkubiert bei 37°C für zwei Stunden. Danach gibt man 2µl T4 Ligase und 2µl 100mM ATP dazu und lässt die Oligonukleotide aneinander binden.

3. Chloroform-Phenol-Extraktion

Um die Lösung von den Enzymen und anderen nicht erwünschten Stoffen zu befreien wird die DNA extrahiert. Hierzu wird das bereits vorhandene Volumen mit Wasser verdoppelt und 100µl eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 zugegeben und anschließend zentrifugiert.

Die wässrige Phase wird in ein neues Röhrchen überführt und 250µl Ethanol werden hinzugegeben.

Bei -20°C wird die DNA zunächst ausgefällt, durch das anschließende Zentrifugieren bei 13 000rpm und 4°C bildet sich ein Pellet. Dieses wird mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann in 37µl Wasser resuspendiert.

4. Biotinylierung

Für den weiteren Verlauf des Versuchs müssen die DNA-Stränge biotinyliert werden. Zu der extrahierten DNA werden hierfür 5µl 0,4 M Bio-14-dATP, 6µl DNA Polymerase und 5µl Polymerasepuffer gegeben und das Gemisch über Nacht bei 37°C inkubiert.

Danach werden die Oligonukleotide in einer Sephadex G-50 Säule aufgereinigt, indem man sie für 1 min bei 2000rpm zentrifugiert.

5. Koppelung an Streptavidin

Zunächst werden 2 mal 50µl Streptavidin-Dynabeads dreimal mit WB1000 (1M NaCl, 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0,1% NP-40) gewaschen. Zu 50µl der biotinylierten Oligonukleotide werden 150µl WB1300 gegeben.

Danach werden die Oligonukleotide an die Kügelchen gekoppelt, indem man sie zueinander gibt und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur im Rotationsrad drehen lässt. Nach der halben Stunde werden die Nukleotide einmal mit WB1000 und zweimal mit PBB gewaschen.

Proteinextrakt (schwer und leicht) wird mit PBB auf 400 μ l verdünnt und zu den entsprechenden immobilisierten Nukleotiden gegeben.

Das Gemisch wird 2h bei 4°C in einem Rotationsrad inkubiert, damit die Proteine an die Nukleotide binden können, und dann viermal mit jeweils 1ml PBB gewaschen.

Anschließend werden die Ansätze vereinigt und mit 30 μ l Laemmli-Puffer versetzt.

Die Nukleotide werden zentrifugiert und für 10min bei 70°C und 1400rpm im Schüttler inkubiert.

Der Überstand wird auf ein 4-12%iges PAA-Gradienten Gel mit MOPS-Puffer geladen und das Gel bei 200V für etwa 45min laufen gelassen.

Anschließend färbt man das Gel mit Comassie (Abb. 1) und entfärbt es danach wieder mit Wasser über Nacht.

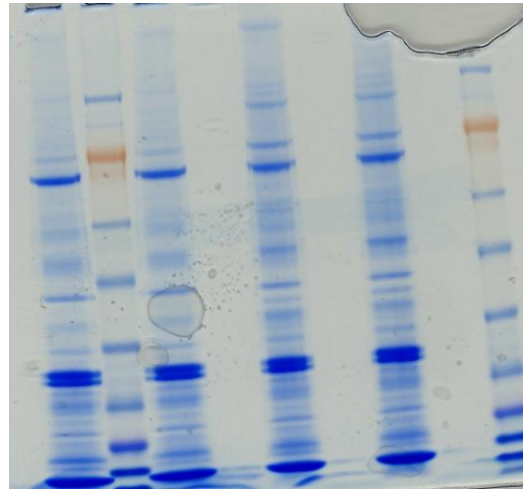


Abb.1 Mit Comassie gefärbtes Gel

6. In-Gel Proteinverdau

Zunächst werden einige Lösungen hergestellt.

- Verdauungspuffer: 50mM Ammoniumbicarbonat (ABC) in Wasser
- Entfärbepuffer: gleiche Teile Verdauungspuffer und 100%igen Ethanol
- Reduktionspuffer: 100 μ l 1M DTT in 9,9ml Verdauungspuffer
- Alkylierungspuffer: 102 μ g Iodoacetamid in 10ml Verdauungspuffer
- Trypsinlösung: 12,5ng/ μ l Trypsin in 50mM ABC, bei -20°C lagern
- Extraktionslösung: 300 μ l Trifluoressigsäure, 3ml Acetonitril in 6,7ml Wasser

Das Gel wird auf einer sauberen Glasplatte mit Wasser abgespült. Die Banden, die untersucht werden sollen, werden herausgetrennt, in kleine Stückchen geschnitten und auf Mikrozentrifugenröhrchen („Eppis“) verteilt. Die Gelstückchen werden so oft mit Entfärbepuffer (ca. 1ml) für 25min gewaschen, bis sie farblos sind. Anschließend werden sie mit Acetonitril für 10min dehydriert und 5min im SpeedVac getrocknet.

Danach werden die Gelstückchen bei 56°C für eine Stunde in Reduktionspuffer rehydriert, um sie anschließend 45min im Dunkeln bei 25°C in jeweils 150 μ l Alkylierungspuffer zu inkubieren.

Dann werden die Gelstückchen mit Verdauungspuffer 20min gewaschen und darauf zweimal mit Acetonitril (ca. drei- bis vierfache Menge des vorhandenen Volumens) getrocknet.

Die Gelstückchen werden danach mit Verdauungspuffer 20min gewaschen und wieder zweimal mit Acetonitril für jeweils 10min getrocknet.

Anschließend werden die Proben im SpeedVac getrocknet bis sie beginnen im Röhrchen zu springen.

Bei 37°C werden die Stückchen für ca. 20min in Trypsinlösung rehydriert und dann nochmals so viel dazu gegeben, dass die Gelstücke völlig überdeckt sind und über Nacht bei 37°C inkubiert werden können.

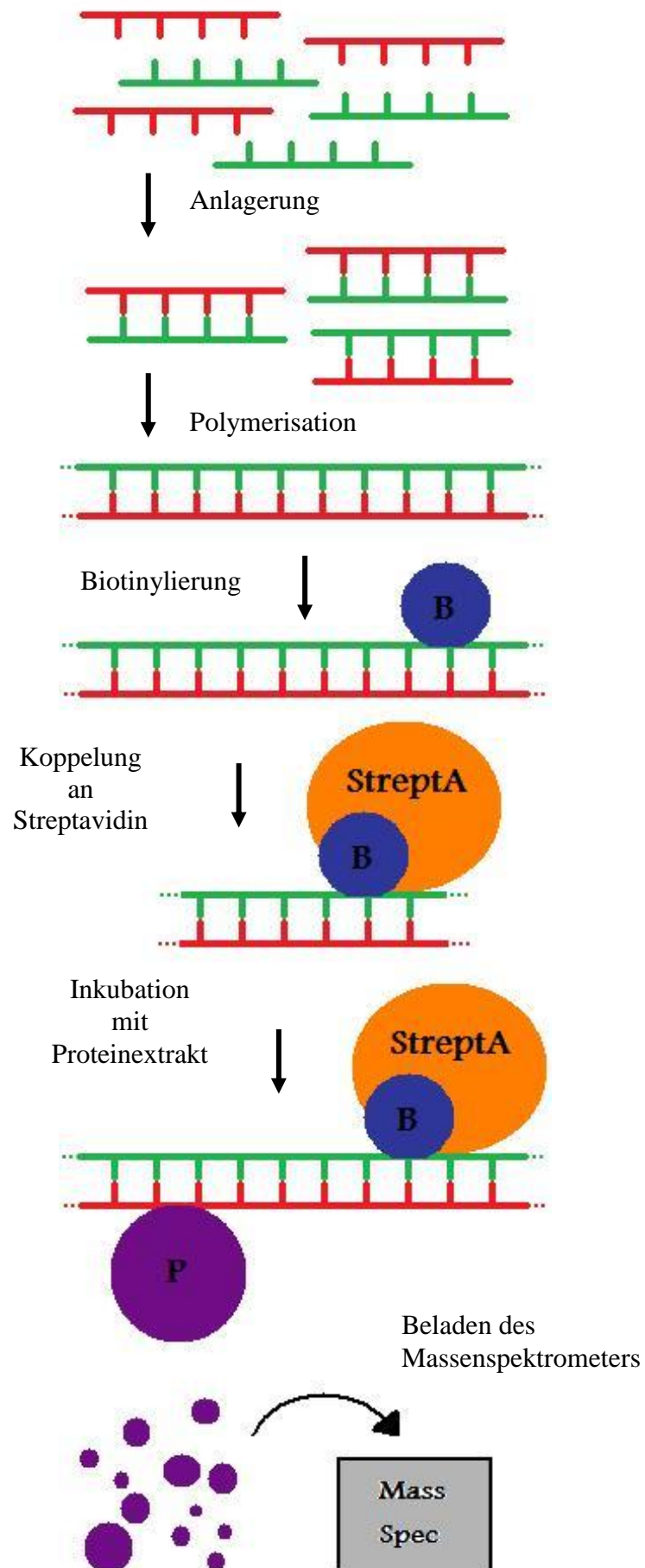
Am nächsten Tag extrahiert man die Peptide zweimal mit Extraktionspuffer (gleiches Volumen wie bereits vorhanden dazugeben) für jeweils 15min unter starkem Schütteln. Der Überstand wird nach jedem Schritt entnommen und zusammengeschüttet.

Danach dehydriert man die Gelstücke zweimal mit Acetonitril (ebenfalls mit gleichem Volumen) für 10min und gibt den Überstand zu dem aus dem vorigen Schritt. Die Peptid-Enthaltenden Proben werden anschließend im SpeedVac bis auf 10-20% des Ursprungsvolumens eingetrocknet und dann mit ca. 40% des vorhandenen Volumens an 2%iger Trifluoressigsäure reaktiviert. Zuletzt werden die Proben bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert, um übrige Gelstücke zu pelletieren, und dann auf StageTips geladen.

7. Messung im Massenspektrometer

Der letzte Teil des Versuchs besteht in der Messung der Proteine im Massenspektrometer, um die gebundenen Proteine zu identifizieren und das Verhältnis zwischen der Bindung an gewöhnliche DNA und an Telomere zu bestimmen, um Aussagen über die Spezifität der Bindung machen zu können. Hierfür wurde ein LTQ-Orbitrap Hybridmassenspektrometer verwendet.

8. Übersicht



IV. Versuchsergebnisse

In den vier Wochen konnte ich den Versuch zweimal machen. Zunächst führte ich ihn nur „vorwärts“, also mit schweren Proteinen für die Telomere und leichten für die normale DNA, durch. Beim zweiten Versuch wurde dann parallel „vorwärts“ und „rückwärts“ getestet. Mit Hilfe eines Computerprogramms konnten die Daten des Massenspektrometers ausgewertet werden und man erhielt konkrete Werte, wie spezifisch Proteine an die Telomere bzw. die normale DNA gebunden haben.

Im Folgenden zeige ich, um die Tabelle übersichtlich zu halten, nur die Verhältnisse, die bei den jeweiligen Proteinen erreicht wurden und ihren Rang, da andere Proteine spezifischer zu binden scheinen, bei denen es sich jedoch um Verunreinigungen handelte.

Versuch I:

Rang	Name des Proteins	Wert
39	POT1	7,915
63	TERF 2- Interacting Protein	5,966
79	TERF 2	4,598
92	TERF 1	3,523
98	TERF 2	2,949

Versuch 2:

Rang	Name des Proteins	„vorwärts“ Wert	„rückwärts“ Wert
18	TERF 2	10,579	0,0264
88	TERF 2- Interacting Protein	5,557	0,2595
140	TERF 1	4,087	0,045

V. Diskussion

Da im ersten Versuch das Experiment nur vorwärts durchgeführt wurde, kann man anhand der erhaltenen Werte nicht beurteilen, bei welchen Proteinen es sich um Verunreinigungen handelt und bei welchen wirklich um spezifisch bindende Proteine. Somit ist die erste Tabelle nur begrenzt aussagekräftig.

Beim zweiten Versuch kann man jedoch feststellen, bei welchen Proteinen es sich um spezifisch bindende handelt, da diese im Vorwärts-Experiment einen hohen und im Rückwärts-Experiment dann einen entsprechend niedrigen Wert erreichen.

In der Tabelle habe ich nur die Proteine gezeigt, die eindeutig spezifisch binden und bei denen dieses Verhalten auch zu erklären ist, denn auch beim parallelen Testen gab es Proteine, die ihren erhaltenen Werten nach eigentlich spezifisch binden müssten, bei denen es aber sehr unwahrscheinlich ist, da sie in ihrer gewöhnlichen Funktion für Telomere eigentlich keine Bedeutung haben können.

Bezogen auf die anfängliche Fragestellung, welche Proteine spezifisch an Telomere binden, haben die Versuche gezeigt, dass die TERF Proteine aussagekräftige Ergebnisse liefern, auf Grund derer man davon ausgehen kann, dass es sich bei ihnen um spezifisch an Telomere bindende Proteine handelt.

VI. Rückblick

Durch das Praktikum konnte ich einen Einblick in den Forscheralltag und eine gewisse Routine in der Laborarbeit gewinnen, die mir für die Zukunft sowohl im Studium als auch später im Beruf sicherlich helfen wird.

Neben der Arbeit im normalen Labor hatte ich die Möglichkeit in der Zellkultur zu arbeiten, was mich sehr gefreut hat, da ich zwar schon mehrfach in molekularbiologischen Labors tätig war, mir aber in der Zellkultur noch viel Übung fehlte.

Während der gesamten Zeit im Institut waren alle Mitarbeiter immer sehr freundlich, hilfsbereit und für alle Fragen offen.

Dafür möchte ich mich nochmals bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken, besonders bei meinem Betreuer Falk Butter und bei Christian Eberl, der diese Aufgabe für eine Woche übernommen hat.

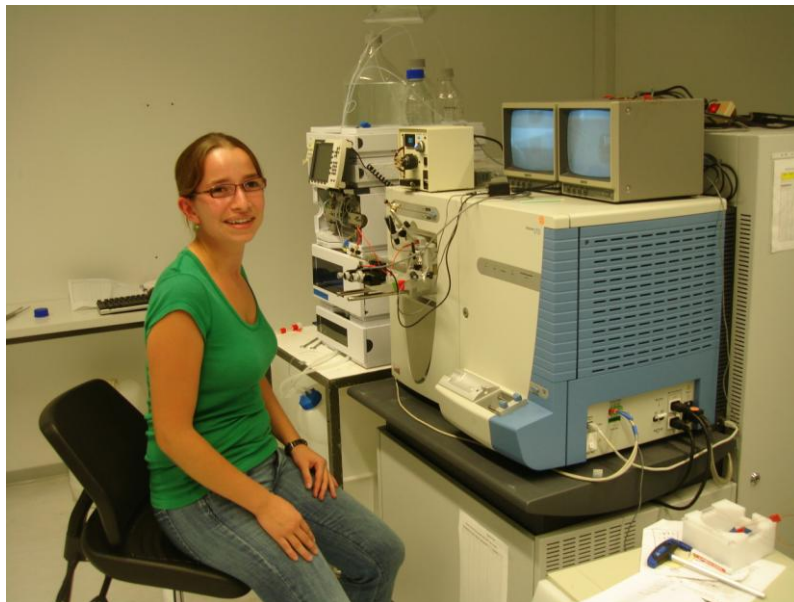
Bedanken möchte ich mich auch beim Förderverein der Biologieolympiade e.V., der dieses Praktikum möglich gemacht hat.

VII. Literatur

Mann, M. (2006), *Functional and quantitative proteomics using SILAC*, Nature Reviews Mol. Cell Biol. **7**: 952-958

Raynaud, C. M. et al. (2008), *Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process*, Critical Reviews in Oncology/Hematology **66**: 99-117

VIII. Anhang



Das Massenspektrometer und ich