

Institut für Organische Chemie und Biochemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

RNA-Struktur-Determinanten
zur erfolgreichen heterologen Proteinexpression
in vitro und in *Escherichia coli*

Michael Paulus

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 04.12.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 26.02.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Zentrales Dogma der Molekularbiologie	1
1.2. Transkription	2
1.3. Bakterielle Translation	4
1.3.1. Überblick der Translation.....	4
1.3.2. Aufbau der Ribosomen.....	4
1.3.3. Aminoacylierung der Transfer-Ribonukleinsäuren.....	5
1.3.4. Positionierung der mRNA im Ribosom	6
1.3.5. Ablauf der Translation	7
1.3.5.1. Initiation	7
1.3.5.2. Elongation.....	10
1.3.5.3. Termination.....	11
1.4. Ausbildung von RNA-Strukturen.....	12
1.5. Abbau von RNA-Molekülen in <i>Escherichia coli</i>	15
1.5.1. Überblick über die RNA-Degradation	15
1.5.2. Enzyme des RNA-Abbaus und das Degradasom.....	16
1.5.2.1. Enzyme des RNA-Abbaus und deren Funktionsweisen.....	16
1.5.2.2. Das <i>E. coli</i> Degradasom	19
1.6. Proteinexpression <i>in vitro</i>	20
1.7. Zielsetzung der Arbeit	23
2. Material.....	26
2.1. Chemikalien	26
2.2. Enzyme.....	27
2.3. Standards und Kits	27
2.4. Material für Elektrophorese und Western Blot	27
2.5. Geräte und sonstige Materialien.....	27
2.6. Biologische Materialien	29
2.7. Oligodesoxynukleotide.....	29
2.8. Puffer und Medien.....	31
2.9. Programme	31
3. Methoden	32
3.1. Methoden zur Nukleinsäure-Aufreinigung und -Analytik	32
3.1.1. Phenol-Extraktion von Nukleinsäuren	32

3.1.2.	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren.....	32
3.1.3.	Adsorption von Nukleinsäuren an Silicamembranen.....	32
3.1.4.	Reinigung der RNA mit Sephadex G-50-Zentrifugationssäulen	33
3.1.5.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
3.2.	Elektrophoretische Methoden	35
3.2.1.	Native Agarosegelelektrophorese	36
3.2.2.	Polyacrylamidgelelektrophorese	37
3.2.2.1.	Polyacrylamidgelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	38
3.2.2.2.	Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen	39
3.2.2.3.	Western Transfer und His ₆ -Tag-Detektion	40
3.2.3.	Färbung von Nukleinsäurefragmenten bei/nach der Elektrophorese	40
3.2.3.1.	Färbung mit Ethidiumbromid.....	40
3.2.3.2.	Färbung von RNA mit SYBR Green II.....	41
3.3.	Zellanzucht von <i>Escherichia coli</i> Bakterien	41
3.4.	Präparation von Plasmid-DNA.....	42
3.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
3.5.1.	Zweistufige Amplifikation linearer Expressionskonstrukte.....	42
3.5.2.	Einstufige Amplifikation linearer Expressionskonstrukte	46
3.6.	DNA-Rekombination <i>in vitro</i>	46
3.6.1.	Ligation von PCR-Produkten in pBAD-TOPO-Plasmide.....	47
3.6.2.	Transformation in kompetente Top 10 <i>E. coli</i>	47
3.6.3.	Transformation in <i>E. coli</i> BL 21 pLysS	48
3.7.	Bakterielle Proteinexpression (<i>in vivo</i>)	48
3.8.	Proteinbiosynthese <i>in vitro</i>	49
3.9.	Transkription <i>in vitro</i>	49
3.10.	RNA-Strukturuntersuchung mit der RNase H	50
3.10.1.	RNA-Strukturuntersuchung des eingeführten RST.....	51
3.10.1.1.	Sequentielle Oligonukleotidhybridisierung	52
3.10.1.2.	Überlappende Oligonukleotidhybridisierung.....	52
3.10.2.	RNA-Strukturuntersuchung translationsinitiationsrelevanter Bereiche.....	53
3.11.	RNA-Stabilitätsuntersuchung.....	54
3.12.	Theoretische RNA-Strukturuntersuchung.....	54
4.	Ergebnisse	57
4.1.	Expressionsinitiation durch Einführen des RST	57
4.1.1.	Expressionsversuche (<i>in vitro</i>) mit linearen DNA-Konstrukten	57

4.1.1.1.	Zweistufige PCR-Amplifikation linearer Expressionskonstrukte	57
4.1.1.2.	Einstufige PCR-Amplifikation linearer Expressionskonstrukte.....	58
4.1.1.3.	Expressionsergebnisse linearer DNA-Konstrukte <i>in vitro</i>	59
4.1.1.4.	Expression mit und ohne RST.....	62
4.1.2.	Entkopplung von Transkription und Translation <i>in vitro</i>	65
4.1.3.	Expressionsversuche (<i>in vitro</i>) unter dem Aspekt der RNA-Struktur.....	68
4.1.3.1.	Expression mit verlängertem Stamm des verwendeten RST bei konstanter Stabilität....	68
4.1.3.2.	Expression mit variierender Stammlänge des RST ohne konstante Stabilität.....	69
4.2.	RNA-Strukturuntersuchungen.....	73
4.2.1.	Untersuchungen des eingeführten RST.....	73
4.2.1.1.	Sequentielle Oligonukleotidhybridisierung	73
4.2.1.2.	Überlappende Oligonukleotidhybridisierung.....	75
4.2.1.2.1.	mRNA des Gens 1049 mit RST-überlappender Oligonukleotidhybridisierung.....	76
4.2.1.2.2.	mRNA des Gens CIITA mit RST-überlappender Oligonukleotidhybridisierung ...	77
4.2.1.2.3.	Vergleich der RNase H-Spaltung bei Wildtyp und RST-Variante	78
4.2.2.	Strukturelle Auswirkungen durch Einführen des RST.....	82
4.2.2.1.	Auswirkungen des RST auf die mRNA-Struktur der Ribosomenbindestelle	82
4.2.2.2.	Auswirkungen des RST auf die mRNA-Struktur der Kodons +1 bis +6	85
4.2.3.	Theoretische RNA-Strukturuntersuchung.....	88
4.2.3.1.	RNA-Struktur des Initiationsbereichs	88
4.2.3.2.	Ausbildung des RST im Gen-Kontext.....	91
4.2.4.	mRNA-Stabilität im <i>in vitro</i> Expressionssystem	93
4.2.5.	Klonierung und Expression (<i>in vivo</i>) der linearen Expressionskonstrukte	95
4.2.5.1.	Klonierung und Verifizierung der linearen Expressionskonstrukte.....	95
4.2.5.2.	Zelluläre Expression (<i>in vivo</i>)	96
4.3.	Einfluss von Betain und Trehalose auf die <i>in vitro</i> Proteinexpression	98
4.3.1.	RNA-Strukturdestabilisierung durch Betain und Trehalose	98
4.3.1.1.	Destabilisierung einer inhibierenden RST-Struktur mit Betain und Trehalose.....	98
4.3.1.2.	Anwendung von Betain und Trehalose	101
5.	Diskussion	103
6.	Literaturverzeichnis.....	115
7.	Begriffsdefinitionen.....	123
8.	Abkürzungen.....	124

1. Einleitung

1.1. Zentrales Dogma der Molekularbiologie

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie (Abb. 1) beschreibt, wie die genetische Information des Genotyps vererbt wird, und wie sie beim Phänotyp zum Ausdruck gelangt.

In der DNA ist die genetische Information konserviert. Durch semikonservative Replikation der DNA und Aufteilung auf sich teilende Zellen wird der Genotyp vererbt.

Der erkennbare Ausdruck der Erbinformation beim Phänotyp erfolgt durch Expression der Gene. Die Gen-Expression umfasst auf dem Weg von der DNA zum Protein zwei Schritte, die Transkription der mRNA (1.2) und die Translation der Proteine (1.3). Bei der Transkription dient ein Strang der DNA als Matrize für die Synthese der komplementären Botenribonukleinsäure (messenger RNA; mRNA), die als Informationsüberträger fungiert. Im zweiten Schritt, der Translation, wird die genetische Information der mRNA in die entsprechende Proteinsequenz übersetzt. Im Translationsprodukt, dem korrekt gefaltete Protein, wird die genetische Information funktionell wirksam. Die Translation ist eine der kompliziertesten Abläufe in der Zelle. Bei ihr erfolgt der Übergang von der Nukleinsäureebene zur Proteinebene.

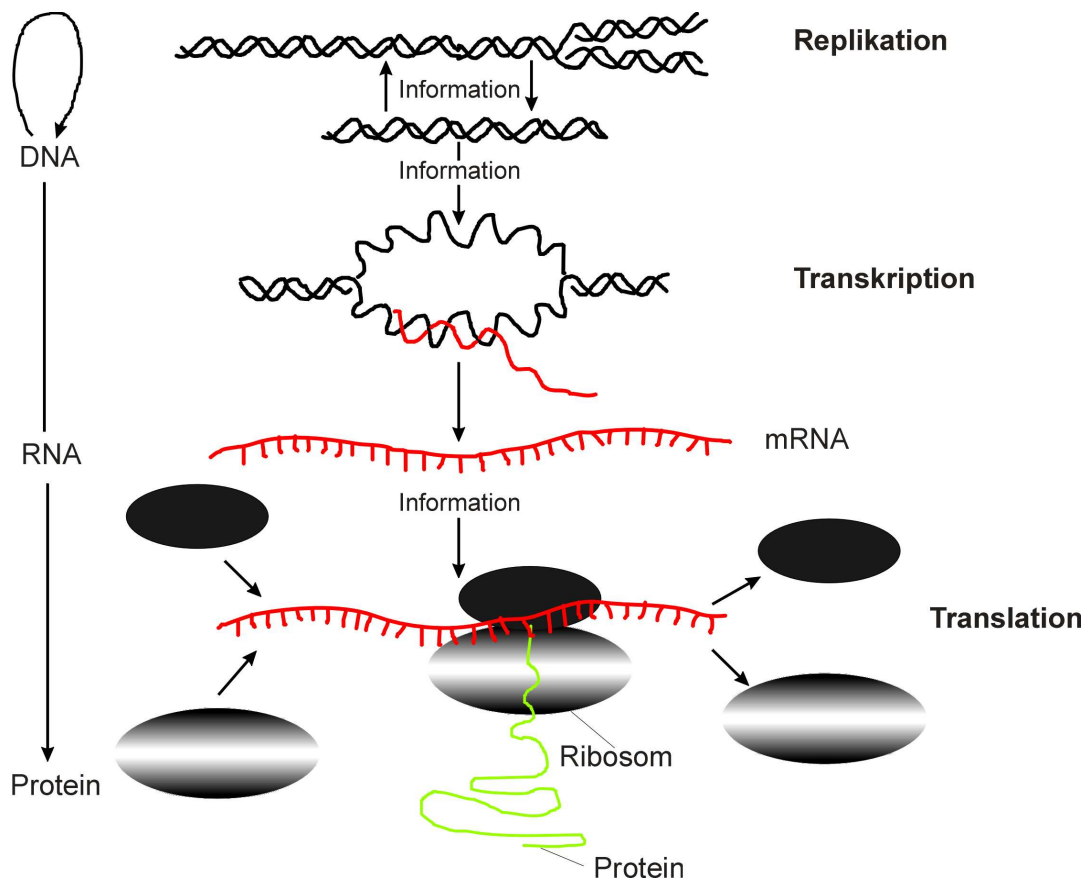


Abb. 1: Zentrales Dogma der Molekularbiologie

1.2. Transkription

Die Transkription der mRNA erfolgt durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase und wird in drei Phasen eingeteilt: Initiation, Elongation und Termination.

Für die mRNA-Synthese benötigt die RNA-Polymerase Magnesiumionen und Ribonukleosid-5'-Triphosphate als monomere Bausteine der mRNA.

Bezüglich ihres Aufbaus gibt es unterschiedliche RNA-Polymerasen. Die RNA-Polymerase von *E. coli* besteht beispielsweise aus 5 Kern-Untereinheiten ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) und einer sechsten Untereinheit σ . Die Untereinheit σ liegt an den 5 Kern-Untereinheiten gebunden vor und „dirigiert“ das Holo-Enzym zur Bindungsstelle auf der DNA, dem Promotor, der stromaufwärts von Strukturgenen liegt. Bakteriellen Promotoren haben (vom ersten Nukleotid der mRNA gesehen) in den Regionen -35 und -10 nt eine wichtige Konsensus-Sequenz, die von der Untereinheit σ erkannt wird. Außerdem kommt in stark exprimierten Genen ein zusätzliches AT-reiches Erkennungssegment zwischen -40 und -60 nt vor, das an die α Untereinheit der RNA-Polymerase bindet und das als „upstream Promotor“ (UP) bezeichnet wird. Die Stärke der Polymerasebindung, und damit die der Transkription, hängt von den Sequenzen und den Abständen der beschriebenen Regionen zueinander ab.

Am Promotor erfolgt die Initiation der Transkription, indem im ersten Schritt ein geschlossener Enzym/DNA-Komplex entsteht. Der geschlossene Komplex geht durch teilweise Entwindung der DNA in einen offenen Enzym/DNA-Komplex über. Es kommt zur Konformationsänderung des Komplexes, zum Wegbewegen von der Promotorstelle und zum Abspalten der Untereinheit σ . Damit hat die Elongationsphase begonnen, bei der der ternäre Komplex (Enzym, DNA und mRNA) auf der DNA entlang wandert und die Phosphodiesterbindungen der mRNA gebildet werden. Dabei katalysiert das Enzym die Verlängerung der mRNA in 5'-3'-Richtung, indem ein nukleophiler Angriff der 3'-Hydroxylgruppe auf das α -Phosphat des hinzukommenden Ribonukleosidphosphats erfolgt. Bei der Anlagerung des ersten Ribonukleosid-5'-Triphosphats werden die Phosphatgruppen nicht abgespalten, sondern bleiben am 5'-Ende der mRNA erhalten. Mit wachsender Kettenlänge wird die 5'-Seite der mRNA aus dem ternären Komplex freigesetzt, während die auf der 3'-Seite zuletzt synthetisierten 8 Ribonukleotide an der DNA hybridisiert bleiben.

Bei der Termination werden zwei unterschiedliche Mechanismen unterschieden. Die faktorunabhängige Termination erfolgt, indem eine GC-haltige 20 bis 25 Nukleotid lange palindromische Sequenz einen RNA-Stem-Loop ausbildet, dem eine kurze Ribouridin-Sequenz folgt. Hierbei enthält die DNA-Matrize (antiparalleler DNA Strang) komplementär zu Ribouridinnukleosiden, Desoxyadenosine. Die U-A-Paarung hat eine schwache Hybridisierungsenergie

und führt zusammen mit dem vorangestellten RNA-Stem-Loop zur Konformationsänderung des ternären Komplexes und zur Ablösung des Transkripts.

Als zweite Möglichkeit besteht die Rho-abhängige Termination, bei der sich ebenfalls in manchen Fällen ein RNA-Stem-Loop ausbildet, aber keine Ribouridin-Sequenz folgt. Das Rho-Protein bindet an einer Erkennungssequenz auf der mRNA und wandert auf ihr in 5'-3' Richtung entlang, bis es den ternären Komplex erreicht. Dort führt das Rho-Protein mit seiner ATP-abhängigen RNA-DNA-Helikaseaktivität zur Freisetzung des Transkripts.

Im Rahmen der Arbeit kam die T7-RNA-Polymerase zum Einsatz. Als eine der einfachsten RNA-Polymerasen besteht sie aus nur einer Untereinheit mit 838 Aminosäuren (98 kDa) (Moffatt *et al.*, 1984; Stahl und Zinn, 1981). Sie wurde erstmals 1968 aus *E. coli* Bakterien isoliert, die mit dem T7-Phagen infiziert waren. Dort transkribiert die RNA-Polymerase späte Phagen-Gene. Sie erkennt den T7-Promotor sehr spezifisch. Der Promotor ist in eine Bindungs- und Initiationsdomäne unterteilt (Abb. 2).

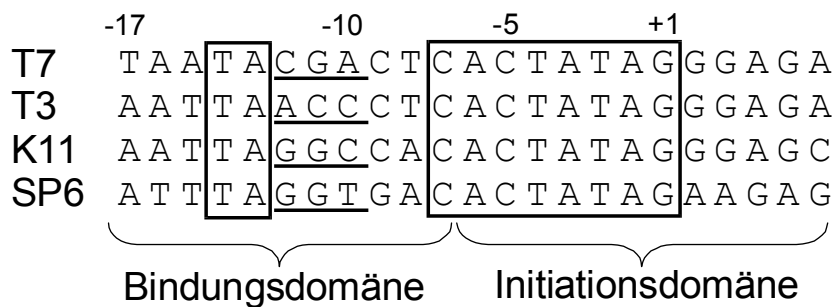


Abb. 2: **Konsensus Sequenzen einiger Klasse III Promotoren der Bakteriophagen T7, T3, K11 und SP6.** Die übereinstimmenden Sequenzen sind eingerahmt; Polymerasespezifische Triplets sind unterstrichen (Kochetkov *et al.*, 1998)

Bis die ersten 9 bis 12 Nukleotide synthetisiert werden liegt die T7-Polymerase in einer Konformation vor, bei der die Polymerase leichter wieder von der DNA abdissoziieren kann („abortive Konformation“). Ab einer RNA-Kettenlänge von 9 bis 12 Nukleotiden interagiert die austretende mRNA mit N-terminalen Domänen der T7-RNA-Polymerase, was zu Konformationsänderung des Enzyms und zum Übergang in den prozessiven Zustand führt. Bei der Elongation zeigt die T7-RNA-Polymerase eine sehr hohe Transkriptionsrate von 230 Nukleotiden pro Sekunde (Iost *et al.*, 1992; Kochetkov *et al.*, 1998).

Die Termination ist der umgekehrte Mechanismus der Initiation und kommt zustande, indem der RNA-Stem-Loop am Ende des Transkripts den Kontakt der austretenden mRNA zu N-terminalen Domänen der T7-RNA-Polymerase verringert und somit das Enzym wieder in die

„abortive“ Konformation mit der verringerten Affinität zur DNA übergeht (Kochetkov *et al.*, 1998).

Vergleicht man die hohe Transkriptionsrate der T7-Polymerase (230 nt/s) mit der Translationsgeschwindigkeit der Ribosomen von 7 bis 12 Kodons/s (21 bis 36 nt/s) (Iost *et al.*, 1992), dann wird im Mittel acht mal mehr Transkript synthetisiert als translatiert wird. Damit wird deutlich, dass unter Verwendung der T7-Polymerase die T7-Transkription von der Translation zeitlich entkoppelt ist.

1.3. Bakterielle Translation

1.3.1. Überblick der Translation

Bei der Translation wird der genetische Code der Boten-RNA (mRNA) in die lineare Aminosäuresequenz der Proteine umgesetzt. Sie ist damit der Übergang von der Nukleinsäure zum Protein und stellt eine der komplexesten Mechanismen der Proteinbiosynthese dar, die bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Ramakrishnan, 2002).

Die Translation findet an den Ribosomen statt. Dabei bestimmt die Sequenz der Nukleotidtriplets (Kodons) der mRNA die Aminosäuresequenz der Polypeptidkette. Die Identität der Aminosäure, die je Kodon an die wachsende Peptidkette angefügt wird, wird durch deren Kopplung an eine Adapterribonukleinsäure, der Transfer-RNA (tRNA), vermittelt. Als Vorstufe der Translation wird die Aminosäure über ihre Carboxylgruppe kovalent an das 3'-Ende der tRNA gebunden. Bei der Translation hybridisiert das Antikodon eines tRNA-Stem-Loops der Aminoacyl-tRNA spezifisch mit dem entsprechenden Kodon auf der mRNA und führt so die entsprechende Aminosäure in die katalytisch aktive Region der Ribosomen, wo dann die Aminosäure dem amino-terminalen Ende der wachsenden Polypeptidkette angefügt wird.

Während der Translation wird die mRNA in den Ribosomen geführt. Der gesamte Prozess der Translation erfordert die Bewegung der mRNA und der tRNAs „durch“ das Ribosom in Translationsrichtung und verläuft sehr schnell und mit hoher Genauigkeit (Green und Noller, 1997). Allgemein wird die Translation in drei Stadien eingeteilt: Initiation, Elongation und Termination.

1.3.2. Aufbau der Ribosomen

Das bakterielle Ribosom aus *E. coli* hat eine Masse von ca. 2.700 kDa, einen Durchmesser von 20 nm und einen Sedimentationskoeffizienten von 70 S. Es ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut, der 30S- und der 50S-Untereinheit. Die Proteine der Untereinheiten sind mit 3 ribosomalen RNA-Molekülen assoziiert, der 23S-, 16S- und der 5S-rRNA. Die 23S- und die

5S-rRNA sind mit den 34 Proteinen (L1-L34) der 50S-Untereinheit assoziiert, während die 16S-rRNA mit den 21 Proteinen (S1-S21) der 30S-Untereinheit assoziiert ist. Jede dieser rRNAs ist für die Architektur des Ribosoms essentiell und übernimmt bei der Translation wesentliche katalytische Aufgaben.

Die ribosomalen Untereinheiten besitzen 3 tRNA-Bindungsstellen: die Aminoacylbindungsstelle (A), welche die eintretende Aminoacyl-tRNA bindet; die Peptidylbindungsstelle (P), in der die tRNA mit der wachsenden Peptidkette gebunden vorliegt; die Ausgangsstelle (E), in der die deacylierte tRNA gebunden ist, bevor sie aus dem Ribosom freigesetzt wird. Die 30S-Untereinheit bindet die mRNA und den Antikodon-Stem-Loop der tRNA, während die 50S-Untereinheit den Akzeptorarm der tRNA bindet, und die Peptidbindung zwischen der eintretenden Aminosäure der A-Stelle und der Aminosäurekette der P-Stelle katalysiert. Beide Untereinheiten sind an der Translokation beteiligt.

1.3.3. Aminoacylierung der Transfer-Ribonukleinsäuren

Als Vorstufe der Translation werden die 20 Aminosäuren im Cytosol von den Aminoacyl-Synthetasen aktiviert. Die Ausbildung einer Peptidbindung ist thermodynamisch ungünstig. Deshalb ist das Ziel der Aktivierung zum einen, dass die Carboxylgruppe der Aminosäure aktiviert und damit die Ausbildung der Peptidbindung im Ribosom erleichtert wird, und zum anderen, dass die Verbindung zwischen Aminosäure und genetischer Information auf der mRNA über den spezifischen tRNA Adapter hergestellt wird. Jede Aminosäure wird von einer spezifischen Aminoacyl-Synthetase aktiviert.

Die Aktivierung durch die Synthetase erfolgt in zwei Reaktionsschritten. Im ersten Schritt reagiert die Carboxylgruppe der Aminosäure mit dem α -Phosphat des ATP und bildet ein 5'-Aminoacyladenylat (Aminoacyl-AMP) unter Abspaltung von Pyrophosphat aus.

Das Zwischenprodukt bleibt im aktiven Zentrum der Synthetase gebunden. Im zweiten Schritt der Aktivierung wird zwischen Carboxylgruppe und 5'- oder 3'-Hydroxylgruppe der Ribose am 3'-Ende der tRNA ein Aminosäureester unter Abspaltung von Monophosphat ausgebildet und somit die Aminoacyl-tRNA synthetisiert.

Die Aminoacyl-Synthetasen in *E. coli* werden anhand ihrer unterschiedlicher Strukturen und Reaktionsmechanismen in zwei Klassen eingeteilt. Sie erkennen sehr spezifisch die Aminosäure und die zugehörigen tRNAs. Aminoacyl-Synthetasen vermeiden durch Korrekturlesen die Aktivierung falscher Aminosäuren. Sie besitzen meist ein Synthese- und ein Hydrolyse-Zentrum. Ähnlich strukturierte Aminosäuren werden so doppelt überprüft, indem „zu große“ Aminosäuren nicht vom Synthese-Zentrum akzeptiert werden und „zu kleine“ fälschlich akti-

vierte Aminosäuren durch Hydrolyse wieder aus der Synthetase entfernt werden. Die tRNAs werden von den Synthetasen anhand ihrer unterschiedlichen Basensequenzen des Akzeptorstamms und des Anti-Kodon-Loops spezifisch erkannt.

1.3.4. Positionierung der mRNA im Ribosom

Anhand der Bindungsverhältnisse bei der Initiation wurde der Weg der mRNA durch das Ribosom röntgenkristallographisch untersucht (Yusupova *et al.*, 2001). Für den Weg der mRNA durch das Ribosom ist lediglich die 30S-Untereinheit relevant, da die mRNA die Lösungsseite dort verlässt und auch wieder in die Lösung austritt. Nur an der A- und der P-Stelle tritt die mRNA in Kontakt mit der Bindungsplattform zur 50S-Untereinheit (siehe Abb. 3, B), wo die zwei Kodons an der Elongation beteiligt sind (Culver, 2001; Yusupova *et al.*, 2001). Insgesamt ist die mRNA über ca. 30 Nukleotide in der 30S-Untereinheit gebunden (Abb. 3, A, C).

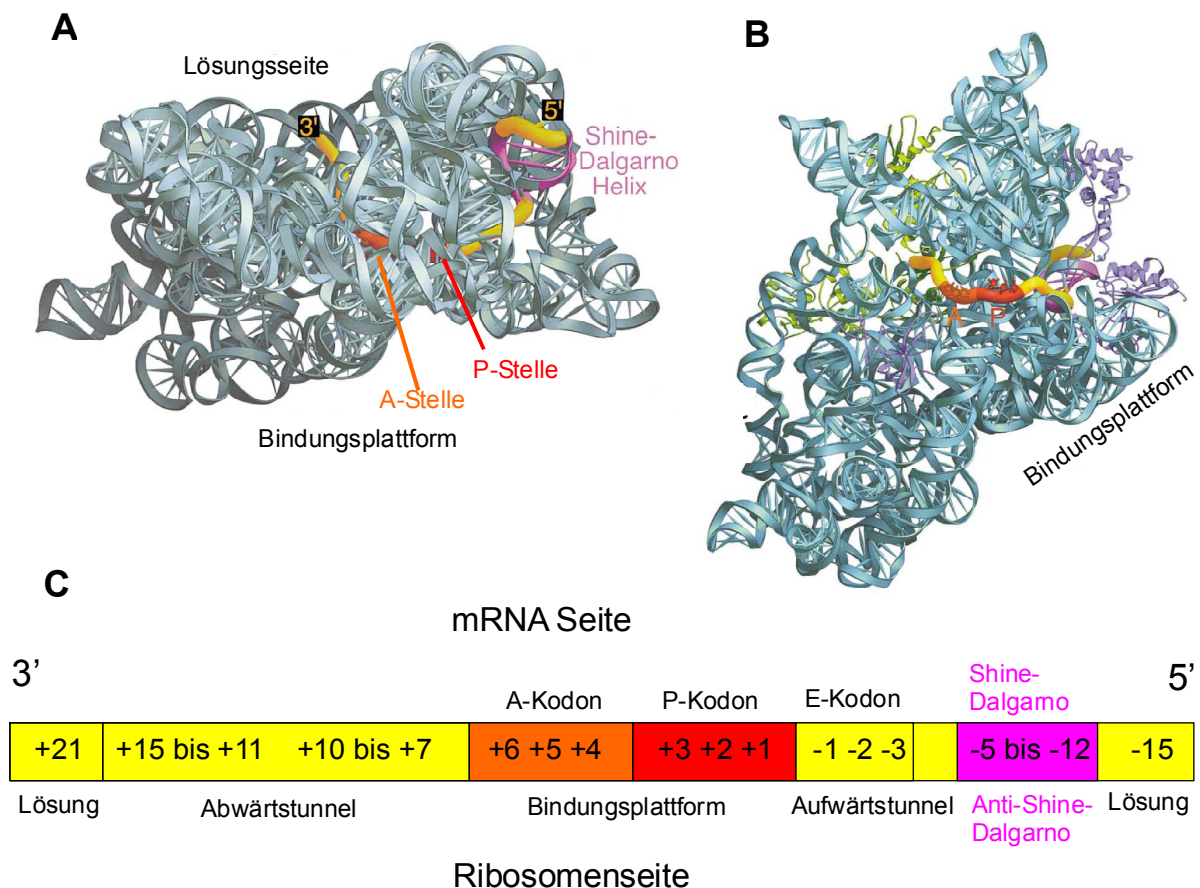


Abb. 3: mRNA in der 30S-Untereinheit (Culver, 2001). **A:** Strukturmodell der mRNA in der 30S-Untereinheit. Die mRNA ist von der 5'-Seite (-15) zur 3'-Seite (+15) in der 30S-Untereinheit dargestellt. Die P-Stelle (rot) und die A-Stelle (orange) der mRNA sind markiert. Violett ist die Paarung der SD-Sequenz mit der 16S-rRNA hervorgehoben. **B:** Andere Sicht von A. S 7 und S 11 sind dunkelblau. S 3, 4, 5 sind im Abwärtstunnel hellgrün dargestellt. **C:** Schematische Darstellung

lung des Initiationsbereichs der mRNA und deren Interaktionen mit dem Ribosom. Die Farben sind analog zu A.

Die SD-Sequenz interagiert nicht nur mit der Anti-SD-Sequenz der 16S-rRNA (Abb. 3, A). In der Umgebung der großen Furche der SD-Helix liegen N-terminale basische und aromatische Aminosäureseitenketten des ribosomalen Proteins S 18 (Yusupova *et al.*, 2001), die mit dem Zuckerphosphatrückgrat der mRNA interagieren. Außerdem ist S 11 mit N- und C-terminalen Domänen an Interaktionen mit der SD-Helix beteiligt (Culver, 2001; Yusupova *et al.*, 2001). Anschließend passiert die mRNA den Aufwärtstunnel (-1 bis -4), der aus S 7 und mehreren Hairpin-Loops der 16S-rRNA besteht und die E-Stelle (-1 bis -3) beinhaltet. Die A- und P-Stelle liegen relativ frei an der Bindungsplattform vor (Abb. 3, B). Nach ihr passiert die mRNA den relativ engen Abwärtstunnel (+7 bis +10), der aus mehreren Helices der 16S-rRNA besteht und der durch die Nukleotide C 1397 und U 1196 die mRNA an der A-Stelle positioniert. Anschließend ist die mRNA umgeben von den ribosomalen Proteinen S 3, 4, 5 (Abb. 3, B), die mit ihren basischen Aminosäureseitenketten mit dem Zuckerphosphatrückgrat interagieren und sie dadurch sequenzunabhängig positionieren. Es wird vermutet, dass S 3, 4, 5 in ihrer Anordnung um die mRNA RNA-Sekundärstrukturen beim Eintritt bei der Translation (+13 bis +15) entwinden. Dabei interagiert S 4 und/oder S 5 möglicherweise sequenzunabhängig mit einem RNA-Strang, während S 3 den mit dem Gegenstrang interagiert und bei der Translokation in einer Rotationsbewegung die Sekundärstrukturhelix physikalisch entwindet (Yusupova *et al.*, 2001).

1.3.5. Ablauf der Translation

1.3.5.1. Initiation

Die Strukturaufklärung des ternären Komplexes aus Ribosom, mRNA und Transfer-RNAs (Yusupova *et al.*, 2001) ermöglichte die Korrelation klassischer biochemischer Daten mit der Struktur des Komplexes zu unterschiedlichen Phasen der Translation (Ramakrishnan, 2002). Damit wurde ein weiterer Fortschritt zum Verständnis der Mechanismen der Translation geleistet.

Die Initiation teilt sich in drei Schritte auf. Im ersten Schritt bindet die 30S-Untereinheit des Ribosoms die beiden Initiationsfaktoren 1 und 3 (IF1, IF3). IF3 bindet an der Bindungsplattform zwischen 30S- und 50S-Untereinheit (vermutlich an der E-Stelle; siehe Abb. 4) und verhindert zum einen die Zusammenlagerung der 30S-Untereinheit mit der 50S-Untereinheit und begünstigt zum anderen die Anlagerung der Initiator-fMet-tRNA^{fMet}, indem IF 3 die Bindung von anderen Aminoacyl-tRNAs in die P-Stelle destabilisiert wird. IF 1 bindet an die A-Stelle

und verhindert dort die tRNA-Bindung und führt zu einer Konformationsänderung, die das Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation der Untereinheiten verschiebt (siehe Abb. 4) (Ramakrishnan, 2002). Die mRNA wird richtig positioniert, indem die auf der 5'-Seite des Start-Kodons gelegene Shine-Dalgarno-Sequenz (SD), bestehend aus 4 bis 9 Purinresten, mit der Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz am 3'-Ende der 16S-rRNA der 30S-Untereinheit hybridisiert. Im zweiten Schritt der Initiation kommt der Initiationsfaktor 2 (IF 2), der eine GTPaseaktivität besitzt, und die Initiator-fMet-tRNA^{fMet} zum Komplex hinzu (siehe Abb. 4). Dabei erhöht IF 1 die Affinität von IF 2 und der Initiator-fMet-tRNA^{fMet} zum Komplex. Da IF 2 das Aminoacyl-Ende der Initiator-fMet-tRNA^{fMet} und IF1 bindet, und die Initiator-fMet-tRNA^{fMet} über Watson-Crick-Basenpaarungen in der P-Stelle mit dem Start-Kodon verbunden ist, bildet IF 2 eine Brücke zwischen Initiator-fMet-tRNA^{fMet} und IF 1. Somit sind alle Bindungsstellen an der 30S-Untereinheit besetzt (Ramakrishnan, 2002).

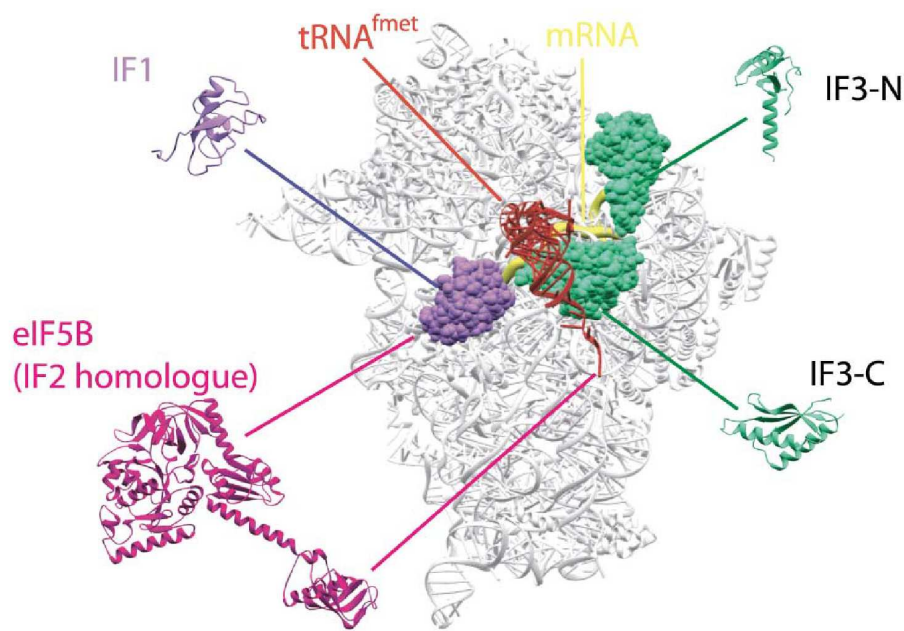


Abb. 4: **Struktur und Interaktion der Initiationsfaktoren (Ramakrishnan, 2002).** Die Kristallstruktur des 30S-IF 1 (violett) Komplexes ist gezeigt. Die ungefähren Position des IF 3 (grün) und die Interaktion von IF 2 sind angedeutet (rot). Die Initiator-fMet-tRNA^{fMet} (rot) liegt in der P-Stelle vor, die mRNA ist gelb hervorgehoben.

Im dritten Schritt der Initiation findet die 50S-Untereinheit zum Initiationskomplex. Gleichzeitig wird das von IF 2 gebundene GTP hydrolysiert und alle Initiationsfaktoren verlassen den ternären Komplex. Es bildet sich das 70 S – Ribosom mit gebundener mRNA und Initiator-fMet-tRNA^{fMet}. Die Reihenfolge und warum beispielsweise alle Bindungsstellen besetzt sein müssen oder wie IF 3 die Bindung von Elongations-tRNAs in der P-Stelle verhindert, bleiben noch ungeklärt.

Bei der heterologen Expression verschiedener Gene bleiben alle Faktoren der Translation, wie Initiationsfaktoren und deren Positionierung an die Ribosomenuntereinheiten, konstant. Die einzig variable Komponente im Initiationsschema ist die mRNA.

Die Initiation wird allgemein als limitierender Schritt bei der Proteinexpression gesehen (Gold, 1988; Gualerzi *et al.*, 1977; Hartz *et al.*, 1991; Jacques und Dreyfus, 1990).

Erste Kontakte zwischen mRNA, fMet-tRNA und 30S-Ribosomenuntereinheit sind für die Ausbildung des Pre-Initiationskomplexes maßgeblich und bestimmen die Initiationseffizienz. Folglich wird eine zugängliche SD-Sequenz und ein zugängliches Start-Kodon auf RNA-Strukturebene als wichtige Eigenschaft für eine erfolgreiche Translationsinitiation gesehen (de Smit und van Duin, 1994b; Gold, 1988; Hartz *et al.*, 1991; Jacques und Dreyfus, 1990; McCarthy und Brimacombe, 1994; Tessier *et al.*, 1984; van Meerten *et al.*, 2001). Die Paarungseffizienz der SD- mit der Anti-SD-Sequenz korreliert dabei mit der Translations-effizienz (Hui und de Boer, 1987; Jacob *et al.*, 1987). In diesem Zusammenhang wird von unterschiedlich stabilen mRNA-Strukturen des Initiationsbereichs berichtet (de Smit und van Duin, 1994a; Gold, 1988; Tessier *et al.*, 1984). Untersuchungen lokaler mRNA-Strukturen des Initiationsbereichs mit der SD-Sequenz und dem Start-Kodon zeigten, dass schwächere RNA-Sekundärstrukturen als - 6 kcal/mol (bezüglich ihrer Freien Energie der Faltung) die Initiation nicht beeinflussen. Eine Stabilisierung dieser RNA-Strukturen um je 1,4 kcal/mol führt jedoch zu 10-fach verringerter Proteinexpression (de Smit und van Duin, 1994a; Gold, 1988).

Allgemein gilt, dass bei hoch exprimierten *E. coli* Genen AT-reiche Kodons direkt nach dem Start-Kodon dominieren (Stenstrom *et al.*, 2001) und GC reiche Kodons an dieser Position die Expressionsraten verringern (Pedersen-Lane *et al.*, 1997). Die Konversion von GC reichen Kodons der Positionen 3, 4 und 5 erhöhte die Expression der Zielproteine auf bis zu 25 % der Zellmasse (Pedersen-Lane *et al.*, 1997). Als Grund für die gesteigerte Expression und die Tatsache, dass AT-reiche Kodons zu Beginn von hoch exprimierten *E. coli* Genen vorkommen, wird die geringere Wahrscheinlichkeit AT-reicher Kodons zur Sekundärstrukturbildung gesehen. Dadurch wird die SD-Sequenz besser zugänglich für die Initiation. Diese Regel ermöglicht jedoch nicht in allen Fällen die erfolgreiche Expression schwer exprimierbarer Gene und erfordert außerdem für jedes Gen separate Optimierungsarbeit.

Untersuchungen des A-Protein Gens des MS2-Phagen zeigten, dass die Expression des Gens durch Paarung von abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen des Strukturgens mit mRNA-Sequenzen des Initiationsbereichs die Translation verhinderte und damit das Strukturgen selbst als *anti-sense* RNA fungierte (van Meerten *et al.*, 2001). Dadurch wird deutlich, dass sog.

long range Interaktion bei der heterologen Expression eine entscheidende Rolle spielen können.

Eukaryontische Gene benötigen für ihre Initiation keine SD-Sequenz. Daher ist ihre Genstruktur nicht dahingehend organisiert, dass sie für ihre Expression möglichst geringe Affinität zur bakteriellen Initiationsdomäne haben.

Bis heute wurde noch keine universell einsetzbare Anfangssequenz zur heterologen Proteinexpression gefunden.

1.3.5.2. Elongation

Die Elongation bei der Proteinbiosynthese umfasst drei wesentliche Reaktionsschritte:

1. Bindung der Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle des Ribosoms
2. Ausbildung der Peptidbindung
3. Translokation

An den Reaktionsschritten sind neben dem Komplex aus mRNA, Ribosom und Aminoacyl-tRNAs noch 3 Elongationsfaktoren (EF-Tu, EF-G, EF-Ts) und GTP beteiligt. Die Aminoacyl-tRNA wird im ternären Komplex mit EF-Tu-GTP an die A-Stelle des Ribosoms gebracht. EF-Tu stabilisiert dabei die aktivierte Esterbindung der Aminoacyl-tRNA.

Eine korrekte Kodon-Antikodon-Interaktion führt zur Konformationsänderung des Ribosoms. Das Ribosom erkennt die korrekte Paarung des Kodons mit dem Antikodon durch die Nukleotide A 1492, A 1493 der Helix 44 der 16S-rRNA, sowie des G 530-Restes der 16S-rRNA. A 1493 interagiert mit der ersten Kodon-Antikodon-Paarung, während A 1492 und G 530 mit der zweiten Kodon-Antikodon-Paarung interagieren. Das Ribosom ist damit in der Lage die ersten beiden Kodon-Antikodon-Paarungen als korrekt zu erkennen, während die dritte Paarung vom Ribosom unbeachtet bleibt. Dieses strukturelle Ergebnis ist im Einklang mit früheren Ergebnissen, die zur Wobble-Theorie führten und zur Tatsache, dass der genetische Code degeneriert ist (Ramakrishnan, 2002). Die korrekte Kodon-Antikodon-Interaktion bei der tRNA-Bindung vermittelt die GTP-Hydrolyse durch EF-Tu. Die Affinität von EF-Tu zur Aminoacyl-tRNA sinkt durch die GTP-Hydrolyse und der Komplex aus GDP und EF-Tu verlässt das Ribosom. EF-Tu wird von EF-Ts in Verbindung mit GTP wieder regeneriert.

Die tRNA in der A-Stelle ändert ihre Konformation hin zum Peptidyltransferase-Zentrum der 50S-Untereinheit. Die 23S-rRNA der 50S-Untereinheit katalysiert die Verdrängung der tRNA in der P-Stelle von der Peptidkette durch die α -Aminogruppe der Aminosäure in der A-Stelle. Die α -Aminogruppe der A-Stelle fungiert dabei als nukleophile Gruppe. Es bildet sich die Peptidbindung aus, wobei die naszierende Peptidkette der Peptidyl-tRNA von der P-Stelle auf

die Aminosäure der A-Stelle übertragen wird, während die tRNA deacyliert in der P-Stelle verbleibt. Die Peptidyltransferaseaktivität wird ausschließlich der 23S-rRNA zugeschrieben. Damit ist das Ribosom als Ribozym klassifizierbar (Ban *et al.*, 2000; Nissen *et al.*, 2000). Die genauen Mechanismen der Katalyse sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt (Ramakrishnan, 2002).

Um eine weitere Aminosäure anzufügen, muss die mRNA mit den gebundenen tRNAs um ein Kodon in Translationsrichtung verschoben werden. Die Translokation wird von EF-G katalysiert und verschiebt die Peptidyl-tRNA von der A-Stelle in die P-Stelle und die deacylierte tRNA von der P-Stelle in die E-Stelle, wo sie freigesetzt wird. Die Energie für die Bewegung, bei der sich die Ribosomenstruktur ändert, wird durch GTP-Hydrolyse gewonnen.

1.3.5.3. Termination

Der Prozess der Termination beginnt mit dem Erreichen des Stop-Kodons (UAA, UAG, UGA) am 3'-Ende der mRNA, und wird durch die Terminationsfaktoren (RF 1, RF 2, RF 3) in Gang gesetzt. UAA/UAG wird von RF 1 und UAA/UGA von RF 2 erkannt. Der jeweilige Terminationsfaktor bindet mit Unterstützung von RF 3 und GTP an das Kodon in der A-Stelle und veranlasst die Peptidyltransferase die Peptidkette der P-Stelle auf ein H₂O-Molekül zu übertragen und so freizusetzen. Die Terminationsfaktoren werden unter GTP-Hydrolyse freigesetzt. Der verbleibende Komplex aus deacylierter tRNA in der P-Stelle, mRNA und Ribosom bindet EF-G und den GTP assoziierten Ribosomen Recycling Faktor (RRF) (Janosi *et al.*, 1996). Die Hydrolyse des GTP führt zur Dissoziation des Ribosomenkomplexes in seine Untereinheiten (Karimi *et al.*, 1999). Es lagert sich nun der Initiationsfaktor 3 an die 30S-Untereinheit und führt zur Freisetzung der mRNA und der deacylierten tRNA. Damit kann eine neue Translationsrunde beginnen.

1.4. Ausbildung von RNA-Strukturen

Der Einfluss der RNA-Struktur auf viele biologische Prozesse ist in den vergangenen Jahren erkannt und zum Forschungsobjekt in vielen Bereichen geworden. Das Interesse der Funktionalität der RNA-Struktur reicht neben dem beschriebenen Einfluss auf die Translationsinitiation (1.3.5.1) von den funktionellen Mechanismen der Retroviren, im speziellen des HI-Virus mit seinen Mechanismen und deren Bedeutung für die pharmazeutische und medizinische Forschung, über die Ribozym Forschung mit ihren potentiellen pharmazeutischen Anwendungen bis zur Funktionen der RNA-Struktur bei der Gen-Regulation im intakten Organismus. Aus diesem Interesse heraus wurden mittlerweile eine Reihe von Methoden entwickelt, um die RNA-Struktur zu analysieren. Außerdem wurden brauchbare Computer-Algorithmen entwickelt, um die RNA-Struktur zu berechnen.

Die bedeutenden Unterschiede zwischen RNA und Proteinen im Hinblick auf deren Struktur liegen in den reduzierten Kombinationsmöglichkeiten der RNA-Bausteine im Vergleich zu denen der 20 Aminosäuren. Daraus resultiert ein geringerer Informationsgehalt bei der RNA, als bei den Proteinen. Es wird die Meinung vertreten, dass durch die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen die RNA-Strukturbildung einfacher zu verstehen sei als die Proteinfaltung (Sigler, 1975; Tinoco und Bustamante, 1999).

In der Literatur wird beschrieben, dass die RNA-Faltung sehr stark hierarchisch verläuft, und auf dem Weg der Faltung über Intermediärprodukte der Grad der Sekundär- und Tertiär-Strukturorganisation zunimmt (Brion und Westhof, 1997; Draper, 1996; Misra und Draper, 2002; Tinoco und Bustamante, 1999). Dabei ist die Sekundärstruktur einer RNA sehr viel stabiler als ihre Tertiärstruktur (Tinoco und Bustamante, 1999).

Als Nukleinsäurepolymer ist das Zuckerphosphat-Rückgrad der RNA negativ geladen. Diese polyelektrolytische Eigenschaft stellt eine elektrostatische Barriere bei der Faltung dar. Bei der Faltung der RNA müssen diese elektrostatischen Abstoßungskräfte aus den partiell negativ geladenen Zucker-Phosphatgruppen und der Entropieeffekt der Kette überwunden werden (Misra und Draper, 2002; Russell *et al.*, 2002; Sigler, 1975; Thirumalai *et al.*, 2001).

Unter denaturierenden Bedingungen (hohe Temperatur, niedrige Ionenstärke) liegt die RNA in einer nahezu linearen Kette mit fluktuierenden undefinierbaren Mikrostrukturen vor (Abb. 5, A). Unter Faltungsbedingungen bilden sich kooperativ schnell kompakte Strukturen innerhalb des Polynukleotids aus. Diese kompakten Strukturen sind ein ungeordneter Intermediärzustand, bei dem noch keine definierbaren tertiären Endstrukturen ausgebildet werden (Misra und Draper, 2002; Russell *et al.*, 2002; Sigler, 1975; Thirumalai *et al.*, 2001; Tinoco und Bustamante, 1999). Der Intermediärzustand wird durch helikale Sekundärstrukturen, entstan-

den durch Basen-Paarungen und Basen-Stapelungen, dominiert. Diese frühen helikalen Sekundärstrukturen werden als „short range-Interaktionen“ bezeichnet (Brion und Westhof, 1997; Misra und Draper, 2002; Tinoco und Bustamante, 1999) und bilden sich in Gegenwart monovalenter und divalenter Kationen schnell aus. Dabei werden die Coulomb'schen Abstoßungskräfte der Phosphatgruppen der RNA durch die Kationen neutralisiert (Misra und Draper, 2002) (Abb. 5, B). Mg^{2+} nimmt jedoch eine besondere Rolle ein. Einerseits sind Mg^{2+} -Ionen delokalisiert gebunden und können durch ihre hohe Ladungsdichte doppelhelikale RNA-Sekundärstrukturen besser stabilisieren als beispielsweise Na^+ (Misra und Draper, 2002). Andererseits führen nach Ausbildung erster lokaler Sekundärstrukturen wiederum Mg^{2+} -Ionen zur Annäherung der Helices und zu ersten tertiären Kontakten, die sich dann im weiteren Verlauf zur nativen Tertiärstruktur zusammenlagern (Misra und Draper, 1998). Dieser strukturelle Übergang vom Intermediärzustand mit seinen helikalen Sekundärstrukturen zur tertiären Endstruktur scheint jedoch über einen strukturellen Kollaps - ähnlich wie bei der Proteinfaltung (dort bezeichnet als „molten globule“) - zu verlaufen (Murthy und Rose, 2000; Russell *et al.*, 2002) (Abb. 5, C). Dynamisch gesehen verläuft der strukturelle Kollaps durch kooperatives Bindungsverhalten bei der Kationenanlagerung (Mg^{2+}). Durch Anlagerung eines oder weniger Kationen erhöht sich die Annäherungswahrscheinlichkeit der RNA-Helices, was wiederum die lokale negative Ladung in der Nähe der Helices erhöht. Als Folge lagern sich noch mehr Kationen an. Zusätzlich kommt es zu Entropie-Effekten durch delokalisierte Kationen (Misra und Draper, 2002; Murthy und Rose, 2000; Russell *et al.*, 2002). Dies führt zum Kollaps der Polyanionen (RNA) unter Anlagerung divalenter Kationen (Russell *et al.*, 2002). Dieser strukturelle Kollaps wird auch von Murthy *et al.* als allgemeines Verhalten der RNA bestätigt (Murthy und Rose, 2000). Er berichtet von unterschiedlichen Möglichkeiten, wie sich die Helices ineinander lagern: 1. Ineinandergreifen einer großen Schleife („major grooves“) zweier Helices. 2. Paralleles Aneinanderpacken zweier Helices. 3. Platzieren des Zucker-Phosphat-Rückrats einer Helix in eine große Schleife („major groove“) einer zweiten Helix.

Unterschiedliche Ionenarten, die den kollabierten Zustand der RNA hervorrufen können, beeinflussen die Faltung der RNA. Es wird von einer verlangsamten Faltungsrates bei steigender Ladung des Ions berichtet. In Gegenwart monovalenter Kationen erfolgt die Faltung 20-40 mal schneller als bei multivalenten Metallionen. Daraus lässt sich schließen, dass multivalente Kationen die RNA schnell zum kollabierten Zustand vernetzen, der dann schwerer zur nativen Tertiärstruktur reorganisiert werden kann. Es entstehen kinetische Fallen (Heilman-Miller *et al.*, 2001).

Im Vergleich zu den tertiären Interaktionen der RNA sind die Sekundärstrukturelemente sehr stabil (Brion und Westhof, 1997; Herschlag, 1995; Tinoco und Bustamante, 1999). Sie sind im Hinblick auf die biologische Aktivität der RNA gegenüber tertiären Interaktionen von übergeordneter Bedeutung, weil die Sekundärstruktur hochenergetische Barrieren ausbilden kann (Nussinov und Tinoco, 1981; Thirumalai und Woodson, 2000), die die biologische Aktivität signifikant beeinflussen können und durch die zusätzlich die tertiäre Faltung häufig in kinetische Fallen gerät (Woodson, 2000). Dynamisch gesehen bilden sich bei der Transkription der mRNA beim Austritt aus der RNA-Polymerase schnell lokale Haarnadelschleifen (lokal hairpins) aus.

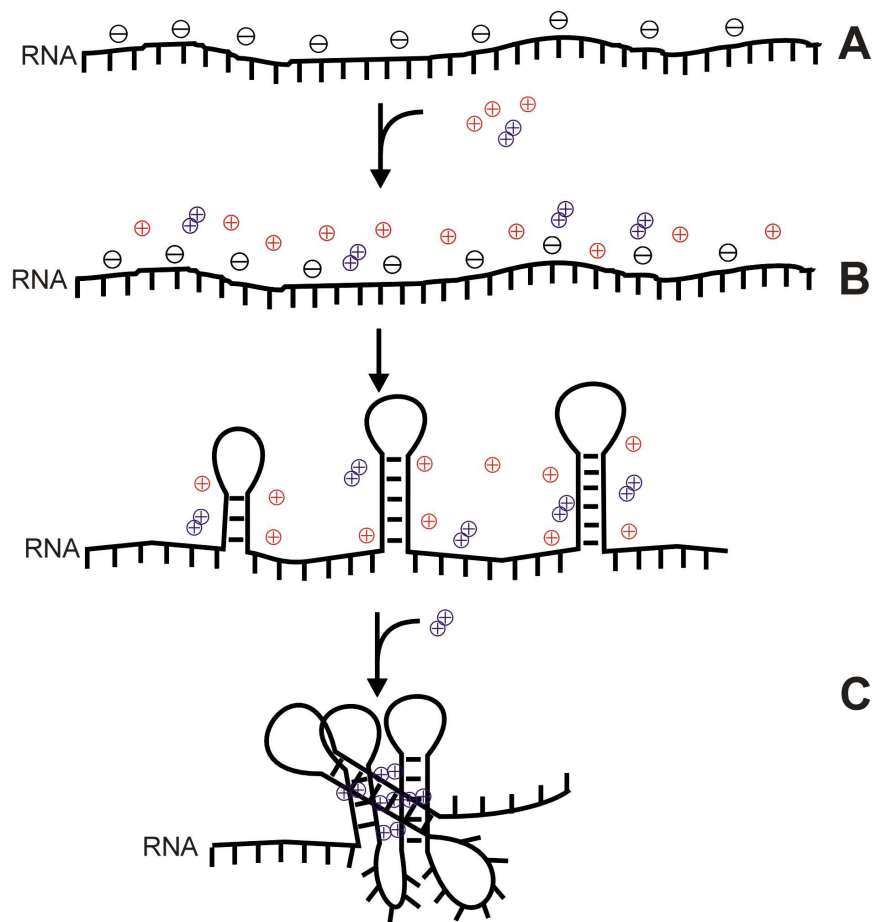


Abb. 5: Modell der RNA-Strukturausbildung

1.5. Abbau von RNA-Molekülen in *Escherichia coli*

1.5.1. Überblick über die RNA-Degradation

Die Stabilität der mRNA stellt einen der Hauptkontrollpunkte der Gen-Expression in allen Zellen dar und ist durch ihre DNA-Sequenz kodiert (Ross, 1995). Die Transkription ergibt mRNA-Moleküle, die in der Zelle exponentiell wieder abgebaut werden (Ross, 1995). Unterschiedliche Halbwertszeiten lassen demnach mehr oder weniger Translationsinitiationen je mRNA-Molekül zu, wodurch die Proteinmenge in der Zelle reguliert wird (Carpousis, 2002; Grunberg-Manago, 1999; Ross, 1995).

Es wird zwischen Abbau und Inaktivierung der mRNA unterschieden. Dabei ist unter Abbau die chemisch nachweisbare Menge an mRNA ohne Berücksichtigung ihrer Länge zu verstehen. Die Aktivität ist dagegen als Menge der für die Translation intakten mRNA-Moleküle definiert und kann z.B. mittels Gelelektrophorese als entsprechendes Volllängentranskript analysiert werden (Kennell, 2002).

Die Stabilität eines Transkripts wird von seiner RNA-Struktur und den Wechselwirkungen zu unterschiedlichen Faktoren beeinflusst die an der RNA-Degradation beteiligt sind. Solche Faktoren können RNA-bindende Proteine, wie Translationsrepressoren (Mattheakis und Nomura, 1988) oder antisense-RNA-Moleküle (Case *et al.*, 1990) sein.

Man unterscheidet Cis-wirkende Elemente, die den Abbau des RNA-Transkripts erschweren, und Trans-wirkende Elemente, die zum Abbau der mRNA führen. Cis-wirkende Elemente sind vorwiegend stabile RNA-Sekundärstrukturen an den 5'- und 3'-Enden der mRNA (Arnold *et al.*, 1998; Carrier und Keasling, 1999; Chen und Belasco, 1990; Emory *et al.*, 1992; Wong und Chang, 1986). Trans-wirkende Elemente sind hauptsächlich vier Ribonukleasen, zwei Endo- (RNase E/RNase III) und zwei Exoribonukleasen (PNPase/RNase II) (Carpousis, 2002; Grunberg-Manago, 1999).

Der Abbau bzw. die Inaktivierung der mRNA ist kein zufälliger endonukleolytischer Prozess, weil keine inverse Korrelation zwischen mRNA-Länge und deren Halbwertszeit besteht (Chen und Belasco, 1990; McCormick *et al.*, 1994). Generell wird beim Abbau der mRNA-Moleküle in *E. coli* beobachtet, dass die 5'-Enden schneller degradieren und die Stabilitäten zu den 3'-Enden hin zunehmen (Selinger *et al.*, 2003). Dies legt einen allgemeinen 5'-3' Degradationsweg der mRNA nahe, obwohl in *E. coli* keine 5'-3'-Exonukleasen gefunden wurden (Carpousis, 2002; Grunberg-Manago, 1999; Selinger *et al.*, 2003).

Allgemein besteht eine Korrelation zwischen steigender Stabilität der mRNA und Translationsinitiationseffizienz (Arnold *et al.*, 1998; Baumeister *et al.*, 1991). Dabei wird bereits durch bloße Bindung der 30S ribosomalen Untereinheit die mRNA stabilisiert (Arnold *et al.*,

1998). Damit steht die Geschwindigkeit der 30S Komplexbildung ebenfalls in Zusammenhang mit der mRNA-Stabilität, und eine inverse Korrelation der mRNA-Stabilität zur RNA-Polymerasegeschwindigkeit wird deutlich (Iost *et al.*, 1992).

Die Degradation der mRNA in *Escherichia coli* ist ein organisierter Prozess, der unter anderem an einem hochmolekularen Komplex stattfindet, dem Degradasom. Das Schlüsselenzym für den initialen Schritt des RNA-Abbaus ist die Endoribonuklease E (RNase E). Dabei ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die endonukleolytische Spaltung der mRNA im Bereich der 5'-Enden, sehr häufig durch die RNase E (Apirion, 1973; Ehretsmann *et al.*, 1992). Es folgt der exonukleolytische Abbau des entstandenen 3'-Endes in 3'-5' Richtung durch die Polynukleotidphosphorylase (PNPase) und die RNase II. Damit verbleibt ein verkürztes Transkript für eine neue endonukleolytische Spaltung durch die RNase E (Bouvet und Belasco, 1992; Carpousis, 2002; Grunberg-Manago, 1999; Lin-Chao und Cohen, 1991).

1.5.2. Enzyme des RNA-Abbaus und das Degradasom

1.5.2.1. Enzyme des RNA-Abbaus und deren Funktionsweisen

Schlüsselenzym für den RNA-Abbau ist die Endoribonuklease E (RNase E), die vom *rne* Gen codiert wird. Die RNase E ist die Hauptkomponente des *E. coli* Degradasoms. Allgemein ist das Enzym neben der mRNA-Degradation noch an der Prozessierung ribosomaler RNA (Apirion und Lassar, 1978; Misra und Apirion, 1979) sowie der Spaltung des Anti-sense Regulators (RNA I) bei der Replikation des ColE1-Typ-Plasmids (Lin-Chao und Cohen, 1991) beteiligt. Die 1061 Aminosäuren (McDowall und Cohen, 1996) bilden ein Homodimer und sind in eine N-terminale (1 bis 498), eine zentrale (597 bis 684) und eine C-terminale Domäne (844 bis 1061) aufgeteilt. Die N-terminale Domäne enthält das katalytisch aktive Zentrum, während die zentrale Region eine Arg-reiche RNA-Bindungsdomäne (580 bis 700) besitzt. Das Enzym spaltet Einzelstrang-RNA 5' von AU-Dinukleotiden (Bouvet und Belasco, 1992; Mackie, 1991). Das Enzym benötigt beides, eine interne potentielle Spaltstelle und einen 5'-ungepaarten Nukleosidmonophosphatrest (Mackie, 1998). Deshalb können 5'-RNA-Sekundärstrukturen mit 5'-Triphosphat-Rest als Stabilisierung der Transkripte verwendet werden (Arnold *et al.*, 1998; Carrier und Keasling, 1999; Emory *et al.*, 1992). Im Einklang dazu stehen Ergebnisse, die zeigen, dass stabile RNA-Sekundärstrukturen am 5'-Ende bei heterologen mRNAs nicht immer zu Stabilisierung führen. Wenn auf der 5'-Seite des RNA-Stem-Loops noch 5 ungepaarte Nukleotide der mRNA vorliegen, wird der stabilisierende Effekt der Sekundärstruktur revertiert (Arnold *et al.*, 1998; Bouvet und Belasco, 1992; Chen *et al.*, 1991; Emory *et al.*, 1992).

Neben der RNase E enthält *E. coli* noch weitere Enzyme, die den Abbau der mRNA katalysieren. Eine weitere Endoribonuklease ist die RNase III, die an der Prozessierung von rRNA und dem Abbau von mRNA beteiligt ist. Das Enzym besteht aus zwei identischen Polypeptiden (je 24,5 kDa), mit ausgeprägten Domänen für die RNA-Bindung und -Spaltung (Li und Nicholson, 1996). Es spaltet Doppelstrang-RNA abhängig von den Paarungen des Spaltbereichs entweder in einen linearen Bruch („Nick“), oder es spaltet den gesamten Doppelstrang der RNA. Bestimmte Watson-Crick-Paarungen an bestimmten Bereichen des Doppelstrangs verhindern eine Spaltung (Zhang und Nicholson, 1997). Dagegen erkennt die RNase III spezifisch doppelsträngige Bereiche von terminalen 5' oder 3' RNA-Stem-Loop Strukturen. Insofern kann neben dem translationsinhibierenden Effekt einer „Anti sense“ RNA diese auch die mRNA zum Abbau durch die RNase III markieren (Case *et al.*, 1990). Damit besteht ein gegenläufiger Effekt zur Stabilisierung der mRNA durch terminale RNA-Sekundärstrukturen, die eine Spaltung der mRNA erschweren (siehe RNase E, RNase II, PNPase). Da jedoch der limitierende Schritt beim Abbau der mRNA durch die RNase E erfolgt (Carpousis, 2002) und die Erkennung durch die RNase III sequenzspezifisch ist, wird eine entsprechende terminale RNA-Sekundärstruktur insgesamt zu einer Stabilisierung führen.

Zwei weitere Enzyme sind im Zusammenhang mit der Spaltung von RNA-Molekülen bekannt, die Ribonuklease II und die Polynukleotid Phosphorylase. Die Exoribonuklease II (RNase II) ist analog der Polynukleotid Phosphorylase (PNPase) eine 3'-Exonuklease, mit Einzelstrangspezifität. Sie spaltet 5'-Monophosphate von der RNA ab. Die RNase II besteht aus einer Polypeptidkette mit 644 Aminosäuren. Sie enthält wie die PNPase eine RNA-bindende S1-Domäne am C-terminalen Ende (Bycroft *et al.*, 1997). Die PNPase aus *E. coli* wird allgemein als Homotrimer aus 77 kDa Untereinheiten beschrieben (Regnier *et al.*, 1987) und ist eine der Hauptkomponenten des Degradasoms. Im Vergleich zur RNase II benötigt die PNPase ausschließlich freie 3'-Hydroxyl-Enden für ihre Initiation.

Die beiden Ribonukleasen (RNase II/PNPase) werden *in vivo* wechselseitig bezüglich ihrer Menge reguliert (Zilhao *et al.*, 1996). Sie übernehmen beinahe vollständig die gesamte Exonukleaseaktivität in *E. coli*, die sich mit ~90% für RNase II und 10% für PNPase auf die beiden Enzyme verteilt (Deutscher und Reuven, 1991).

Die PNPase kann nach Bindung an einen freies 3'-Hydroxyl-Ende ohne Einschränkungen hochstrukturierte mRNA-Moleküle abbauen, wogegen die RNase II sensitiver auf RNA-Sekundärstrukturen reagiert (Braun *et al.*, 1996; Coburn und Mackie, 1996). Dies kann dazu führen, dass die RNase II ein freies 3'-Endes bis zu einer stabilen RNA-Sekundärstruktur abbaut, und dann das Transkript so verbleibt, dass die mRNA nicht mehr weiter durch die

PNPase abgebaut wird (Braun *et al.*, 1996). Insofern stabilisiert die Rho-unabhängige Transkriptionstermination mit ihrer RNA-Sekundärstruktur und den folgenden Uracil-Resten die 3'-Seite der mRNA. Außerdem wird von weiteren 3'-RNA-Sekundärstrukturen zur Stabilisierung der mRNA gegen deren Abbau berichtet (Chen und Belasco, 1990; Wong und Chang, 1986).

Um RNA-Sekundärstrukturen zu entwinden, werden in den Zellen Proteine eingesetzt, die allgemein als RNA-Helikasen bezeichnet werden. Sie werden auch beim Abbau der mRNA verwendet, um den Abbau strukturierter RNA-Moleküle zu ermöglichen und zu beschleunigen. RhlB ist eine ATP-abhängige DEAD-Box Helicase (Py *et al.*, 1996). DEAD steht für die in dieser Proteinfamilie auftretende Sequenz Asp-Glu-Ala-Asp. Die RhlB enthält sieben Motive, die an der Bindung von Magnesiumionen, ATP und RNA beteiligt sind. RhlB ist eine Hauptkomponente des Degradasoms, liegt wahrscheinlich als Dimer vor und benötigt zur Entwindung von Duplex-RNA einzelsträngige, überhängende Bereiche. Das Enzym entwindet in einer ATP-abhängigen Reaktion RNA-Sekundärstrukturen und unterstützt damit die Aktivität der PNPase, die bei hochstrukturierter mRNA ansonsten verlangsamt würde (Py *et al.*, 1996). Die Aktivität der Helicase wird stark durch die Assoziation mit dem C-terminalen Ende der RNase E stimuliert (Carpousis, 2002).

Neben den primär am Abbau der RNA beteiligten Enzymen wird der Abbau der RNA auch durch Markierung reguliert. Solche Markierungen werden durch die beiden Enzyme Polyphosphat Kinase (PPK) und die Poly-(A)-Polymerase in den Zellen durchgeführt. Die Polyphosphat Kinase (PPK) ist die am spätesten entdeckte Komponente des Degradasoms. Das Homotetramer, das aus 80 kDa Untereinheiten aufgebaut ist, katalysiert die reversible Polymerisation von terminalem Phosphat des ATP zu bis zu 20 Phosphatresten langen Poly-(P)-Ketten. Damit wird wahrscheinlich über den Phosphatspiegel die Aktivität des Degradasoms reguliert (Blum *et al.*, 1997). Die Poly-(A)-Polymerase liegt in unterschiedlichen Varianten in *E. coli* vor und katalysiert templatunabhängig die Addition von 10 bis 60 Adenosyl-Resten an das 3'-Ende der mRNA. Sie verwendet dabei ATP als Substrat und Energiequelle. 3'-Poly-Adenosyl-Enden von mRNA-Molekülen sind normalerweise bei Eukaryonten bekannt, sind aber dort signifikant länger (80 bis 200 Adenosyl-Reste). Die Polyadenylierung reguliert generell den mRNA-Abbau, indem sie mRNA-Moleküle destabilisiert (O'Hara *et al.*, 1995). Es ist anzunehmen, dass die angefügten 3'-Poly-(A)-Enden geringe Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen zeigen, und deshalb einen Angriffspunkt für die 3'-5'-Exonukleasen (RNase II/PNPase) bilden. Damit wird der mRNA-Abbau schnell und effektiv initiiert.

1.5.2.2. Das *E. coli* Degradasom

Das Degradasom ist ein Multienzym-Komplex, der hauptsächlich aus der RNase E, der PNPase und der ATP-abhängigen RNA-Helikase (RhIB) besteht (Carpousis, 2002; Grunberg-Manago, 1999; Miczak *et al.*, 1996; Py *et al.*, 1996). Neben diesen Enzymen werden noch weitere in Assoziation mit dem Degradasom genannt (Miczak *et al.*, 1996). Eine Enolase mit glycolytischer Aktivität, GroEL und DanK, sowie die Fragmente der 23S- und 16S-rRNA sind im Degradasom vorhanden.

Funktionell wird im Degradasom die Aktivität der RNase E und der PNPase räumlich koordiniert (Carpousis, 2002; Carpousis *et al.*, 1994; Grunberg-Manago, 1999). Nach der endonukleolytischen Spaltung durch die RNase E wird das entstandene 3'-Ende von der PNPase direkt gebunden. Währenddessen entwindet die ATP-abhängige RNA-Helikase (RhIB) die Sekundärstruktur des 3'-Endes und erhöht so die Abbaueffektivität der PNPase, die das Fragment dann in 3'-5'-Richtung schnell abbaut (Py *et al.*, 1996). Die Lokalisierung der Enzyme im Degradasom beschleunigt dabei die Substratbindung und den Substratabbau durch die PNPase.

1.6. Proteinexpression *in vitro*

Proteine werden für biotechnologische und medizinische Anwendungen mit Hilfe gentechnischer Methoden produziert. Dazu wird klonierte DNA in Form von Vektoren (Plasmiden) bevorzugt in prokaryontische Organismen eingeschleust, und die Gene in Zellkulturen expriert. Anfang der Fünfziger Jahre wurden erstmals die Proteinsynthese außerhalb von intakten Zellen durchgeführt, indem mit aufgeschlossenen Zellen oder davon isolierten Fraktionen Proteine synthetisiert wurden (Borsook, 1950; Gales und Folkes, 1954; Khesin, 1953; Peterson und Greenberg, 1952; Siekevitz, 1952; Siekevitz und Zamecnik, 1951; Winnick, 1950a; Winnick, 1950b). Ein großer Schritt der Weiterentwicklung der *in vitro* Translationsysteme war die Verwendung exogener mRNA zur Proteinsynthese in einem bakteriellen System (Nirenberg und Matthaei, 1961). Die Weiterentwicklung in kleinerem Volumina (<200 μ l) zeigte eine verringerte Proteinsynthese, wobei dort endogene Matrizen verwendet wurden (Roberts und Paterson, 1973; Zubay, 1973).

Die ersten gekoppelten Transkriptions-/Translationssysteme, die DNA als Templat verwendeten, wurden aus Bakteriophagen entwickelt. Darin wurde die mRNA vom DNA-Templat durch *E. coli* RNA-Polymerasen transkribiert, und von der gebildeten mRNA während ihrer Synthese das Protein translatiert (Byrne *et al.*, 1964; Wood und Berg, 1962). In diesem System war wegen der anhaltenden Synthese der mRNA die mRNA-Stabilität für die Translation nicht mehr von entscheidender Bedeutung (Ryabova *et al.*, 1998). Die von Zubay und Gold-Schweiger nachfolgend weiterentwickelten Systeme wurden wegen ihrer einfachen Präparation, hohen Stabilität und hohen Aktivität bekannt. (Chen und Zubay, 1983; DeVries und Zubay, 1967; Gold und Schweiger, 1969; Lederman und Zubay, 1967).

Ende der achtziger Jahre wurde die kontinuierliche zellfreie Transkription/Translation (CFCF-Technologie; continuous-flow cell-free) entwickelt (Spirin *et al.*, 1988). Dabei wird eine Substratlösung, die verbrauchte Komponenten des Systems (z. B.: Aminosäuren, NTPs, Komponenten des Energie regenerierenden Systems) beinhaltet, kontinuierlich über eine Ultrafiltrationsmembran mit dem Reaktionsraum ausgetauscht. Über den Austausch der Flüssigkeit durch die Membran werden zum einen verbrauchte Komponenten der Reaktion zugeführt und zum anderen Abfallprodukte der Reaktion (z. B.: Nukleotidmonophosphate, anorganische Phosphate) und das translatierte Protein aus dem Reaktionsraum abgeführt. CFCF-Reaktionen können bis zu 100 Stunden andauern und verlieren dabei nicht die zur Synthese nötigen, von der Membran zurückgehaltenen, hochmolekularen Bestandteile. In CFCF-Reaktionen wurden mRNA-Templates für Translationen, so wie DNA-Templates in gekoppelten Transkriptionen/Translationen eingesetzt (Baranov *et al.*, 1989; Baranov und Spirin, 1993; Kigawa und

Yokoyama, 1991; Kudlicki *et al.*, 1992). Basierend auf diesen Arbeiten wurde von der Firma Hoffman-LaRoche das RTS (Rapid Translation System) entwickelt. Dabei wurde ein mit Modifikation auf der Methode von Zubay basierendes „Batch“-System (RTS 100 HY) entwickelt. Außerdem wurde das CFCF Prinzip durch das CECF (continuous-exchange cell-free) System ersetzt. Wie beim Vorgänger läuft in einer Reaktionskammer die kombinierte Transkription/Translation ab. Unterschied zum vorigen System ist der Austausch der Substrate, Abfallprodukte und synthetisierten Proteine über eine Dialysemembran, wobei eine Zufütterungslösung mit dem zehnfachen Volumen der Reaktionslösung bereitgestellt wird. Deshalb kann die Proteinsynthese bis zu 24 Stunden andauern.

Die einfache Anwendung des *in vitro* Expressionssystems, geringe Kosten, schnelle Ergebnisse und hohe Ausbeuten machen dieses System zu einer guten Alternative zur Proteinexpression *in vivo* (Swartz, 2001). Ein wesentlicher Vorteil des System ist jedoch, dass es Aufgaben bewältigen kann, die Zellen nicht oder nur sehr umständlich erfüllen können. Im *in vitro* System können z.B. toxische Proteine in hohen Konzentrationen exprimiert werden oder es können Kontrollmechanismen der Zelle, wie Regulation durch das Produkt selbst, umgangen werden (Cole, 1996; Swartz, 2001). Außerdem ist der Einbau unnatürlicher, markierter Aminosäuren unproblematisch (Chung *et al.*, 1993; Kigawa *et al.*, 1999). Gegebenenfalls können Chaperon-Systeme, die zur richtigen Faltung und Löslichkeit der produzierten Proteine beitragen, der Reaktion zugesetzt werden. Zu den am besten untersuchten Faltungshelfern im Cytoplasma von *E. coli* gehören die DnaK/DnaJ/GrpE- (DnaK) und GroES/GroEL-Systeme (GroE) (Neidhardt, 1987). Neben vielen Proteinen, die ohne Hilfe von Chaperonen die korrekte Konformation *in vivo* einnehmen, gibt es andere Proteine, die meist eines der beiden Faltungssysteme benötigen, um in Lösung ihre biologische Funktion ausüben zu können (Bukau *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1997). Ein weiterer wichtiger Vorteil des *in vitro* Systems, der im Rahmen der Arbeit zum Tragen kam, ist die Möglichkeit, Untersuchungen der Translation direkt durchzuführen, weil durch Einsatz der mRNA als Translations-Templat Effekte ausgeschlossen werden, die auf DNA-Replikations- oder Transkriptionsebene stattfinden.

Zur einfacheren Templatgenerierung wurde die Methode der Expressions-PCR entwickelt. PCR Produkte wurden sowohl in eukaryontischen (Resto *et al.*, 1992; Switzer und Heneine, 1995) als auch in prokaryontischen *in vitro* Proteinsynthesystemen eingesetzt (Nakano *et al.*, 1999; Ohuchi *et al.*, 1998). Bei allen Reaktionen mit einer längerer Versuchsdauer (z. B. CECF) sind nur DNA-Templates als Vektoren oder als sehr lange lineare DNA einsetzbar, weil die in den Lysaten enthaltenen Exonuklasen die DNA abbauen, bevor nennenswerte

Mengen Genprodukt produziert werden (Yang *et al.*, 2000). In den benutzten *E. coli* S30 Lysaten ist vor allem die Exonuklease V für den Abbau linearer DNA vom 3'-Ende her verantwortlich (Benzinger *et al.*, 1975). Im RTS 100 HY System ist die lineare DNA durch die Zugabe unspezifischer linearer DNA vor sofortigem Abbau geschützt. Diese zusätzlich zugegebene DNA besitzt aufgrund ihrer eukaryontischen Herkunft keinen systemspezifischen T7-Promotor und führt daher mit der zugesetzten T7-RNA-Polymerase zu keiner Hintergrundsynthese von Proteinen. Damit können im RTS 100 HY System PCR-Produkte als Expressions-Templates eingesetzt werden, nachdem sie mit den bakteriellen Regulations-elementen fusioniert worden sind (Watzel 2001) (3.5.1).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die heterologe Proteinexpression ist über die letzten Jahrzehnte zu einer der wichtigsten Methoden in der Biotechnologie geworden. Nachdem die Genome der unterschiedlichsten Organismen sequenziert worden sind, ist die Expression der Proteine und die Erforschung ihrer Strukturen und Funktionen für zukünftiges Verständnis molekularbiologischer und biochemischer Zusammenhänge von immenser Wichtigkeit. In diesem Kontext ist die Technologie des Hochdurchsatzverfahrens und die biotechnologische Produktion pharmazeutischer Wirkstoffe, wie z.B. die rekombinante Insulin-Produktion, sehr wichtig geworden. Die Überexpression von rekombinanten Proteinen hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab, für die viele Strategien zur Steigerung der Proteinexpression entwickelt wurden (Balbas, 2001; Jonasson *et al.*, 2002; Makrides, 1996). Für die Hochdurchsatz-Expression von verschiedenen Proteinen eignet sich das *in vitro* Expressionssystem. Aus Produktevaluierungen und der Kundenbetreuung waren bei der Fa. Roche Diagnostics zu Beginn der Arbeit einige Gene bekannt, die bei der bakteriellen *in vitro* Expression nicht, oder sehr schwach exprimierbar waren. Diese Gene stellen die Grundlage der hier vorgestellten Arbeit dar. Anhand dieser Gene sollten unterschiedliche Ansätze zur erfolgreichen heterologen Proteinexpression entwickelt und untersucht werden.

Voruntersuchungen, die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt worden sind (Voss, 2001), zeigten die Einflüsse einer stabilen RNA-Sekundärstruktur im *in vitro* Expressionssystem. Es wurden ideale RNA-Stem-Loop Sequenzen (ideal gepaarter Stamm bei gleichzeitig ungepaarter Haarnadelschleife) mit ansteigender Stammlänge (6 bis 8 bp; $\Delta G_0 = -7,8$ kcal/mol bis $\Delta G_0 = -11,8$ kcal/mol) direkt auf der 3'-Seite des Start-Kodons (+3) in einem als Wildtyp stark exprimierbaren Konstrukt (GFP) platziert. Die so mutierten Konstrukte zeigten ab der Stammlänge von 6 bp stark inhibierte Expression. Nachdem eine der inhibierenden RNA-Sekundärstrukturen (Stammlänge: 8 bp; $\Delta G_0 = -11,8$ kcal/mol) um 12 Nukleotide in Translationsrichtung abwärts in die Gensequenz hineinverschoben worden war (Position +15), war die Expression nahezu nicht mehr durch die RNA-Sekundärstruktur beeinflusst. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten überein, die den Weg der mRNA durch das Ribosom beschreiben und den linearen Platzbedarf der mRNA in der 30S-Untereinheit des Ribosoms mit 30 nt (-15 bis +15) beziffern (Culver, 2001; Ramakrishnan, 2002; Yusupova *et al.*, 2001).

Es wurde bei RNA-Strukturvorhersagen beobachtet, dass genspezifische mRNA-Sequenzen, die schwer translatierbar sind, häufig mit den *regulatorischen Elementen*⁴ der bakteriellen Translation RNA-Sekundärstrukturen ausbilden (Abb. 6, B). Insofern wurde auf Basis dieser

Voruntersuchungen eine Anfangssequenz entworfen, die zu verbesserter heterologer Proteinexpression führen sollte. Sie besteht aus 5 AT-reichen AS-Kodons, die allgemein eine geringe Neigung zu RNA-Sekundärstrukturausbildung zeigen, gefolgt von einer GC-reichen idealen RNA-Stem-Loop Sequenz (7 bp; $\Delta G_0 = -9,9$ kcal/mol) in den Positionen +19 bis +36. Diese beiden Sequenzen sollten vor Strukturgenen platziert werden (Abb. 6, C), und auf mRNA-Ebene die Translation fördern, indem die stabile RNA-Sekundärstruktur sich ausbildet und den bakteriellen Translationsinitiationsbereich von Paarungen mit genspezifischen mRNA-Sequenzen freihält (Abb. 6, D). Dadurch sollte die Translationsinitiation der schwer exprimierbaren Gene optimiert werden. Die Anwendung der beschriebenen Anfangssequenz würde bei Hochdurchsatz-Expression von cDNA-Banken zu erhöhter Expressionswahrscheinlichkeit führen. Zusätzlich würde die Umsetzung der Strategie neue Einblicke darüber geben, wie eine gut translatierbare mRNA beschaffen sein muss, dass sie zu starker heterologer Proteinexpression führt.

Außerdem war aus anderen molekularbiologischen Methoden der Einsatz RNA-struktur-schwächender Reagenzien bekannt. Es sollte untersucht werden, ob diese Reagenzien bei der *in vitro* Expression wirksam sind und wie sie auf die Expression strukturierter mRNA wirken.

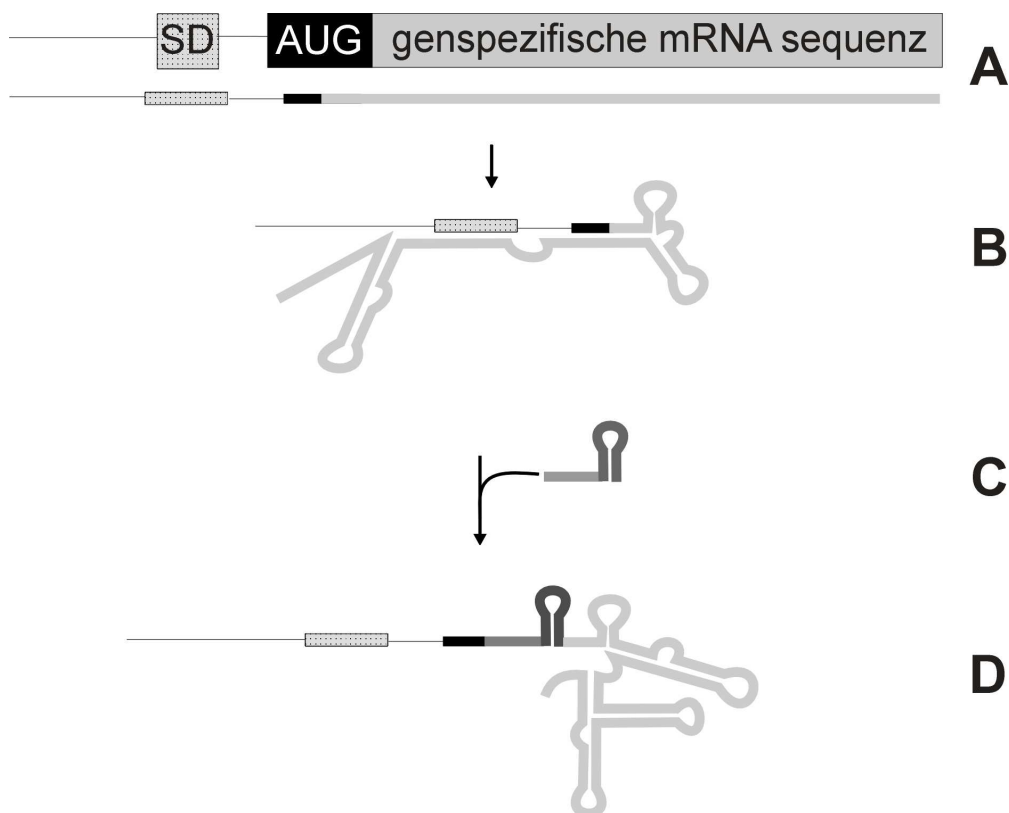


Abb. 6: **Strategie der Einführung eines idealen RNA-Stem-Loops.** **A.** Initiationsbereich mit SD-Sequenz und Start-Kodon, gefolgt von der genspezifischen mRNA-Sequenz. **B:** Rückfaltung (Abwärts Paarung¹) der genspezifischen mRNA-Sequenz mit den regulatorischen Elementen⁴ der

bakteriellen Translation. **C/D:** Die Einführung einer AT-reichen Sequenz und eines RNA-Stem-Loops soll die Rückfaltung der genspezifischen mRNA mit den regulatorischen Elementen⁴ des Initiationsbereichs verhindern.

2. Material

2.1. Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
Agar-Agar	Difco (Becton Dickinson, Heidelberg)
Agarose MP	Roche (Basel, Schweiz)
Betain-Monohydrat	Fluka (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Bromphenolblau – Natriumsalz	Fluka (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Carbenicillin	BIOMOL (Hamburg)
Caseinhydrolysat	Roche (Basel, Schweiz)
Chloramphenicol	Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Cl ₂ Mg*6H ₂ O	Merck (Darmstadt)
dNTP-Mix (PCR)	Roche (Basel, Schweiz)
dNTPs (<i>in vitro</i> Transkription)	Roche (Basel, Schweiz)
DTT	Serva (Heidelberg)
Essigsäure p.a. (99,8 %)	Riedel de Haen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
H ₂ O (PCR-grade)	Roche (Basel, Schweiz)
HCl p.a. (25 bzw. 37 %)	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Difco (Becton Dickinson, Heidelberg)
IPTG	BIOMOL (Hamburg)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Phenol (Roti-Phenol)	Roth (Karlsruhe)
SYBR Green II (10.000 x in DMSO)	Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Trehalose	Merck (Darmstadt)
Tris	Roche (Basel, Schweiz)

2.2. Enzyme

Anti-His ₆ -POD-MAK	Roche (Basel, Schweiz)
DNase I RNase-frei	Roche (Basel, Schweiz)
High Fidelity DNA polymerase	Roche (Basel, Schweiz)
RNase H	Roche (Basel, Schweiz)
T7-RNA-Polymerase	Roche (Basel, Schweiz)

2.3. Standards und Kits

Chemilumineszenz Detektionssubstrat	Roche (Basel, Schweiz)
DNA-Marker VII	Roche (Basel, Schweiz)
DNA-Marker VIII	Roche (Basel, Schweiz)
High Pure RNA-Isolation Kit	Roche (Basel, Schweiz)
mini quick spin RNA Column	Roche (Basel, Schweiz)
Multi-Tag-Marker	Roche (Basel, Schweiz)
pBAD-TOPO Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
RNA-Marker III	Roche (Basel, Schweiz)
RTS 100 HY	Roche (Basel, Schweiz)

2.4. Material für Elektrophorese und Western Blot

Bis-Tris-Gele 4-12%	Invitrogen (Karlsruhe)
E-Gel 1,2% agarose (GP)	Invitrogen (Karlsruhe)
E-Gel 2% agarose (GP)	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen (Karlsruhe)
PVDF Membran	Roche (Basel, Schweiz)
TBE-Harnstoffgele 15 %	Invitrogen (Karlsruhe)
TBE-Harnstoffgele 6 %	Invitrogen (Karlsruhe)

2.5. Geräte und sonstige Materialien

Agarose Gelkammer Mini-Sub Cell	Bio-Rad (München)
Agarose Gelkammer Wide Mini-Sub Cell	Bio-Rad (München)

Analysenwaagen BP211D, I 2000 D	Sartorius (Göttingen)
Autoklav FVA3	Fedegardi Autoclavi SPA (Mailand, Italien)
Blot Modul Xcel II	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA-Sequenzierung	sequiserve (Vaterstetten)
Eppendorf Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)
Kühlfalle	Saur (Reutlingen)
Lumi Imager F1	Roche (Basel, Schweiz)
Multipipette Pro	Eppendorf (Hamburg)
pH Meter	WTW (Weilheim)
Photometer UV Pharma Spec 1700	Shimadzu (Japan)
Pipetboy acu	IBS (Fernwald)
Pipetten P2, P10, P20, P200, P1.000	Gilson (Bad Camberg)
Pipettenspitzen, Eppendorf-Gefäße, Petrischalen	Greiner (Nuertingen)
Primer	Metabion, München
Proteingelkammer I9001-Xcell II Mini	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteingelkammer I9001-Xcell Sure Lock	Invitrogen (Karlsruhe)
Schüttelheizblock Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Schüttelheizblock Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Schüttelinkubator Multitron	Infors (Bottmingen, Schweiz)
Schüttelinkubator Thermocult	Selzer (Waghäusel)
Spektrophotometer RF 5301	Shimadzu (Japan)
Sterilbox BDK Uvb 6.12	Sonnenbühl (Gentingen)
Stromgeber E-Gel	Invitrogen (Karlsruhe)
Stromgeber Power Pac 1.000/500; Power Pac 200	Bio-Rad (München)
Thermocycler Master cycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Vakuum Konzentrator	Buchhofer (Reutlingen)
Wasserbäder Precitherm PVF	Clinicon International (Keltem)

2.6. Biologische Materialien

<i>E.coli</i> BL 21 pLysS	B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (_{r_B- m_B-}) <i>gal l</i> (DE3) [pLysS Cam ^r] ^a	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
<i>E.coli</i> TOP10F'	F' <i>mcrA</i> .(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> .M15. <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> .(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i> .	Invitrogen (Karlsruhe)
pBAD-TOPO	Linearisierter Vektor mit überhängender 3' Thymidin Base zur TA Klonierung von PCR Produkten. Der Vektor ist durch eine kovalent gebunden Topoisomerase I zum Einbau von PCR Produkten mit einzelnen 3'-überhängenden Desoxyadeninbasen vor- gesehen.	Invitrogen (Karlsruhe)
pIVEX2.3	<i>In vitro</i> Expressionsvektor zum Einsatz in allen zellfreien <i>E.coli</i> RTS Systemen. Der Vektor ist mit regulatorischen Elementen versehen, um ein C-terminal His ₆ - markiertes Protein zu exprimieren.	Roche (Basel, Schweiz)
pIVEX2.4	Der Vektor ist analog zu pIVEX2.3d auf- gebaut. Es wird ein N-termial His-getagtes Protein exprimiert.	Roche (Basel, Schweiz)

Die Vektoren pIVEX 2.3 und 2.4 dienen mit unterschiedlichen Genen in ihrer MCS als Templat für die PCR.

2.7. Oligodesoxynukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'---3')
Primer C	GAAA TTAATACGACTCACTATA GGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAAT AATTTTGTTTAACTTTAAG AAGGAGATATACC
Primer D	CAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGG TTGGGAGTAGAAT GTTAAGGATTAGTttatta
T7-Promotor Primer	GAAA TTAATACGACTCACTATA GGGAGACCACAACGGTTTC

T7-Terminator Primer	CAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGG
pBAD sequencing	ATGCCATAGCATTTTTATCC
Forward Primer	
(c)	GTGCAG
(d)	ATCA
(e)	TGCACGATC
(f)	GCACGATCA
1049 (a)	TGTTGAATAATATTTTCAT
1049 (b)	GGTGTTAGC
1049 (b ₁)	CGCGGTGTTAGC
1049 (g)	GGTGTTAGCTGTTGAATAATATTT
1049 (h)	TTAGCTGTTGAATAATATTT
CIITA (b)	CCCCAACTC
CIITA (b ₁)	GGGCCCCAACTC
CIITA (g)	CCCCAACTCAGAATATGTATATTTTC
CIITA (h)	AACTCAGAATATGTATATTTTC
1049 K8	TGTTGAATAATATTTTCAT
1049 WT	CGGCGCGGTGTTAGCCAT
Survivin K1	AGAATATGTATATTTTCAT
Survivin WT	CAACGTCTGGGGCACCCAT
CIITA K1	AGAATATGTATATTTTCAT
CIITA WT	TAGGGGCCCAACTCCAT
RBS-Sonde 2	TCTCCT

Bei den Primern C und T7-Promotor ist der T7-Promotor, bei den Primern D und T7-Terminator ist der T7-Terminator jeweils durch Fettdruck hervorgehoben. Beim Primer C ist die Ribosomenbindestelle durch Kursive- und Fettdruck gekennzeichnet. Der Überlappungsbereich der Primer C und D bei der zweiten PCR-Stufe (3.5.1) ist unterstrichen. Die für die zweistufige Amplifikation linearer Expressionskonstrukte (3.5.1) je Gen und je Variante notwendigen Primer A und B sind hier nicht beschrieben, weil ihr Aufbau unter 3.5.1 beschrieben ist und sich ihre jeweilige Sequenz durch Kombination der Sequenzelemente in Tab. 3 ergibt. Alle Oligodesoxynukleotide wurden bei Metabion (München) synthetisiert.

2.8. Puffer und Medien

10% Blockierlösung	Roche (Basel, Schweiz)
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE MES SDS-Laufpuffer (20x)	Invitrogen (Karlsruhe)
PCR Reaktionspuffer (10x)	Roche (Basel, Schweiz)
TBE-Laufpuffer (5x)	Invitrogen (Karlsruhe)
TBE-Proben-Puffer (2x)	Invitrogen (Karlsruhe)
TBE-Puffer (10x)	Roche (Basel, Schweiz)
TBST-Puffer (10x)	Roche (Basel, Schweiz)

2.9. Programme

Neben Standardcomputerprogrammen und Steuerungsprogrammen für Analysengeräte wurden im Rahmen der Arbeit folgende Computerprogramme verwendet:

Vector NTI Version 6	InforMax (North Bethesda, USA)
Lumi Analyst 3.1 Image Analysis Software	Roche (Basel, Schweiz)
<i>mfold</i>	http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold
RNAdraw	http://rnadraw.base8.se/
RNAviz	http://rrna.uia.ac.be/rnaviz/

3. Methoden

3.1. Methoden zur Nukleinsäure-Aufreinigung und -Analytik

3.1.1. Phenol-Extraktion von Nukleinsäuren

Aus wässrigen Lösungen von Nukleinsäuren können Proteine durch Phenol-Extraktion abgetrennt werden. Dabei werden die Proteine denaturiert, während die Nukleinsäuren gelöst in der wässrigen Phase verbleiben (Kirby, 1965).

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit dem gleichen Volumen wassergesättigtem Phenol pH 4-4,5 versetzt und durch intensives Schütteln (Vortexen) eine Emulsion gebildet. Eine 10-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und maximaler Umdrehungszahl (12.000 rpm) führte zur Trennung der Phasen. Die organische Phenolphase verbleibt unten, die Interphase zwischen Phenolphase und wässriger Phase enthält die denaturierten Proteine. Die wegen geringster Dichte oben aufschwimmende wässrige Phase enthält die gelösten Nukleinsäuren (Sambrook, 2001). Sie wurde sorgfältig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mittels Ethanol-Fällung aufkonzentriert.

3.1.2. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Die Ethanolpräzipitation dient vor allem der Konzentrierung von Nukleinsäuren nach vorhergegangenen Reinigungsschritten wie z. B. der Phenol-Extraktion. Bei der Ethanol-Fällung werden auch Salze entfernt, die überwiegend in Lösung bleiben.

Bezogen auf das Volumen der nukleinsäurehaltigen Lösung wurde das 0,1-fache Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 zugesetzt, und mit dem 2,5-fachen Volumen eisgekühlten Ethanols gemischt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 bis 4 Stunden bei -20°C, oder 2 Stunden bei -70°C, wurde der Fällungsansatz für 10 min bei 4 °C und 15.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend mit 70 % Ethanol (mit gleichem Volumen der Ausgangs-Nukleinsäure-Lösung) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl der Überstand verworfen.

Anschließend wurde das Sediment vor der Wiederaufnahme in wässriger Lösung 5 bis 15 min bei Raumtemperatur getrocknet (Sambrook, 2001).

3.1.3. Adsorption von Nukleinsäuren an Silicamembranen

Basis dieser Methode ist die Eigenschaft von Nukleinsäuren in Gegenwart eines chaotropen Salzes spezifisch an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen zu binden (Vogelstein und Gillespie, 1979). Durch die Gegenwart des chaotropen Salzes wird das geordnete Kluster der Wasser-

moleküle um die Nukleinsäure zerstört und somit die Nukleinsäure dehydratisiert. Damit wird die Affinität der Nukleinsäure zur Glasfaser- oder Silica-Oberfläche erhöht und führt zu deren Anlagerung. Es werden spezifisch nur Nukleinsäuren gebunden während Proteine und Lipide unter den für die RNA-Isolierung optimierten Pufferbedingungen in Lösung bleiben. Die RNA kann anschließend gewaschen und wieder eluiert werden. Damit ist für die Isolierung keine organische Extraktion und Ethanolpräzipitation notwendig.

Im Rahmen der Arbeit wurde der High Pure RNA-Isolation Kit verwendet. Die Herstellervorschrift wurde zur Reisolierung der mRNA aus dem *in vitro* Expressionssystem bei der mRNA-Stabilitätsuntersuchung (3.11) abgewandelt, da das Hersteller-Protokoll die Isolierung aus Kulturzellen, Blut, Hefen und Bakterien beschreibt. Der dafür notwendige Zellaufschluss wurde weggelassen und mit dem Einstellen der Bindungsbedingungen für die Adsorption der RNA an das Glasfaservlies begonnen.

Es wurde 1 Volumen RNA-haltige Lösung mit dem 2-fachem Volumen Lyse/Binde-Puffer [4,5 M Guanidiniumchlorid, 50 mM Tris-HCl und 30% Triton X-100 (w/v), pH 6,6 (25°C)] versetzt und auf eine Zentrifugationssäule überführt. Bei 8.000 x g (rcf) wurde 15 s zentrifugiert und dabei die RNA an das Säulenmaterial gebunden. Danach wurde die RNA jeweils mit 1 Volumen der mitgelieferten Waschpuffer (I [5 M Guanidiniumchlorid und 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25° C)]; II [20 mM NaCl und 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25° C)]) gewaschen. Dabei wurde jeweils bei 8.000 x g (rcf) für 15 s zentrifugiert und das Eluat verworfen. Anschließend wurde die RNA nochmals mit dem 0,4-fachem Volumen Waschpuffer II gewaschen und durch Zentrifugation bei 13.000 x g für 2 min das Glasfaservlies getrocknet, um die Reste des Waschpuffers zu entfernen. Zur Elution wurden 50 bis 100 µl H₂O_{PCR-grade} zugegeben, 1 min bei RT inkubiert, und die RNA dann durch Zentrifugation für 1 min bei 8.000 x g eluiert.

3.1.4. Reinigung der RNA mit Sephadex G-50-Zentrifugationssäulen

Basis dieser Methode ist die Reinigung einer Probe durch Gelfiltration im Zentrifugalfeld. Dabei werden Nukleinsäuren relativ zu ihrer Größe aufgetrennt. Kleine Moleküle wie nicht inkorporierte Nukleotide und Salze verbleiben in der Gelmatrix, während größere Moleküle (DNA, RNA oder Oligonukleotide) schneller durch die Matrix wandern. Die Methode wurde verwendet, um die mRNA nach der *in vitro* Transkription zu reinigen, bevor sie im *in vitro* Expressionssystem translatiert wurde. Außerdem wurde die Methode verwendet, um gegebenenfalls längere Oligonukleotide, die nach der Synthese entsalzt vorlagen, zu reinigen.

Die verwendeten RNA-Zentrifugationssäulen sind mit den Zentrifugationsschritten und Pufferbedingungen so eingestellt, dass sie ab einer Länge größer 20 Nukleotide eine Ausbeute eluierter Nukleinsäurepolymere von über 80 % erreichen. Dabei war ein Probenauftragsvolumen von 20 bis 75 µl möglich.

Zuerst wurde das Säulenmaterial durch invertieren resuspendiert und dann die Säule in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 min (1.000 x g) zur Pufferentfernung zentrifugiert. Anschließend wurde nach Auftragen von 300 µl H₂O_{dd} 3 min zentrifugiert (1.000 x g), um Salzreste von der Säule zu entfernen. Nach Verwerfen des Eluats folgte eine einminütige Zentrifugation zur Entfernung des Wassers aus der Säule. Anschließend wurden 20 bis 75 µl Probe aufgetragen, für 4 min zentrifugiert (1.000 x g) und die Nukleinsäure in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt.

3.1.5. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren wegen der π -Elektronensysteme der konjugierten Doppelbindungen in den aromatischen Ringen der Basen ultraviolettes Licht. DNA und RNA zeigen spezifisch ein Absorptionsmaximum bei 257 nm. Deshalb kann mit UV-Spektroskopie die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung ermittelt werden (Lotspeich, 1998).

Bei der Wellenlänge von 260 nm absorbieren bereits auch Verunreinigungen wie Proteine oder andere aromatische Substanzen. Das Absorptionsmaximum der Protein-Verunreinigung liegt jedoch nicht bei 260 nm, sondern durch die aromatischen Reste der Proteine bei 280 nm. Deshalb kann mit einer Referenzmessung und einer Verhältnisbildung der Absorptionswerte von 260 und 280 nm die Reinheit der Lösung bestimmt werden. Reine DNA ergibt dabei einen Quotienten von 1,8, während eine Verunreinigung durch Proteine und aromatische Verbindungen dieses Verhältnis zu kleineren Werten hin verschiebt. Reine RNA ergibt einen Quotienten größer oder gleich 2 (Lotspeich, 1998).

Basis der Konzentrationsermittlung ist die Absorption bei der Wellenlänge 260 nm. Sie bezieht sich auf das Lambert-Beer-Gesetz:

$$OD = \varepsilon \times c \times d$$

mit: ε = Extinktionskoeffizient der Substanz

c = Konzentration

d = Schichtdicke der Lösung (= 1 cm)

Im Absorptionsbereich von 0 bis 1 (geräteabhängiger Bereich) ist die Absorption durch Nukleinsäuren näherungsweise eine lineare Funktion der Konzentration der Lösung. Daraus

ergibt sich bei einer Absorption (oder bei Schichtdicke von 1 cm Optische Dichte (OD) genannt) von 1 eine Konzentration von doppelsträngiger DNA (dsDNA) von 50 µg/ml. Einzelsträngige DNA-Oligomere (ssDNA) besitzen bei gleicher Menge eine höhere Absorption, was als Hyperchromie bezeichnet wird. Sie haben dementsprechend bei einer Optischen Dichte von 1 eine Konzentration von 33 µg/ml. Für RNA ergibt eine Optische Dichte von 1 eine Konzentration von 40 µg/ml.

3.2. Elektrophoretische Methoden

Im Rahmen der Arbeit wurden unterschiedliche elektrophoretische Trennmethoden zur Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen verwendet, die native Agarosegelelektrophorese und die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese.

Grundsätzlich bestehen bei der elektrophoretischen Trennung von Nukleinsäuren Parallelen zur Trennung von Proteinen. Die Trennungen von Nukleinsäuren und Proteinen im elektrischen Feld laufen in den festen Trägermaterialien Agarose und Polyacrylamid ab. Allerdings besitzen die Nukleinsäuren, im Gegensatz zu den Proteinen, über einen sehr hohen pH-Bereich eine negative Ladung, die von den negativ geladenen Phosphat-Gruppen des Zucker-Phosphat-Rückrats stammt. Deshalb ist die Wanderung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld über einen weiten Bereich pH-unabhängig. Außerdem ist die Ladungsdichte über das Nukleinsäurefragment gleichmäßig verteilt, was ein relativ konstantes Verhältnis des Molekulargewichts zur Ladung bedeutet. Die Wanderung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld innerhalb der Gel-Matrix wird durch zwei Theorien beschrieben, die in der Realität beide zum Tragen kommen. Der *Ogston-Siebeffekt* beruht auf der Annahme, dass die Nukleinsäurefragmente in Lösung eine globuläre Form annehmen. Die unterschiedlichen Fragmente werden bei der Wanderung durch die Porenmatrix des Gels dadurch aufgetrennt, dass größere globuläre Fragmente öfter innerhalb der Poren der Gel-Matrix kollidieren als kleinere Fragmente und ihre Wanderung deshalb erschwert wird (Lotspeich, 1998). Die *Reptationstheorie* dagegen nimmt an, dass Nukleinsäuremoleküle im elektrischen Feld ihre globuläre Form aufgeben und sich entlang des Feldes ausrichten können. Die Moleküle „*schlängeln*“ sich demnach durch die Gel-Matrix und deren Trennung erfolgt dadurch, dass längere DNA-Moleküle dafür länger brauchen, als Kürzere (Lotspeich, 1998).

3.2.1. Native Agarosegelelektrophorese

Agarose ist die am meisten verbreitete Gelsubstanz zur Auftrennung von Nukleinsäuren, weil die Gele am einfachsten handhabbar und ungiftig sind. Agarosegele bestehen aus Galaktose-Einheiten, die durch Aufkochen in Wasser (35-95 °C) gelieren. Es entstehen Polysaccharidsol-Doppelhelices, die sich in Gruppen zu dicken Fäden anordnen und große Porengrößen schaffen. Je kleiner die zu trennenden Nukleinsäuremoleküle sind, um so höher wird die Agarose Konzentration gewählt (Tab. 1; üblicherweise 0,5 – 2 %).

Nach dem Probenauftrag wird eine Spannung angelegt. Die Nukleinsäuren wandern zur Anode und werden dabei entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist proportional zur angelegten Spannung (außer bei großen DNA-Molekülen, die mit zunehmender Spannung langsamer wandern). Zusätzlich verlangsamt die Gegenwart interkalierender Substanzen wie Ethidiumbromid die Laufgeschwindigkeit um ca. 15%. Für die Größenanalyse wird ein interner Längenstandard mit den Proben aufgetragen. Die Laufstrecke aller Fragmente ist weitgehend proportional zum dekadischen Logarithmus der Fragmentlängen (Helling *et al.*, 1974; Lotspeich, 1998). Durch Vergleich mit dem Längenstandard kann die Größe eines Fragments ermittelt werden.

Agarosekonzentration [% (m/v)]	Trennbereich von DNA-Fragmenten :
0,7	800 - 10.000
0,8	500 - 7.000
1,2	400 - 6.000
1,5	200 - 4.000
2,0	100 - 3.000

Tab. 1: Agarosekonzentrationen für Trennbereiche von DNA-Fragmenten

Die Agarosegelelektrophorese wurde im Rahmen des Projekts zur Prüfung der PCR-Produkte und zur Aufreinigung vor Klonierungen verwendet. Außerdem wurde mit der Methode auch mRNA teilweise analysiert.

Es wurden 1 % Agarose Gele mit 0,15 µl/ml Ethidiumbromid bei einem Volumen von 100 ml in TBE-Puffer verwendet. 6 µl der Amplifikate aus der PCR-Reaktion wurden mit 2 µl eines 10-fach konzentriertem BPB-Ladepuffer [5%(m/v) BPB – Natriumsalz; 50% Glycerol: 50% H₂O_{dd}] und 12 µl H₂O versetzt. Die Taschen des Agarosegels wurden je mit 10 µl dieser Mischung beladen. Der Ladepuffer enthält Glycerol, um die Dichte der Probe zu erhöhen, dass sie in den Taschen des Gels verbleibt und nicht herausgeschwemmt wird. Nach der Probenbeladung wurde eine Spannung von U = 120 V angelegt, und für 30 bis 35 min die

Elektrophorese spannungsbegrenzt durchgeführt. Dabei wurden die Fragmente im Bereich zwischen 400 und 1.500 bp aufgetrennt. Als Marker wurden die Molekulargewichtsmarker VII und VIII mit jeweils 1 µg/Spur verwendet. Nach dem Lauf wurde das Agarose Gel mit dem Lumi-Imager System fotografiert und gegebenenfalls die Produktmengen densitometrisch über die aufgetragenen Markermengen analysiert.

Um für die Klonierung einzelner PCR-Produkte ausschließlich das Zielfragment zu isolieren wurde ein wie bereits beschriebenes Agarosegel gegossen. Allerdings wurde ein präparativer Kamm mit größerem Fassungsvermögen eingesetzt (30 µl PCR-Produkt wurden mit 3,3 µl BPB-Ladepuffer (10 x) versetzt und aufgetragen). Nach der Elektrophorese wurden die Banden durch UV-Bestrahlung visualisiert und dabei die Zielfragmente mit einem Skalpell isoliert. Anschließend wurde die DNA aus der Agarose-Matrix mittels Gel-Extraktions-Kit nach Herstellerprotokoll reextrahiert.

Neben der „klassischen“ Agarosegelelektrophorese wurden auch Fertiggele (E-Gel[®] 1,2% bzw. 2%) eingesetzt.

Als Ladepuffer wurde 0,002% (m/v) Bromphenolblau-Lösung (H₂O_{PCR}) zur Probenverdünnung verwendet. Von einer PCR-Reaktion wurden 0,5 µl bei 10 µl Auftragsvolumen aufgetragen. Im Fall von mRNA wurden 200 ng/Spur (basierend auf der Konzentrationsbestimmung durch die Optische Dichte) verwendet. Der DNA-Marker VIII wurde mit 200 ng/Spur eingesetzt.

Die Elektrophorese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, und das Ergebnis der Trennung mit dem Lumi-Imager System analysiert.

3.2.2. Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese können im Allgemeinen Nucleinsäuren und Proteine analog den bereits beschriebenen Mechanismen aufgetrennt werden. Die Gele zeigen gegenüber den Agarosegelen eine besseres Auflösungsvermögen, eine höhere Beladungskapazität sowie eine größere Trennkapazität (Lotspeich, 1998).

Polyacrylamidgele sind klar, chemisch inert und bestehen aus quervernetztem Acrylamidmonomeren, mit einem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid. Als Polymerisationsstarter wird Amoniumpersulfat und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin) verwendet. Die Gele werden zwischen zwei Platten polymerisiert und die Elektrophorese findet in einer vertikalen Elektrophoresekammer unter wesentlich höheren Spannungsverhältnissen als bei der Agarosegelelektrophorese statt (Lotspeich, 1998).

Im Rahmen der Arbeit wurden ausschließlich denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Als Denaturierungsmittel wird Harnstoff eingesetzt, der die Wasserstoffbrückenbindungen höherer Nukleinsäurestrukturen stört und damit die Vereinheitlichung der Struktur verschiedener Nukleinsäuren bewirkt. Es werden Fragmente mit einer Genauigkeit bis zu ± 3 Nukleotide (nt) aufgetrennt (Invitrogen, 2002). Als Denaturierungsmittel bei der Proteinauftrennung (SDS-PAGE) wird Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Dadurch werden höhere Strukturen in Proteinen aufgebrochen und die Polypeptidketten in eine gestreckte Konformation gezwungen. Es lagert sich SDS in einem einigermaßen konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS je 1 g Polypeptid an. Die negative Ladung von SDS überlagert die Eigenladung des Polypeptids und führt zu einer einheitlichen negativen Gesamtladung des SDS-Protein-Komplexes. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Komplexes im elektrischen Feld hängt dann nur noch von der Ladung proportional zur Molekülgröße ab. Zwischen der relativen Mobilität des Proteins und dem Logarithmus des entsprechenden Molekulargewichts besteht ein linearer Zusammenhang (Weber und Osborn, 1969). Aus diesem kann das tatsächliche Molekulargewicht näherungsweise bestimmt werden.

3.2.2.1. Polyacrylamidgelelektrophorese von Nukleinsäuren

Für die Analyse von Nukleinsäuren wurden denaturierende 6 % und 15 % TBE-Harnstoffgele [7 M] der Fa. Novex in Kombination mit dem Novex-Gelelektrophoresesystem verwendet.

Als Molekulargewichtsmarker wurde der RNA-Molekulargewichtsmarker III mit 50 ng/Spur verwendet. Für die Analyse kleinerer Fragmente (im 15% TBE-Harnstoffgel) wurde der RNA-Molekulargewichtsmarker III (50 ng/Spur) mit einer Auswahl an Oligonukleotiden (75 ng/Spur) gemischt und verwendet.

Oligonukleotidmarker:	RNA-Marker III
125	1517
87	1049
67	575
57	483
46	310
27	
21	
15	

Tab. 2: Fragmentgrößen [nt] des verwendeten Oligonukleotidmarkers und des RNA-Markers III

Es wurde wegen der Färbemethode (3.2.3.2) eine höhere Oligonukleotidmenge verwendet, da die Affinität von SYBR Green II zu RNA um den Faktor 1,5 größer ist als zu DNA (3.2.3.2). Deshalb werden 75 ng DNA/Spur verwendet, weil sie ein zu 50 ng RNA/Spur vergleichbares Signal ergeben.

Die Fertiggele wurden in die Gelkammer vertikal eingesetzt und die Kammer mit 500 ml TBE-Laufpuffer (Invitrogen, 2002) aufgefüllt. Während des Vorlaufs bei $U = 180 \text{ V}$ für $t = 15 \text{ min}$ wurden die Proben bei $T = 70 \text{ °C}$ für 5 min im TBE-Proben-Puffer (Invitrogen, 2002) denaturiert. Anschließend wurden die Taschen des Polyacrylamidgels vom Harnstoff freigespült, die Proben mit einer Menge von 50 bis 350 ng/Spur beladen und die Gelelektrophorese spannungsbegrenzt bei $U = 180 \text{ V}$ durchgeführt. 6% TBE-Harnstoffgele hatten eine Laufzeit von 45 min, während sie für 15% TBE-Harnstoffgele 75 min betrug.

Nach der Elektrophorese wurden die Gelkammern zerlegt und die Gele mit SYBR-Green II nachgefärbt (siehe 3.2.3.2).

3.2.2.2. Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Zur Analyse der Proteinexpression wurden denaturierende 4-12% Bis-Tris-Gele verwendet. Die Gele basieren nach Herstellerangaben mit einigen Abweichungen auf dem Elektrophoresesystem nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Fertiggele haben einen pH-Wert von 8,5 im Gegensatz zum pH der klassischen Laemmli-Gele, bei denen eine Sammelgel mit pH 6,8 und ein Trenngel mit pH 8,8 verwendet wird. Während des Laufs bleibt bei den Bis-Tris-Gelelen durch den MES-Puffer der pH-Wert über 7 (im Gegensatz zu den Laemmli-Gelelen, der auf pH 5,2 absinkt) und verhindert damit die Spaltung von Aspartyl-Prolyl-Peptidbindungen bei niederem pH (Rittenhouse und Marcus, 1984). Der Trennbereich der 4-12% Bis-Tris-Fertiggele liegt zwischen 2,5 und 200 kDa.

Als Molekulargewichtsmarker wurde für die Analysen der Multi-Tag-Marker [6,5 $\mu\text{l}/\text{Spur}$] verwendet, weil dieser Marker His₆-Epitope für die Antikörper-Detektion nach einem Western Blot Transfer besitzt.

Die Proben (1 bis 2 $\mu\text{l}/\text{Spur}$ aus einer *in vitro*-Expression (3.7)) wurden mit 10-fach konzentriertem Reduktionsmittel (DTT) auf 0,05 M DTT eingestellt, SDS-haltiger Probenpuffer zugesetzt und mit H₂O auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Anschließend wurde die Mischung bei 70°C für 10 min denaturiert. Die Taschen des Gels wurden beladen und die Gelelektrophorese spannungsbegrenzt bei $U = 200 \text{ V}$ für 35 min durchgeführt.

3.2.2.3. Western Transfer und His₆-Tag-Detektion

Nach der Proteingelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels Elektroblob auf eine PVDF-Membran transferiert. Das Verfahren wurde im gleichen System wie die Elektrophorese durchgeführt und folgte den Herstellerangaben. Es wurde die Spannung in der Kammer so angelegt, dass die negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel in Richtung Anode wandern. Auf Anodenseite des Gels war die PVDF Membran platziert, so dass die Proteine auf die Membran transferiert wurden.

Der Elektroblob wurde im Transferpuffer [25 mM Tris; 192 mM Glycin in 20 % (v/v) Methanol] bei $U = 30 \text{ V}$ für $t = 1,5 \text{ h}$ durchgeführt. Danach wurde die Membran für mindestens 1 h in 10% Blockierlösung bei Raumtemperatur geschüttelt, zweimal für je 2 min in TBST-Puffer gewaschen und bei Raumtemperatur mit einer 1:4.000 Verdünnung Anti-His₆-POD-MAK TBST-Puffer für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut 4 mal je 2 min mit TBST-Puffer gewaschen, in einer Entwicklungsfolie platziert und mit Chemilumineszenz-Substrat versetzt. Das Substrat wurde von der Peroxidase, die mit dem am His₆-Tag gebundenen Antikörper assoziiert war, umgesetzt, und das resultierende Chemilumineszenz-Signal im Lumi-Imager System analysiert.

3.2.3. Färbung von Nukleinsäurefragmenten bei/nach der Elektrophorese

3.2.3.1. Färbung mit Ethidiumbromid

Um die bei der Elektrophorese entstanden Nukleinsäurebanden zu visualisieren wurde Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid ist dem Agarosegel bereits beim Giessen aus einer Stock-Lösung zugesetzt worden. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren und entwindet dabei doppelhelikale Bereiche ein wenig. Bei Bestrahlung mit UV-Licht absorbiert das Ethidiumbromid bei 300 bzw. 360 nm und emittiert rot-oranges Licht bei 560 nm. Damit werden die Banden als konzentrierte Ansammlung von interkalierendem Ethidiumbromid sichtbar und sind entsprechend der DNA-Konzentration und der Fragmentgröße (kurze Fragmente interkalieren weniger Ethidiumbromid als lange Fragmente) mehr oder weniger kontrastreich zu sehen. Mit Ethidiumbromid können DNA-Mengen bis 5 ng sichtbar gemacht werden. Für RNA ist die Nachweisempfindlichkeit geringer.

3.2.3.2. Färbung von RNA mit SYBR Green II

Um die RNA nach der Elektrophorese zu visualisieren wurde SYBR Green II verwendet (Sigma, 1998; Spiess, 1999). RNA hat eine höhere Bindungskapazität (~ 0.54) für SYBR Green II als doppelsträngige DNA (~ 0.36). Daraus ergibt sich eine um den Faktor 1,5 stärkere Affinität von SYBR Green II zu RNA als zu DNA (Sigma, 1998).

SYBR Green II besitzt ein Fluoreszenzanregungsmaximum von 497 nm und ein Emissionsmaximum bei 520 nm. Damit sind Banden nach der Elektrophorese als konzentrierte Ansammlung von gebundenem SYBR Green II sichtbar, und sie sind entsprechend der RNA-Konzentration und der Fragmentgröße (kurze Fragmente binden weniger SYBR Green II als lange Fragmente) zu sehen. Die Detektionsgrenze in nicht denaturierenden Gelen wird bei 500 pg/RNA-Bande vom Hersteller angegeben.

Es wurde eine Färbelösung angesetzt, indem der SYBR Green II-Stock in 1x TBE-Puffer verdünnt wurde. Die Färbelösung sollte im Dunkeln eingesetzt werden, da SYBR Green II lichtempfindlich und pH-sensitiv (optimal pH 8,0) ist. Die Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese in einer Kunststoffschale mit der Färbelösung überschichtet und für 20 bis 45 min unter Lichtausschluss auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert und mit dem Lumi-Imager System analysiert. Nach der Färbung kann die Färbelösung in einer dunklen Flasche bei 4°C gelagert und drei bis vier mal wiederverwendet werden (Sigma, 1998).

Zur Quantifizierung von RNA-Banden wurde in jeder Spur der Bereich direkt unterhalb der Zielbande als Leerwert verwendet und so die gemessenen Intensität um den Hintergrund bereinigt.

3.3. Zellanzucht von *Escherichia coli* Bakterien

Zur Zellanzucht und zur Selektion Plasmidhaltiger Stämme, die hier alle eine Ampicillin-Resistenz auf dem Zielplasmid trugen, wurde LB-Medium [10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7.0] mit Carbenicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Carbenicillin wurde anstelle von Ampicillin verwendet, weil es die gleichen wachstumshemmenden Charakteristiken zeigt wie Ampicillin, aber länger stabil bleibt.

Die *E. coli* Bakterien wurden in einem Volumen von 3 ml entweder vom LB-Festmedium als Einzelkolonie mit einer Pipettenspitze oder direkt aus einem bei -70 °C gelagertem Glycerol-Stock angeimpft und bei 37°C (230 min^{-1}) im Schüttelinkubator 12 h inkubiert. Für die Langzeitlagerung der Bakterien wurden von der Übernachtskultur 100 µl in 900 µl steril filtrierte Glycerol-Wasser-Lösung (50 %) gegeben, und bei -70 °C gelagert.

Zur Selektion von Einzelkolonien wurde aus LB-Medium Festmedium hergestellt, indem dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 g/L Agar zugesetzt wurde. Nach dem Autoklavieren wurde nach Abkühlen der Lösung auf ca. 55 °C Carbenicillin [100 µg/ml] zugesetzt und die Lösung in Petrischalen portioniert. Nach dem Gelieren des Mediums wurden die Platten bei +4 °C gelagert.

3.4. Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit isoliert. Alle Reaktionsschritte wurden bei Raumtemperatur und in einer Tischzentrifuge durchgeführt. Dabei wurden Bakterien aus 2 ml Flüssigkultur über Zentrifugation (12.000 rpm) pelletiert und die Isolation der Plasmid-DNA aus den pelletierten Zellen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Bei der Isolation wurden die Zellen durch Zugabe verschiedener Puffer alkalisch lysiert (NaOH/SDS/RNase A-haltiger Puffer). Anschließend wurden Hochsalzbedingungen eingestellt, wobei Proteine denaturierten und chromosomale DNA sowie SDS ausfielen, während kleine Plasmid-DNA in Lösung geblieben ist. Die Plasmid-DNA wurde anschließend an eine Silicamembran gebunden (siehe auch 3.1.3) und gewaschen. Zur Elution wurden 50 µl H₂O_{PCR} auf die Membran gegeben, diese 1 min inkubiert, und die DNA dann durch Zentrifugation bei Nidrigsalzbedingungen eluiert.

3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit auf Basis einer DNA-Matrize (mit geringer Konzentration) spezifische DNA-Abschnitte zu amplifizieren (Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Faloona, 1987). Dabei wird der zu amplifizierende Bereich durch die sequenzspezifische Hybridisierung von zwei Oligonukleotiden (Primern) markiert. Der Bereich zwischen den beiden Primern wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in Gegenwart aller dNTPs in sich wiederholenden Temperaturzyklen exponentiell vervielfältigt.

3.5.1. Zweistufige Amplifikation linearer Expressionskonstrukte

Zur bakteriellen Proteinexpression im *in vitro* Expressionssystem wurden lineare Expressionskonstrukte mittels PCR amplifiziert (Watzel M., 2001). Die Konstrukte wurden in zwei PCR-Stufen aufgebaut (Abb. 7, B,C) und dabei die bakteriellen Regulationselemente an die Gensequenz angefügt (Abb. 7, A). Zur Detektion der Zielproteine wurden die Konstrukte mit einem c-terminalen Hexa-Hisitidin-Ende versehen, an das der spezifische Antikörper bei der Western Blot Analyse (3.2.2.3) bindet. Damit wird spezifisch das Zielprotein detektiert.

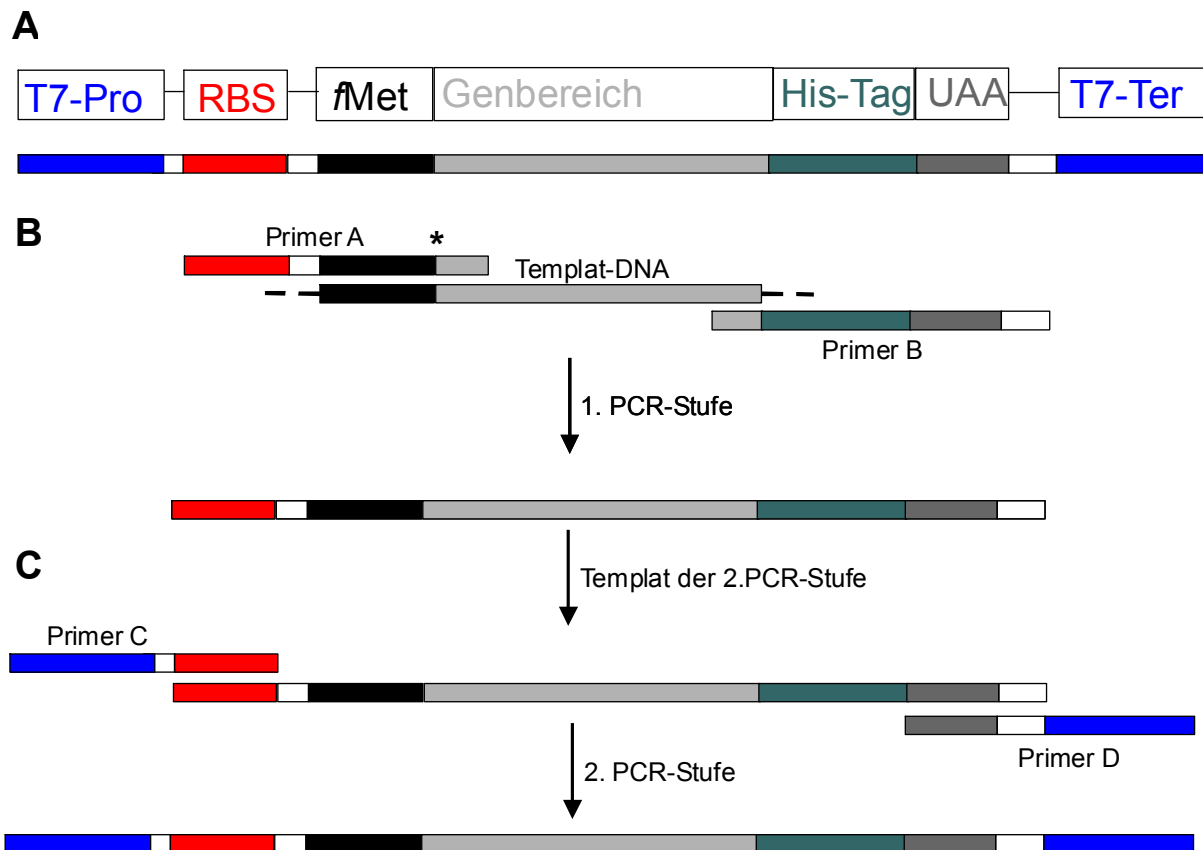


Abb. 7: **A:** Regulatorische Elemente eines bakteriellen Expressionskonstrukts. **B/C:** Schema des Aufbaus eines linearen Expressionskonstrukts in zwei PCR-Stufen.

In der ersten PCR-Stufe (Abb. 7, B) wurden auf der 5'-Seite der Gensequenz die Ribosomenbindestelle (RBS) bzw. die SD-Sequenz mit dem folgenden Start-Kodon und auf der 3'-Seite der Gensequenz der His₆-Tag und das Stop-Kodon (UAA) mit den Primern A und B angefügt. Für die Amplifikation der Wildtyp-Konstrukte wurde in der ersten PCR-Stufe die Gensequenz direkt nach dem Start-Kodon fusioniert (Tab. 3, A). Für die Amplifikation der RNA-Stem-Loop-Varianten wurden jeweils andere A-Primer verwendet (Tab. 3, C), die zwischen das Start-Kodon und dem Strukturgen eine AT-reiche Sequenz (Tab. 3, B) und einen idealen RNA-Stem-Loop-Sequenz (RST L₇: **CTGCACGTGATCGTG**CAG) einfügten (die Hybridisierungsbereiche sind grau hinterlegt). Die Position, an der die AT-reichen Sequenzen mit der RNA-Stem-Loop-Sequenz über den Primer A fusioniert wurden, sind in Abb. 7 (B) gekennzeichnet (*).

Im Folgenden wird der Begriff „RNA-Stem-Loop“ mit RST abgekürzt. Für weitere Kontrollversuche (4.1.3.1, 4.1.3.2) wurden noch weitere RST-Sequenzen anstelle der oben gezeigten Sequenz (Stammlänge von 7 bp: RST L₇) in den A-Primern verwendet. Ihre Sequenzen sind in Tab. 3 (D) gezeigt. Auf den obigen RST mit Stammlänge von 7 bp wird im Folgenden Be-

zug genommen. Deshalb sind nur andere Stammlängen nach der Abkürzung (RST) mit der Abkürzung der Stammlänge (L_x) explizit angegeben.

Mit den Primern C und D wurde dann die T7-Promotor und die T7-Terminator Sequenz in der zweiten PCR-Stufe angesetzt.

A

Gen	Ursprungs-Organismus	Accession number	Genspezifischer Forward Primer	Genspezifischer Reverse Primer	Molekulargewicht des Proteins [kDa]
1049	Humanes cytomeglio Virus	M17209	GCTAACACCGCG	GCGCCGGGTGCGCGA	9,3
Survivin	Human	NM001168	GGTGCCCCGACG	ATCCATGGCAGCCAGC	17,2
CIITA	Human	U18259	GAGTTGGGGCCC	AGAACCCCC	44
L30 r.p.	Human	m94314	AAGGTCGAGCTG	GCGTTTTCCACCAAC	18
S4X isoform r.p.	Human	m58458	GCTCGTGGTCCC	GCCCACTGCTCTGTTTGG	30
GFP	Aequorea victoria	U73901	ACTAGCAAAGGA	AGAACCCCCCCC	28
Tubulin	Human	J00314	AGGGAAATCGTG	ATGAGAACCCCC	50

B

1: Lys- Tyr- Thr- Tyr -Ser1 AAATATACATATTCT	6: Lys- Thr- Tyr- Tyr-Ser2 AAAACATATTATTCA
2: Lys- Thr- Tyr- Tyr -Ser1 AAAACATATTATTCT	7: Lys- Tyr-Ser2- Tyr- Thr AAATATTCATATACA
3: Lys- Tyr-Ser1-Tyr - Thr AAATATTCTTATACA	8: Lys- Tyr- Tyr-Ser2- Thr AAATATTATTCAACA
4: Lys- Tyr- Tyr-Ser1- Thr AAATATTATTCTACA	9: His- His- His- His- His CATCATCATCATCAT
5: Lys- Tyr- Thr- Tyr-Ser2 AAATATACATATTCA	

C

Forward Primer-A:

AGGAGATATACCATG-(*AT-reiche Kombination(B)*)-(RST(D))-(genspezifischer Forward Primer (A))

Reverse Primer-B:

ATTCGCCTTTTATTATTA-(*His₆-tag*)- (genspezifischer Reverse Primer (A))

D

RST L ₉ :	CAGACAAATAGATATTTGTCTGTA
RST L ₈	CGTGCACGTGCATCGTGCACG
RST L ₇	CTGCACGTGATCGTGCAG
RST L ₆	CGCACGTGCATCGTGCGA
RST L ₅	CGCCGTGCATCGGCC
RST L ₄	GCCGTGATCGGC
RST L ₃	GCGTGCATCGCA
RST L ₂	CGTGCATCG

Tab. 3: **A:** Liste der exprimierten Gene. Die Primerpaare zeigen den genspezifischen Bereich, der auf dem Templat bei der ersten PCR hybridisiert. **B:** Liste der verwendeten AT-reichen Kombinationen **C:** Aufbau der Primer für die erste PCR, um die RST-Varianten zu amplifizieren. Die eingeführte Überlappungsregion für die Hybridisierung der Primer C, D bei der zweiten PCR sind unterstrichen. Die AT-reiche Kombination (B) wurde direkt nach dem Start-Kodon positioniert, gefolgt von der RST-Sequenz und dem genspezifischen Forward Primer (A). Der Wildtyp wurde amplifiziert, indem der genspezifische Forward Primer (A) ohne AT-reiche Sequenz und RST-Sequenz verwendet wurde. **D:** verwendete RST-Varianten mit gekennzeichnete Stammlänge.

Die PCR-Reaktionen wurden mit 50 µl Reaktionsvolumen in einem Thermocycler durchgeführt. Die Zusammensetzungen der Reaktionskomponenten (Tab. 4, A) sowie der jeweiligen Reaktionsbedingungen (Tab. 4, B) sind für die beiden PCR-Stufen in Tab. 4 zusammengestellt. Die Reaktionskomponenten der beiden PCR-Stufen wurden jeweils zu gleichen Mengen verwendet. Einziger Unterschied war, dass bei der ersten PCR-Stufe 50 ng Plasmid-DNA als Templat eingesetzt wurde, und in der zweite PCR-Stufe 2 µl der ersten PCR als Templat verwendet wurde. Nach den jeweiligen PCR-Stufen wurden die Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Mengen der linearen Expressionskonstrukte der zweiten PCR-Stufe wurden mit dem Lumi-Imager System densitometrisch über Vergleich mit einer DNA-Bande des DNA-Markers VIII abgeschätzt und 100 ng in eine *in vitro* Expressionsreaktion eingesetzt.

A

Reaktionskomponente	Endkonzentration
DNA-Templat	50 ng/2 μ l (PCR 1)
Primer	0,4 μ M
HiFi DNA-Polymerase	2,8 U
Nukleotidmischung (dNTP)	10mM jeweils
MgCl ₂	1,5 mM
Reaktions-Puffer (10x)	1x

B

1. PCR

Bedingungen:	T	t
1. Denaturierung	95	5 min
Zyklen: 20		
Denaturierung	95	1 min
Primer Anlagerung	55	1 min
Primer Verlängerung	72	1 min
Finale Verlängerung		

2. PCR

Bedingungen:	T[°C]	t
1. Denaturierung	95	5 min
Zyklen: 30		
Denaturierung	95	1 min
Primer Anlagerung	50	1 min
Primer Verlängerung	72	1 min
Finale Verlängerung	72	10 min

Tab. 4: Reaktionskomponenten (A) und Reaktionsbedingungen (B) bei der zweistufigen PCR.

3.5.2. Einstufige Amplifikation linearer Expressionskonstrukte

Die linearen Expressionskonstrukte wurden nach der zweistufigen Amplifikation in pBAD-TOPO-Vektoren kloniert (3.6). Um von den daraus isolierten Plasmiden wieder lineare Expressionskonstrukte zu erhalten und um die Insertion bei der Klonierung zu prüfen, wurden diese mit dem Primerpaar T7-Promotor und T7-Terminator in einer einstufigen PCR amplifiziert. Die Reaktionsbedingungen und -zusammensetzungen entsprachen denen der unter 3.5.1 beschriebenen zweiten PCR-Stufe, mit der Ausnahme, dass die Temperatur für die Primeranlagerung bei 60 °C gewählt wurde. Die so amplifizierte linearen Expressionskonstrukte wurden ebenfalls mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und für *in vitro* Transkriptionen als DNA-Templat verwendet (3.9).

3.6. DNA-Rekombination *in vitro*

Die mittels PCR generierten linearen Expressionskonstrukte wurden mit dem pBAD-TOPO Klonierungssystem ligiert und transformiert. Der pBAD-TOPO-Vektor wurde verwendet, weil er selbst keinen T7-Promotor/Terminator besitzt. Damit wurden Interferenzen bei der *in vivo* Proteinexpression von einem vektorbasierenden T7-Promotor/Terminator mit dem durch das PCR-Produkt eingebrachten T7-Promotor/Terminator vermieden, so dass bei der *in vivo* Proteinexpression nach Induktion gleiche messenger RNA-Moleküle wie von linearen Ex-

pressionskonstrukten bei der gekoppelten *in vitro* Transkription/Translation transkribiert wurden.

Die korrekte Insertion bei der Klonierung wurde zweifach überprüft, einerseits mittels einstufiger PCR unter Verwendung der T7-Promotor/Terminator Primer (3.5.2), andererseits wurde die *in vitro* Expression (3.8) der so erhaltenen linearen Expressionskonstrukte mit den *in vitro* Expressionsergebnissen der zweistufigen Konstrukte abgeglichen. Nicht exprimierbare linearen Wildtyp-Konstrukte aus der einstufigen PCR wurden mittels DNA-Sequenzierung verifiziert. Die so gesammelten Plasmide wurden als Templat für die einstufige PCR-Amplifikation linearer Expressionskonstrukte (3.5.2) und, nach deren Transformation in einen Expressionsstamm (3.6.3), für die *in vivo* Expression (3.7) verwendet.

3.6.1. Ligation von PCR-Produkten in pBAD-TOPO-Plasmide

Die in der PCR verwendete Taq-DNA-Polymerase (3.5) besitzt eine templatunabhängige terminale Transferaseaktivität, die einen 3'-Deoxyadenosin-Überhang an jedem der Einzelstränge der dsDNA des PCR-Produkts anfügt. Als Gegenstück besitzt der TOPO-Vektor überhängende 3'-Desoxythymidinreste an der Ligationsstelle.

An den 3'-Enden des Vektors ist die Topoisomerase I gebunden. Ihre Phosphotyrosylbindung (Tyr 274) konserviert die Energie der ursprünglich aufgebrochenen Phosphodiesterbindung der DNA. Dadurch kann die 5'-Hydroxy-Gruppe des PCR-Produkts die Phosphotyrosylbindung zur Topoisomerase verdrängen, die ursprüngliche Spaltung der DNA rückgängig machen und die Topoisomerase freisetzen (Invitrogen, 2001).

Die Ligationsansätze wurden in einem Volumen von 6 µl durchgeführt. 2µl PCR Produkt und 1 µl pBAD-TOPO-Vektor wurden auf die benötigten Salzbedingungen [200 mM NaCl; 10 mM MgCl₂] eingestellt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bis zur Transformation auf Eis gelagert.

3.6.2. Transformation in kompetente Top 10 *E. coli*

Nach der Ligation der PCR-Produkte in den pBAD-TOPO-Vektor wurde das Plasmid in kompetente *E. coli* Bakterien, die mit dem pBAD-TOPO Cloning Kit geliefert wurden, transformiert. Dafür wurden 2 µl des Ligationsansatzes ohne Mischen zu den chemisch kompetenten Zellen (TOP10 *E. coli*) gegeben und der Ansatz 5 bis 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 30 s bei 42 °C inkubiert (Wasserbad) und schnell auf Eis gestellt. Es wurden 250 µl SOC-Medium [20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂] zugegeben und die Bakterien für 1 h bei 37 °C im Schüttelheiz-

block (200 rpm) inkubiert. Von der Transformationslösung wurden 50 bis 200 μl auf LB-Festmedium (3.3) zur Selektion von Einzelkolonien ausplattiert.

3.6.3. Transformation in *E. coli* BL 21 pLysS

Um die isolierten Plasmide, die ein kloniertes lineares Expressionskonstrukt enthielten, für *in vivo* Expressionsanalysen (3.7) zu verwenden, wurden die Plasmide in den Expressionsstamm *E. coli* BL 21 pLysS, der eine induzierbare T7-RNA-Polymerase besitzt, transformiert.

Für die Transformation wurden 200 μl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 3,4 μl β -Mercaptoethanol versetzt und vorsichtig gemischt. Je Ansatz wurde ein Volumen von 25 μl der Zellen verwendet. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und alle 2 min vorsichtig gemischt. Nach Zugabe der Plasmidlösung (1 μl aus einer Plasmidpräparation) wurden die Zellen zuerst 30 min auf Eis, dann für 1 min bei 42°C und anschließend wieder 2 min auf Eis inkubiert. Dem Ansatz wurde 200 μl auf 42°C temperiertes SOC-Medium (3.6.2) zugegeben, und der Ansatz bei 37°C für 1 h im Thermoheizblock (1.000 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Festmedium (3.3) mit dem zusätzlichem Antibiotikum Chloramphenicol [34 mg/ml] ausplattiert und für 12 h bei 37°C inkubiert.

3.7. Bakterielle Proteinexpression (*in vivo*)

Für Untersuchungen der *in vivo* Proteinexpression von unterschiedlichen Expressionskonstrukten wurden die pBAD-Plasmide dieser klonierten linearen Expressionskonstrukte (3.6) verwendet.

Zuerst wurden die Orientierungen der insertierten linearen Expressionskonstrukte im Plasmid überprüft. Es wurden nur Expressionskonstrukte in ihren Genvarianten verglichen, die gleich orientiert waren, um eventuelle auf Orientierung basierende Expressionsunterschiede auszuschließen. Die Orientierung der Expressionskonstrukte im Plasmid wurde mittels PCR-Analyse unter Verwendung des pBAD Sequenzierungs „Forward“-Primers und des jeweiligen genspezifischen Reverse Primers (Tab. 3) analysiert. Die Bedingungen der PCR-Analyse entsprachen denen der ersten PCR-Stufe bei der zweistufigen Amplifikation linearer Expressionskonstrukte (3.5.1).

Gleich orientierte Plasmide wurden nach dem unter 3.6.3 beschriebenen Transformationsprotokoll in den Expressionsstamm *E. coli* pB21 pLysS transformiert. Vom LB-Festmedium wurden positiv transformierte Einzelkolonien isoliert, jeweils eine Flüssigkultur [4 ml LB-Medium: 125 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin; 34 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol] angeimpft und die Kulturen bei 37°C (230 min^{-1}) inkubiert. Als die Flüssigkultur nach ca. 5 h bis zu einer Zelldichte von

ca. 10^8 Zellen/ml angewachsen war, wurde die T7-RNA-Polymerase mit IPTG [1 mM] induziert und die Expression der Zielproteine bei 37°C (230 min^{-1}) für weitere 2 h durchgeführt. Da der pBAD-Vektor keinen T7-Promotor besitzt, wurde ausschließlich der mit dem linearen Expressionskonstrukt eingeführte T7-Promotor als Transkriptions-Start verwendet. Damit wurde die gleiche mRNA, wie bei der *in vitro* Proteinbiosynthese der linearen Expressionskonstrukte (3.5.1) transkribiert.

Die Kulturen wurden auf Proteinbiosynthese der Zielproteine hin untersucht, indem 1 ml der Zellsuspension pelletiert (3 min 14.000 rpm), in SDS-Probenpuffer (150 μl) wieder aufgenommen, und davon anschließend 10 μl mittels Polyacrylamidgelelektrophorese, Western Blot Transfer und His₆-Tag-Detektion analysiert wurden.

3.8. Proteinbiosynthese *in vitro*

Das *in vitro* Expressionssystem RTS 100 HY wurde verwendet, um die Expression der unterschiedlichen linearen Expressionskonstrukte (3.5) zu analysieren. Das System basiert mit einigen Modifikationen auf der Methode nach Zubay *et.al* (Zubay, 1973).

Der Expressions-Kit wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Zuerst wurden die Lyophilisate der Einzelkomponenten rekonstituiert. Für eine 50 μl -Reaktion wurden 12 μl Aminosäuremischung, 1,25 μl N-formyl-Methionin, 10 μl Reaktionsmischung, 4,75 μl Rekonstitutionspuffer, 12 μl *E. coli*-Lysat und 100 ng lineares Expressionskonstrukt mit RNase-/DNase-freiem H₂O auf 50 μl eingestellt. Für die entkoppelte Translation von mRNA wurden 2 μg mRNA als Templat eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden vom Expressionsansatz 0,1 bis 1 μl /Spur mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.2.2.2), Western Blot Transfer His₆-Detektion (3.2.2.3) analysiert.

3.9. Transkription *in vitro*

Um die mRNA der entsprechenden Genvarianten zu synthetisieren wurde die DNA-abhängige RNA-Polymerase des T7-Phagen eingesetzt. Damit wurde die mRNA separat transkribiert, um sie für Translations- (3.8), Struktur- (3.10) und Stabilitätsuntersuchungen (3.11) einzusetzen.

Die Reaktion verläuft prinzipiell wie im gekoppelten System. Die T7-RNA-Polymerase benötigt neben der DNA-Matrize für ihre Aktivität Mg^{2+} und wird durch Spermidin stimuliert. Als DNA-Matrize dienten einstufige lineare PCR-Produkte (3.5.2), die an den 5'- und 3'-Enden den T7-Promotor bzw. T7-Terminator als Start bzw. Stop-Signal für die Transkription enthielten. Mit diesen linearen DNA-Expressionskonstrukten wurde eine sogenannte „run-

off^c Transkription (Resto *et al.*, 1992) durchgeführt, bei der die gleiche mRNA wie bei der gekoppelten Proteinbiosynthese (3.8; 3.7) entstanden ist. Damit war die Vergleichbarkeit gegeben.

Die Reaktionskomponenten wurden wie in Tab. 5 beschrieben verwendet, und der Ansatz für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Nach der Transkriptionszeit wurde 1 U/μl DNase I zum Abbau der DNA-Matrize zugesetzt, und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die mRNA mittels Phenol-Extraktion (3.1.1) isoliert und durch Ethanolpräzipitation aufkonzentriert (3.1.2). Die Transkriptmengen und die Reinheit der Lösungen wurde photometrisch (3.1.5) bestimmt, und die Größe und Reinheit der mRNA wurde abhängig von der Transkriptlänge mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (3.2.2.1) oder nativer Agarosegelelektrophorese (3.2.1) überprüft.

Reaktionskomponenten	Endkonzentrationen
DNA	5 bis 25 ng/μl
Nukleotide	
dATP	1,5 mM
dCTP	1,5 mM
dUTP	1,5 mM
dGTP	1,5 mM
Transkriptionspuffer	
Tris-HCl, pH 8,0 (20° C)	40 mM
MgCl ₂	6 mM
Dithiothreit	10 mM
Spermidin	2 mM
T7-RNA-Polymerase	1 U/μl

Tab. 5: *In vitro* Transkriptionsansatz mit der T7-RNA-Polymerase

3.10. RNA-Strukturuntersuchung mit der RNase H

Für die Untersuchung spezifischer mRNA-Sekundärstrukturen wurde das Enzym RNase H verwendet, weil so auch in größeren mRNAs Zielsequenzen untersucht werden konnten.

Die Aktivität der RNase H ist als spezifischer Abbau des RNA-Strangs in DNA-RNA-Doppelsträngen beschrieben (Robertson und Dunn, 1975). Damit wird die gezielte sequenzspezifische Abspaltung von RNA-Fragmenten nach vorheriger Oligonukleotidhybridisierung ermöglicht. Abhängig von der Zugänglichkeit der RNA-Sekundärstruktur werden ungepaarte RNA-Bereiche durch die Hybridisierung des spezifischen Oligonukleotids für den RNase H

Abbau markiert, während strukturell gebundene RNA-Bereiche schlechter oder gar nicht durch die Oligonukleotidhybridisierung für den RNase H-Abbau markiert werden (Donis-Keller, 1979; Gunzl *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 1999).

Es ist beschrieben, dass für die Oligonukleotidmarkierung der RNA zum spezifischen RNase H-Abbau bereits eine Oligonukleotidlänge ab 4 nt ausreichend ist, aber im Allgemeinen eine Länge von ca. 12 nt zu guter Abbaueffizienz und zu höherer Spezifität zur Zielsequenz führt (Donis-Keller, 1979; Gunzl *et al.*, 2002). Die Spaltfragmente sind nach dem RNase H-Abbau mit der Polyacrylamidgelelektrophorese detektierbar (Donis-Keller, 1979).

Für die Aufklärung von RNA-Strukturen müssen jedoch für die Hybridisierung der Oligonukleotide Pufferbedingungen gewählt werden, die bezüglich ihrer Ionenstärke die RNA-Faltung auf Sekundärstrukturebene ermöglichen (1.4) (Phillips *et al.*, 1999). Erst wenn sich die RNA-Struktur ausgebildet hat, kann die RNA-Sekundärstruktur durch das Hybridisierungsverhalten eines sequenzspezifischen DNA-Oligonukleotids untersucht werden.

Einerseits sollte mit dieser Methode die Ausbildung der vorhergesagten Sekundärstruktur des eingeführten RST (3.5.1) experimentell untersucht werden. Andererseits wurde die Methode verwendet, um Bereiche der mRNA, die für die Translationsinitiation wichtige Elemente (wie beispielsweise die Ribosomenbindestelle) beinhalten, strukturell zu untersuchen.

Ein Versuchsansatz wurde im 10 µl-Maßstab durchgeführt und enthielt 50 ng/µl mRNA. Die mRNA wurde zuerst bei 70°C für 2 min im Inkubationspuffer [25 mM Tris-HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 10 mM Cl₂Mg*6H₂O] denaturiert und anschließend die Rückfaltung der mRNA bei 30°C für 30 min abgewartet (Phillips *et al.*, 1999). Anschließend wurde die entsprechende Oligonukleotidmenge zugesetzt, eine Hybridisierungszeit von 10 min abgewartet, und dann die Spaltungsreaktion nach Zugabe von 1 U RNase H [1 U/µl] für 30 min bei 30°C durchgeführt. Nach der Reaktion wurden 50-350 ng mRNA im denaturierenden 15%-TBE-Harnstoffgel analysiert (3.2.2.1), wobei durch die Zugabe des 2 x TBE-Harnstoff-Probenpuffers die Enzymaktivität der RNase H beendet wurde.

3.10.1. RNA-Strukturuntersuchung des eingeführten RST

Für die Untersuchung, ob sich der eingeführte RST im Kontext der genspezifischen mRNAs ausbildet, wurden bezüglich der Oligonukleotidhybridisierung unterschiedliche Strategien gewählt.

3.10.1.1. Sequentielle Oligonukleotidhybridisierung

Die Oligonukleotide (a) bis (f) (Abb. 8) wurden entsprechend der linearen, ungefalteten mRNA Sequenz geplant. Die Oligonukleotide (a) bis (d) wurden in die Spaltungsreaktion jeweils in drei Konzentrationen eingesetzt, und die Oligonukleotide (e) und (f) wurden mit 36 μM verwendet. Entsprechend der strukturellen Zugänglichkeit der Zielsequenz sollte die Oligonukleotidhybridisierung, die durch die RNase H-Spaltung visualisiert wurde, gepaarte Bereiche detektieren.

3.10.1.2. Überlappende Oligonukleotidhybridisierung

Basis dieses Ansatzes war die Vorstellung, dass Oligonukleotide, die den RST überlappend hybridisieren, nur dann hybridisieren und zur Abspaltung der erwarteten Fragmentgrößen auf der 3'- und 5'-Seite des RST führen, wenn dieser sich ausgebildet hat. Die überlappenden Oligonukleotide (Abb. 8, g, h) wurden dementsprechend geplant, und für die Untersuchung der mRNA der Gene 1049 und CIITA nach den in Abb. 8 gezeigten Hybridisierungspositionen (g und h) mit 1 $\mu\text{g}/\text{Rkt}$ eingesetzt. Als Kontrollen dienten die Oligonukleotide mit Hybridisierungspositionen vor bzw. nach dem RST (a und b/b₁). Dabei ist (b₁) ein verglichen mit (b) verlängertes Oligonukleotid. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Materialteil (2.7) aufgelistet und mit der Gen-Bezeichnung vor der Hybridisierungsposition gekennzeichnet.

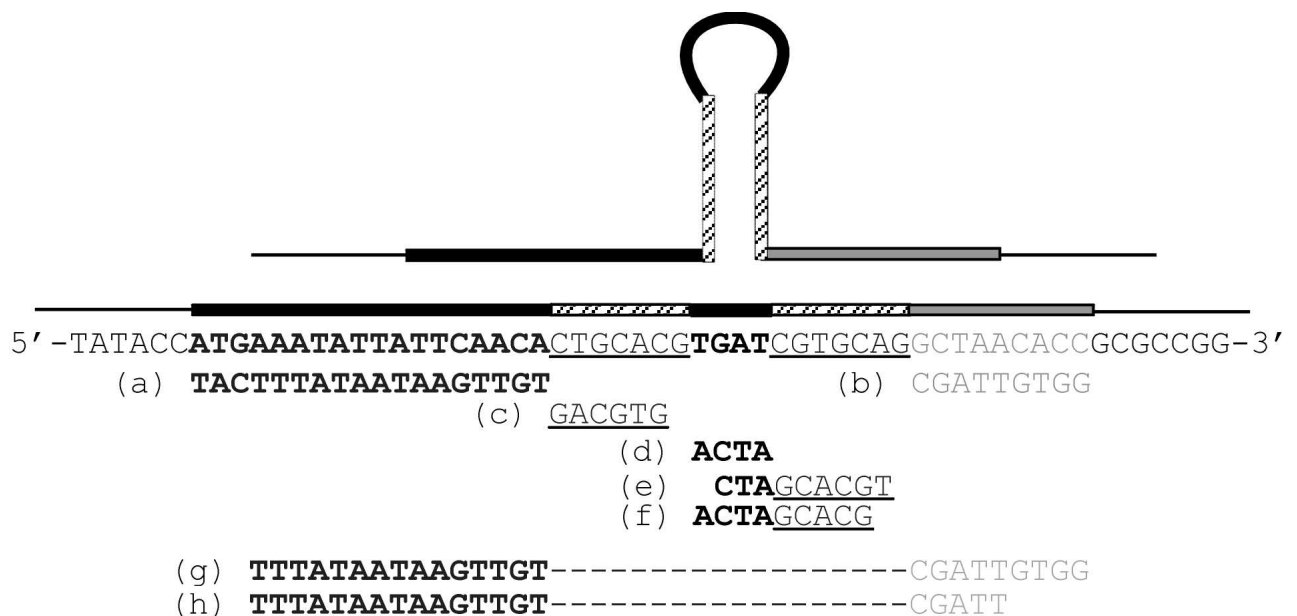


Abb. 8: Darstellung des Initiationsbereichs der mRNA der 1049 Stem-Loop-Variante (AS-Kombination 8) mit ideal ausgebildetem RST und der Hybridisierungspositionen der Oligonukleotide.

3.10.2. RNA-Strukturuntersuchung translationsinitiationsrelevanter Bereiche

Allgemein ist aus der Anti-Sense-Technologie bekannt, dass die Kinetik und Thermodynamik der Oligonukleotidhybridisierung stark beeinflusst wird, wenn die Hybridisierung die Stabilität einer RNA-Sekundärstruktur überwinden und kompensieren muss (Lima *et al.*, 1992; Nellen und Lichtenstein, 1993). Insofern wird die sequenzspezifische Spaltung durch die RNase H nach Oligonukleotidhybridisierung auch verwendet, um die strukturelle Stabilität einer spezifischen RNA-Sequenz zu untersuchen (Phillips *et al.*, 1999). Eine relativ geringere Spaltproduktmenge aus einem oligonukleotidvermittelten RNase H Verdau zeigt folglich eine Stabilisierung der RNA-Sekundärstruktur des untersuchten Sequenzabschnitts (Phillips *et al.*, 1999). Dabei wird das komplementäre Oligonukleotid mit zunehmender Menge in den RNase H-Verdau eingesetzt und konkurriert mit der komplementären RNA-Struktur um die Hybridisierung der Zielsequenz (Abb. 9). Damit lässt sich die Wildtyp-mRNA-Struktur mit der mRNA-Struktur einer Variante an einer bestimmten Zielsequenz vergleichen. Dieses Prinzip wurde angewandt, um die für die Translationsinitiation wichtigen Bereiche wie Ribosomenbindestelle und das Start-Kodon mit den folgenden 18 Nukleotiden zu untersuchen. Für die Titration wurden unterschiedliche Oligonukleotide verwendet, die entsprechend ihrer eingesetzten Mengen im Ergebnisteil gekennzeichnet sind. Ihre Sequenzen sind im Materialteil tabelliert aufgeführt. Dabei folgt der Gen-Bezeichnung die Bezeichnung der Genvariante (Kx: AS-Kombination x mit RST; WT: Wildtyp). Für die Titration der strukturellen Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle wurde das Oligonukleotid RBS-Sonde 2 verwendet.

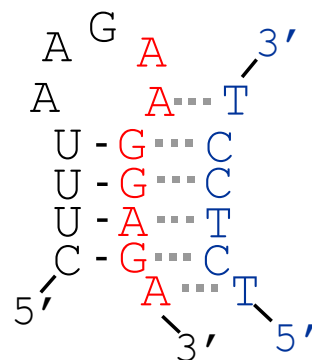


Abb. 9: Darstellung der Konkurrenzsituation zwischen komplementärem Oligonukleotid und dem Gegenstrang der mRNA der Ribosomenbindestelle.

3.11. RNA-Stabilitätsuntersuchung

Stabilitätsuntersuchungen der mRNA wurden im RTS 100 HY *in vitro* Expressionssystem, das analog den unter 3.8 beschriebenen Bedingungen verwendet wurde, durchgeführt. Einziger Unterschied war, dass das *E. coli* Lysat in unterschiedlichen Konzentrationen verdünnt eingesetzt wurde, ausgehend von der Konzentration, wie es bei der *in vitro* Proteinbiosynthese verwendet wurde [1x]. Die Ansätze wurden ohne Zusatz des *E. coli* Lysats, das separat in zwei unabhängigen Konzentrationsreihen verdünnt wurde, auf Eis gemischt und auf Reaktionsgefäße verteilt. Die Ansätze enthielten Aminosäuren, Start-Methionin, Reaktions-Mix, Reaktionspuffer und 1 µg mRNA. Nachdem gleichzeitig die beiden Lysat-Verdünnungsreihen den Ansätzen zugegeben worden sind, wurden die Ansätze vorsichtig gemischt und für 20 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die mRNA mit dem High pure RNA Isolation Kit (3.1.3) reisoliert. Dabei wurden RNasen durch Zugabe des Lyse-Puffers schnell inaktiviert. Die mRNA wurde mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese im 6%-TBE-Harnstoffgel analysiert (3.2.2.1), und die verbliebenen mRNA-Mengen wurden densitometrisch bestimmt (3.2.3.2).

3.12. Theoretische RNA-Strukturuntersuchung

Für theoretische RNA-Strukturuntersuchungen wurden unterschiedliche Computerprogramme verwendet. RNA-Faltungsprogramme berechnen auf Basis der Hybridisierungsenergien der unterschiedlichen Ribonukleotidbasen die RNA-Sekundärstrukturen, in denen das RNA-Polymer nach der Hybridisierung komplementärer Sequenzen gefaltet vorliegt.

Das Computerprogramm RNAdraw (Matzura und Wennborg, 1996) bietet die Möglichkeit aus den unterschiedlichen Faltungsalternativen die wahrscheinlichste RNA-Struktur anhand der Paarungswahrscheinlichkeiten zu berechnen. Damit erhält man aus der Analyse eine wahrscheinlichste RNA-Struktur, in der die Paarungen bezüglich ihrer Paarungswahrscheinlichkeit markiert sind. Dabei wird allerdings die Identität suboptimaler alternativer Paarungen nicht aufgeschlüsselt. Diese Software wurde verwendet, um die Faltungen der 5'-UTR-Sequenzen mit unterschiedlichen AS-Kombinationen der AT-reichen Sequenzen (Tab. 3, B) und RST, aber ohne Gen-Kontext zu vergleichen, und um die strukturelle Ausbildung der Ribosomenbindestelle bei den mRNA-Varianten des Gens 1049 zu berechnen.

Das Programm *mfold* (Zuker, 2003) ergibt nach der Berechnung eine Anzahl möglicher unterschiedlicher RNA-Sekundärstrukturen, die bezüglich der Gibbs'schen Freien Energie der Faltung variieren. Die Anzahl der Strukturvorschläge ist, ausgehend von der stabilsten Struktur, auf ein Fenster der Faltungsenergie (Gibbs'schen Freien Energie) begrenzt. Die Größe des

Fensters ist abhängig von der Länge der RNA-Sequenz und ist im Programm blockweise gegeben.

Die einzelnen Paarungen der Basen aller berechneter RNA-Strukturen können in einer Dot-Plot-Graphik verglichen und dargestellt werden. So können einzelne Bereiche der RNA und deren Paarungen in allen Sekundärstrukturen identifiziert und der jeweiligen RNA-Struktur - und damit deren Freier Energie - zugeordnet werden, ohne dass jede Struktur einzeln analysiert werden muss.

Das Programm *mfold* wurde verwendet, um die RNA-Sekundärstrukturen der mRNA-Moleküle der unterschiedlichen Expressionskonstrukte zu berechnen, und den strukturellen Unterschied zwischen jeweiligen RST- und Wildtyp-mRNA-Varianten vergleichend zu analysieren.

Da die beschriebenen drastischen Geschwindigkeitsunterschiede zwischen Transkription mit der T7-RNA-Polymerase und der Translationsinitiation zu einer zeitlichen Entkopplung beider Vorgänge führt (1.2), wurde je Variante die Sekundärstruktur der gesamten mRNA berechnet. Die Sekundärstrukturberechnungen wurden mit der Einstellung von 30 °C (analog den Bedingungen der *in vitro* Expression) durchgeführt. Mit der Dot-Plot-Analyse wurden die Paarungen der Ribosomenbindestelle (RBS) und des Start-Methionins (AUG) mit abwärts gelegenen Gensequenzen identifiziert (*Abwärtsparungen*¹) und die Anzahl der Strukturen (k_i), die eine solche Paarung (i) zeigten, gezählt. Auf der Basis der Anzahl aller Strukturen (n) wurde die Frequenz für das Auftreten dieser Abwärtsparung¹ (i) des jeweiligen regulatorischen Elements⁴ berechnet.

$$(1) \quad f_i = \frac{k_i}{n}$$

Eine solche Abwärtsparung¹ (i) wird mit größerer Wahrscheinlichkeit auftreten und die Translationsinitiation beeinflussen je energetisch stabiler die gesamte mRNA-Struktur ist, in der sie vorkommt. Deshalb sollte die Freie Energie der stabilsten Struktur (ΔG_i), die eine solche Abwärtsparung¹ (i) beinhaltet, als Gewichtung der Frequenz (f_i) mit berücksichtigt werden. Dafür wurde die Freie Energie der stabilsten Struktur (ΔG_i) zwischen 0 und 1 normalisiert (r_{ki}).

$$(2) \quad r_{ki} = \frac{\Delta G_i - \Delta G_{max}}{\Delta G_{min} - \Delta G_{max}}$$

Die resultierende normalisierte Freie Energie (r_{ki}) wurde dann verwendet, um die Frequenz (f_i) der jeweiligen Abwärtsparung¹ zu gewichten. Die Summe aller energiegewichteter Frequenzen über eine mRNA-Variante reflektierten bezüglich des jeweiligen regulatorischen Elements⁴ dessen *Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen*², oder die Gesamtwahrscheinlichkeit für Abwärtsparungen¹ (p_{Gki}).

$$(3) \quad p_{G_{ki}} = \sum_i f_i * r_{ki}$$

Auf Basis der Wahrscheinlichkeiten für die Abwärtsparungen¹ des jeweiligen regulatorischen Elements⁴ ($p_{G_{ki}}$) wurde die Wildtyp-mRNA mit der jeweiligen RST-Variante verglichen. Die verringerte Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² nach Einführung des RST (p_r) kann als *Freisetzungspotential*³ des RST bezüglich des jeweiligen regulatorischen Elements⁴ gesehen werden und wurde in Prozent berechnet.

$$(4) \quad p_r = 100\% * \left[1 - \frac{p_{G_{ki}}(RST)}{p_{G_{ki}}(WT)} \right]$$

Die Ausbildung des eingeführten RST im Gen-Kontext wurde in Anlehnung an das obige Verfahren berechnet. Es wurden mit der Dot-Plot-Analyse die Strukturen identifiziert, in denen sich der RST ausbildet. Aus ihrer Anzahl ergab sich die Frequenz für die RST-Ausbildung (f_{RST}). Sie wurde mit der normalisierten Freien Energie (r_{RST}) der stabilsten Struktur gewichtet, in der sich der RST ausbildete. Daraus ergab sich die Ausbildungswahrscheinlichkeit für den RST im Kontext des Gens (p_{RST}).

$$(5) \quad p_{RST} = f_{RST} * r_{RST}$$

4. Ergebnisse

4.1. Expressionsinitiation durch Einführen des RST

4.1.1. Expressionsversuche (*in vitro*) mit linearen DNA-Konstrukten

4.1.1.1. Zweistufige PCR-Amplifikation linearer Expressionskonstrukte

Als Expressions-Templates wurden in zwei PCR-Stufen lineare Expressionskonstrukte amplifiziert (3.5.1). Die erste PCR-Stufe wurde dabei verwendet, um analog der beschriebenen Strategie zur Expressionsinitiation (1.7) den Bereich aus 5 AT-reichen AS-Kodons und dem RST zwischen das Start-Kodon und der genspezifischen Sequenz der Wildtyp-Variante einzufügen und so die RST-Varianten zu amplifizieren.

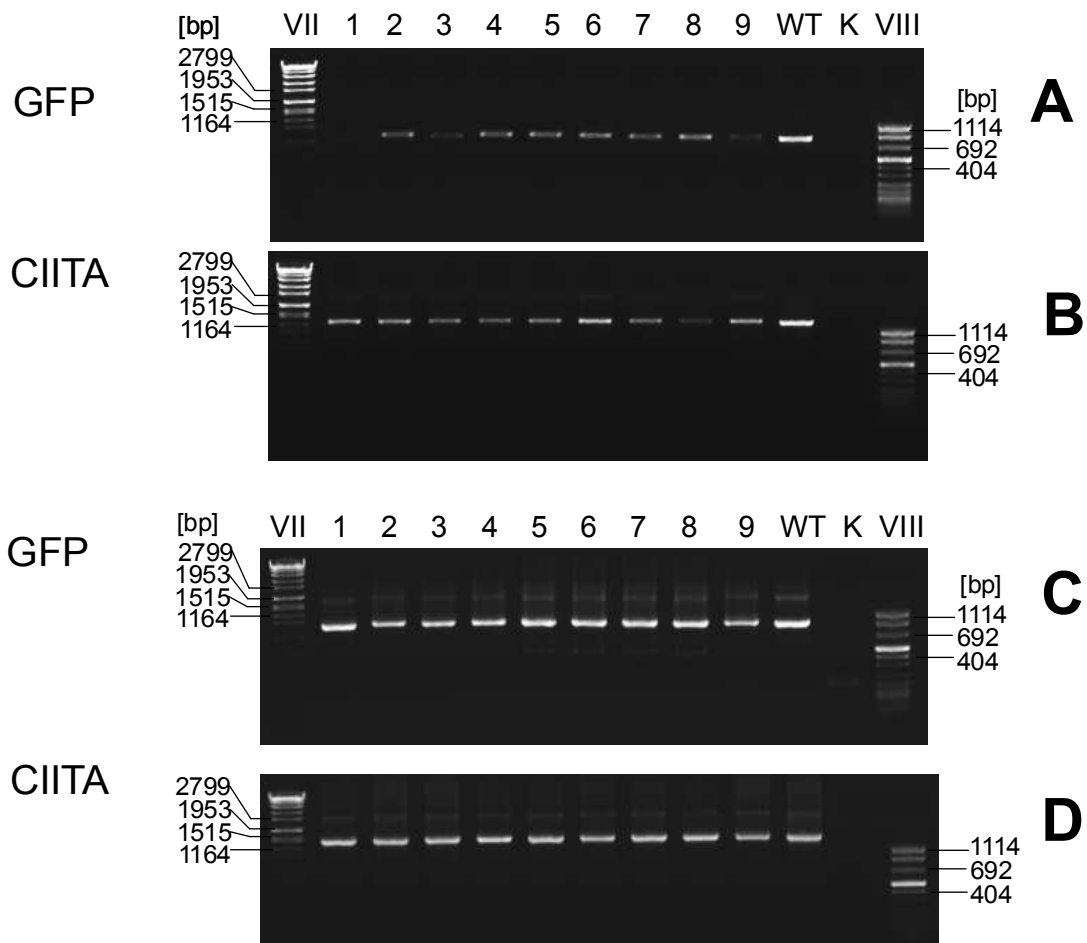


Abb. 10: Analyse der zweistufig amplifizierten PCR-Expressionskonstrukte (1.PCR-Stufe: A,B; 2.PCR-Stufe: C,D). In den Spuren 1 bis 9 sind jeweils die Kombinationen der AT-reichen AS-Kodons mit dem RST zu sehen. Der Wildtyp ist gekennzeichnet (WT). Ebenso die PCR-Kontrolle (K).

Die Analyse der ersten PCR-Stufe mittels Agarosegelelektrophorese ist in Abb. 10 (A, B) exemplarisch für die Gene GFP und CIITA abgebildet. In den Spuren 1 bis 9 sind die RST-Varianten zu sehen. Die Nummerierung der Spuren korreliert mit den Aminosäurekombination in Tab. 3 (B). Die Spur der Wildtyp Variante ist gekennzeichnet (WT). Die Molekulargewichtsmarker (VII, VIII) und die Negativkontrolle, die alle Reaktionskomponenten exklusive DNA-Templat enthielt, ist entsprechend gekennzeichnet (K).

Im zweiten Teil der Abbildung ist die Analyse der zweiten PCR-Stufe im Agarosegel gezeigt. Dabei wurden an die Konstrukte aus der ersten PCR-Stufe (Abb. 10, A, B) die T7-Promotor/Terminator Regionen fusioniert. Verglichen mit der einstufigen Amplifikation der linearen Expressionskonstrukten (Abb. 11) entstanden bei der zweiten PCR-Stufe noch schwache Nebenbanden (oberhalb der Zielprodukte; ca. 1.900 bzw. 2.900 bp). Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um Dimere der eingesetzten PCR-Produkte aus der ersten Stufe (GFP: 820 bp; CIITA: 1270 bp). Da jedoch die *in vitro* Expressionen einstufiger PCR-Produkte, die keine Nebenbanden enthielten, gleiche Ergebnisse wie die zweistufigen Produkte zeigten, ist eine Beeinflussung der Expression durch die schwachen Nebenbanden auszuschließen (Expressionsdaten nicht gezeigt).

4.1.1.2. Einstufige PCR-Amplifikation linearer Expressionskonstrukte

Wie im Methodenteil beschrieben (3.5.2) wurden in einer einstufigen PCR-Amplifikation lineare Expressionskonstrukte amplifiziert, um sie für die *in vitro* Transkription (3.9) der mRNA als Templat einzusetzen. In Abb. 11 ist exemplarisch die Analyse von zwei Genen (1049/Survivin) nach der PCR-Amplifikation im Agarosegel abgebildet. Als Amplifikations-Templat dienten dabei jeweils die reisolierten pBAD-Plasmide (3.6).

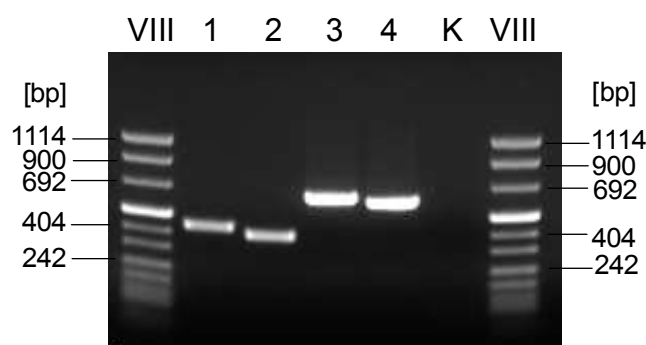
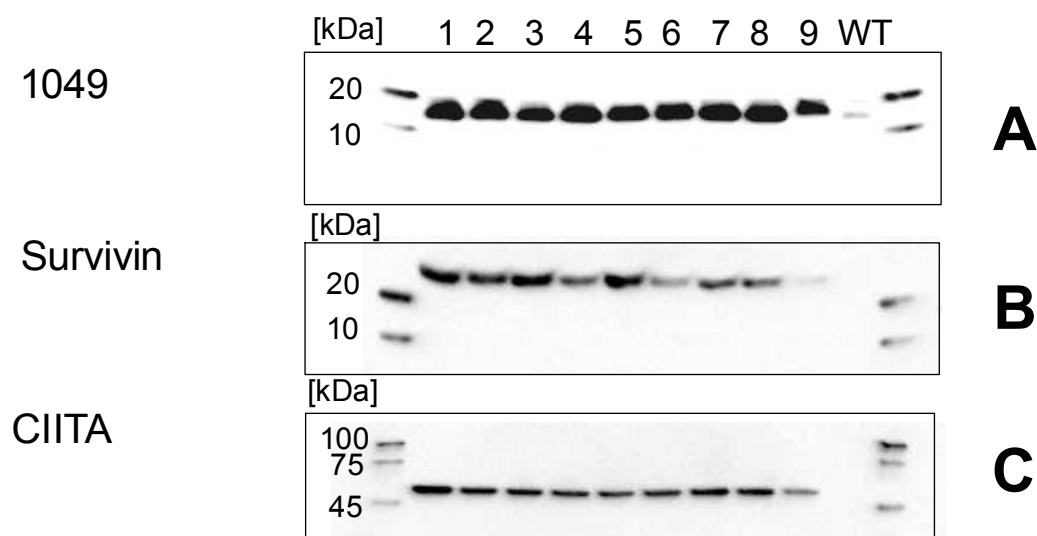


Abb. 11: **Beispiele einstufig amplifizierte linearer Expressionskonstrukte.** Spuren 1, 2: 1049 mit RST-Variante (1) und Wildtyp (2). Spuren 3,4: Survivin mit RST-Variante (3) und Wildtyp (4). Mit K ist die Spur der PCR-Kontrolle gekennzeichnet.

Die Abb. 11 zeigt in Spur 1 das lineare Konstrukt der RST-Variante mit Aminosäurekombination 8 des Gens 1049, während in der Spur 2 die Wildtyp-Variante des Gens 1049 analysiert wurde. Die Spuren 3 und 4 zeigen die Varianten des Gens Survivin, in Spur 3 die RST-Variante mit AS-Kombination 1 und in Spur 4 die Wildtyp-Variante. Die Markerspuren sind entsprechend des verwendeten Molekulargewichtsmarkers gekennzeichnet (VIII). Negativkontrolle der PCR war ein Ansatz, der alle Komponenten außer das DNA-Templat enthielt (K). Der logarithmische Zusammenhang zwischen Laufstrecke und Größe der DNA-Fragmente (Helling *et al.*, 1974; Lotspeich, 1998) führt dazu, dass die Größenunterschiede zwischen RST-Variante und Wildtyp stärker zu sehen sind, je kleiner das Fragment ist.

4.1.1.3. Expressionsergebnisse linearer DNA-Konstrukte *in vitro*

Im *in vitro* Expressionssystem wurde der Einfluss des Sequenzbereichs aus AT-reicher AS-Kombination mit folgender RST-Sequenz, der zwischen Start-Kodon und Strukturgen platziert worden war, auf die *in vitro* Expression verschiedener Strukturgene untersucht. Dafür wurden die linearen Expressionskonstrukte (3.5.1) im *in vitro* Expressionssystem als Templat eingesetzt. Die Expression sieben verschiedener Gene, die von unterschiedlichen Ursprungsorganismen stammten und deren Länge der codierenden Sequenzen zwischen 246 und 1380 nt variierte, wurden jeweils in unterschiedlichen Konstruktvarianten auf diese Weise untersucht. Die *in vitro* Expression der Konstrukte zeigte als Folge des eingeführten Sequenzbereichs die erfolgreiche Expression von fünf vorher nicht exprimierbaren Genen (Abb. 12, A - E), und die verbesserte Expression zweier Gene, die als Wildtyp-Variante bereits exprimierbar waren (Abb. 12, F, G).



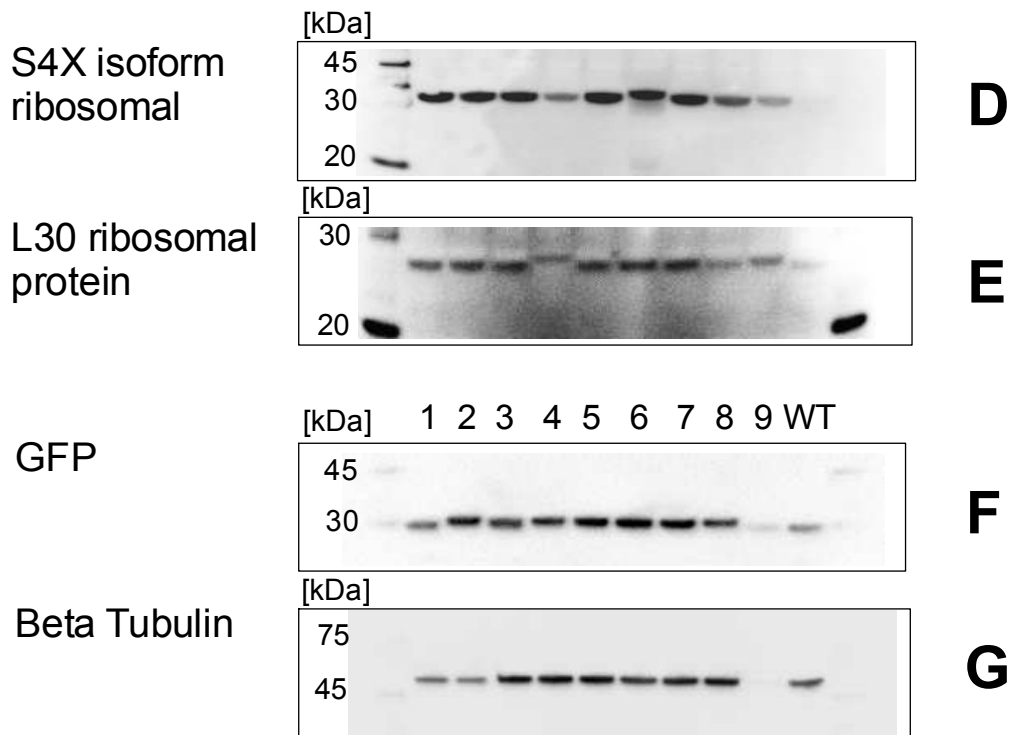


Abb. 12: ***In vitro* Expressionsergebnisse der linearen Konstrukte des Wildtyps im Vergleich zu den RST-Varianten.** Western Blot Analyse von fünf Genen, deren Wildtyp-Konstrukte (Spur 10) nicht exprimierbar waren (A bis E). Spuren 1 bis 9 zeigen jeweils die Expressionen unter Verwendung des RST in Kombination mit den unterschiedlichen AT-reichen AS-Kodonkombination (Tab. 3, B). Die Beispiele F und G zeigen die Expressionsergebnisse zweier vorher exprimierbarer Gene im Vergleich zwischen RST-Varianten und Wildtyp.

Während der Wildtyp jedes Gens nicht oder nur sehr schwach exprimierbar war, zeigten die RST-Varianten eine stark verbesserte Expression (Abb. 12, A bis E). Zusätzlich führte der eingeführte Sequenzbereich zu einer signifikanten Expressionssteigerung bei den Genen, die als Wildtyp bereits exprimierbar waren (Abb. 12, F,G). Die RST-Varianten 1 bis 8 (Abb. 12, 1-8) unterschieden sich in der Reihenfolge der AT-reichen AS-Kodons (Tab. 3, B). Ein Konstrukt enthielt als AT-reiche AS-Kombination die Sequenz, die für den His₅-Tag codierte (Tab. 3, B, 9). Dessen Expressionsanalyse zeigte bei allen untersuchten Genen geringere Mengen des jeweiligen Zielproteins (Abb. 12, Spuren 9), als im Vergleich bei den Konstrukten mit den jeweiligen AS-Kombinationen 1 bis 8. Damit wird deutlich, dass diese Sequenz (Tab. 3, B, 9) als AT-reiche AS-Kombination schlechter geeignet ist, um die Expression erfolgreich zu initiieren. Dies lässt sich durch den vergleichbar höheren GC-Gehalt der AS-Kombination 9 erklären. Der höhere GC-Gehalt führt wegen der höheren Neigung zu RNA-Sekundärstrukturbildung zu schlechterer Translationsinitiation (Pedersen-Lane *et al.*, 1997; Stenstrom *et al.*, 2001).

Bei einigen Genen wurden geringe Expressionsunterschiede der AS-Kombinationen zueinander detektiert (Abb. 12, B 4, 6 im Vergleich zu 5; D und E jeweils 4 und 5). Experimente zur notwendigen Stammlänge des RST (4.1.3.2) können diese geringen Unterschiede erklären. Es wurde beispielsweise bei der Expression unterschiedlicher Stammlängen des RST im Kontext des Gens 1049 festgestellt, dass das Gen 1049 bereits ab einer Stammlänge von 2 bp gut exprimierbar wird. Im Vergleich dazu benötigt das Gen Survivin für eine erfolgreiche Expression den RST mit 7 bp-Stammlänge. Das bedeutet, dass das Freisetzungspotential³ des eingeführten RST mit 7 bp (zur Freisetzung des Initiationsbereichs⁴ aus Abwärtspaarungen¹) im Falle des Survivins limitiert war. Dagegen benötigte das Gen 1049 keinen so massiven strukturellen Eingriff zur Freisetzung des Initiationsbereichs⁴ aus Abwärtspaarungen¹. Folglich muss für eine erfolgreiche Expression die mRNA-Struktur des Initiationsbereichs von Survivin durch den RST in einer translatierbaren Struktur gerade genug stabilisiert worden sein. Bei der 1049-mRNA genügte dagegen die Destabilisierung der Wildtyp-mRNA, um die Expression zu ermöglichen. Dieser Zusammenhang wird von der sehr schwachen Expression des Wildtyps von 1049 im Vergleich zur nicht detektierbaren Wildtyp-Expression von Survivin gestützt (Abb. 12, A, B, WT). Zusätzlich zeigte die RNA-Strukturuntersuchung der ersten 18 translatierten Nukleotide (4.2.2.2), dass die mRNA von Survivin in diesem Bereich stabilisiert wurde, und im Gegensatz dazu die von 1049 destabilisiert wurde. Dies bestätigt ebenfalls die Folgerung, dass die Survivin-mRNA in einer exprimierbaren Struktur stabilisiert werden musste, und die mRNA von 1049 bereits durch Destabilisierung exprimierbar wurde.

Nur in der beschriebenen limitierten Situation von Survivin (und der Gene in Abb. 12, D, E, je 4, 5) kommen die Unterschiede der AT-reichen Kombinationen in der Expression zum Tragen und führen zu detektierbaren Effekten. Um diese Effekte zu untersuchen wurden die RNA-Strukturen der 5'-untranslatierten Regionen (5'-UTR) mit den eingeführten AT-reichen AS-Kombinationen und dem RST, aber ohne Gen-Kontext, mit dem RNA-Faltungs-Programm RNAdraw (Matzura und Wennborg, 1996) analysiert.

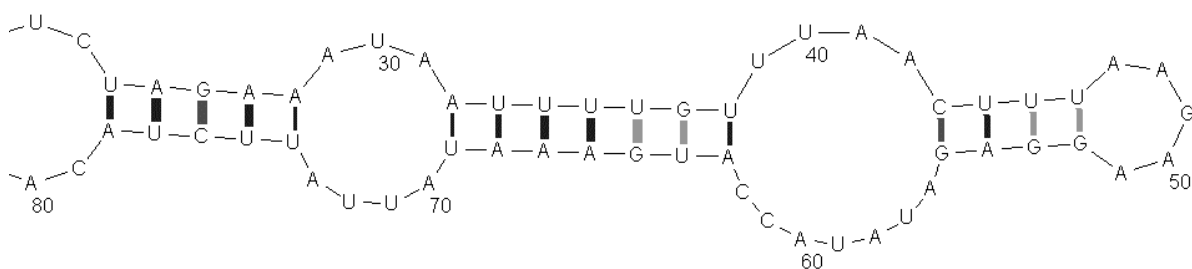


Abb. 13: **Faltung der 5'-UTR Region der AT-reichen AS-Kombination 4.** Die RBS ist in den Positionen 50 bis 55 zu sehen. Das Start-Kodon liegt in den Positionen 63 bis 65. Von Position 66 bis 79 ist die AT-reiche Sequenz zu sehen, die mit 5'-UTR-Sequenzen gepaart vorliegt.

Im Fall der AT-reichen Kombination 4 (Abb. 13) und 6 (Tab. 3, B, 4, 6) zeigten die RNA-Strukturen der untersuchten Bereiche, dass die AT-reichen Sequenzen Paarungen mit UTR-Sequenzen auf der 5'-Seite der Ribosomenbindestelle ausbildeten. Im Gegensatz dazu zeigte die AT-reiche Kombination 5 (Tab. 3, B, 5) dieses Faltungsverhalten nicht (Abb. 14).

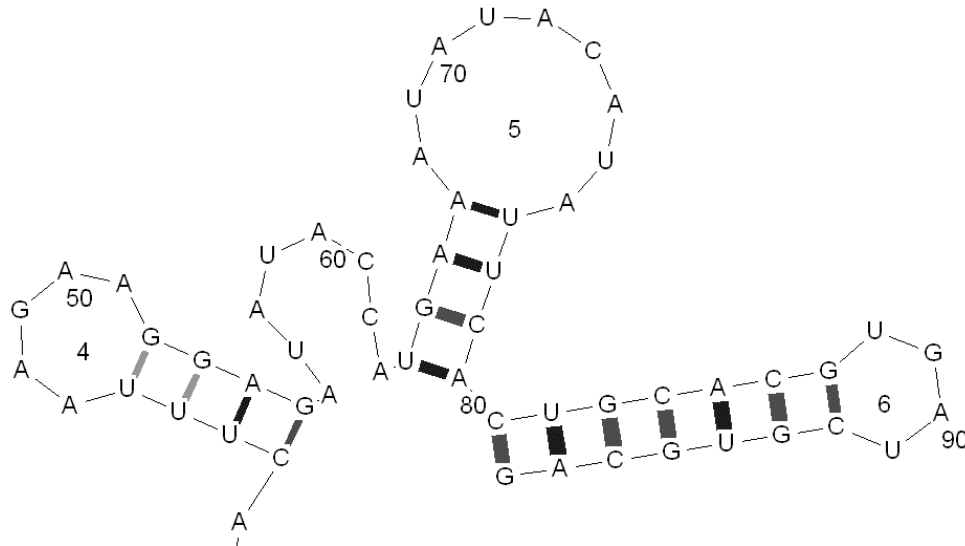


Abb. 14: **Faltung der 5'-UTR Region der AT-reichen AS-Kombination 5.** Im Loop 4 ist die RBS (50 bis 55) zu sehen. Das Start-Kodon liegt in den Position 63 bis 65. Von Position 66 bis 79 ist die AT-reiche Sequenz zu sehen (Loop 5), und von Position 80 bis 98 der eingeführte RST (Loop 6).

Die AT-reiche Sequenz der AS-Kombination 5 (66 bis 80 nt) bildet eine separate Haarnadelschleife ohne Affinität zu 5'-UTR-Sequenzen. Dies bedeutet, dass die AT-reiche Kombination 5 selbst die Faltung mit UTR-Sequenzen nicht forciert, während die Kombinationen 4 und 6 selbst solche Paarungen begünstigt. Unter Berücksichtigung der Expressionsergebnisse (Abb. 12) scheint dieser Effekt ebenfalls im Kontext der Strukturgene zum Tragen zu kommen. Die eingeführte Region aus AT-reicher AS-Kombination und RST setzt den Translationsinitiationsbereich von Paarungen mit der Gensequenz frei, und im Fall der Limitierung dieses Prozesses (Abb. 12, B, D, E) ist die AT-reiche Kombination 5 dafür besser geeignet als 4 und 6, weil 4 und 6 selbst schon Affinität zu 5'-UTR-Sequenzen zeigen.

4.1.1.4. Expression mit und ohne RST

Um zu untersuchen, ob die AT-reiche Kombination oder der RST zu der stark verbesserten Expression geführt hat, wurden lineare Expressionskonstrukte angefertigt. Sie enthielten nur die AT-reiche Sequenz (Tab. 3, B, 1, 2), jedoch ohne den RST. Ihre Expressionsergebnisse im Vergleich zu den Varianten mit RST sind in Abb. 15 gezeigt.

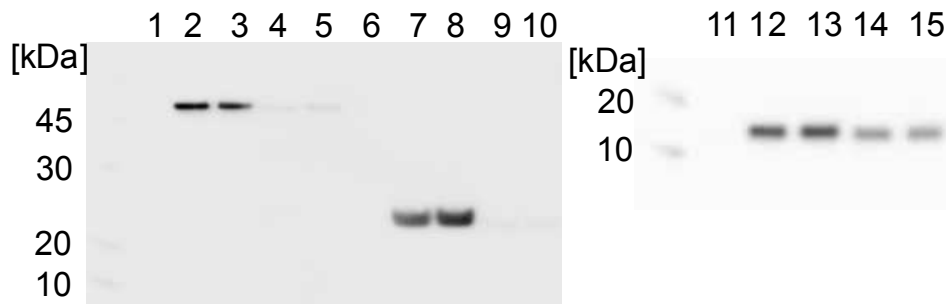


Abb. 15: **In vitro** Expressionsergebnisse linearer Konstrukte mit und ohne RST. Spuren 1 bis 5: CIITA (1: WT; 2,3: AT-reiche Kombinationen 1 und 2 jeweils mit RST; 4,5: AT-reiche Kombinationen 1 und 2 jeweils ohne RST). Spuren 6 bis 10: Survivin (6: WT; 7, 8: AT-reiche Kombinationen 1 und 2 jeweils mit (RST); 9, 10: AT-reiche Kombinationen 1 und 2 jeweils ohne RST). Spuren 11 bis 15: 1049 (11: WT; 12, 13: AT-reiche Kombinationen 1 und 2 jeweils mit (RST); 14, 15: AT-reiche Kombinationen 1 und 2 jeweils ohne RST).

Die Spuren 1 bis 5 zeigen die Expression der CIITA-Varianten. Spur 1 zeigt die Expressionsergebnisse der nicht exprimierbaren Wildtyp-Variante, 2 und 3 die Expressionen der Konstrukte mit AT-reicher Kombination (Tab. 3 B, 1,2) und RST. Im Vergleich dazu zeigen die Spuren 4 und 5 die Expressionsergebnisse der Konstrukte mit gleicher AT-reicher Kombination aber ohne RST.

In den Spuren 6 bis 10 sind die Expressionsergebnisse von Survivin zu sehen. Dabei zeigt die Spur 6 die Ergebnisse des nicht exprimierbaren Wildtyps, während die Spuren 7 und 8 die Expression der Konstrukte mit AT-reicher Kombination (Tab. 3, B, 1,2) und RST zeigen. In den Spuren 9 und 10 sind dagegen die Ergebnisse der Konstrukte mit AT-reicher AS-Kombination (Tab. 3, B, 1,2), aber ohne RST zu sehen.

Nach dem gleichen Prinzip sind in den Spuren 11 bis 15 die Expressionsergebnisse von 1049 zu sehen. Die nicht exprimierbare Wildtyp-Variante ist in Spur 11 zu sehen, während in den Spuren 12 und 13 die Varianten mit AT-reicher Kombination (Tab. 3 B, 1,2) und RST mit den Varianten ohne RST mit gleicher AT-reicher Kombination in den Spuren 14 und 15 verglichen wurden.

Während alle Wildtyp-Varianten (Abb. 15, Spuren 1, 6, 11) keine Expression zeigten, waren die Konstrukte mit AT-reicher Kombination und RST (Abb. 15, Spuren 2, 3, 7, 8, 12, 13) gut exprimiert. Vergleichbar dazu zeigten die Konstrukte mit AT-reicher Sequenz ohne RST (Abb. 15, Spuren 4, 5, 9, 10, 14, 15) keine, oder nur sehr schwache Expression. Dies zeigt deutlich, dass für die erfolgreiche Expressionsinitiation der vorher nicht exprimierbaren Gene der RST essentiell ist.

Bei einigen Konstrukten führte jedoch das Einbringen der AT-reichen Kombination ohne RST (Abb. 15, Spuren 14, 15) zu stärkerer Expression, als im Vergleich zur nicht exprimierbaren

Wildtyp-Variante (Abb. 15, Spur11). Dieses Ergebnis basiert auf der Tatsache, dass hoch exprimierte *E. coli*-Gene AT-reiche Sequenzen direkt nach dem Start-Kodon beinhalten (Stenstrom *et al.*, 2001), und GC-reiche Kodons an dieser Position die Expressionsraten verringern (Pedersen-Lane *et al.*, 1997), weil sie höhere Tendenz zu Sekundärstrukturbildung zeigen. Deshalb hat beim Gen 1049 die AT-reiche Sequenz zu verbesserter Expression geführt. Es ist jedoch offensichtlich, dass bei allen untersuchten Genen die AT-reiche Kombination ohne den RST nicht zu vergleichbar hohen Expressionsergebnissen führte, wie sie in Kombination mit dem RST (Abb. 15, Spuren 12, 13) erreicht wurden. Das bedeutet, dass der RST für die erfolgreiche Expressionsinitiation essentiell ist.

4.1.2. Entkopplung von Transkription und Translation *in vitro*

Nachdem der RST als wichtiger Teil zur erfolgreichen Proteinexpression detektiert worden war, trat die Frage nach dessen Einfluss auf die Proteinexpression in den Vordergrund. Es bestand die Möglichkeit, dass der RST die Stabilität der mRNA erhöht und auf diese Weise die Expression verbessert. Alternativ könnte das Einbringen des Stem-Loops die Translationsinitiation verbessern und so zu gesteigerter Expression führen. Als weitere durch den eingeführten RST potentiell beeinflusste Mechanismen wurden die Transkription und die Stabilität der DNA gesehen. Gegen den Abbau von dsDNA wurden strukturelle Ansätze zur Stabilisierung entwickelt und untersucht (Hirao *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1993; Yoshizawa *et al.*, 1994). Insofern konnte zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass die eingeführte RST-Sequenz auf DNA-Ebene zu einer Stabilisierung hätte führen können, und deshalb die gesteigerte Expression detektiert wurde. Im Hinblick auf die Transkription war ebenfalls eine Beeinflussung durch den eingeführten RST denkbar. In diesem Fall würde der RST jedoch eher die Transkriptionseffizienz verschlechtern, wenn man den Einfluss des Terminations-Loops bei der Transkription und den Mechanismus der Termination bei der T7-RNA-Polymerase bedenkt (1.2). Außerdem konnte möglicherweise durch die je Gen um 11 AS verlängerte Wildtypsequenz auch die Proteinstabilität verändert haben. Warum dies unwahrscheinlich ist, wird in der Diskussion erläutert.

Um alle potentiell durch den RST beeinflussten Mechanismen der Proteinsynthese, die im Wirkungsbereich von der DNA-Stabilität bis hin zum Syntheseprodukt der Transkription liegen könnten, als Ursache für die gesteigerte Expression auszuschließen, wurde die Transkription von der Translation entkoppelt. Dafür wurde die mRNA separat transkribiert und als Templat in die Translation eingesetzt.

Zuerst wurde mit der *in vitro* Transkription die mRNA der jeweiligen Gene und Varianten transkribiert. Die Bedingungen der Transkription sind im Methodenteil beschrieben (3.9). Ein Teil des Volumens der synthetisierten mRNA von 1049 und Survivin wurde anschließend mit Sephadex G-50 Säulen (3.1.4) gereinigt, und die Translationsergebnisse der gereinigten mit denen der ungereinigten mRNA-Templates verglichen. Damit sollten mögliche strukturelle Veränderungen der mRNA erkannt werden, die eventuell durch die Reinigung verursacht worden sind, so dass die mRNA-Struktur nicht mehr dem strukturellen Zustand wie beim Austritt aus der T7-RNA-Polymerase entsprach. Zusätzlich wurde die mRNA von CIITA (Ergebnisse Abb. 17, B) mittels Phenol-Extraktion (3.1.1) isoliert und mit Ethanolpräzipitation aufkonzentriert (3.1.2). Alle Transkripte wurden mittels Gelelektrophorese auf ihre korrekte

Größe und ihre Reinheit hin überprüft. Exemplarisch ist ein Ergebnis der Elektrophorese in Abb. 16 gezeigt.

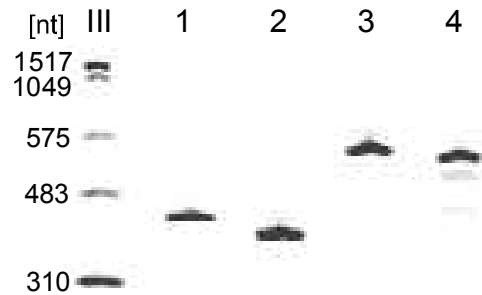


Abb. 16: TBE-Harnstoff-Polyacrylamidgel (6%) der *in vitro* transkribierten mRNA. Die mRNA von 1049-RST (1) und WT (2), und Survivin-RST (3) und WT (4). Es wurde der RNA-Molekulargewichtsmarker (III) verwendet.

Im nächsten Schritt wurden die separat transkribierten mRNA-Moleküle *in vitro* translatiert. Die Bedingungen der entkoppelten Translation entsprachen denen der gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation (3.8), außer dass 2 µg mRNA als Templat anstelle der DNA eingesetzt wurden. Damit war die Vergleichbarkeit zwischen gekoppelter und entkoppelter Reaktion gegeben. Die mRNA der Gene 1049 und Survivin wurde jeweils in zwei RST-Varianten (1049: Tab. 3, B, 1, 8; Survivin: Tab. 3, B, 1, 3) und dem Wildtyp verwendet, während CIITA nur mit einer RST-Variante (Tab. 3, B, 1) und dem Wildtyp eingesetzt wurde. Die Produkte der Translation wurden mittels Western Blot analysiert und sind in Abb. 17 gezeigt.

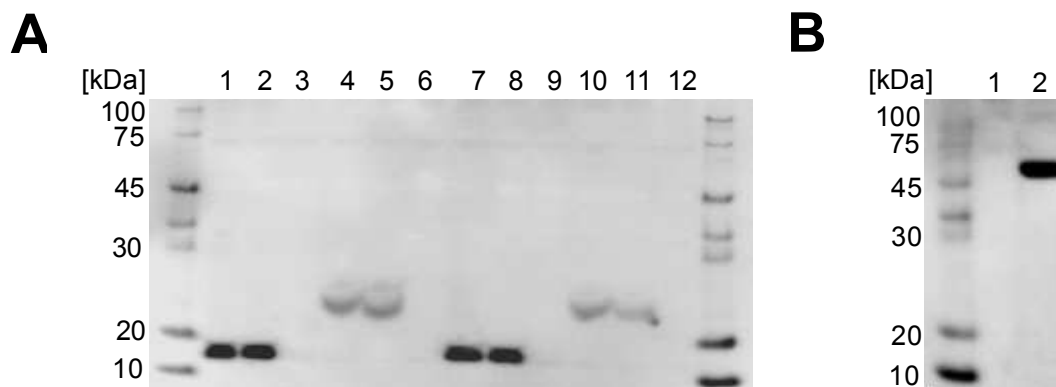


Abb. 17: *In vitro* Translationsergebnisse basierend auf mRNA-Transkripten. **A:** 1049: Spuren 1 bis 3 (ungereinigte mRNA); Spuren 7 bis 9 (Sephadex G-50 gereinigte mRNA). Survivin: Spuren 4 bis 6 (ungereinigte mRNA); Spuren 10 bis 12 (Sephadex G-50 gereinigte mRNA). **B:** CIITA: Spuren 1, 2. **A/B:** RST-Varianten: 1049 (A: 1, 2, 7, 8), Survivin (A: 4, 5, 10, 11) und CIITA (B: 2); Wildtyp-Varianten: 1049 (A: 3, 9); Survivin (A, 6, 12); CIITA (B, 2).

Die Translation der separat transkribierten mRNA zeigte vergleichbare Ergebnisse, wie die Proteinbiosynthese der linearen DNA-Konstrukte im gekoppelten *in vitro* Expressionssystem. Die Wildtyp-Varianten von 1049 (Abb. 17, A, 3, 9), Survivin (Abb. 17, A, 6, 12) und CIITA (Abb. 17, B, 2) waren nicht exprimierbar, während die RST-Varianten von 1049 (Abb. 17, A, 1, 2, 7, 8), Survivin (Abb. 17, A, 4, 5, 10, 11) und CIITA (Abb. 17, B, 1) eine starke Expression zeigten. Die Ergebnisse zeigen, dass die gesteigerte Expression der RST-Varianten auf mRNA-Ebene basierte, und die Translationsinitiation der mRNA durch Einführen des RST verbessert wurde. Sie zeigen auch, dass keine anderen Mechanismen (DNA-Stabilität, Transkription) durch Einbringen des RST soweit verändert wurden, dass sie der Grund für die gesteigerten Expressionsergebnisse sein könnten. Lediglich eine veränderte mRNA-Stabilität war als Ursache für die gesteigerte Expression durch den Einsatz des RST an dieser Stelle noch möglich. Diese Untersuchung wird unter 4.2.4 beschrieben.

Der Vergleich der Expressionsergebnisse gereinigter (Abb. 17, A, 7 bis 12) und ungereinigter mRNA (Abb. 17, A, 1 bis 6) zeigte, dass die Reinigung keinen Einfluss auf die Translation hatte. Die Reinigungsprozeduren führten dazu, dass die mRNA bei geringer Ionenstärke vorlag, sowohl bei der Reinigung mit Sephadex G-50 (H₂O-Reste auf der Säule) als auch bei der Phenol-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation und Aufnahme des Pellets in H₂O. Unter Berücksichtigung der Theorie der RNA-Faltung (1.4) bedeutet dies, dass die tertiäre Struktur der mRNA mindestens einmal aufgebrochen wurde, bevor sie für die Translation verwendet wurde. Zusätzlich wurde auch hitzedenaturierte mRNA zur Translation verwendet, ohne dass Translationsunterschiede detektiert wurden (Daten nicht gezeigt).

4.1.3. Expressionsversuche (*in vitro*) unter dem Aspekt der RNA-Struktur

4.1.3.1. Expression mit verlängertem Stamm des verwendeten RST bei konstanter Stabilität

Um den räumlichen Einfluss des RST auf die Translationsinitiation unabhängig von seiner Stabilität zu untersuchen wurde ein verlängerter RST mit 9 bp Stammlänge verwendet, der die gleiche Stabilität wie der 7 bp-Stem-Loop hatte ($\Delta G = -9,9$ kcal/mol). Sein Einsatz in der Expression sollte zeigen, ob eine Vergrößerung des Stem-Loops zu einer besseren räumlichen Freisetzung des Initiationsbereichs⁴ führt oder ob die Initiation durch die Position des Loops räumlich limitiert ist. Es wurden erneut lineare Expressionskonstrukte angefertigt. Sie enthielten die AT-reiche Sequenz (Tab. 3, B, 1) mit dem jeweiligen RST L_{7/9} (Tab. 3, D). Ihre Expressionsergebnisse sind in Abb. 18 gezeigt.

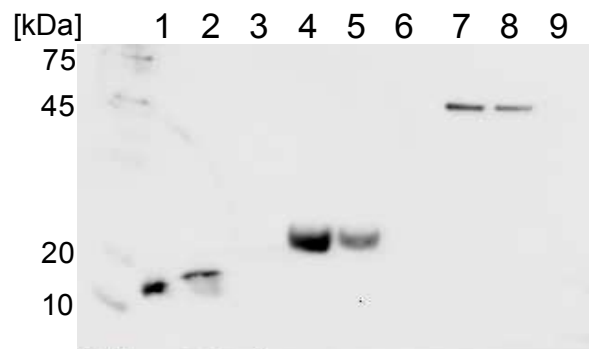


Abb. 18: ***In vitro* Expressionsergebnisse unter Verwendung unterschiedlicher Stammlängen des RST, bei konstanter Stabilität.** Spuren 1 bis 3: 1049 (1: RST L₇; 2: RST L₉); 3: WT). Spuren 4 bis 6: Survivin (4: RST L₇; 5: RST L₉; 6: WT). Spuren 7 bis 9: CIITA (7: RST L₇; 8: RST L₉; 9: WT).

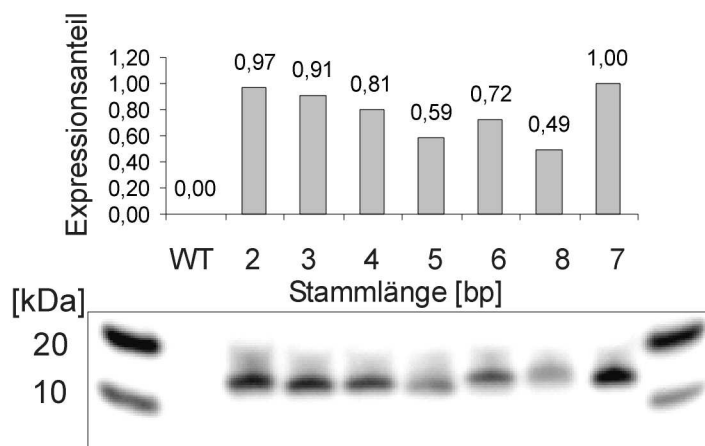
Der Western Blot in Abb. 18 zeigt die Expression linearer Expressionskonstrukte der Gene 1049 (Spuren 1-3), Survivin (Spuren 4-6) und CIITA (Spuren 7-9). In den Spuren 1, 4 und 7 ist jeweils die Expression unter Verwendung des RST mit 7 bp Stammlänge zu sehen, während in den Spuren 2, 5 und 8 die Expression der verlängerten RST-Variante mit 9 bp Stammlänge zu sehen ist. Die Spuren 3, 6 und 9 zeigen die nicht exprimierbaren Wildtyp-Varianten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verlängerung des Stamms des RST (auf Stammlänge 9 bp) bei gleichem Energiegehalt zwar die Expression ermöglicht, aber nicht zu so starker Expression führt, wie bei Verwendung des kürzeren Stamms (mit Stammlänge 7 bp). Dies weist darauf hin, dass die Translationsinitiation nicht nur durch den linearen Abstand des RST, sondern auch durch dessen räumlichen Platzbedarf beeinflusst wird. Damit wird die Austrittsposition der mRNA aus dem Ribosom (+15 Nukleotide) (Culver, 2001; Yusupova *et*

al., 2001) relativiert. Die mRNA-Sekundärstruktur ab Position +18 nt beeinflusst die Translationsinitiation immer noch erheblich und behindert die Initiation räumlich - im Vergleich zu der kürzeren Stammlänge.

4.1.3.2. Expression mit variierender Stammlänge des RST ohne konstante Stabilität

Um den Einfluss des RST auf die Initiation im Kontext der RNA-Struktur besser zu verstehen und die Wirkungsweisen des RST weiter aufzuklären wurde in einem weiteren *in vitro* Expressionsversuch die Stammlängen des RST variiert, ohne die Stabilität der eingeführten RNA-Struktur konstant zu halten. Die Stammlängen des RST variierten von 2 bp bis 8 bp (RST L₂₋₈). Es wurden erneut lineare Expressionskonstrukte analog der beschriebenen zweistufigen PCR-Amplifikation aufgebaut (3.5.1). An die AS-Kombinationen der Gene 1049 (Tab. 3, B, 8), Survivin (Tab. 3, B, 3) und CIITA (Tab. 3, B, 1) wurden jeweils die RST L₂₋₈-Sequenzen (Tab. 3, D) fusioniert und diese beiden Sequenzen vor dem Strukturgen platziert. Die linearen Expressionskonstrukte, die je Gen die sieben verschiedenen Stammlängen (RST L₂₋₈) beinhalteten, wurden dann im *in vitro* System exprimiert (3.8). Ihre Expressionsergebnisse sind in Abb. 19 gezeigt.

1049



A

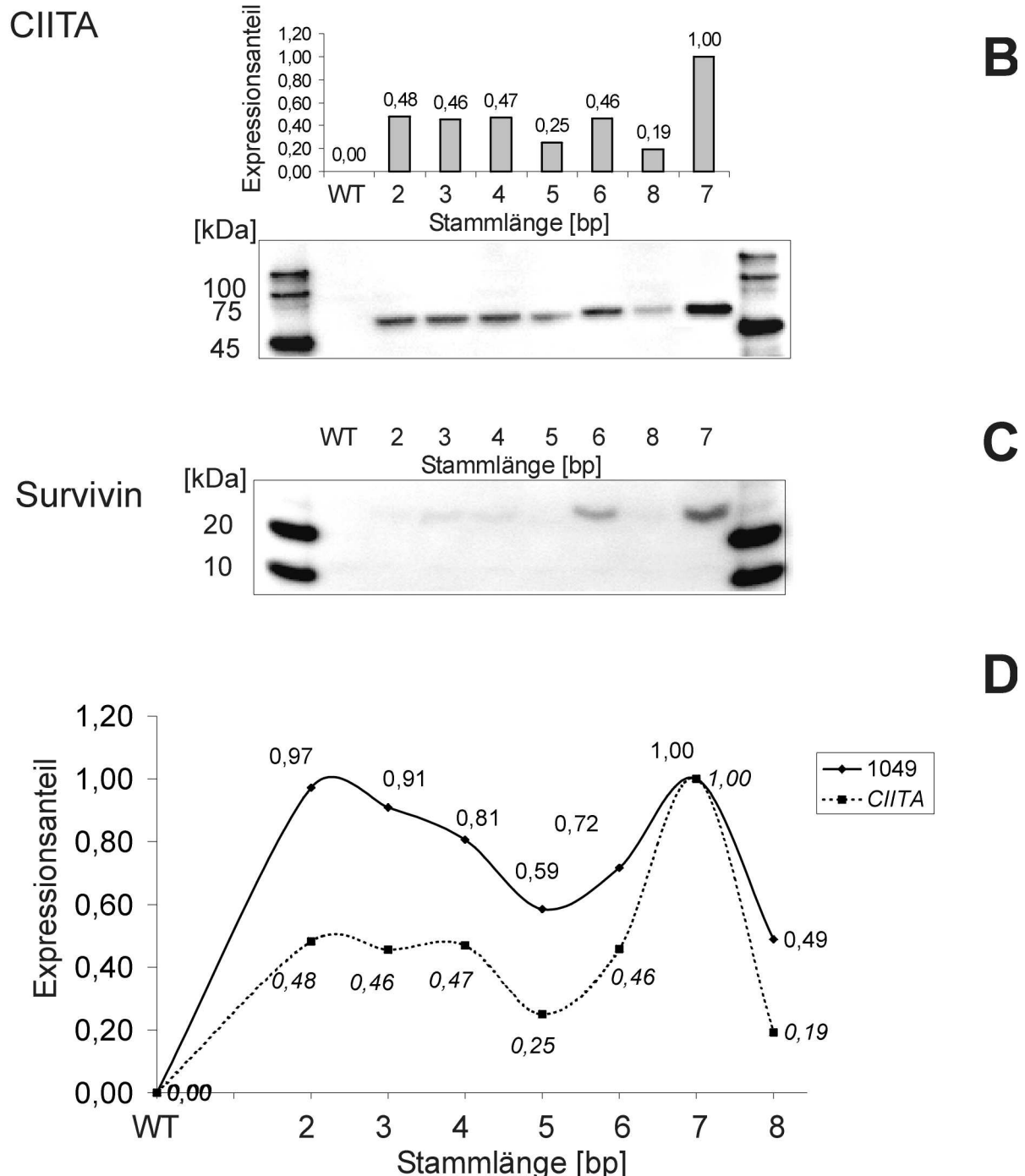


Abb. 19: **In vitro** Expressionsergebnisse unter Verwendung von RST-Varianten. **A bis C**: Western Blot Analyse der *in vitro* Expressionen unter variierender RST-Stammlänge. Die Spuren der PAA-Gele sind mit den Stammlängen der verwendeten RST-Sequenzen gekennzeichnet. **D**: Darstellung der Expressionsergebnisse von A und B in Abhängigkeit der Stammlänge des RST.

In Abb. 19 sind die densitometrisch bestimmten Expressionswerte (A/B) jeweils auf die je Gen maximal erreichten Expressionswerte normalisiert. Bei allen Genen (Abb. 19, A bis C) wurde jeweils der maximale Expressionswert bei der Verwendung des RST mit der Stammlänge von 7 bp erreicht. Die Variation der Stammlänge zeigte beim Gen 1049 (Abb. 19, A), dass die mRNA des Gens bereits ab einer Stammlänge von 2 bp annähernd so gut exprimier-

bar war (97 %), wie unter Verwendung des RST mit 7 bp (100%). Mit Zunahme der Stammlänge von 2 zu 5 bp nahm die Expression der Varianten stetig ab, um dann mit 6 bp und 7 bp wieder anzusteigen, den maximalen Expressionswert zu durchlaufen und bei 8 bp wieder stark abzunehmen. Ein ähnliches Verhalten zeigt sich beim Gen CIITA (Abb. 19, B). Bereits bei geringen Stammlängen (2 bis 4 bp) zeigte sich eine detektierbare Expression von ca. 50 % der maximal erreichten Expression. Die Expression bei geringen Stammlängen (2-5 bp) waren jedoch nicht annähernd so stark, wie bei den korrespondierenden Stammlängen des Gens 1049. Aber auch beim Gen CIITA verringerte sich der Expressionswert bei der Stammlänge von 5 bp nochmals signifikant und durchlief wiederum über die Stammlänge von 6 bp ein Maximum bei 7bp, um dann wieder bei 8 bp einen minimalen Expressionswert zu erreichen. Das gleiche Verhalten zeigte sich bei der Expression von Survivin unter Verwendung der unterschiedlichen Stammlängen, nur insgesamt auf einem Expressionsniveau, das an der Detektionsgrenze lag. Deshalb lieferte eine densitometrische Auswertung (im Rauschbereich) keine signifikanten Daten. Unter Verwendung der geringen Stammlängen (2 bis 4 bp) ist eine sehr schwache Expression zu sehen, die bei der Stammlänge von 5 bp nicht mehr erkennbar ist. Die Expression nahm wieder mit der Stammlänge von 6 bp zu, durchlief den maximalen Expressionswert bei 7 bp des RST, um bei der Stammlänge von 8 bp minimale Expression, wie bei Stammlänge 5 bp, zu erreichen.

Die Ergebnisse sprechen insgesamt dafür, dass die Initiation der Translation bei den drei Genen mit der Stammlänge des RST korreliert (Abb. 19, D) und eine allgemeine Abhängigkeit der Expression verschiedener Gene von der verwendeten Stammlänge vorliegt. Geht man davon aus, dass die Ausbildung des RST im Kontext des Strukturgens den Initiationsbereich der Translation von dessen Paarungen mit abwärts gelegenen RNA-Bereichen des Strukturgens freisetzt, so wird je Gen ein unterschiedliches Freisetzungspotential³ des Translationsbereichs (oder freisetzende Energie) durch Einbringen des RST benötigt. Für die Expressionsinitiation des Gens 1049 wird weniger Freisetzungspotential³ als für die des Gens CIITA benötigt, wobei das Gen Survivin am schwersten initiiert ist. Das bedeutet, dass zur erfolgreichen Initiation der Translation des Gens 1049 bereits eine geringere Destabilisierung der Wildtyp-RNA-Struktur ausreicht, während das Gen Survivin in einer gerade translatierbaren RNA-Struktur durch Einbringen des RST mit Stammlänge 7 bp vorliegt. Beim Gen Survivin ist demnach das Potential des eingeführten RST mit 7 bp zur erfolgreichen Translationsinitiation limitiert. Das Gen CIITA liegt in diesem Zusammenhang zwischen den beiden Extremen (1049 und Survivin).

Die stärkste Expression wurde bei allen Genen durch Einsatz des RST mit der Stammlänge von 7 bp ($\Delta G_7 = -9,9$ kcal/mol) erreicht, wodurch diese Stammlänge universell einsetzbar wird.

Der Expressionserfolg in Abhängigkeit der Stammlänge des eingebrachten RST (Abb. 19, D) zeigt, dass die Funktionalität des RST sich aus mehreren überlagerten Einflüssen zusammensetzt. Der räumliche Platzbedarf und die Stabilität des RST können die Translation sowohl begünstigen als auch erschweren. Wird der RST zu groß, so verringert er wegen seiner Größe die Translation (4.1.3.1). Genauso ist die Translationsinitiation suboptimal, wenn der RST stabiler wird (Abb. 19, D, 2 bis 6 bp) ohne eine entsprechende räumliche Größe zu haben. Dabei konkurrieren zwei gegenläufige Effekte: eine stabile RST-Struktur wird vom Ribosom erschwert aufgelöst, während ihre räumliche Größe oder Ausbildungswahrscheinlichkeit die gesamte mRNA-Struktur nicht ausreichend verändern kann, so dass der gewünschte Effekt der Freisetzung des Initiationsbereichs⁴ aus Abwärtsparungen¹ zustande kommt. Es verringert sich die Expressionsleistung aber auch stark, wenn der RST zu groß und zu stabil ist (Abb. 19, D, 8 bp), weil der RST dann vom Ribosom sehr schwer aufgelöst werden kann. Beim Gen 1049 verringert beispielsweise der Einsatz des RST mit 8 bp Stammlänge die Expression um 50 % im Vergleich zu der bei 7 bp. Bei CIITA ist dieser Effekt noch dramatischer. Die Verlängerung des RST von 7 auf 8 bp ($\Delta G_7 = -9,9$; $\Delta G_8 = -13,0$ kcal/mol) verringert die Expression um 80 %. Dagegen fördert der RST die Translation, indem er bei optimaler Größe (Abb. 19, D, 7 bp) die Stabilität nicht überschreitet, ab der er vom Ribosom erschwert aufgelöst werden kann. Die optimale Größe scheint dabei zwischen dem „Freihalten“ des Initiationsbereichs vor Abwärtsparungen¹ und größen-/stabilitätsbedingter Verringerung der Translation zu konkurrieren. Mit 7 bp ist der RST in ausgewogenem Gleichgewicht zwischen räumlicher Größe und Stabilität, um die Translation maximal zu begünstigen.

4.2. RNA-Strukturuntersuchungen

4.2.1. Untersuchungen des eingeführten RST

Um Rückschlüsse über die Funktionalität des vor die Strukturgene eingeführten RST ziehen zu können, musste seine strukturelle Ausbildung untersucht werden. Dafür wurden, wie im Methodenteil beschrieben (3.10.1), unterschiedliche Strategien gewählt. Bei der experimentellen Methode wurde die spezifische Hybridisierung der Oligonukleotide über den RNase H Verdau und die Analyse der Spaltfragmente im Polyacrylamidgel visualisiert. Die Untersuchungen wurden analog den im Methodenteil beschriebenen Vorgehen (3.10) mit unterschiedlichen Oligonukleotiden durchgeführt.

4.2.1.1. Sequentielle Oligonukleotidhybridisierung

Um die Ausbildung des RST zu untersuchen wurden bei diesem Ansatz (3.10.1.1) kombinatorische Oligonukleotide zur Hybridisierung an die RST-mRNA (Tab. 3, B, 8) des Gens 1049 verwendet. Das Hybridisierungsverhalten der Oligonukleotide sollte Aufschluss über die strukturelle Situation des RST im Gen-Kontext geben. Generell sind einzelsträngige RNA-Bereiche für die Hybridisierung des komplementären Oligonukleotids besser zugänglich und führen zu verstärkter Spaltung durch die RNase H, während doppelsträngige RNA-Bereiche schwer oder nicht für die Hybridisierung durch das komplementäre Oligonukleotid zugänglich sind, und sie folglich nicht oder schwach von der RNase H gespalten werden (Donis-Keller, 1979; Gunzl *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 1999). Eine zunehmenden Oligonukleotidmenge konkurriert dabei um die Hybridisierung der Zielsequenz mit der komplementären Sequenz der RNA-Struktur, und sie zeigt damit die Zugänglichkeit und folglich die Stabilität der RNA-Sekundärstruktur in diesem Bereich (Lima *et al.*, 1992; Phillips *et al.*, 1999). Auf diese Weise wurde das Hybridisierungsverhalten auf der 5'- und 3'-Seite des RST mit dem Hybridisierungsverhalten innerhalb des RST verglichen. Die Oligonukleotide und ihre Zielsequenzen der Hybridisierung sind in Abb. 8, und die daraus resultierenden Spaltfragmente als Ergebnisse des RNase H Verdau in Abb. 20 gezeigt. Bei diesem Versuch wurde ausschließlich die oben genannte RST-Variante der mRNA des Gens 1049 verwendet. Deshalb sind die Oligonukleotide nur mit den Buchstaben a bis f gekennzeichnet, und die Genbezeichnung vor den Buchstaben (z.B. 1049 a), wie sie im Materialteil die genspezifischen Oligonukleotide kennzeichnet (2.7), ist weggelassen.

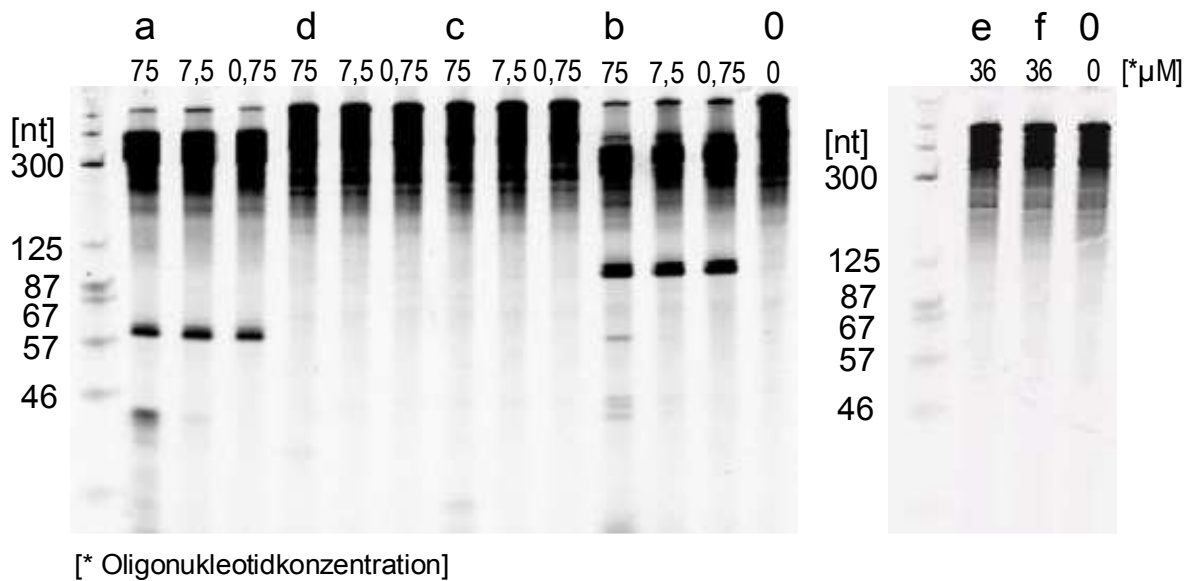


Abb. 20: **15 % TBE-Harnstoffgel der Spaltprodukte als Visualisierung des Hybridisierungsverhaltens spezifischer Oligonukleotide an die mRNA-Struktur.** Die Spuren sind analog der verwendeten Oligonukleotide aus Abb. 8 gekennzeichnet. Jedes Oligonukleotid wurde mit ansteigender Menge eingesetzt und ist entsprechend gekennzeichnet. Oligonukleotid (a) zeigt seine vermittelte Spaltung auf der 5'-Seite des RST, während das Oligonukleotid (b) die vermittelte Spaltung auf der 3'-Seite des RST zeigt. Die Oligonukleotide (c, d, e, f) vermittelten keine Spaltung durch die RNase H. Die Spur 0 zeigt die Kontrolle ohne Oligonukleotid.

Wie in Abb. 20 dargestellt, wurden je Oligonukleotid unterschiedliche Mengen für die Hybridisierung und den RNase H Verdau eingesetzt. Am Ende des Verdaus wurden die RNasen deaktiviert und, das denaturierende Polyacrylamidgel mit einem Volumen von 10 µl beladen (dies entsprach 250 ng mRNA). Das Oligonukleotid (a) vermittelte die Abspaltung auf der 5'-Seite des RST mit der erwarteten Fragmentgröße von 62 nt. Genauso zeigte das Oligonukleotid (b) die Spaltung auf der 3'-Seite des RST mit dem erwarteten Fragment von 98 nt. Bemerkenswert dabei ist, dass die Oligonukleotide in allen verwendeten Konzentrationen zu annähernd gleichen Spaltproduktmengen führten. Das bedeutet, dass die Bereiche vor und nach dem RST sehr gut für die Hybridisierung zugänglich waren. Im Gegensatz dazu konnten die Oligonukleotide (c) und (d) bei keiner verwendeten Konzentration hybridisieren und die RNase H-Spaltung vermitteln. Lediglich unspezifische sekundäre Spaltprodukte mit kleinerer Größe wurden bei geringeren Fragmentgrößen detektiert.

Weil die Länge des Oligonukleotids einen maßgeblichen Einfluss auf die Hybridisierung hat (Young und Wagner, 1991), und die zum RNA-Stamm und der Haarnadelschleife komplementären Oligonukleotide (c, d) nur 6 Basen bzw. 4 Basen lang waren, wurden diese

Bereiche mit den Oligonukleotiden (e) und (f) nochmals untersucht. Mit diesen Oligonukleotiden wurde die Nukleotidlänge, die beim Oligonukleotid (b) zu deutlicher Spaltung führte, in den RST hineinverschoben. Die Oligonukleotide wurden mit 36 μM in den RNase H Verdau eingesetzt und zeigten ebenfalls keine Hybridisierung.

Das Oligonukleotid (d) sollte in der Haarnadelschleife hybridisieren, zeigte aber keine Spaltung durch die RNase H. In diesem Kontext wird berichtet, dass Oligonukleotide, die über 4 bp an die RNA hybridisieren, eine RNase H-Spaltung vermitteln können (Donis-Keller, 1979; Phillips *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wird auch berichtet, dass Haarnadelschleifen auf Grund ihrer Tertiärstruktur, deren Veränderung eine Öffnung des RNA-Stamms notwendig machen würde, keine Hybridisierung zuließen (Lima *et al.*, 1992). Im Falle der untersuchten Haarnadelschleife, bestehend aus 4 Nukleotiden, war die Hybridisierungsenergie aus den komplementären Oligonukleotiden (d, e, f) nicht hoch genug, um eine Hybridisierungshelix innerhalb der AT-reichen Haarnadelschleife auszubilden. Der Stamm war scheinbar so stabil, dass er keine strukturelle Veränderung der Haarnadelschleife zur Ausbildung einer Hybridisierungshelix mit dem Oligonukleotid (d) oder den jeweiligen Sequenzabschnitten der Oligonukleotide (e, f) zuließ. Das dabei die Stabilität des Stamms der Grund für die ausbleibende Hybridisierung der Haarnadelschleife war, wird im folgenden Zusammenhang plausibel. Nicht einmal die Sequenzabschnitte der Oligonukleotide (e, f), die gegen den Stamm gerichtet waren und diesen öffnen sollten konnten diesen so weit destabilisieren, dass dann die Hybridisierung an die Haarnadelschleife mit den komplementären Sequenzabschnitten ermöglicht wurde. Das der Stamm bei keiner der verwendeten Konzentrationen des Oligonukleotids (c) eine Hybridisierung erkennen ließ, zeigt seine Stabilität und untermauert diese Schlussfolgerung.

4.2.1.2. Überlappende Oligonukleotidhybridisierung

Durch diesen Ansatz sollte untersucht werden, ob der RST sich ausgebildet hat, und ob die RNA-Sekundärstruktur des RST durch Oligonukleotide überlappend hybridisiert und damit die Strukturausbildung nachgewiesen werden kann. Für diese Untersuchungen wurde jeweils die RST-mRNA der Gene 1049 mit der AS-Kombination 8 (Tab. 3, B, 8) und die des Gens CIITA mit der AS-Kombination 1 (Tab. 3, B, 1) verwendet. Zusätzlich wurde beim Gen 1049 noch die Wildtyp-mRNA untersucht. Zur Hybridisierung an die 1049-mRNA wurden die in Abb. 8 (a, b, g, h) beschriebenen Oligonukleotide verwendet. Für die Untersuchung der CIITA-mRNA wurden die jeweiligen Oligonukleotide analog platziert, und sie sind im Materialteil (2.7) aufgelistet. Bei beiden Genen wurde jeweils noch ein weiteres Oligonukleotid

(b₁) verwendet, das genauso wie (b) auf der 3'-Seite des RST platziert war, aber noch um drei Nukleotide auf der genspezifischen Seite verlängert war.

Die Untersuchung unter Verwendung der RNase H zur Visualisierung der Hybridisierung wurde wie im Methodenteil (3.10) beschrieben durchgeführt.

4.2.1.2.1. mRNA des Gens 1049 mit RST-überlappender Oligonukleotid-hybridisierung

Für diese Versuche wurde die RST-Variante des Gens 1049 verwendet. Diese Variante diente auch für die unter 4.2.1.2.3 gezeigten Ergebnisse. Die Spaltfragmente des RNase H Verdau nach Hybridisierung der überlappenden Oligonukleotide sind in Abb. 21 gezeigt. Die verwendeten Oligonukleotide (g, h, b, b₁) beziehen sich auf das Gen 1049.

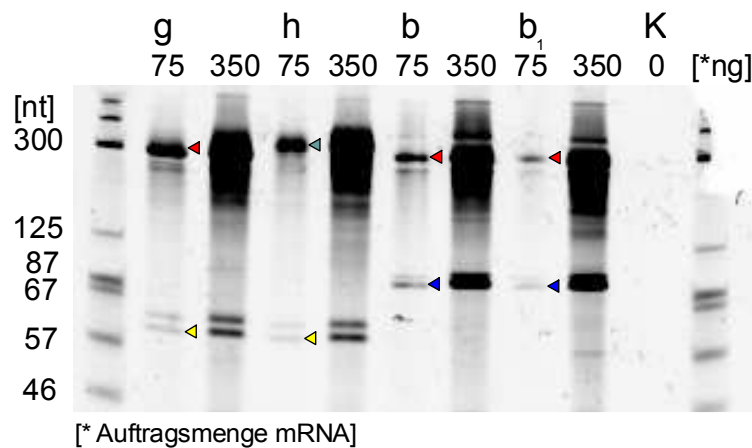


Abb. 21: **15% TBE-Harnstoff-Polyacrylamidgel nach RNase H Untersuchung der 1049-mRNA RST-Variante (AS-Kombination 8).** Die verwendeten Oligonukleotide (g, h, b, b₁) sind gekennzeichnet. Ebenso sind die Auftragsmengen der mRNA auf das PAA-Gel über den Spuren gekennzeichnet. Die verbleibenden 3'-Fragmente sind rot bzw. grün hervorgehoben, und die 3'-Fragmente sind gelb bzw. blau markiert. Die Kontrolle (K) enthielt den Reaktionsansatz ohne mRNA.

In Abb. 21 sind in den Spuren g und h die gleichen 5'-Fragmente, wie bei den Ergebnissen unter 4.2.1.2.3 zu sehen (Abb. 23, g₁, h₁). Das größere 5'-Fragment (grün), das unter Verwendung des Oligonukleotids (h) durch die RNase H abgespalten wurde, zeigt deutlich, dass keine vollständige Verkürzung des 3'-Fragments zustande gekommen ist (grün), wie dies unter Verwendung der Oligonukleotide (g, b, b₁) der Fall war (rot). Gleichzeitig wurde mit den Oligonukleotiden (g) und (h) die erwarteten 5'-Fragmente im Bereich 60 bis 63 nt abgespalten (gelb). Das bedeutet, dass bei Verwendung beider überlappenden Oligonukleotide (g) und (h) diese auf der 5'-Seite des RST hybridisierten. Auf der 3'-Seite des RST konnte nur das auf dieser Seite verlängerte Oligonukleotid (g) überlappend hybridisieren, wogegen das kürzere Oligonukleotid (h) nicht überlappend hybridisieren konnte.

Bei den Reaktionen der Spuren b und b₁ wurden entsprechenden Oligonukleotide verwendet, die zur Spaltung nach dem RST führen. Sie führten einerseits zur vollständigen Verkürzung des 3'-Fragments (rot) und andererseits zur Abspaltung des 3'-Fragments inklusive RST-Sequenz (blau).

Die Differenz zwischen den 5'-Fragmenten (gelb), die mit den überlappenden Oligonukleotide (g) und (h) abgespalten wurden, und den 5'-Fragmenten, die mit den Kontrolloligonukleotiden (b) und (b₁) abgespalten wurden (blau), liegt im Rahmen der Genauigkeit der Gelelektrophorese bei den erwarteten 30 Nukleotiden, die durch Ausbildung des RST bei überlappender Hybridisierung zustande kommt. Das bedeutet, dass bei vollständiger Verkürzung der mRNA mit dem Oligonukleotid (g) der RST überlappt und abgespalten wurde, während bei (h) der RST am 3'-Fragment verblieben ist.

4.2.1.2.2. mRNA des Gens CIITA mit RST-überlappender Oligonukleotidhybridisierung

Die Untersuchung, die unter 4.2.1.2.1 bei der mRNA des Gens 1049 gezeigt ist, wurde nach dem gleichen Prinzip der überlappenden Oligonukleotidhybridisierung beim Gen CIITA durchgeführt. Die Oligonukleotide sind im Materialteil (2.7) aufgelistet. Die verwendeten Oligonukleotide (g, h, b, b₁) beziehen sich auf das Gen CIITA. In Abb. 22 sind die Hybridisierungen und die daraus resultierende RNase H Spaltprodukte im PAA-Gel analysiert.

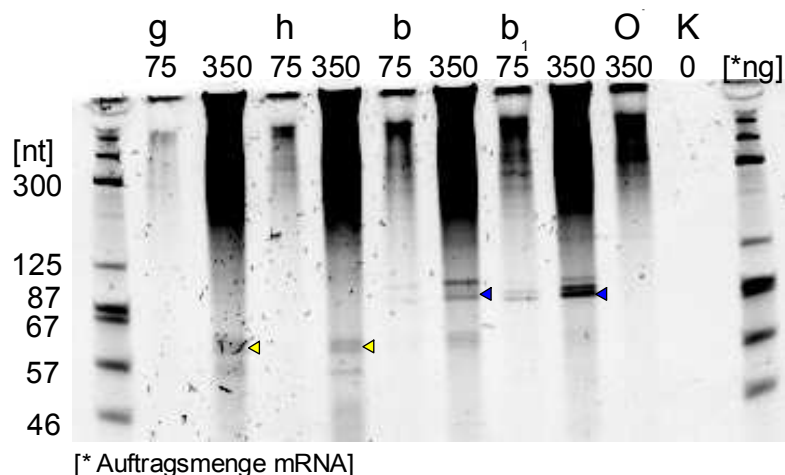


Abb. 22: 15% TBE-Harnstoff-Polyacrylamidgel nach RNase H Untersuchung der CIITA-mRNA RST-Variante (AS-Kombination 1). Die verwendeten Oligonukleotide (g, h, b, b₁) sind gekennzeichnet. Ebenso sind die Auftragsmengen der mRNA auf das PAA-Gel über den Spuren gekennzeichnet. Die 3'-Fragmente sind gelb bzw. blau markiert. Die Kontrolle (K) enthielt den

Reaktionsansatz ohne mRNA, während die Kontrolle O' den Reaktionsansatz ohne Oligonukleotid zeigt.

Es zeigt sich auch beim Gen CIITA das gleiche Muster wie beim Gen 1049 unter Punkt 4.2.1.2.1. Die 5'-Fragmente in den Spuren g und h sind jedoch nicht so deutlich (gelb), was auf die Größe der mRNA von 1378 Nukleotiden und der deshalb komplexeren Strukturausbildung beruhen kann. Wegen der Größe der mRNA können in diesem Fall die 3'-Fragmente nicht analysiert werden. Die Spuren b und b₁ zeigen auch hier relativ deutlich die 5'-Fragmente inklusive RST. Es wird deutlich, dass die 5'-Fragmente nach Hybridisierung der Oligonukleotide (g) und (h) die RST-Sequenz nicht beinhalten, weil keine Fragmentbanden in den Spuren g und h (Abb. 22) mit der Fragmentgrößen wie bei den Kontrollreaktionen (Abb. 22, b, b₁) zu finden sind.

4.2.1.2.3. Vergleich der RNase H-Spaltung bei Wildtyp und RST-Variante

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um das Hybridisierungsverhalten der überlappenden Oligonukleotide (g) und (h) zwischen Wildtyp- und RST-Variante zu vergleichen. Dafür wurde die 1049-mRNA in der RST-Variante mit AS-Kombination 8 und die Wildtyp-Variante verwendet. Zur überlappenden Hybridisierung wurden die Oligonukleotide (g) und (h) verwendet, und der RNase H Verdau wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide (g, h) beziehen sich auf das Gen 1049, weshalb die Genbezeichnung des Materialteils (z.B. 1049 g) im Folgenden weggelassen wird. Die Analyse der Spaltfragmente im PAA-Gel sind in Abb. 23 gezeigt.

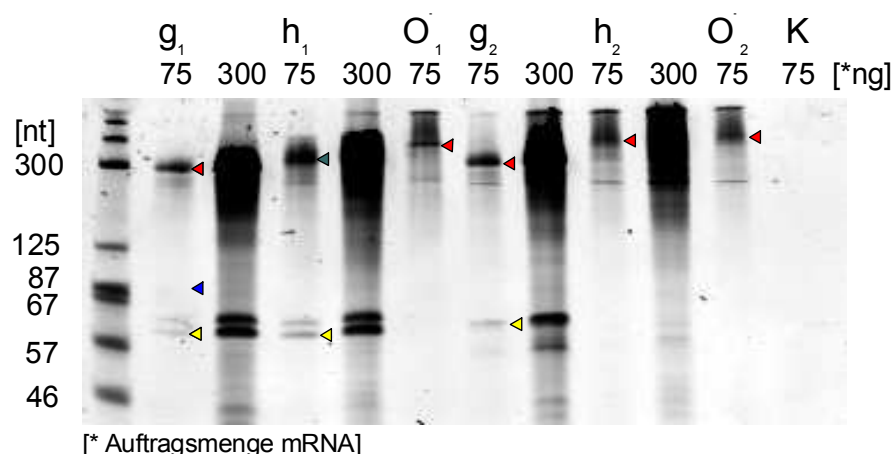


Abb. 23: **15% TBE-Harnstoff-Polyacrylamidgel nach RNase H Untersuchung der 1049-mRNA.** Die verwendeten Oligonukleotide (g, h) sind gekennzeichnet. Ebenso sind die Auftragsmengen der mRNA auf das PAA-Gel über den Spuren gekennzeichnet. Die 3'-Fragmente sind gelb markiert. Die Kontrolle (K) enthielt den Reaktionsansatz ohne mRNA, während die Kontrolle O' den

Reaktionsansatz ohne Oligonukleotid zeigt. Der Index 1 bezeichnet die RST-Variante und der Index 2 die Wildtyp-mRNA.

Die Spaltfragmente der 1049-RST-mRNA (Abb. 23, Index 1) zeigen das gleiche Muster wie es unter 4.2.1.2.1 erhalten wurde. Es entstehen deutlich unterschiedliche Fragmentlängen des 3'-Fragments (rote bzw. grüne Markierungen) unter Verwendung der beiden Oligonukleotide (g) und (h). Das bedeutet, dass das Oligonukleotid (g) auf der 3'-Seite des RST hybridisiert, während das Oligonukleotid (h) ein längeres 3'-Fragment produziert (grün), weil es mit den 5 nt auf der 3'-Seite des RST nicht ausreichend hybridisieren kann. Es bildet sich unter Verwendung des Oligonukleotids (h) das gleiche 5'-Fragment (Abb. 23, h₁) aus, wie beim Oligonukleotid (g) (Abb. 23, g₁), weil auf der 5'-Seite des RST die Oligonukleotide in beiden Fällen hybridisieren (gelbe Markierungen). Folglich enthält das längere 3'-Fragment nach Verwendung des Oligonukleotids (h) noch den RST und kann den RST nicht überlappend hybridisieren. Falls der RST durch das Oligonukleotid (g) nicht überlappt würde, müsste bei vollständiger Verkürzung auf das 3'-Fragment (rot) ein um 33 Nukleotide längeres 5'-Fragment inklusive RST entstehen (blaue Markierung).

Die Wildtyp-Variante von 1049 (Abb. 23, g₂) zeigt ein Spaltfragment, das dem 5'-Fragment entspricht (gelb), weil auf der Wildtypsequenz 9 Nukleotide des Oligonukleotids (g) partiell hybridisieren können. Beim verkürzten Oligonukleotid (h) ist kein 5'-Fragment mehr zu sehen, weil hier die 5 Nukleotide, die auf der genspezifischen Sequenz hybridisieren sollten, für eine Hybridisierung nicht mehr ausreichen.

Die Ergebnisse (4.2.1.2.1; 4.2.1.2.3) des RNase H Verdaus unter Verwendung des Oligonukleotids (1049 h) zeigen, dass sowohl bei der Wildtyp- als auch bei der RST-Variante die 5 Nukleotide, die an die genspezifische mRNA-Sequenz hybridisieren sollten, nicht hybridisieren und das entsprechende 3'-Fragment abspalten konnten. Damit konnte dieses Oligonukleotid auch bei der RST-Variante den RST nicht überlappen. Für eine Überlappung des RST sind 9 Nukleotide (durch das Oligonukleotid g) notwendig, um von der 5'-Seite die RNA-Sekundärstruktur des RST bis zur 3'-Seite zu überlappen.

Die Ergebnisse der RST-überlappenden Oligonukleotidhybridisierung unter 4.2.1.2.1 und 4.2.1.2.3 zeigen die vollständige Verkürzung der RST-mRNA des Gens 1049 von 410 nt auf die erwartete Fragmentlänge von 300 nt auf der 3'-Seite des RST unter Verwendung des Oligonukleotids 1049 g. Gleichzeitig kommt es beim überlappenden Oligonukleotid (1049 g) zur Abspaltung des 5'-Fragments in der erwarteten Größe. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den Spaltprodukten (unter 4.2.1.2.1) aus dem Einsatz der Oligonukleotiden b und b₁, die

das 5'-Fragment inklusive RST abspalteten, weist darauf hin, dass der RST ausgebildet wurde und durch das überlappende Oligonukleotid 1049 g für den Abbau durch die RNase H markiert wurde. Wenn sich der RST nicht ausgebildet hätte, müsste in Abb. 21 (g) eine Bande auf gleicher Höhe wie bei b und b₁ zu sehen sein, oder es hätte das 3'-Fragment der mRNA bei Einsatz des Oligonukleotids (g) nicht vollständig verkürzt, sondern wie bei Verwendung des Oligonukleotids (h) vorliegen müssen.

Die Ergebnisse der RST-überlappenden Oligonukleotidhybridisierung bei der mRNA des Gens CIITA zeigen gleiche Fragmentierungen der 5'-Fragmente wie beim Gen 1049. Dies stützt die Interpretation, dass der RST sich ausgebildet hat, weil auch hier keine 5'-Fragmente inklusive des RST detektiert wurden. Lediglich die Verkürzung der 3'-Fragmente konnte nicht überprüft werden. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, weil sich in der sehr viel längeren CIITA-mRNA von 1378 Nukleotiden analoge Fragmentierung wie bei der kürzeren 1049-mRNA (410 nt) zeigt. Der Längenunterschied ist wahrscheinlich der Grund, warum das Ergebnis nicht so deutlich wie bei der mRNA des Gens 1049 ist.

Bei den beschriebenen Versuchen besteht jedoch die Möglichkeit, dass das RST-überlappende Oligonukleotid die detektierten Fragmente in zwei Teilreaktionen generiert. Stellt man sich das Oligonukleotid in zwei hybridisierungsaktiven Bereichen (5' und 3' vom RST) vor, so ist es denkbar, dass in einem ersten Schritt einer dieser Bereiche des Oligonukleotids (g) partiell an die mRNA hybridisiert und ein 5'-Frgament mit oder ohne RST abspaltet. Im zweiten Schritt wird dann der andere Teil des Oligonukleotids (g) an die Zielsequenz partiell hybridisieren und diese abspalten. Aus dieser Überlegung ist mit den überlappenden Oligonukleotiden noch nicht die stabile Ausbildung des RST nachgewiesen, sondern es besteht lediglich der Hinweis auf dessen Ausbildung. Erst mit der Analyse des Stamms im Vergleich zu umgebenden Sequenzen konnte die Ausbildung des RST nachgewiesen werden (4.2.1.1). Wegen der übereinstimmenden 5'-Fragmentbanden bei der sequentiellen Oligonukleotidhybridisierung (4.2.1.1) und der überlappenden Oligonukleotidhybridisierungen (Abb. 21) weisen die Ergebnissen der überlappenden Oligonukleotidhybridisierungen auf die Ausbildung des RST in der 1049-RST-mRNA. Damit sind auch die Ergebnisse der überlappenden Oligonukleotide bei der Untersuchung der Gene Survivin und CIITA ein Hinweis auf die Ausbildung des RST im jeweiligen Gen-Kontext.

Die Doppelbanden der 5'-Fragmente nach der Hybridisierung des überlappenden Oligonukleotids (g) aus Abb. 21 und Abb. 23 wurden zusammen mit den Ergebnissen eines weiteren RNase H Verdaus in Abb. 24 dargestellt, um den Grund für Abspaltung der Doppelbanden zu analysieren. Die 5'-Fragmente aus der Hybridisierung des überlappenden Oligonukle-

otids (g) sind in Abb. 24 in den Spuren 1 und 2 zusehen. Die Spuren 3 bis 5 in Abb. 24 zeigen die Spaltfragmente aus dem RNase H Verdau unter Verwendung des Oligonukleotids 1049 K8 (siehe Kapitel 4.2.2.1, Abb. 27, A, 1 bis 3), das vor dem RST hybridisiert. Der einzige Unterschied zum Oligonukleotid (1040 g) ist, dass dieses Oligonukleotid noch auf der 5'-Seite an das Start-AUG hybridisiert. Deshalb wurde bei der PAA-Analyse des RNase H Verdau mit dem Oligonukleotid 1049 K8 (Abb. 24, 3 bis 5) ein kürzeres Fragment detektiert als in der unteren Bande der Spuren 1 und 2. Dies wurde erwartet, weil das Oligonukleotid 1049 K8 auf der 5-Seite um 3 Nukleotide länger ist als das überlappende Oligonukleotid (g).

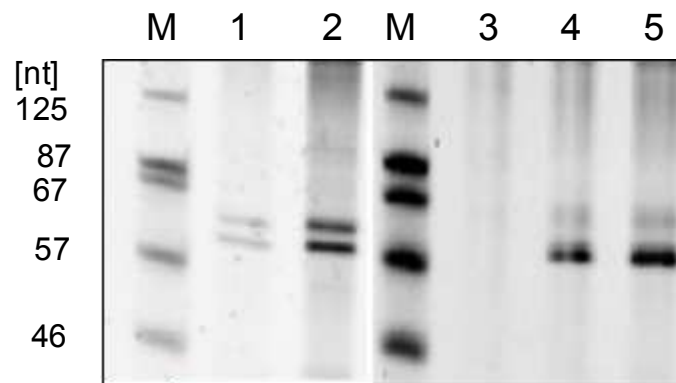


Abb. 24: Vergleich der Polyacrylamidgele aus Abb. 21, g (linke Hälfte: M, 1, 2) und aus Abb. 27, A, 1 bis 3 (rechte Hälfte: M 3, 4, 5).

Der Vergleich der Doppelbanden der 5'-Spaltfragmente (Abb. 24, Spuren 1, 2) mit den 5'-Spaltfragmenten der Spuren 3 bis 5 (Abb. 24, Spuren 3 bis 5) zeigt, dass die Doppelbande nur bei der überlappenden Hybridisierung zustande kommt. Dafür sind zwei Möglichkeiten denkbar. Entweder entsteht bei überlappender Hybridisierung eine Spannungssituation, die zu der Doppelbande führt, oder die drei zusätzlichen Hybridisierungen mit dem Start-AUG stabilisieren die Hybridisierung im Vergleich zur Hybridisierung der 3 Adenosinreste, die wegen ihrer geringeren Hybridisierungsenergie partiell hybridisieren könnten und deshalb zu der Doppelbande führen könnten.

4.2.2. Strukturelle Auswirkungen durch Einführen des RST

Nachdem unter 4.2.1 untersucht wurde, ob sich die eingefügte RST Struktur im Kontext der Strukturgene ausbildet, sollte mit den folgenden Versuchen der Einfluss des RST auf die strukturelle Einbindung von translationswirksamen Elementen in der mRNA untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde die strukturelle Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle und des Start-Kodons mit den ersten 18 translatierten Nukleotiden unter Verwendung komplementärer Oligonukleotiden und RNase H untersucht.

Generell konkurriert eine ansteigende Menge eines komplementären Oligonukleotids um die Hybridisierung der Zielsequenz auf der mRNA mit dem komplementären mRNA-Gegenstrang der Zielsequenz. Der Gegenstrang bildet dabei mit der Zielsequenz des Oligonukleotids die RNA-Sekundärstruktur aus. Folglich kann die Neigung der Zielsequenz zur mRNA-Strukturausbildung zwischen Wildtyp-mRNA und RST-mRNA mittels Oligonukleotid-Titration verglichen werden (Lima *et al.*, 1992; Phillips *et al.*, 1999).

4.2.2.1. Auswirkungen des RST auf die mRNA-Struktur der Ribosomenbindestelle

Eines der für die Translation wichtigen Elemente ist die Ribosomenbindestelle (1.3). Durch die Einführung des RST wurde eine strukturelle Veränderung der mRNA im Bereich der Ribosomenbindestelle erwartet. Nach der unter 1.7 erklärten Strategie sollte der RST zu einer besseren Zugänglichkeit der RBS für die Translationsinitiation führen. Deshalb wurde die Struktur der Ribosomenbindestelle analog den im Methodenteil (3.10.2) beschriebenen Bedingungen untersucht. Für die Titration der Ribosomenbindestelle wurde bei allen mRNA-Varianten und allen Genen das komplementäre Oligonukleotid RBS-Sonde 2 verwendet. In Abb. 25 sind die Ergebnisse der Titration der Ribosomenbindestelle mit der RBS-Sonde 2 abgebildet. Es wurden je Ansatz 5 µl der Reaktion (die 125 ng mRNA repräsentierten) im 15 % TBE-Harnstoffgel analysiert. Die Menge der Spaltprodukte wurde je Gen relativ zur maximal erreichten Spaltproduktmenge der entsprechenden Größe der 5'-Fragmentbande (50 nt) normalisiert. Als Fehlerindikator wurde der Leerwert der Spur ohne Spaltung (0 ng Oligonukleotid) verwendet.

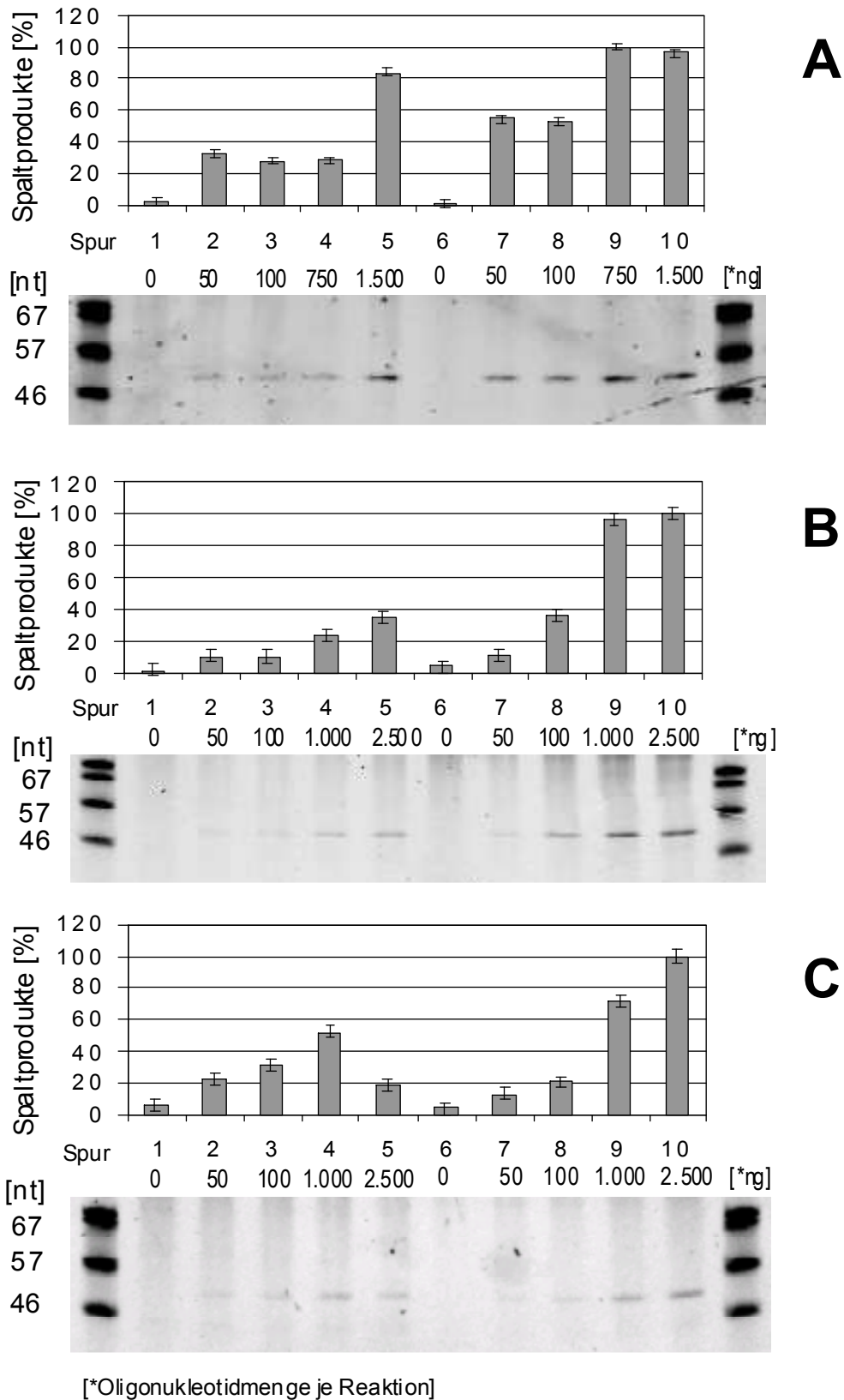


Abb. 25: **Titration der strukturellen Zugänglichkeit der RBS.** Das TBE-Harnstoffgel zeigt die Spaltprodukte nach der Oligonukleotid-Titration mit der RBS-Sonde 2. Die Menge der Spaltprodukte wurde je Gen auf die maximale Spaltproduktmenge normalisiert (%). **A:** Spuren 1 bis 5: 1049

RST-mRNA; Spuren 6 bis 10: 1049 Wildtyp-mRNA. Beide Varianten wurden mit ansteigender Oligonukleotidmenge beprobt (0, 50, 100, 750, 1.500 ng/Reaktion). **B:** Spuren 1 bis 5: Survivin RST-mRNA; Spuren 6 bis 10: Survivin Wildtyp-mRNA. **C:** Spuren 1 bis 5: CIITA RST-mRNA; Spuren 6 bis 10: CIITA Wildtyp-mRNA. Die Varianten wurden mit ansteigender Oligonukleotidmenge untersucht (B/C) (0, 50, 100, 1.000, 2.500 ng/Reaktion).

Die Ergebnisse der Titration des Oligonukleotids zeigen, dass bei der Wildtyp-mRNA des Gens 1049 (Abb. 25, A, 6 bis 10) bereits bei einer Oligonukleotidkonzentration von 50 ng ein deutlicher Abbau zu sehen ist, der bei höheren Konzentrationen der Sonde (100 ng) zunimmt, und ab 750 und 1.500 ng ein Plateau erreicht. Im Vergleich dazu führt bei der mRNA-Variante, die den RST enthält, die Oligonukleotidhybridisierung erst bei der Konzentration von 1.500 ng zu einem signifikanten Abbau (Abb. 25, A, 6 bis 10). Insgesamt ist bei der RST-Variante die gemessene Spaltproduktmenge, und folglich die Oligonukleotidhybridisierung, bei allen Oligonukleotidkonzentrationen deutlich geringer als bei der Wildtyp-mRNA.

Die Titrationen des Oligonukleotids bei den mRNA-Varianten des Gens Survivin zeigen noch deutlicher, dass bei der Wildtyp-mRNA (Abb. 25, B, 6 bis 10) bereits bei einer Oligonukleotidmenge von 100 ng die Ribosomenbindestelle für die Sondenhybridisierung so gut zugänglich ist wie bei der RST-mRNA (Abb. 25, B, 1 bis 5) erst bei der 25-fachen Oligonukleotidmenge (2.500 ng). Auch die mRNA-Varianten des Gens CIITA zeigen bei der Titration der RBS-Sonde 2, dass die Wildtyp-Variante (Abb. 25, C, 6 bis 10) besser für die Sondenhybridisierung zugänglich ist als im Vergleich zur RST-Variante (Abb. 25, C, 1 bis 5).

Bei allen untersuchten Genen wurden je Oligonukleotidmenge mehr Spaltprodukte bei der jeweiligen Wildtyp-mRNA als im Vergleich bei der RST-Variante gefunden. Das bedeutet, dass bei den Wildtyp-mRNA-Varianten die Ribosomenbindestelle für die Oligonukleotidhybridisierung besser zugänglich war als bei den jeweiligen RST-Varianten. Folglich führte das Einbringen des RST zu einer Stabilisierung der Ribosomenbindestelle.

Nach der Faltung der 1049-mRNAs mit dem Computerprogramm RNAdraw (Matzura und Wennborg, 1996) zeigt sich das experimentelle Ergebnis im Einklang zur Strukturvorhersage mit RNAdraw. Demnach liegt die Ribosomenbindestelle bei der RST-mRNA mit größerer Paarungswahrscheinlichkeit in der kurzen RNA-Sekundärstruktur, wie sie in Abb. 26 gezeigt ist, vor als bei der Wildtyp-Variante. Folglich stabilisiert das Einführen des RST diese RNA-Struktur.

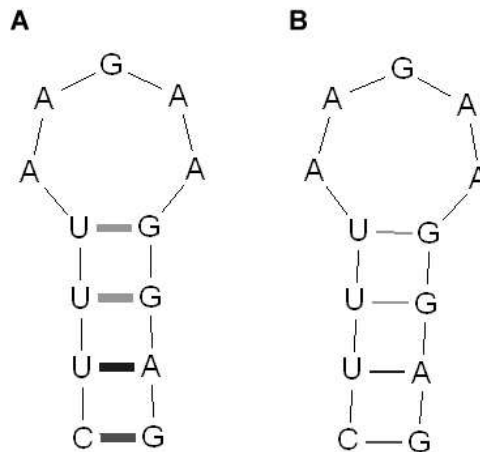


Abb. 26: **RNA-Struktur der Ribosomenbindestelle der mRNA-Varianten von 1049** (Matzura und Wennborg, 1996). **A:** RST-Variante (AS-Kombination 8). **B:** Wildtyp-mRNA. Die höhere Paarungswahrscheinlichkeit wird durch die breiter dargestellte Hybridisierung gekennzeichnet.

Die geringere Paarungswahrscheinlichkeit der Ribosomenbindestelle bei der Wildtyp-mRNA (Abb. 26, B) bedeutet, dass diese Sequenz demnach häufiger andersartig gepaart vorliegt (siehe 4.2.3.1).

Bei Survivin zeigte sich ein gleiches Verhalten der RBS nach Einbringen des RST wie beim Gen 1049. Die RBS wurde durch den eingeführten RST stabilisiert. Nach der Faltung der mRNA mit den Computerprogrammen RNAdraw und mit *mfold* zeigte sich kein Unterschied in der Ausbildung der RNA-Struktur der Ribosomenbindestelle selbst. Auffallend war jedoch, dass anhand der Faltungsvorhersagen der Sequenzbereich 5' von der Ribosomenbindestelle mit Sequenzen der genspezifischen mRNA eine Sekundärstruktur ausbildete.

4.2.2.2. Auswirkungen des RST auf die mRNA-Struktur der Kodons +1 bis +6

Als zweiter wichtiger Bereich für die Proteinexpression wurde die strukturelle Zugänglichkeit der ersten 18 Nukleotide (Kodons +1 bis +6) nach dem Start-Kodon der mRNA untersucht. Bei der Translationsinitiation wird dieser Bereich der mRNA (bis +15 nt) in der 30S-Untereinheit des Ribosoms platziert (1.3.4). Deshalb wurde die Titration dieses Bereichs analog dem im Methodenteil beschriebenen RNase H Verdau (3.10.2) durchgeführt. Unter Verwendung der jeweilig komplementären Oligonukleotide wurde jeweils die RST-mRNA mit der Wildtyp-mRNA bei den Genen 1049, Survivin und CIITA verglichen. Die Ergebnisse der Titrationen sind in Abb. 27 zusammengefasst.

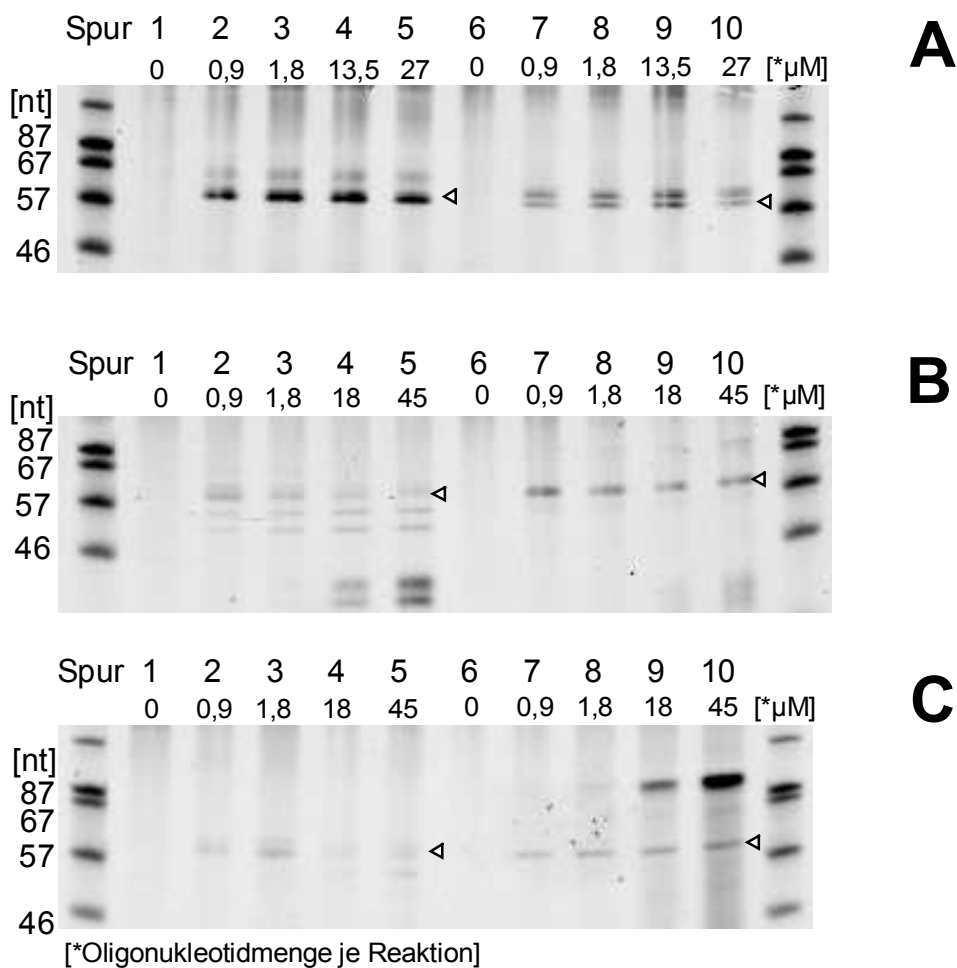


Abb. 27: **Titration der strukturellen Zugänglichkeit der ersten 18 translatierten Nucleotide.** Das TBE-Harnstoffgel zeigt die Spaltprodukte nach der Oligonucleotidtitration. **A:** Spuren 1 bis 5: 1049 RST-mRNA; Spuren 6 bis 10: 1049 Wildtyp-mRNA. Beide Varianten wurden mit ansteigender Oligonucleotidmenge beprobt (0, 50, 100, 750, 1.500 ng/Reaktion). **B:** Spuren 1 bis 5: Survivin RST-mRNA; Spuren 6 bis 10: Survivin Wildtyp-mRNA. **C:** Spuren 1 bis 5: CIITA RST-mRNA; Spuren 6 bis 10: CIITA Wildtyp-mRNA. Die Varianten wurden mit ansteigender Oligonucleotidmenge untersucht (B/C)(0, 50, 100, 1.000, 2.500 ng/Reaktion).

In Abb. 27 sind jeweils die erwarteten Spaltprodukte nach dem RNase H Abbau mit einem Pfeil gekennzeichnet. Insgesamt sind in den TBE-Harnstoffgelen in Abb. 27 Nebenbanden zu sehen. Diese kommen wegen der Länge der verwendeten Oligonucleotide (18 nt) durch partielle Hybridisierung zustande. Es können jedoch nur partielle Hybridisierungen an der Zielsequenz als relevant erachtet werden, die im Gel höher laufen, weil sie nur in einem begrenzten Bereich abwärts des Start-Kodons partiell hybridisieren können. Das Größenfenster der relevanten Fragmentgrößen ist wegen der Oligonucleotidlänge und der Tatsache, dass bereits 4 nt eine RNase H-Spaltung vermitteln können (Donis-Keller, 1979; Phillips *et al.*, 1999), limitiert. Vom Transkriptbeginn bis zum Start-Kodon ist das 5'-Spaltfragment 62 nt lang (ex-

klusive Start-AUG). Wenn mindestens 4 nt des Oligonukleotids (18 nt Länge) am 3'-Ende des 5'-Fragments partiell hybridisieren müssen, kann das größte spezifische Spaltfragment maximal 76 nt lang sein. Im Rahmen der Genauigkeit der Gelelektrophorese (± 3 nt (Invitrogen, 2002)) können deshalb keine Fragmente, die größer als 79 nt sind, aus der spezifischen Hybridisierung stammen. Genauso sind Nebenbanden, die kleiner als 59 nt sind, das Produkt unspezifischer Hybridisierungen und zeigen nur, dass die Zielsequenz insgesamt schlecht für die Hybridisierung erreichbar ist.

Im Fall des Gens 1049 zeigten die Titrations, dass die ersten 18 Nukleotide der RST-Variante (Abb. 27, A, 1 bis 5) bereits bei der geringsten Oligonukleotidmenge (0,9 μ M) für die Hybridisierung gut zugänglich waren. Dabei wurde bei dieser geringen Oligonukleotidmenge eine wesentlich höhere Menge an Spaltprodukten detektiert als bei der Wildtyp-mRNA bei allen Oligonukleotidkonzentrationen (Abb. 27, A, 6 bis 10). Folglich waren die ersten 18 translatierten Nukleotide bei der WT-mRNA stark in Sekundärstrukturen gebunden und wurden durch Einführen des RST signifikant destabilisiert. Dass sowohl bei der Wildtyp-mRNA als auch bei der RST-mRNA leichte Nebenbanden direkt oberhalb der Zielbande detektiert wurden, weist auf eine partielle Hybridisierung der Oligonukleotide nahe des Start-Kodons hin.

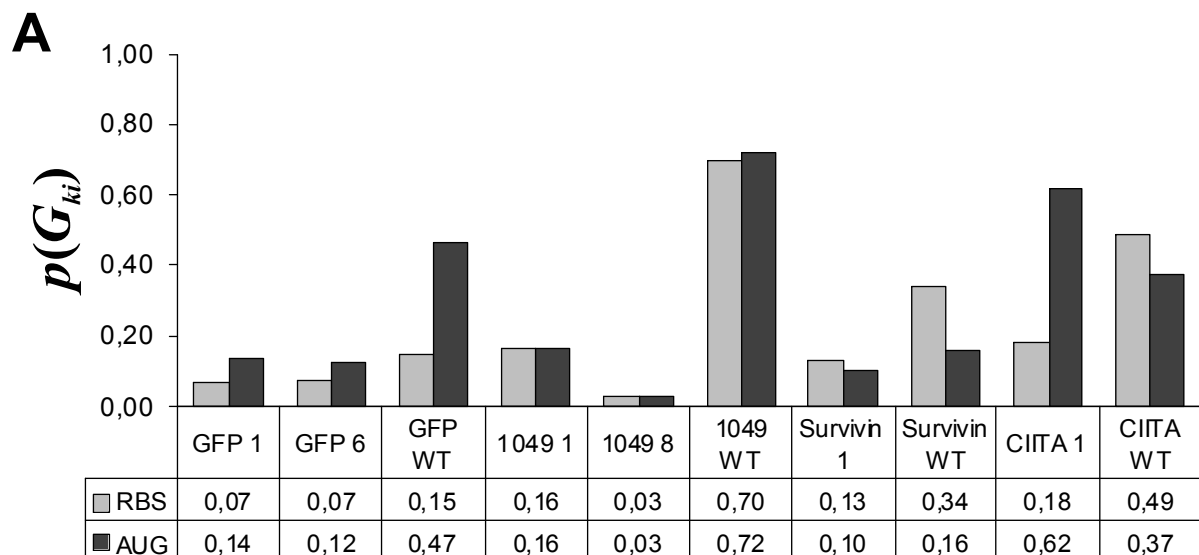
Im Gegensatz zur 1049-mRNA zeigten die Titrationsergebnisse der Survivin-mRNAs, dass die ersten 18 Nukleotide bei der RST-Variante (Abb. 27, B, 1 bis 5) stark in Sekundärstrukturen gebunden vorlagen. Die Titration führte lediglich zu kleineren, unspezifischen Spaltfragmenten, weil die Zielsequenz für die Hybridisierung nicht erreichbar war. Vergleichbar dazu war die Wildtyp-mRNA (Abb. 27, B, 6 bis 10) von Survivin im Initiationsbereich besser durch die Oligonukleotidhybridisierung erreichbar. Das bedeutet, dass die Einführung des RST in die Wildtyp-mRNA eine Stabilisierung der ersten 18 translatierten Nukleotide zur Folge hatte.

Analog der mRNAs von Survivin verhielten sich die mRNAs von CIITA. Die RST-mRNA (Abb. 27, C, 1 bis 5) zeigte bei allen verwendeten Oligonukleotidkonzentrationen kaum detektierbare Spaltprodukte. Vergleichbar dazu zeigte die Wildtyp-mRNA (Abb. 27, C, 9 bis 10) bei allen verwendeten Oligonukleotidkonzentrationen schwache Spaltprodukte in der erwarteten Größe. Zusätzlich waren unspezifische Hybridisierungen (Abb. 27, A, 9, 10) außerhalb des beschriebenen Fensters detektiert worden (Fragmentbanden größer 87 nt). Damit wird deutlich, dass die ersten 18 translatierten Nukleotide bei der Wildtyp-mRNA nicht sehr gut für die Hybridisierung zugänglich waren, aber die Einführung des RST in die Wildtyp-mRNA zu einer Stabilisierung der mRNA-Struktur in diesem Bereich geführt hat.

4.2.3. Theoretische RNA-Strukturuntersuchung

4.2.3.1. RNA-Struktur des Initiationsbereichs

Die theoretische Untersuchung der mRNA-Varianten bezog sich auf die Paarungen der bakteriellen Regulationselemente der Translation (RBS und Start-Kodon(AUG)) mit abwärts gelegenen genspezifischen mRNA-Sequenzen. Wie im Methodenteil beschrieben (3.12) wurden mit der Dot-Plot-Analyse die Abwärtspaarungen¹ der RBS und des Start-Methionins (AUG) identifiziert. Mit diesen Daten wurden die Frequenzen für das Auftreten einer solchen Paarung (f_i) und ihre energetische Gewichtung (r_{ki}) mit den jeweiligen Formeln berechnet. Die Verknüpfung dieser beiden Ergebnisse und die Summierung aller so erhaltener energiegewichteter Frequenzen über eine Genvariante lieferte die Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² der Variante (p_{Gki}). Der Vergleich zwischen Wildtyp- und RST-mRNA wurde je Gen wie unter 3.12 beschrieben durchgeführt, und er zeigt bezüglich der regulatorischen Elemente des Initiationsbereichs⁴ (RBS; AUG) die verringerte Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² nach Einführung des RST (p_r). Dieser Wert kann folglich auch als Freisetzungspotential³ des RST bezüglich des jeweiligen regulatorischen Elements⁴ gesehen werden. Die Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² (p_{Gki}) der RBS und des Start-AUG sowie das Freisetzungspotential³ des RST (p_r) sind in Abb. 28 gezeigt.



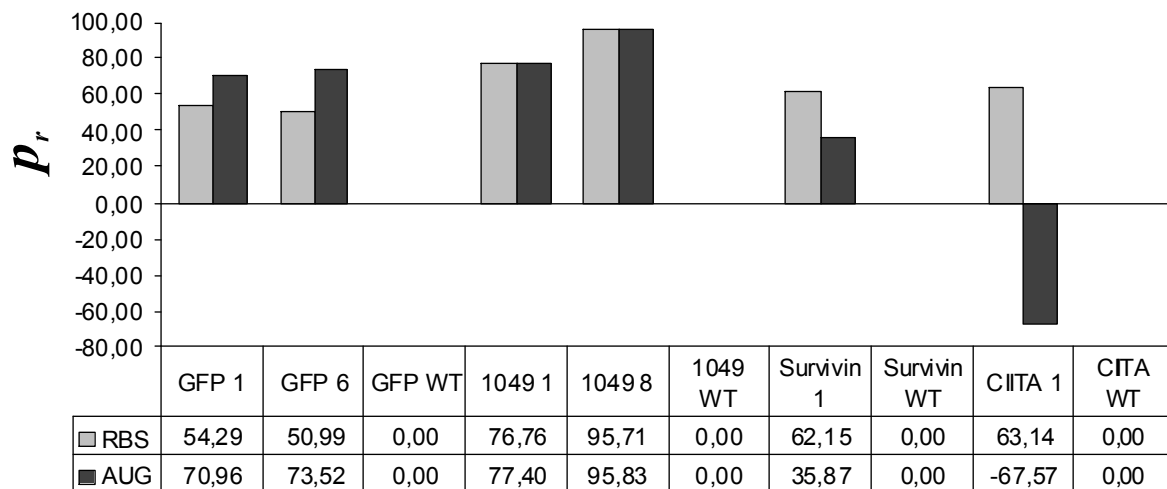
B

Abb. 28: **Affinität der Initiationsdomäne zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen.** **A:** Berechnete Wahrscheinlichkeit für Abwärtspaarungen¹ (p_{Gki}) der RBS und des Start-AUG. Die Wildtyp-Varianten (WT) und die RST-Varianten (nummeriert mit der AS-Kombination (Tab. 3, B)) der Gene 1049, Survivin und CIITA sind gezeigt. **B:** Berechnete Werte für das Freisetzungspotential³ durch das Einführen des RST bezüglich der jeweiligen regulatorischen Elemente⁴.

Insgesamt führte die Einführung des RST bei allen untersuchten Genen zu einer deutlichen Verringerung der Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² der beiden regulatorischen Elemente⁴. Außer bei CIITA wurde eine höhere Affinität des Start-AUG bei der RST-Variante zu abwärts gelegenen genspezifischen Regionen berechnet als im Vergleich bei der Wildtyp-mRNA. Die Ribosomenbindestelle bei CIITA wurde dagegen durch Einbringen des RST um 63,1 % aus Abwärtspaarungen¹ freigesetzt. Das Start-AUG von CIITA zeigte durch Einbringen des RST eine erhöhte Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² (was zu einem negativen Freisetzungspotential³ (p_r) von $-67,54$ % führte). Dieses Ergebnis basiert auf der Paarung der Nukleotide -2 bis +3 mit 213 bis 217 in einer 5 pb Helix (a: $\Delta G_0 = -8,10$ kcal/mol), der ein interner Loop („interior loop“) ($\Delta G_0 = 2,20$ kcal/mol) und schließlich eine weitere Helix der Nukleotide 7 bis 11 mit 207 bis 211 (b: $\Delta G_0 = -5,20$ kcal/mol) folgt. Dieses Strukturmotiv (siehe Abb. 29) war sehr häufig (und in der stabilsten mRNA-Struktur) in der RST-mRNA von CIITA zu finden ($p_{Gki\ 207-213} = 0,55$) und erhöhte damit die Affinität des Start-AUG zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen². Die Freie Energie der Helix (a), mit dem gepaarten AUG, wird durch die Freie Energie der folgenden internen Haarnadelschleife kompensiert, so dass das Start-Kodon nicht mehr so stark gebunden war, dass es zu Inhibition der Translation hätte führen können (de Smit und van Duin, 1994a). Zusätzlich wurde die Helix (b) aus abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen mit den Nukleotiden der AT-reichen Re-

gion ausgebildet. Die Paarungen der AT-reichen Nukleotide sind weniger stabil und begünstigen deshalb die Translation (Pedersen-Lane *et al.*, 1997; Stenstrom *et al.*, 2001). Wenn die beschriebene Paarung des AUG in der RST-mRNA des Gens CIITA als translationsinhibierende Abwärts Paarung¹ unberücksichtigt bleiben würde, würde der p_r -Wert bezüglich des AUG durch Einbringen des RST bei + 78 % liegen ($p_{Gki} = 0,08$ anstelle von 0,62).

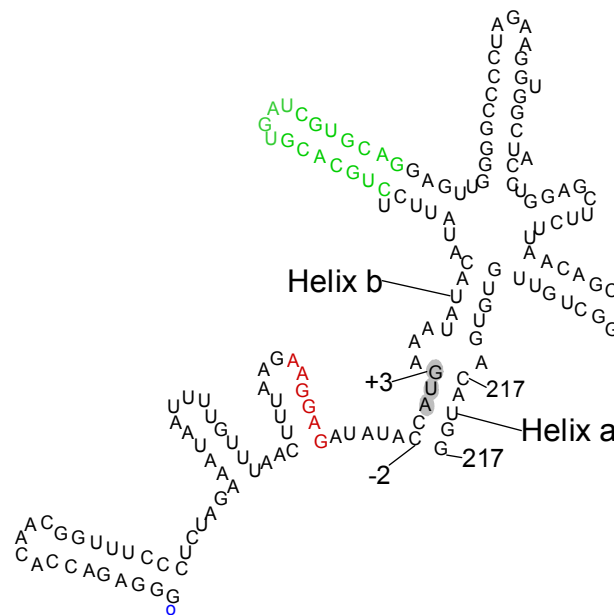


Abb. 29: **Einbindung des Start-AUG in RNA-Sekundärstrukturen beim CIITA.** Die Ribosomenbindestelle ist rot dargestellt, und das Start-AUG ist grau hinterlegt.

Für die RST-mRNA-Varianten von GFP wurden verringerte Affinitäten zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² der Ribosomenbindestelle um 51 und 54,3 % berechnet, und die Affinität des Start-AUG zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² wurde durch Einbringen des RST um 70,8 und 73,5 % verringert. Die RST-Varianten von 1049 zeigten die signifikanteste Verringerung der Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² durch Einbringen des RST. Für die Ribosomenbindestelle war das Freisetzungspotential³ durch den RST 76,8 und 95,7 % und für das Start-AUG 77,4 und 95,8 %. Bei der RST-mRNA von Survivin zeigte der RST dagegen nicht ein so starkes Freisetzungspotential³, die RBS wurde um 62,2 % und das Start-AUG um 35,9 % aus Abwärts Paarungen¹ freigesetzt.

Um zu prüfen, ob die berechneten Werte für die Abwärts Paarungen¹ (p_{Gki}) der Wildtyp- und RST-mRNA-Varianten tatsächlich eine signifikant unterschiedliche Verteilung besitzen, wurde die Mann-Whitney-Statistik (Precht, 1993) verwendet. Damit wurde die Hypothese überprüft, ob die Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² (p_{Gki}) der RST-Varianten über alle Gene nach statistischen Grundlagen signifikant kleiner ist, als die der WT-mRNAs.

Die verwendete Statistik ist ein nichtparametrisches Verfahren zum Vergleich der Mediane zweier unabhängiger Verteilungen (Precht, 1993). Die Verteilungen der Werte (p_{Gki}) der Wildtyp- und RST-Varianten sind unabhängig, weil die die Primärsequenzen von Wildtyp und RST-mRNA verschieden sind.

Das statistische Testverfahren ergab, dass die Affinitäten zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² bezüglich der Ribosomenbindestellen (p_{Gki} (RBS)) auf einem Signifikanzniveau (Irrtumswahrscheinlichkeit) von 2 % bei den RST-Varianten kleiner sind, als bei den Wildtyp-mRNAs. Der Test ergab bezüglich des Start-Kodons (p_{Gki} (AUG)), dass dieses in den RST-mRNAs auf einem Signifikanzniveau (Irrtumswahrscheinlichkeit) von 1 % geringer in Abwärtspaarungen¹ gebunden vorliegt, als in den Wildtyp-mRNAs. Damit ist nachgewiesen, dass der RST bei den regulatorischen Elementen (RBS,AUG) statistisch signifikant die Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² verringert.

4.2.3.2. Ausbildung des RST im Gen-Kontext.

Die mit dem RNA-Faltungsprogramm *mfold* berechneten Daten, die die thermodynamisch wahrscheinlichsten Faltungen der mRNA vorhersagten, wurden verwendet, um die Ausbildung des RST im Gen-Kontext zu untersuchen. Dafür wurden analog dem im Methodenteil beschriebenen Berechnungsverfahren (3.12) die Daten des Computerprogramms weiter verwendet, um die Ausbildungswahrscheinlichkeit für den RST im Kontext des Gens (p_{RST}) zu berechnen.

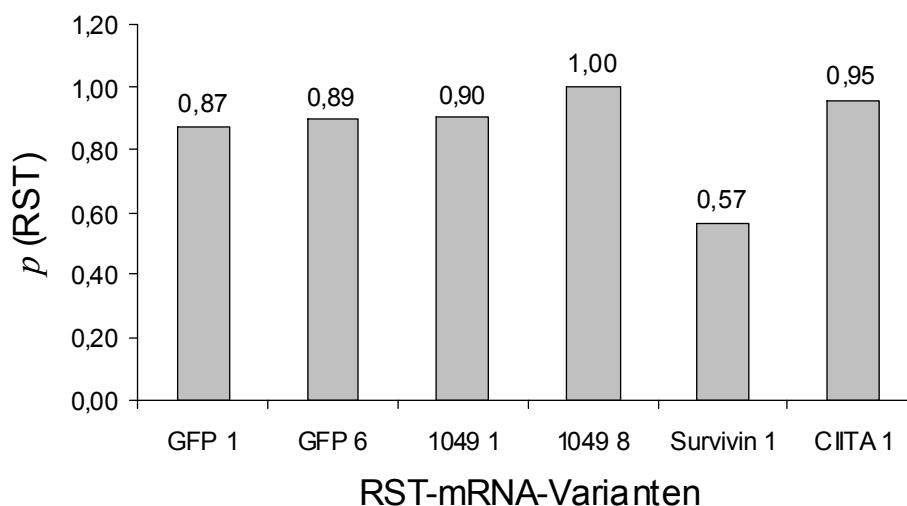


Abb. 30: Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung des eingeführten RST.

Die Ergebnisse der Berechnung der Wahrscheinlichkeit der Ausbildung des RST in Abb. 30 zeigen, dass sich der RST im Gen-Kontext mit hoher Wahrscheinlichkeit ausbildet. Lediglich im Kontext der Survivin-mRNA bildet sich der RST mit geringerer Wahrscheinlichkeit aus. Das der GC-reiche RST sich erschwert ausbildet, zeigt die starke Strukturierung der mRNA von Survivin und die hohe Affinität der Survivin-mRNA zur Ausbildung stabilerer GC-Paarungen.

4.2.4. mRNA-Stabilität im *in vitro* Expressionssystem

Die mRNA-Stabilität ist eine bekannte Ursache für unterschiedliche Expressionsraten von Proteinen und wird durch die mRNA-Struktur maßgeblich beeinflusst (1.5). In der Literatur wird von RNA-Sekundärstrukturen berichtet, die zu einer erhöhten mRNA-Stabilität und deshalb zu einer verbesserten Proteinexpression geführt haben (1.5).

Da das Einbringen des RST die mRNA-Struktur verändert hat, konnte folglich auch die mRNA-Stabilität erhöht und deshalb eine verbesserte Translation detektiert worden sein. Deshalb wurden, wie im Methodenteil beschrieben (3.11), die Stabilitäten der 1049-mRNA-Varianten des Wildtyps und der RST-Variante im *in vitro* Expressionssystem verglichen. Dabei wurde bei jeder Lysatkonzentration ein Doppelverdau durchgeführt und der Mittelwert der verbliebenen mRNA-Menge je Lysatkonzentration berechnet. Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung sind in Abb. 31 zusammengefasst.

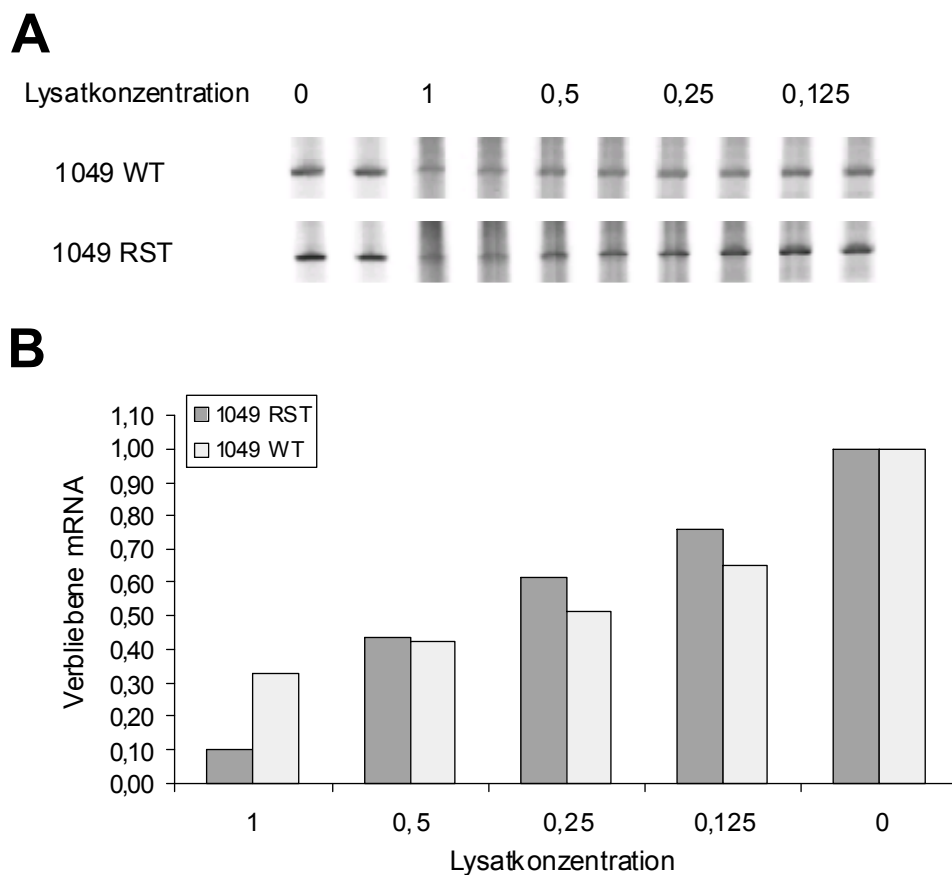


Abb. 31: **Verbliebene mRNA-Mengen nach 20 min im *in vitro* Expressionssystem bei unterschiedlichen Lysatkonzentrationen.** **A:** TBE-Harnstoffgele (6%) der reisolierten 1049-mRNA des Wildtyps (WT) und der RST-Variante (RST). **B:** Darstellung der densitometrisch detektierten mRNA-Mengen (aus A) nach deren Mittelwertbildung.

Die Stabilitätsuntersuchung (Abb. 31) der mRNA-Varianten nach 20 minütigem Verdau im *in vitro* Expressionssystem zeigte, dass die RST-mRNA bei geringeren Lysatkonzentrationen stabiler als die Wildtyp-mRNA war (Abb. 31, B, 0,125x, 0,25x). In höher konzentriertem *E. coli* Lysat stieg die Stabilität der Wildtyp-mRNA im Vergleich zur RST-mRNA an (Abb. 31, B, 0,5x; 1x). Bei den Konzentrationsbedingungen des *E. coli* Lysats, die den Bedingungen der Translation entsprachen (Abb. 31, B, 1x), war die Wildtyp-mRNA stabiler als die RST-mRNA. Damit hat der Einsatz des RST nicht zu einer Erhöhung der RST-mRNA im *in vitro* Expressionssystem geführt. Folglich kann die mRNA-Stabilität nicht der Grund für die drastisch erhöhte Expression der RST-mRNA sein.

4.2.5. Klonierung und Expression (*in vivo*) der linearen Expressionskonstrukte

4.2.5.1. Klonierung und Verifizierung der linearen Expressionskonstrukte

Die linearen Expressionskonstrukte, die den RST L₇ beinhalteten und zu den stark verbesserten Expressionsergebnissen (4.1.1.3) geführt haben, wurden wie im Methodenteil beschrieben in pBAD Vektoren ligiert und die Plasmide in *E. coli* TOP10F' Zellen transformiert (3.6.1.). Da jedoch bei der Ligation von PCR-Produkten immer nur ein DNA-Fragment aus der Lösung von PCR-Produkten eingefügt wird, mussten die Klonierungen auf korrekte Fragmentlänge und Richtigkeit der Fragmente überprüft werden. Dies geschah bezüglich der Fragmentlänge durch einstufige PCR Amplifikation nach Reisolierung der klonierten Plasmide (3.6). In Abb. 32 ist exemplarisch die Überprüfung der Konstrukte des Gens Survivin mittels einstufiger PCR-Amplifikation unter Verwendung der Primer T7-Promotor/T7-Terminator (3.5.2) gezeigt.

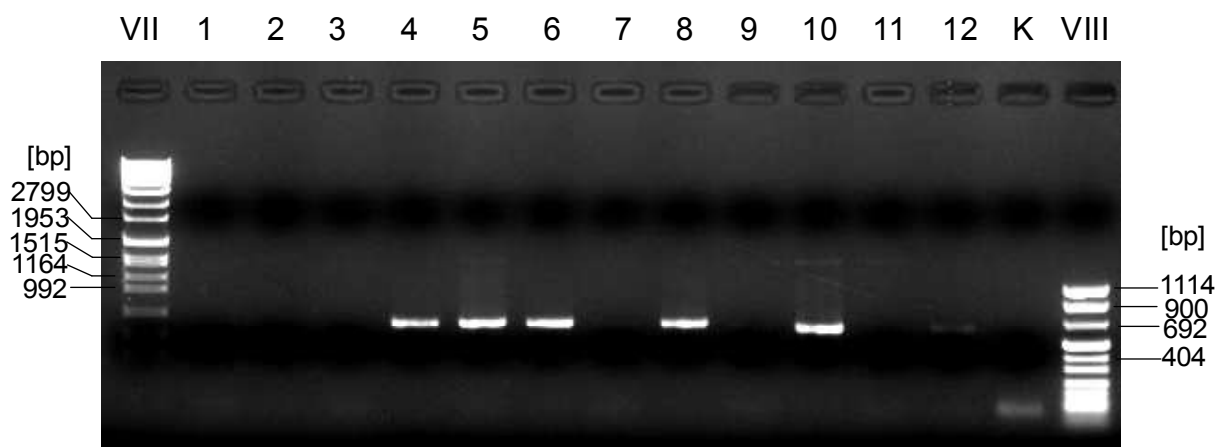


Abb. 32: **Prüfung der klonierten Expressionskonstrukte von Survivin mittels einstufiger PCR.** Die Spuren 1 bis 4 zeigen die Prüfung von vier Einzelkolonien der AS-Kombination 1 (Tab. 3, B, 1). In den Spuren 5 bis 8 wurden 4 Kolonien nach Klonierung der AS-Kombination 3 (Tab. 3, B, 3) überprüft. Die Spuren 9 bis 12 zeigen die PCR-Prüfung der Wildtyp-Konstrukte. Die Negativkontrolle ist gekennzeichnet (K), ebenso die Molekulargewichtsmarker (VII, VIII).

Nachdem die verwendeten Primer jeweils exakt zu Beginn und am Ende des insertierten Konstrukts hybridisierten wurden mit der PCR nur komplette Konstrukte detektiert, die vom T7-Promotor bis zum T7-Terminator das gesamte Insert enthielten. Einzelne verkürzte Konstrukte, die bei der pBAD-Klonierung fälschlicherweise in den Vektor ligiert wurden, konnten so erkannt werden (Abb. 32, Spuren 1 bis 3, 7, 9, 11, 12). Die Kolonien, aus denen diese Plasmide stammten, wurden nicht weiter verwendet.

Bezüglich der korrekten Sequenzen wurden die einstufig amplifizierte linearen Expressionskonstrukte aus der PCR-Prüfung in die *in vitro* Expression eingesetzt und ihre Expression mittels Western Blot Analyse analysiert. Über den Vergleich mit den Expressionen der zwei-stufig amplifizierte Konstrukte (Abb. 12) konnten fehlerhafte Sequenzen, die beispielsweise wegen eines verschobenen Leserahmens bei der Translation zu anderen Ergebnissen hätten führen können, erkannt werden. In Abb. 33 sind exemplarisch die Ergebnisse der Expressionsuntersuchung des Gens 1049 gezeigt.

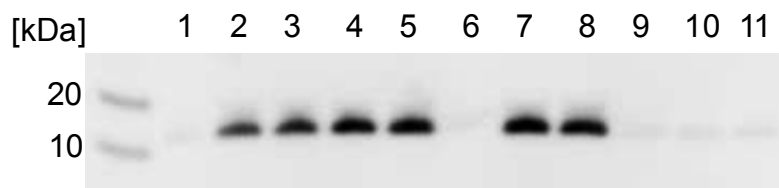


Abb. 33: ***In vitro* Expressionsergebnisse des Gens 1049 nach Reamplifizierung der klonierten Konstrukte mittels einstufiger Expression.** In den Spuren 1 bis 4 ist die Expression der PCR Fragmente der AS-Kombination 1 zu sehen. Die Spuren 5 bis 8 zeigen die Expression der AS-Kombination 8, und die Spuren 9 bis 11 zeigen die Expression des Wildtyps.

Die Spuren 1 bis 4 des Western Blots in Abb. 33 zeigen die Expressionen der PCR-Produkte jeweils mit der AS-Kombination 1, und die Spuren 5 bis 8 zeigen die Expressionen der AS-Kombination 8. Die kaum detektierbare Expression des Wildtyps ist im Vergleich in den Spuren 9 bis 11 zu sehen.

Die jeweiligen weiter verwendeten Wildtyp-Konstrukte von Survivin und 1049 wurden mittels DNA-Sequenzierung verifiziert, weil bei ihnen kein Abgleich über die Expression möglich war. Auf diese Art wurden die pBAD Vektoren mit den jeweiligen Konstrukten verifiziert, die entsprechenden Klone gesammelt und für die *in vitro* Transkription und die *in vivo* Expression weiter verwendet.

4.2.5.2. Zelluläre Expression (*in vivo*)

Nachdem die linearen Expressionskonstrukte kloniert und verifiziert waren (4.2.5.1), wurden die Beispieltgene Survivin und 1049 wie im Methodenteil beschrieben *in vivo* exprimiert (3.7). Dafür wurden je Gen die pBAD-Vektoren, die gleich orientierte Konstruktvarianten des Wildtyps und der RST-Varianten enthielten, in den Expressionsstamm *E. coli* BL 21 pLysS transformiert (3.6.3). Anschließend wurden die Proteine exprimiert, und die Expression mit-

tels Western Blot Analyse der Zielproteine detektiert. Die Ergebnisse der *in vivo* Expression sind in Abb. 34 abgebildet.

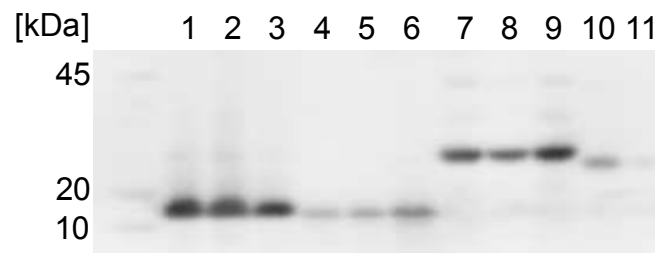


Abb. 34: ***In vivo* Proteinexpression der RST-Varianten im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Konstrukten.** Western Analyse der Expression der RST-Varianten dreier unabhängiger Klone von 1049 (Spuren 1 bis 3) im Vergleich zur Expression dreier unabhängiger Klone, die die Wildtyp-Konstrukte von 1049 beinhalten (Spuren 4 bis 6). Analog sind drei unabhängige Klone der RST-Varianten von Survivin (Spuren 7 bis 9) mit zwei unabhängigen Klonen, die die Wildtyp-Konstrukte beinhalten (Spuren 10, 11), verglichen.

Die Western Blot Analyse der *in vivo* Expression ergab, dass drei unabhängig kultivierte Klone, die die RST-Variante beinhaltenen (Abb. 34, Spuren 1 bis 3) stark exprimierbar waren, wogegen drei unabhängige Wildtyp-Varianten (Abb. 34, Spuren 4 bis 6) sehr schwache Expression zeigten. Die Expressionsergebnisse der unabhängig kultivierten Klone, die die RST-Varianten (Abb. 34, Spuren 7 bis 9) und die Wildtyp-Varianten (Abb. 34, Spuren 10, 11) enthielten, erweiterten die Einsatzmöglichkeit des RST mit seiner expressionsinitiierenden/-steigernden Wirkung auf die zelluläre Proteinexpression.

4.3. Einfluss von Betain und Trehalose auf die *in vitro* Proteinexpression

4.3.1. RNA-Strukturdestabilisierung durch Betain und Trehalose

In vielen Bereichen der Molekularbiologie wirken die Sekundärstrukturen der mRNA beeinflussend auf den Erfolg experimenteller Methoden und Synthesen. So auch im Bereich der cDNA Synthese. Es wird über frühzeitige Terminierungen von stark strukturierten, GC-haltigen mRNA-Templats bei der Reversen Transkription berichtet (Spiess und Ivell, 2002). In diesem Zusammenhang wurden die beiden Reagenzien Betain und Trehalose eingesetzt und führten zu verbesserter Reverser Transkription von langen cDNA-Molekülen (Spiess und Ivell, 2002). Betain (N,N,N-Trimethylglycin) ist ein natürlich vorkommender Methylgruppen-Donor, der eine wichtige Substanz im Zusammenhang der Salztoleranz bei einigen Bakterien darstellt (Boncompagni *et al.*, 1999; Farwick *et al.*, 1995). Betain stabilisiert einerseits Proteine gegen thermische Denaturierung (Santoro *et al.*, 1992) und destabilisiert andererseits die DNA-Helix (Rajendrakumar *et al.*, 1997). Neben dieser Wirkung von Betain auf die DNA zeigt es diese Wirkung auch auf die mRNA. Der Zusatz von Betain schwächte die Stabilität von RNA-Sekundärstrukturen und führte dadurch zu verbesserter Reverser Transkription langer cDNA-Moleküle (Spiess und Ivell, 2002). Trehalose ist ein endogen synthetisierter Schutzfaktor, der in einer Stresssituation gegen thermale Denaturierung von Proteinen wirksam ist, indem er das Proteinrückrat stabilisiert (Singer und Lindquist, 1998). Es wird berichtet, dass Betain und Trehalose in Kombination zu besseren Ergebnissen bei der Reversen Transkription führen als die Einzelsubstanzen (Spiess und Ivell, 2002).

Aus diesem Hintergrund wurde untersucht, ob die beiden Substanzen einen ähnlichen Einfluss auf strukturierte mRNA im Zusammenhang mit der *in vitro* Proteinexpression ausüben.

4.3.1.1. Destabilisierung einer inhibierenden RST-Struktur mit Betain und Trehalose

Für die Untersuchung der Einflüsse von Betain und Trehalose auf die Translation wurde ein zweistufig amplifizierte Expressionskonstrukt des GFP-Gens verwendet. Im Initiationsbereich des Konstrukts wurde ein translationsinhibierender GC-reicher RST, der eine Stammlänge von 6 pb ($\Delta G = -7,8$ kcal/mol) hatte, direkt nach dem Start-Kodon platziert. Bei Standardexpressionsbedingungen führte dieses Konstrukt zu stark verringerter Expression, was im Einklang zu Literaturdaten (de Smit und van Duin, 1994a; Pedersen-Lane *et al.*, 1997; Stenstrom *et al.*, 2001) steht. Den Expressionsansätzen wurde dann in unterschiedlichen Konzentrations-

verhältnissen Betain und Trehalose zugesetzt, um die Wirkung der Substanzen auf die *in vitro* Proteinexpression des suboptimalen Konstrukts zu untersuchen. Dabei wurde die Expression wie im Methodenteil beschrieben (3.8) durchgeführt, allerdings mit der Abweichung, dass die Substanzen in die Ansätze eingebracht wurden, indem das Wasser zum Einstellen des Endvolumens durch die jeweilige Lösung von Betain und Trehalose substituiert wurde. Die Versuche mit dem GFP-Konstrukt ergaben, dass Betain und Trehalose als Einzelsubstanzen zu einer Verdopplung der exprimierten Proteinmenge führten (Daten nicht gezeigt). Die Einzelsubstanzen erreichten jedoch nicht eine so starke Expressionssteigerung wie ihre Kombination. Dieser Effekt wird auch in von Spiess und Ivell beschrieben (Spiess und Ivell, 2002). In der Mischung wurden mehrer Versuche durchgeführt, die in den Abb. 35, und Abb. 36 gezeigt sind.

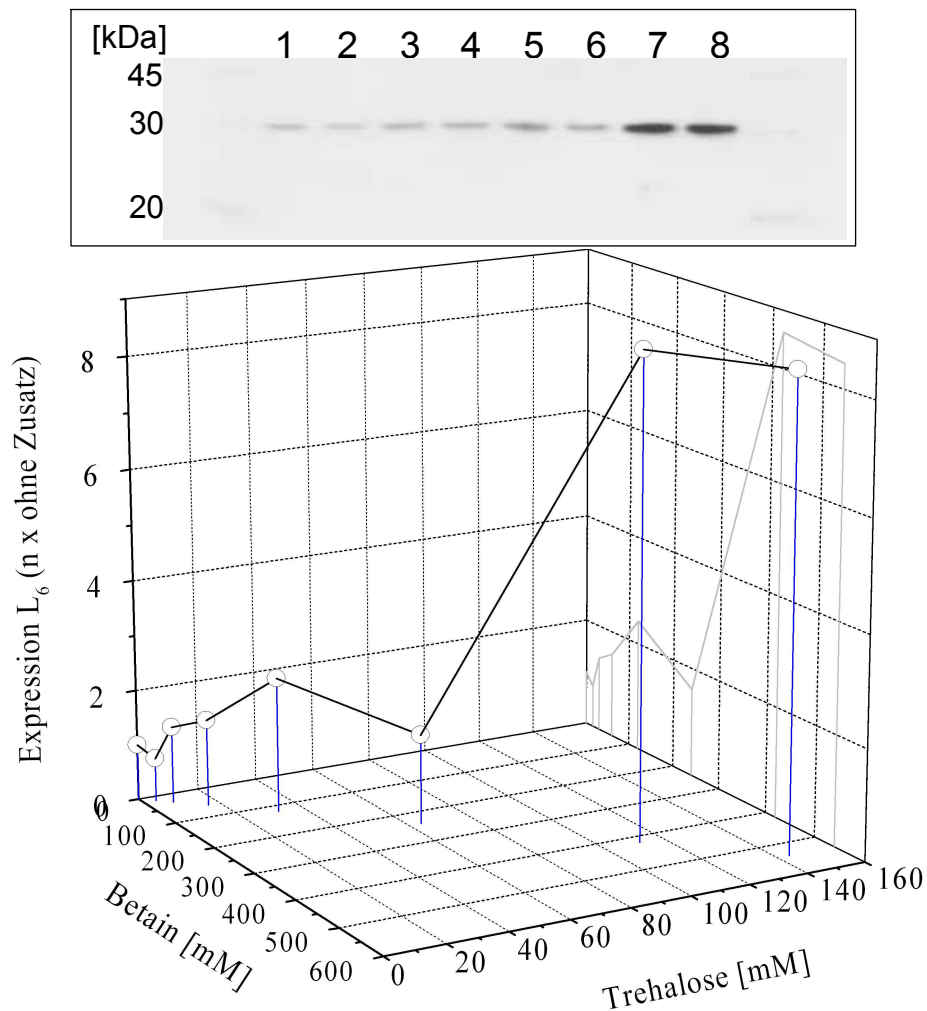


Abb. 35: **Konzentrationsvariation von Betain (0 bis 540 mM) und Trehalose (0 bis 144 mM) bei der Expression des GFP-Konstrukts mit inhibierendem RST.** Die Expressionswerte beziehen sich auf Vielfache der Expression ohne Zusatz (Spur 1).

Die Konzentrationsvariation von Betain und Trehalose bei der beschriebenen GFP-Variante ergab eine deutliche Steigerung (im Vergleich zur Expression ohne Zusatz) der Expression bei einer Trehalose-Konzentration von 112 und 144 mM, bei gleichzeitiger Betain-Konzentration von 420 und 540 mM. Die ursprünglich durch den RST direkt nach dem Start-Kodon schwache Expression wurde um den Faktor 8,5 (Mittelwert der beiden Konzentrationstufen) gesteigert.

Um zu untersuchen, ob noch höhere Konzentrationen zu weiterer Steigerung der Expression führt, wurde ein weiterer Versuch (Abb. 36) durchgeführt.

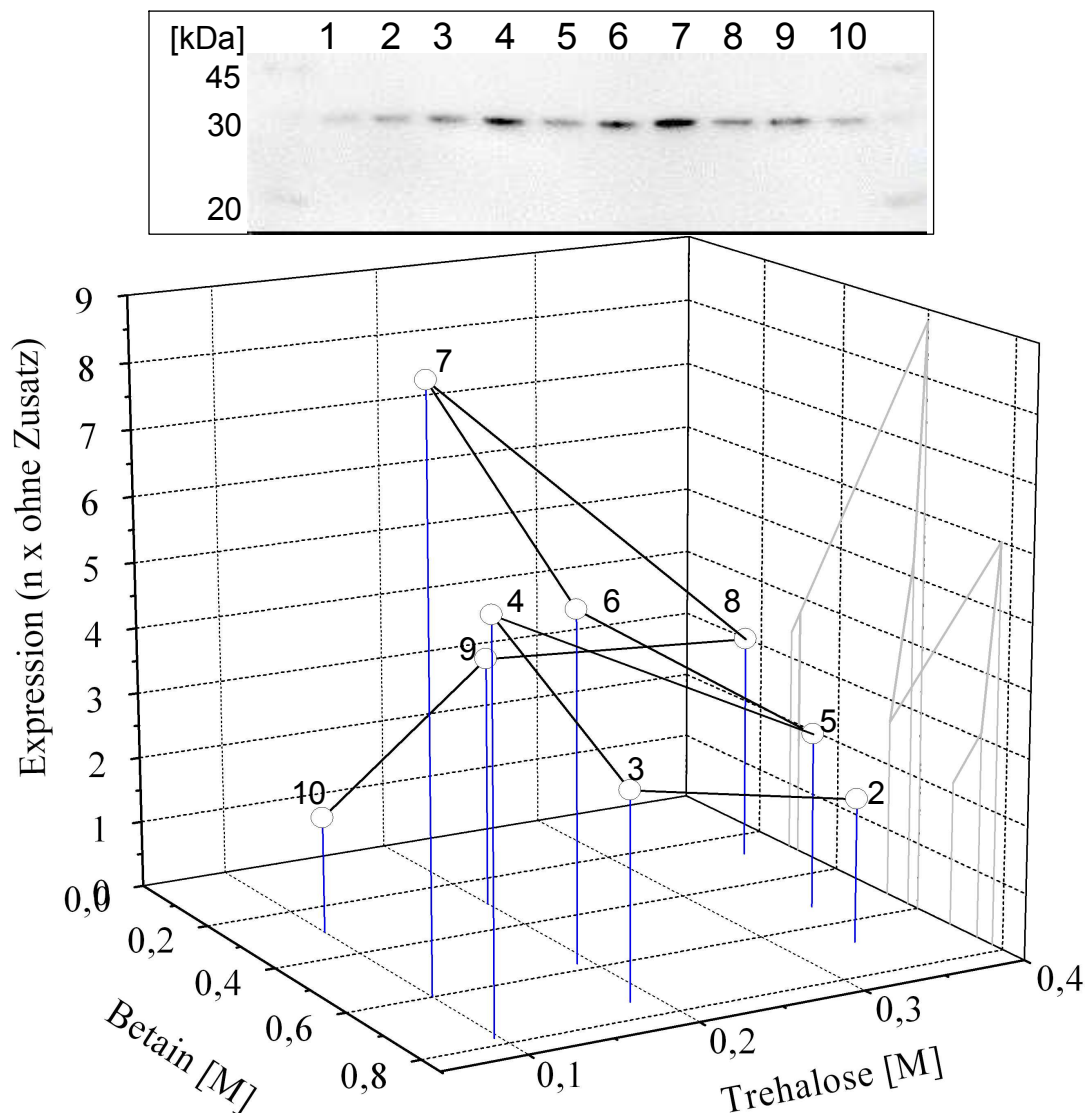


Abb. 36: **Konzentrationsvariation von Betain (300 bis 780 mM) und Trehalose (100 bis 370 mM) bei der Expression des GFP-Konstrukts mit inhibierendem RST.** Die Expressionswerte beziehen sich auf Vielfache der Expression ohne Zusatz. Die Nummern der Knotenpunkte korrelieren mit den Spuren des Western Blots. In Spur 1 ist die Expression der Referenz zu sehen.

In Abb. 36 zeigen die Expressionsergebnisse, dass eine weitere Erhöhung der Betain-Konzentration nicht zu einer weiteren Steigerung der Expression führt (im Vergleich zu Abb.

35). Eine höhere Betain-Konzentration als 600 mM verringert die Expressionsleistung wieder. Sie liegt jedoch immer noch auf dem ca. 2 bis 5-fachem der Expression ohne Zusatz. Tendenziell verringert eine ansteigende Trehalose-Konzentration die Expression der GFP-Variante. Maximale Expressionswerte wurden bei diesem Versuch ebenfalls in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie im vorigen Versuch (Abb. 35), bei 600 mM Betain bei 100 mM Trehalose, detektiert.

In einem weiteren Versuch wurde die Betain-Konzentration konstant bei 700 mM gehalten und die Trehalose-Konzentration variiert (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der *in vitro* Expressionen des beschriebenen GFP-Konstrukts zeigten, dass eine Trehalose-Konzentration von 10 mM zu stärkster Expression bei diesem Versuch geführt hat (6-fache Expression im Vergleich zur Expression ohne Zusatz gezeigt). Allerdings wurden nicht so starke Expressionssteigerungen wie bei den vorigen Versuchen (Abb. 35, Abb. 36) erreicht. Tendenziell zeigt sich analog zu den vorigen Ergebnissen, dass eine geringe Trehalose-Konzentration für die Expressionsinitiation förderlich ist.

4.3.1.2. Anwendung von Betain und Trehalose

Nachdem die *in vitro* Expression bei der Genvariante des GFP (4.3.1) erfolgreich initiiert wurde, indem mit den Reagenzien Betain und Trehalose der inhibierende RST aufgelöst wurde, sollten die beiden Substanzen im Hinblick auf ihre Wirkung bei der Expression schwer exprimierbarer Gene untersucht werden. Dafür wurden Gene verwendet, die als Wildtyp-Varianten wegen ihrer strukturierten mRNA keine Translationsinitiation zuließen, die Gene 1049, Survivin und CIITA. Um auch den Einfluss der Reagenzien auf den initiiierenden RST L₇ (4.1.1.3) zu untersuchen, wurden jeweils Wildtyp- und RST-Varianten verwendet. Die Frage dabei war, ob die Reagenzien ebenfalls den initiiierende RST beeinflussen und einen weiteren Hinweis auf seine Wirkung geben.

Tendenziell zeigten die Vorversuche (4.3.1), dass eine geringe Trehalose-Konzentration für die *in vitro* Expression förderlich ist. Deshalb wurde bei der Untersuchung der schwer exprimierbaren Gene neben der Betain-Konzentration von 600 mM (Abb. 37, A B (1)) zwei Trehalose-Konzentrationen von 10 mM (Abb. 37, A B (2)) und 100 mM (Abb. 37, A B (3)) verwendet. Die *in vitro* Expressionsuntersuchungen der Gene wurde nach dem Standardverfahren (3.8) durchgeführt, und Betain und Trehalose wie unter 4.3.1 beschrieben eingebracht. Die Expressionsergebnisse sind in Abb. 37 gezeigt.

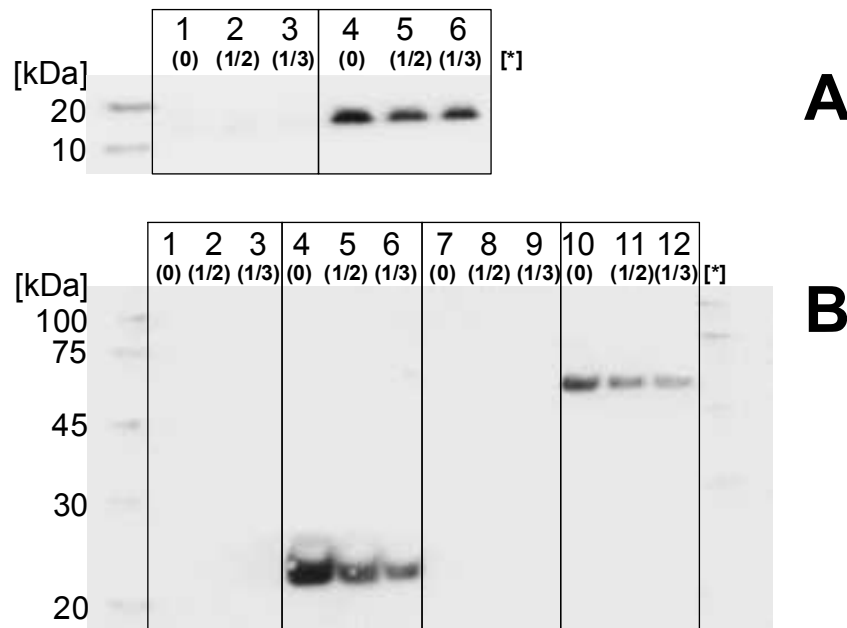


Abb. 37: **Expression linearer DNA-Konstrukte unter Zusatz von 600 mM Betain und 10 bzw. 100 mM Trehalose.** Die Betain bzw. Trehalose-Konzentrationen sind unterhalb der Spuren gekennzeichnet [*]: 1: 600 mM Betain; 2: 10 mM Trehalose; 3: 100 mM Trehalose. **A:** 1049: Wildtyp-Variante (1 bis 3); RST-Variante (4 bis 6). **B:** Survivin: Wildtyp-Variante (1 bis 3); RST-Variante (4 bis 6). CIITA Wildtyp-Variante (7 bis 9); RST-Variante (10 bis 12)

Die Ergebnisse in Abb. 37 zeigen die *in vitro* Expressionsergebnisse der Gene 1049 in der Wildtyp- (Abb. 37, A, 1 bis 3) und RST-Variante (Abb. 37, A, 4 bis 6), der Gene Survivin in Wildtyp- (Abb. 37, B, 1 bis 3) und der RST-Variante (Abb. 37, B, 4 bis 6) sowie des Gens CIITA in Wildtyp- (Abb. 37, B, 7 bis 9) und RST-Variante (Abb. 37, B, 10 bis 12), jeweils bei der gekennzeichneten Betain und Trehalose-Konzentration. Alle Wildtyp-Varianten der drei Gene konnten durch den Zusatz von Betain und Trehalose nicht exprimiert werden. Außerdem zeigen die RST-Varianten mit Betain und steigender Trehalose-Konzentration sinkende Expressionsleistung. Das bedeutet, die Reagenzien waren nicht geeignet, um generell die Expression der strukturierten Wildtyp-mRNAs zu ermöglichen.

Nach den Untersuchungen der Ausbildung des RST und den Vorversuchen mit der inhibierten GFP-Variante sind die Ergebnisse ein Hinweis, dass die Reagenzien den RST bei den Genen destabilisiert haben, was zu verschlechterter Expression führte.

5. Diskussion

Die Umsetzung der beschriebenen Strategie zur optimierten heterologen Proteinexpression, bei der direkt nach dem Start-Kodon fünf AT-reiche Kodons gefolgt von einer GC-reichen RST-Sequenz von 7 bp Stammlänge positioniert wurde, ermöglichte bei der *in vitro* Proteinbiosynthese die Expression schwer exprimierbarer Gene. Die *in vitro* Proteinexpressionsuntersuchungen linearer DNA-Konstrukte zeigten, dass, unter Verwendung der beschriebenen Anfangssequenz, alle Gene erfolgreich exprimiert werden konnten, die als Wildtyp-Varianten nicht exprimierbar waren. Die gleichen expressionssteigernden Effekte dieser Anfangssequenz wurden auch bei der zellulären Expression in *Escherichia coli* detektiert.

Insgesamt wurden 7 Gene von verschiedenen Ursprungsorganismen, die in den Längen der kodierenden Sequenzen von 246 nt bis 1380 nt variierten, auf ihr Expressionsverhalten hin untersucht. Von den 7 untersuchten Genen waren 5 als Wildtyp-Variante nicht exprimierbar und konnten durch die eingeführte Anfangssequenz exprimiert werden. Die verbleibenden zwei Gene waren als Wildtyp-Varianten exprimierbar, wurden aber durch die Anfangssequenz in der Expression signifikant gesteigert. Folglich ist die Strategie eine allgemein einsetzbare Möglichkeit zur gesteigerten oder initiierten heterologen Proteinexpression.

Der Vergleich der *in vitro* Expressionsergebnisse der Konstrukte, die die AT-reiche Sequenz ohne RST beinhalteten, mit den Konstrukten, die neben der AT-reichen Sequenz auch den RST beinhalteten, zeigte, dass der RST für die expressionsfördernde Wirkung bei nicht exprimierbaren Genen essentiell ist. Die Einführung der AT-reichen Sequenz ohne RST zeigte in einem Fall (1049) zwar eine Expression, allerdings eine signifikant geringere als mit beiden Elementen (RST, AT-reiche AS-Kombination). Diese schwach initiierte Expression ist auf die Eigenschaft der AT-reichen Sequenz zurückzuführen, die wegen geringer Neigung zu RNA-Sekundärstrukturbildung die Expression verbessert (Pedersen-Lane *et al.*, 1997; Stenstrom *et al.*, 2001). Unter Verwendung beider Elemente (RST, AT-reiche AS-Kombination) wurden jedoch alle untersuchten Gene deutlich stärker exprimiert.

Nachdem der RST als wichtiges Sequenzelement für die erfolgreiche heterologe Expression detektiert worden war, sollte seine Wirkung untersucht werden. Literaturbekannte Einflussmöglichkeiten zur gesteigerten heterologen Proteinexpression (Balbas, 2001; Jonasson *et al.*, 2002; Makrides, 1996) implizierten, dass der eingeführte RST auf unterschiedlichen Ebenen der Proteinbiosynthese wirksam sein könnte. Der RST könnte sowohl die Transkription als auch die mRNA-Stabilität oder auch die Translationsinitiation beeinflussen. Es war auch nicht auszuschließen, dass die im Vergleich zur Wildtyp-Variante veränderte DNA eine höhere

Stabilität besaß. Jede dieser potentiellen Einflussmöglichkeiten konnte die Ursache für die stark verbesserte Expression sein. Deshalb wurde jeweils die mRNA der Konstruktvarianten der Gene 1049, Survivin und CIITA separat transkribiert und die gereinigten mRNA-Transkripte *in vitro* translatiert. Die Translationen zeigten analoge Ergebnisse wie die DNA-Konstrukte im gekoppelten System. Die Wildtyp-mRNA war nicht exprimierbar, wogegen die RST-mRNA bei allen untersuchten Genen gut exprimierbar war. Das bedeutete, die Wirkung des RST lag auf mRNA-Ebene, und keine anderen Mechanismen der Proteinbiosynthese, wie DNA-Stabilität oder Transkription, waren so weit verändert, dass sie zu den stark gesteigerten Expressionsergebnissen hätten führen können. Die Translationsinitiation oder die mRNA-Stabilität verblieben als potentiell veränderte Mechanismen durch den Einsatz des RST. Neben den veränderten Mechanismen der Proteinbiosynthese war es noch denkbar, dass durch das Einführen des Sequenzbereichs aus AT-reicher Sequenz und RST, die amino-terminale Verlängerung der Wildtyp-AS-Sequenz um 11 AS, die Proteinstabilität beeinflusst wurde. Untersuchungen, die nach definierter Beendigung der Translation die Proteinmengen (der Translationsprodukte der RST-mRNAs) im *in vitro* Expressionssystem verfolgten, zeigten, dass die translatierten Proteine über 8 h stabil im Lysat verblieben sind, ohne dass Abbauprodukte detektiert wurden (Daten nicht gezeigt). Die sehr lange Zeit, in der die Proteine stabil vorlagen, legten nahe, dass die Proteinstabilität im *in vitro* Expressionssystem nicht der Grund für die verbesserten Expressionsergebnisse durch den eingeführten Sequenzbereich waren. Ferner wurden bei den Expressionsuntersuchungen verschiedenste Varianten des eingeführten Sequenzbereichs, und damit unterschiedlichste AS-Reste am N-Terminus der verschiedenen Proteine platziert (AT-reiche Sequenz mit/ohne RST (4.1.1.4); variierende RST-Sequenzen (4.1.3.1; 4.1.3.2). Die Expressionen ließen keinen Zusammenhang zwischen variierenden Sequenzen und Proteinstabilität erkennen. Beispielsweise zeigen die Ergebnisse der Expression der AT-reichen Sequenz ohne RST, dass die AT-reiche Sequenz zu keiner erhöhten Proteinmenge auf Basis einer Stabilisierung der translatierten Proteine führte. Vielmehr wiesen sowohl die RST-Expressionen der Voruntersuchungen, unter Verwendung der RSTs ohne AT-reicher Sequenz, als auch die RST-Expressionen mit AT-reicher Sequenz bei verschiedenen Genen auf eine Korrelation zu den RNA-Struktureigenschaften. Deshalb ist ein entscheidender Einfluß des eingeführten Sequenzbereichs auf die Proteinstabilität unwahrscheinlich und wurde nicht weiter untersucht.

Allgemein führen Stabilitäten der mRNA-Moleküle zu unterschiedlichen Proteinmengen im zellulären Kontext (Carpousis, 2002; Grunberg-Manago, 1999; Ross, 1995). Die Inaktivierung der mRNA erfolgt durch Abbau der für die Translation intakten Vollängentranskripte

(Kennell, 2002) und wird mittels Gelelektrophorese analysiert. Der Abbau der mRNA ist kein zufälliger endonukleolytischer Prozess (Chen und Belasco, 1990; McCormick *et al.*, 1994), und es wird beobachtet, dass die 5'-Enden einer mRNA in *E. coli* schneller degradieren und die Stabilitäten zu den 3'-Enden hin zunehmen (Selinger *et al.*, 2003). Daraus wird ein 5'-3' Degradationsweg der mRNA abgeleitet (Carpousis, 2002; Grunberg-Manago, 1999; Selinger *et al.*, 2003). Durch die Kombination von Exo-, Endonukleasen und RNA-Helikasen, die im *E. coli*-Degradasom assoziiert vorliegen, erfolgt vorwiegend der Abbau der mRNA. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Abbau der mRNA ist dabei eine endonukleolytische Spaltung am 5'-Ende, der eine 3'-5' orientierte exonukleolytische Spaltung des abgespaltenen Fragments folgt (Carpousis, 2002; Grunberg-Manago, 1999).

Allgemein besteht eine Korrelation zwischen steigender Stabilität der mRNA und Translationsinitiationseffizienz (Arnold *et al.*, 1998; Baumeister *et al.*, 1991).

Cis-wirkende Elemente sind vorwiegend stabile RNA-Sekundärstrukturen an den 5'- und 3'-Enden der mRNA (Arnold *et al.*, 1998; Carrier und Keasling, 1999; Chen und Belasco, 1990; Emory *et al.*, 1992; Wong und Chang, 1986) und erschweren den Abbau des mRNA-Transkripts. Aus diesen Zusammenhängen war es denkbar, dass der eingeführte RST in die Wildtyp-mRNA nahe der 5'-Seite zu einer Stabilisierung der mRNA und deshalb zu den stark gesteigerten Expressionsergebnissen geführt hat. Die Stabilitätsuntersuchungen der 1049-mRNA-Varianten im *in vitro* Expressionssystem zeigten jedoch, dass die Einführung des RST nicht zu einer erhöhten Stabilität der 1049-RST-mRNA im Vergleich zu deren Wildtyp-mRNA geführt hat. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Literaturdaten aus der heterologen Proteinexpression, die die stabilisierende Wirkung von RNA-Sekundärstrukturen einschränken. Es wird beschrieben, dass RNA-Strukturen nicht mehr stabilisierend wirken, wenn auf der 5'-Seite der RNA-Sekundärstruktur noch 5 ungepaarte Nukleotide der mRNA vorliegen (Arnold *et al.*, 1998; Bouvet und Belasco, 1992; Chen *et al.*, 1991; Emory *et al.*, 1992). Zusätzlich ist die Menge der nach 20 min aus dem *in vitro* Expressionssystem (unverdünntes *E. coli* Lysat) isolierten Wildtyp-mRNA bedeutend (30 % der eingesetzten Menge). Experimente haben gezeigt, dass nach 30 min im *in vitro* Expressionssystem der Großteil der Proteinmenge synthetisiert ist (Daten nicht gezeigt). Demnach war die Wildtyp-mRNA lange genug stabil, dass sie hätte translatiert werden können. Dann hätte Zielprotein nach 20 min detektiert werden müssen. Dies steht im Einklang mit Literaturdaten, die beschreiben, dass eine translatierbare mRNA ca. alle 3,2 s von Ribosomen initiiert wird (Kennell und Riezman, 1977). Folgedessen führte der eingeführte RST zu keiner gesteigerten Translation über eine

Erhöhung der mRNA-Stabilität, sondern über die Veränderung der Translationsfähigkeit der mRNA.

Weil die mRNA-Stabilität als Ursache für die Translationsunterschiede bei den Varianten des Gens 1049 ausgeschlossen werden konnte, beruht der Effekt der Translationssteigerung bei den untersuchten Genen auf einer veränderten mRNA-Struktur. Da bei der RNA-Struktur die Sekundärstrukturelemente im Vergleich zu den tertiären Interaktionen der RNA sehr stabil sind (Brion und Westhof, 1997; Herschlag, 1995; Tinoco und Bustamante, 1999), und hoch-energetische, biologisch aktive Barrieren hauptsächlich durch RNA-Sekundärstrukturen ausgebildet werden (Nussinov und Tinoco, 1981; Thirumalai und Woodson, 2000), sprechen die Translationsergebnisse dafür, dass durch Einbringen des RST translationsinhibierende Sekundärstruktureigenschaften verändert wurden. Deshalb beschränkten sich die RNA-Strukturuntersuchungen auf die Sekundärstrukturebene. Ferner zeigte der Vergleich der Expressionsergebnisse der mRNA-Transkripte, je vor und nach der Reinigung aus dem Transkriptionsansatz, dass die Entfaltung der mRNA durch die verwendeten Reinigungsschritte keinen Einfluss auf die Translationsergebnisse hatte. Folglich zeigten die Translationsergebnisse, dass mögliche kinetische Fallen bei der tertiären mRNA-Strukturausbildung (Heilman-Miller et al., 2001; Woodson, 2000), die während der Transkription hätten entstehen und deshalb in der gekoppelten *in vitro* Expression zu verbesserter Translation hätten führen können, keine Rolle spielten.

Für Folgerungen über die Wirkung des eingeführten RST war es wichtig zu untersuchen, ob der RST sich im Gen-Kontext ausbildet. Die Ausbildung des RST wurde durch die Analyse des RST im Kontext der 1049-RST-mRNA mit Oligonukleotiden untersucht. Die Oligonukleotide sollten dabei vor, innerhalb und nach dem RST hybridisieren. Die hybridisierungsvermittelten RNase H-Spaltungen zeigten, dass der Sequenzbereich vor und nach dem RST für die Hybridisierung sehr gut zugänglich war, aber keine verwendete Konzentration der entsprechenden Oligonukleotide innerhalb des RST zur Hybridisierung führte. Folglich wurde der RST im Gen-Kontext stabil ausgebildet. Zusätzlich zeigte die überlappende Oligonukleotidhybridisierung bei der 1049-RST-mRNA übereinstimmende Ergebnisse der 5'-Spaltfragmente mit denen der sequentiellen Beprobung. Damit implizierte die überlappende Oligonukleotidhybridisierung ebenfalls die Detektion der RST Ausbildung bei der Survivin-RST-mRNA und der CIITA-RST-mRNA. Die Ergebnisse bei der Survivin- und CIITA-mRNA waren dabei allerdings nicht so deutlich wie bei der 1049-RST-mRNA.

Um die Ausbildung des RST weiter abzusichern, wurden die RNA-Strukturen der jeweiligen Gene mit dem Programm *mfold* berechnet. Die daraus erhaltenen Daten wurden für die theo-

retische RNA-Strukturvorhersage zur Ausbildung des RST verwendet und zeigten bei den untersuchten Genen, dass sich der RST mit hoher Wahrscheinlichkeit im Gen-Kontext ausbildet ($p_{RST} = 0,87$ bis $1,00$), außer im Kontext des Gens Survivin, in dem sich der RST weniger wahrscheinlich ($p_{RST} = 0,57$) ausbildet. Die verringerte Ausbildungswahrscheinlichkeit zeigt, dass das Gen Survivin eine hohe Affinität zum GC-reichen RST hat, also sehr stark zu Sekundärstrukturbildung neigt. Dieses Ergebnis erklärt auch, dass die Expression des Gens Survivin limitiert ist, und nur schwer initiiert werden kann.

Wegen der stark gesteigerten Expressionsergebnisse unter Verwendung des RST und der Eingrenzung des Wirkungsbereichs des RST auf die Struktur der mRNA musste für eine verbesserte Translation die Struktur des Initiationsbereichs verändert worden sein. Deshalb wurden die strukturellen Einflüsse des RST auf die Ribosomenbindestelle untersucht, indem die relative Zugänglichkeit der RBS für die Hybridisierung des komplementären Oligonukleotids zwischen RST- und Wildtyp-mRNA verglichen wurde. Allgemein ist aus der Anti-Sense-Technologie bekannt, dass die Oligonukleotidhybridisierung bezüglich ihrer Kinetik und Thermodynamik stark beeinflusst wird, wenn die Hybridisierung die Stabilität einer RNA-Sekundärstruktur überwinden und kompensieren muss (Lima *et al.*, 1992; Nellen und Lichtenstein, 1993). Folglich zeigt eine relativ geringere Spaltproduktmenge aus einem oligonukleotidvermittelten RNase H Verdau eine Stabilisierung der RNA-Sekundärstruktur des untersuchten Sequenzabschnitts (Phillips *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der Strukturuntersuchung der RBS zeigten, dass die RST-mRNA des Gens 1049 im Bereich der Ribosomenbindestelle schlechter durch Hybridisierung des komplementären Oligonukleotids erreicht worden ist als die Wildtyp-mRNA. Folglich wurde die RBS durch das Einführen des RST in einer Sekundärstruktur stabilisiert. Bei den Untersuchungen der mRNA-Varianten von Survivin und CIITA zeigte sich ein zu 1049 analoges Verhalten der RBS nach Einbringen des RST. Die Ribosomenbindestelle wird durch den eingeführten RST in einer RNA-Sekundärstruktur stabilisiert. Die geringere Stabilität der Sekundärstruktur der Ribosomenbindestelle bei der Wildtyp-mRNA bedeutet, dass diese Sequenz demnach häufiger andersartig gepaart vorliegt. In diesem Zusammenhang zeigte die theoretische RNA-Strukturuntersuchung, dass der Einsatz des RST die Ribosomenbindestelle aus Abwärtspaarungen¹ freisetzte. Berücksichtigt man die stark verbesserte bzw. erfolgreich initiierte Translation der RST-Varianten aller Gene, im Vergleich zu deren Wildtyp-Varianten, dann muss jeweils durch Einführen des RST eine gut translatierbare mRNA-Sekundärstruktur im Bereich der Ribosomenbindestelle stabilisiert worden sein. Solche Strukturen sind vorwiegend kurze, lokale Sekundärstrukturen, die instabiler als $\Delta G_0 = -6$ kcal/mol sind, und die bei der Translationsinitiation durch ribosomale Pro-

teine leicht aufgelöst werden (de Smit und van Duin, 1994a; de Smit und van Duin, 1994b). Dabei führt je eine weitere Stabilisierung der Sekundärstruktur, die die RBS und das Start-AUG beinhaltet, um $\Delta G_0 = -1,4$ kcal/mol je zu einer 10-fachen Verringerung der Translationseffizienz (de Smit und van Duin, 1994a; de Smit und van Duin, 1994b; Gold, 1988).

Vergleicht man die Spaltprodukte der RBS-Titration bei CIITA mit denen der 1049-mRNAs, so ist die Stabilisierung der RBS durch den RST auf mRNA-Strukturebene bei CIITA geringer (weniger Spaltprodukte). Bei zusätzlicher Berücksichtigung der Größenunterschiede beider mRNA-Moleküle legt dieses Verhalten nahe, dass tertiäre Effekte durch den eingeführten RST, die mit der Analytik nicht erfasst werden, ebenfalls eine Rolle spielen. Es scheint, als nehmen tertiäre Effekte an Bedeutung für die mRNA-Sekundärstruktur mit zunehmender mRNA-Länge zu. Für die erfolgreiche Expressionsinitiation durch den RST zeigen sich jedoch bei CIITA und 1049 keine so deutlichen Unterschiede. Folglich sind solche tertiären Effekte im Kontext der RNA-Ribosom-Interaktion vernachlässigbar, was im Einklang zu Literaturmeinungen (Nussinov und Tinoco, 1981; Thirumalai und Woodson, 2000) steht.

Für die Translationsinitiation ist neben der Ribosomenbindestelle auch das Start-Kodon von entscheidender Bedeutung. Die ersten 15 Nukleotide sind bei der Initiation in der 30S-Untereinheit assoziiert (Culver, 2001; Yusupova *et al.*, 2001). Deshalb wurde die strukturelle Einbindung des Start-Kodons mit den folgenden 15 Nukleotiden in RNA-Sekundärstrukturen untersucht. Die Ergebnisse der strukturellen Untersuchung der 1049-mRNAs zeigten, dass der Beginn des Translationsbereichs (Nukleotide 0 bis 18) bei der RST-mRNA wesentlich besser durch das komplementäre Oligonukleotid hybridisiert und somit durch die RNase H besser gespalten werden konnte als bei der Wildtyp-mRNA. Die mRNA-Struktur der RST-Variante ist demnach im Initiationsbereich lokal weniger stabil in Sekundärstrukturen gebunden als an der gleichen Position die Wildtypsequenz. In Verbindung mit den Expressionsergebnissen zeigt die geringere Stabilität des Initiationsbereichs bei der RST-Variante positiven Einfluss auf die Translation (de Smit und van Duin, 1994a; de Smit und van Duin, 1994b). Im Fall der Survivin-mRNAs zeigte die Titration der komplementären Oligonukleotide zu den Nukleotiden 0 bis 18 ein zu 1049 konträres Ergebnis. Bei der Wildtyp-mRNA wurden Spaltfragmente in der erwarteten Größe detektiert. Bei der RST-mRNA waren jedoch vergleichbar weniger Spaltprodukte der erwarteten Größe finden. Stattdessen wurden kürzere Fragmente detektiert, die auf unspezifischer Hybridisierung des Oligonukleotids basierten. Diese Ergebnisse bedeutet eine strukturelle Stabilisierung der ersten 18 translatierten Nukleotide als Folge des Einbringens des RST. Das gleiche Verhalten als Folge der Einführung des RST in die Wildtyp-mRNA wurde im Kontext des Gens CIITA festgestellt. Auch hier wurde der Bereich

der ersten 18 translatierten Nukleotide durch den RST strukturell stabilisiert. In Verbindung mit den Expressionsergebnissen, die bei der RST-Varianten der jeweiligen Gene eine stark verbesserte Expression gezeigt haben, müssen bei der Stabilisierung des Initiationsbereichs RNA-Strukturen ausgebildet worden sein, die bei der Translation aufgelöst werden können. Auch die theoretischen RNA-Strukturuntersuchung zeigte, dass durch den Einsatz des RST die mRNA im Bereich des Start-Kodons nicht mehr so stark Abwärtspaarungen¹ ausbildete. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die ersten 18 translatierten Nukleotide in kurzen lokalen Sekundärstrukturen stabilisiert worden sind, die bei der Translationsinitiation leicht aufgelöst werden (de Smit und van Duin, 1994a; de Smit und van Duin, 1994b). Insgesamt bestätigte die theoretischen mRNA-Strukturuntersuchung mit *mfold* (Zuker, 2003), die zur Identifizierung der Paarungen der Ribosomenbindestelle und des Start-Kodons verwendet wurde, die experimentellen Ergebnisse. Die Einführung des RST verringerte bezüglich der regulatorischen Elemente⁴ deren Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² der Strukturgene. Im Vergleich zwischen RST- und Wildtyp-mRNA-Molekülen wurde die Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle und des Start-Kodons berechnet. Das Freisetzungspotential³ durch den RST erhöhte die Zugänglichkeit der RBS um 50 bis 95 %, und die des Start-Kodons um 35,9 bis 95 %.

An dieser Stelle möchte ich einen zweiten wichtigen Aspekt, der sich aus den Translationsergebnissen ergibt, nochmals aufgreifen und mit den diskutierten Ergebnissen zusammenführen. Nachdem bei der Translation der mRNA analoge Ergebnisse zur DNA-Expression detektiert wurden, können die *in vitro* Expressionsergebnisse aus dem gekoppelten Transkriptions/Translations System im Kontext der RNA-Struktur interpretiert werden. Dabei liefern die Untersuchungen neben strukturellen Aspekten noch zusätzliche Informationen über die RNA-Ribosom-Interaktion bei der Translation (de Smit und van Duin, 1994a; Gold, 1988; Ivanovski *et al.*, 2002; van Meerten *et al.*, 2001).

In diesem Zusammenhang wurden *in vitro* Expressionsuntersuchungen mit variierenden Eigenschaften der eingeführten Sekundärstrukturen durchgeführt. Der Vergleich der Expressionsergebnisse der bereits verwendeten RST-Variante (7 bp; $\Delta G = -9,9$ kcal/mol) mit einer verlängerten RST-Variante (9 bp; $\Delta G = -9,9$ kcal/mol) zeigte, bei gleicher Stabilität der beiden RNA-Sekundärstrukturen, dass die Translationsinitiation der verlängerten RST-Struktur relativ schlechter war. Damit beeinflusst die Größe einer RNA-Sekundärstruktur an dieser Position (+19 bis +36) sterisch die Translationsinitiation. Dies relativiert die Position (+15 nt) ab der die mRNA im Allgemeinen aus der 30S-Ribosomenuntereinheit bei der Initiation austritt (Culver, 2001; Yusupova *et al.*, 2001). Folglich besteht für die erfolgreiche Translations-

initiation ein Gleichgewicht zwischen räumlichem Platzbedarf der RNA-Sekundärstruktur an der beschriebenen Position, dem Freisetzungspotential³ durch die eingeführte RNA-Sekundärstruktur und der sterischen Beeinflussung der Zusammenlagerung der ribosomalen Komponenten bei der Translationsinitiation durch die eingeführte RNA-Sekundärstruktur.

In weiteren Expressionsversuchen wurden Konstrukte unter Variation der Stammlängen der eingeführten RST-Sequenzen untersucht, ohne die Stabilität der RSTs konstant zu halten. Dabei gilt allgemein, dass die Stammlängen mit den Stabilitäten der RSTs korrelieren. Je kürzer der hybridisierte Stamm, desto instabiler ist der eingesetzte RST. Folglich wird sich ein instabilerer Stamm abhängig vom Kontext der Strukturgene weniger wahrscheinlich ausbilden, als ein stabilerer. Die Ergebnisse zeigten, dass die 1049-mRNA bereits bei einer Stammlänge von 2 bp (RST L₂) sehr gut exprimiert war, während CIITA bei dieser Stammlänge signifikant schlechter, und Survivin nicht exprimierbar war. Mit zunehmender Stammlänge des RST von 2 bis 5 bp (RST L₂₋₅) nahm die Expression bei allen Genen ab, durchlief bei 5 bp ein Minimum und zeigte maximale Expression bei der Stammlänge von 7bp, um bei 8 bp wieder zu minimaler Expression zu führen. Daraus wurde gefolgert, dass die Funktionalität des RST sich aus mehreren überlagerten Einflüssen zusammensetzt. Dabei konkurrieren zwei gegenläufige Effekte: eine RST-Struktur muss so stabil sein, dass sie den gewünschte Effekt des Freisetzens des Initiationsbereichs erzielt, also genügend Freisetzungspotential³ besitzt. Gleichzeitig wird der RST mit zunehmender Stabilität vom Ribosom erschwert aufgelöst.

Nachdem die Expressionsversuche und die mRNA-Strukturuntersuchungen zu Ergebnissen geführt haben, die eine unterschiedliche Initiierbarkeit der Gene 1049, CIITA und Survivin bezüglich deren Expression erkennen lassen, werden diese Ergebnisse hier vergleichend zusammengefasst. Damit soll dargestellt werden, inwieweit die errechneten und detektierten Parameter eine Aussage über eine unterschiedliche Initiierbarkeit der Expression der Gene erlauben.

Gen	Expression (RST L ₂)	Expression (AT+ / RST-)	RNA-Strukturänderung durch den RST (Nukleotide 0 bis 18)	P_{RST}	p_r (RBS) [%]	p_r (ATG) [%]
1049	0,97	ja	destabilisiert	1	77-95	77-95
CIITA	0,48	nein	stabilisiert	0,95	63	-68
Survivin	0	nein	stabilisiert	0,57	62	35

Tab. 6: Expression im Kontext der RNA-Strukturergebnisse

Bei der Expression unterschiedlicher Stammlängen des RST im Kontext des Gens 1049 wurde festgestellt, dass das Gen 1049 bereits ab einer Stammlänge von 2 bp gut exprimierbar

war. Gleichzeitig zeigten die Expressionsuntersuchungen der Konstrukte mit AT-reicher AS-Kombination ohne RST (AT+/RST-) eine schwache Translationsinitiation, sehr viel schwächer als mit RST. Die experimentelle RNA-Strukturuntersuchungen zeigte, dass die ersten 18 translatierten Nukleotide relativ zur Wildtyp-mRNA destabilisiert wurden. Und die theoretische RNA-Strukturuntersuchung zeigte sowohl die höchste Ausbildungswahrscheinlichkeit des RST als auch die signifikanteste Verringerung der Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² (höchstes Freisetzungspotential³; p_r). Diese Zusammenhänge weisen darauf hin, dass die 1049-mRNA relativ zu den beiden anderen Genen einfacher initiiert war und nicht so viel Freisetzungspotential³ durch den RST benötigt hat, wie Survivin und CIITA.

Im Vergleich dazu benötigte das Gen Survivin für eine erfolgreiche Expression den RST mit 7 bp-Stammlänge, und keine andere Stammlänge war in der Lage, die Translation vergleichbar zu initiieren. Die Expression der Konstrukte mit AT-reicher Sequenz ohne RST zeigte keine Expression. Die RNA-Struktur der ersten 18 nt wurde durch den RST stabilisiert. Aus der theoretischen RNA-Strukturanalyse ergab sich eine relativ geringe Ausbildungswahrscheinlichkeit des RST (0,57), und das Freisetzungspotential³ (p_r) der regulatorischen Elemente⁴ durch den RST war ebenfalls geringer (RBS: 62 %; ATG: 36 %) als bei 1049. Das bedeutet, dass das Freisetzungspotential³ des eingeführten RST mit 7 bp im Falle des Survivins limitiert war, während das Gen 1049 bereits durch eine instabilere Sekundärstruktur erfolgreich initiiert wurde.

Beim Gen CIITA lagen die Expressionswerte unter Einsatz unterschiedlicher Stammlängen des RST (z.B. bei RST L₂: 48 % der maximalen Expression) zwischen den beiden Genen Survivin (bei RST L₂: keine Expression) und 1049 (bei RST L₂: 97 % der maximalen Expression). Die Expressionsuntersuchung der Konstrukte mit AT-reicher AS-Kombination ohne RST zeigte ebenfalls keine detektierbare Expression. Bei der mRNA-Strukturuntersuchung zeigte die CIITA-mRNA, dass sie durch den Einsatz des RST in den ersten 18 translatierten Nukleotiden stabilisiert wurde. Die theoretischen RNA-Strukturuntersuchung zeigte, dass sich der RST mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit ($p_{RST} = 0,95$) ausbildet, und das Freisetzungspotential³ durch den RST die regulatorischen Elemente⁴ mittelmäßig ($p_r(\text{RBS})$: 63 %) bzw. negativ ($p_r(\text{ATG})$: -68 %) war. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse beim Gen CIITA, dass für die erfolgreiche Expression des Gens mehr Freisetzungspotential³ durch den RST notwendig war als bei 1049, aber das Gen nicht so schwer exprimierbar war wie Survivin.

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Tendenz der unterschiedlichen Parameter. Die Expressionsinitiation bei der RST-Stammlänge von 2 bp (RST L₂) nimmt vom Gen 1049 über das Gen CIITA zu Survivin hin ab. Damit korrelieren sowohl die Parameter der RNA-Struktur-

untersuchung (p_{RST} , p_r) als auch der experimentelle Befund, dass die ersten 18 Nukleotide durch den RST in der 1049-RST-mRNA destabilisiert wurden, und die vergleichsweise schwerer initiierten Gene Survivin und CIITA in diesem Bereich stabilisiert wurden. Zusätzlich sprechen die Untersuchungen der AT-reichen Sequenz ohne RST dafür, dass das Gen 1049 einfacher initiiert war als die beiden anderen Gene. Damit zeigen die Ergebnisse, dass eine erfolgreiche Initiation und das dafür notwendige Freisetzungspotential³ des Initiationsbereichs vom Gen abhängt und mit den verwendeten Parametern korreliert.

Zusammenfassend zeigten die Expressionsergebnisse, dass die Expression von Genen, die als Wildtyp-Varianten nicht exprimierbar sind, durch den Einsatz des RST sehr gut initiiert wird. Die mRNA-Strukturuntersuchungen ergaben, dass sich der eingeführte RST ausbildet und seine Einführung in die Wildtyp-mRNA die Ribosomenbindestelle in einer translatierbaren Struktur stabilisiert. Dabei verringert der RST bezüglich der bakteriellen regulatorischen Elemente⁴ deren Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen², setzt den Initiationsbereich damit aus sogenannten „Long range“-Interaktionen frei. Der RST agiert damit als Barriere für die Paarung der regulatorischen Elemente⁴ mit abwärts gelegenen genspezifischen mRNA-Sequenzen. Das bedeutet, der RST fördert die Ausbildung einer separaten mRNA-Struktur-Domäne, in der sich die bakteriellen regulatorischen Sequenzelemente⁴ in translatierbaren RNA-Strukturen zusammenlagern.

Die Ergebnisse führen zu der allgemeinen Schlussfolgerung, dass die Ausbildung einer stabilen GC-reichen RNA-Sekundärstruktur mit 7 bp Stammlänge ($\Delta G = -9,9$ kcal/mol) 15 Nukleotide abwärts vom Start-Kodon die heterologe Proteinexpression stark verbessert. Zusätzlich sollte der Sequenzbereich zwischen Start-Kodon und der RNA-Sekundärstruktur AT-reich sein. In Abb. 38 ist exemplarisch die mRNA-Struktur der 1049-mRNA in Wildtyp (Abb. 38, A) und RST-Variante (Abb. 38, B) verglichen (Zuker, 2003). Dabei ist jeweils die Ribosomenbindestelle rot hervorgehoben, und das Start-Kodon ist grau hinterlegt. Bei der RST-mRNA ist die AT-reiche Sequenz violett und der eingeführte RST grün hervorgehoben. Im Falle der Wildtyp-mRNA sind die Paarungen des Initiationsbereichs mit abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen (Abb. 38,A, 24 bis 82 nt mit 280 bis 330 nt) erkennbar. Durch Einführen der AT-reichen Sequenz und des RST bilden sich bei der RST-mRNA dagegen im Initiationsbereich kurze, helikale Sekundärstrukturen der RBS und des Start-Kodons aus (Abb. 38, B, 50 – 55 nt, 63 – 65 nt), ohne mit den genspezifischen mRNA-Sequenzen Sekundärstrukturen auszubilden.

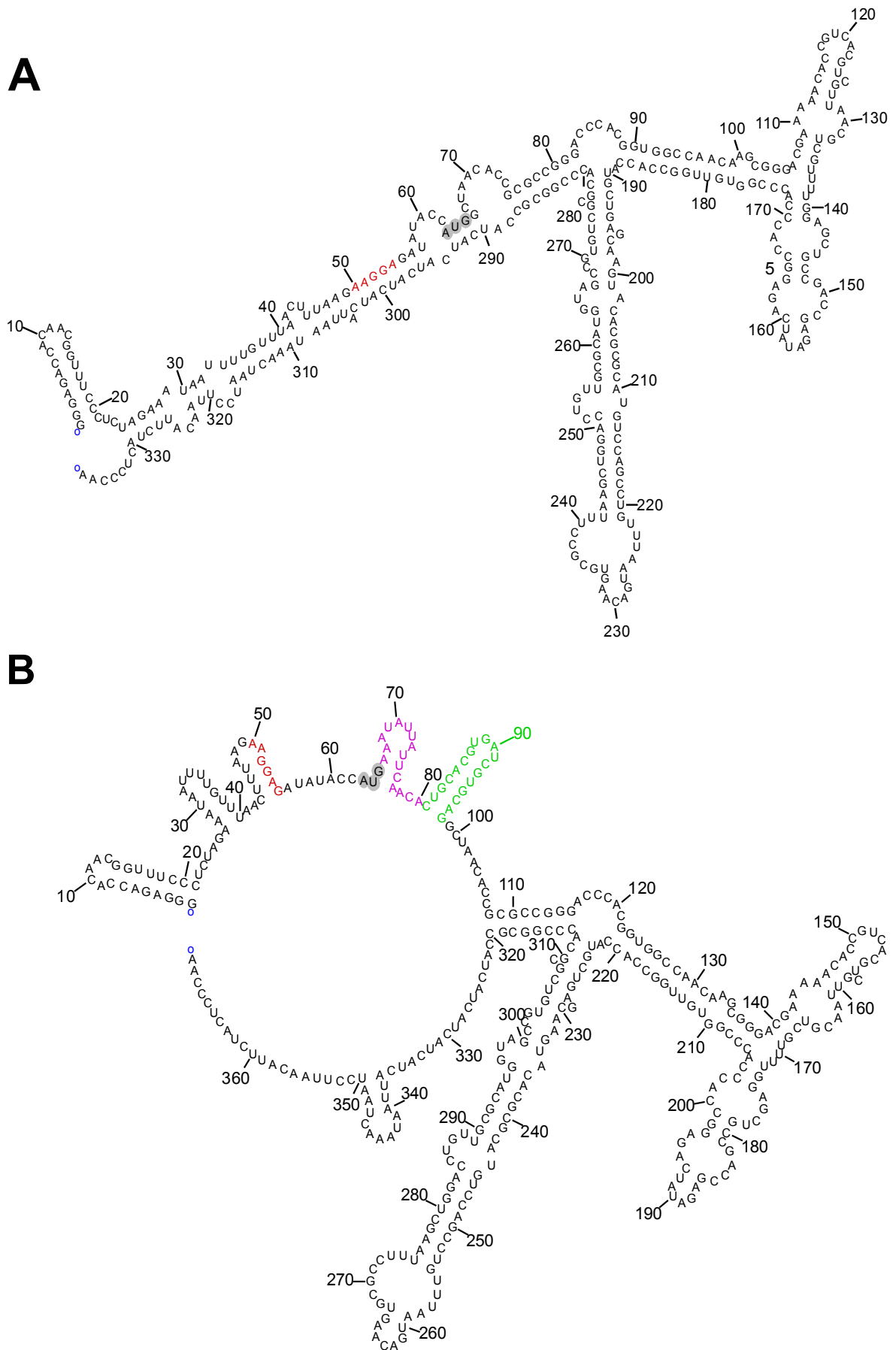


Abb. 38: Exemplarischer Vergleich der Wildtyp-mRNA (A) mit der RST-mRNA (B) des Gens 1049.

Im Rahmen der Arbeit wurde ebenfalls untersucht, ob Reagenzien, die in anderen molekularbiologischen Synthesen erfolgreich die Struktur der mRNA schwächen (Spiess und Ivell, 2002), bei der *in vitro* Expression die Translation strukturierter mRNA ermöglichen können. Die *in vitro* Expressionsversuche der GFP-Variante mit inhibierendem RST direkt nach dem Start-Kodon zeigten, dass die beiden Reagenzien Betain und Trehalose in Kombination die inhibierende RNA-Sekundärstruktur so stark destabilisieren oder das Auflösungsvermögen des Ribosoms für RNA-Sekundärstrukturen so weit erhöhen, dass die Variante erfolgreich exprimiert wurde. Dass die beiden Reagenzien nur in Kombination eine relativ starke Initiation ergeben, weist auf zwei Aspekte hin: einerseits werden durch Trehalose die Proteine stabilisiert (Santoro *et al.*, 1992; Singer und Lindquist, 1998), andererseits wird durch Betain die Sekundärstruktur der mRNA destabilisiert (Spiess und Ivell, 2002).

Die Expressionsuntersuchungen unter Zusatz der Reagenzien Betain und Trehalose zeigten bei schwer exprimierbaren Genen mit strukturierter mRNA, dass sie nicht geeignet sind, um generell die Expression solcher Gene zu ermöglichen. Unter Berücksichtigung der starken Expressionssteigerung bei den Vorversuchen mit der inhibierten GFP-Variante wird deutlich, dass gegenläufige Effekte zum Tragen kommen. Einerseits muss die RNA-Sekundärstruktur der mRNA so weit destabilisiert werden, dass sie vom Ribosom initiiert werden kann. Andererseits bedarf es für eine erfolgreiche Initiation der Hybridisierung der Anti-SD-Sequenz der 16S-rRNA mit der RBS (SD-Sequenz). Wird die RNA-Strukturausbildung durch die eingesetzten Reagenzien geschwächt, so wird gleichzeitig die Effektivität der SD-Anti-SD-Paarung verringert. Dies macht deutlich, dass sie RNA-strukturschwächenden Reagenzien im Zusammenhang mit der Translation ein sehr enges Wirkungsfenster besitzen, das für jede Situation optimiert werden muss. Dabei ist fraglich, ob es gelingt, die jeweilige strukturierte mRNA innerhalb des Wirkungsfensters zu platzieren, d. h. ob die mRNA mit Betain und Trehalose genug destabilisiert werden kann, ohne dass Wechselwirkungen zwischen Ribosom und mRNA unterbunden werden.

6. Literaturverzeichnis

- Apirion, D. 1973. Degradation of RNA in *Escherichia coli*. A hypothesis. *Mol Gen Genet* 122: 313-22.
- Apirion, D., and A. B. Lassar. 1978. A conditional lethal mutant of *Escherichia coli* which affects the processing of ribosomal RNA. *J Biol Chem* 253: 1738-42.
- Arnold, T. E., J. Yu, and J. G. Belasco. 1998. mRNA stabilization by the ompA 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation. *Rna* 4: 319-30.
- Balbas, P. 2001. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol* 19: 251-67.
- Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905-20.
- Baranov, V. I., I. Morozov, S. A. Ortlepp, and A. S. Spirin. 1989. Gene expression in a cell-free system on the preparative scale. *Gene* 84: 463-6.
- Baranov, V. I., and A. S. Spirin. 1993. Gene expression in cell-free system on preparative scale. *Methods Enzymol* 217: 123-42.
- Baumeister, R., P. Flache, O. Melefors, A. von Gabain, and W. Hillen. 1991. Lack of a 5' non-coding region in Tn1721 encoded tetR mRNA is associated with a low efficiency of translation and a short half-life in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 19: 4595-600.
- Benzinger, R., L. W. Enquist, and A. Skalka. 1975. Transfection of *Escherichia coli* spheroplasts. V. Activity of recBC nuclease in rec⁺ and rec⁻ spheroplasts measured with different forms of bacteriophage DNA. *J Virol* 15: 861-71.
- Blum, E., B. Py, A. J. Carpousis, and C. F. Higgins. 1997. Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol Microbiol* 26: 387-98.
- Boncompagni, E., M. Osteras, M. C. Poggi, and D. le Rudulier. 1999. Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family rhizobiaceae and their roles in osmoprotection. *Appl Environ Microbiol* 65: 2072-7.
- Borsook, H. 1950. Protein turnover and incorporation of labeled amino acids into tissue proteins in vivo and in vitro. *Physiol Rev* 30: 206-219.
- Bouvet, P., and J. G. Belasco. 1992. Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E. coli*. *Nature* 360: 488-91.
- Braun, F., E. Hajnsdorf, and P. Regnier. 1996. Polynucleotide phosphorylase is required for the rapid degradation of the RNase E-processed rpsO mRNA of *Escherichia coli* devoid of its 3' hairpin. *Mol Microbiol* 19: 997-1005.
- Brion, P., and E. Westhof. 1997. Hierarchy and dynamics of RNA folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26: 113-37.
- Bukau, B., E. Deuerling, C. Pfund, and E. A. Craig. 2000. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101: 119-22.
- Bycroft, M., T. J. Hubbard, M. Proctor, S. M. Freund, and A. G. Murzin. 1997. The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* 88: 235-42.
- Byrne, R., J. Levin, H. Bladen, and M. Nirenberg. 1964. The in vitro formation of a DNA-ribosome complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 52: 140-148.
- Carpousis, A. J. 2002. The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem Soc Trans* 30: 150-5.
- Carpousis, A. J., G. Van Houwe, C. Ehretsmann, and H. M. Krisch. 1994. Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* 76: 889-900.

- Carrier, T. A., and J. D. Keasling. 1999. Library of synthetic 5' secondary structures to manipulate mRNA stability in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 15: 58-64.
- Case, C. C., E. L. Simons, and R. W. Simons. 1990. The IS10 transposase mRNA is destabilized during antisense RNA control. *Embo J* 9: 1259-66.
- Chen, C. Y., and J. G. Belasco. 1990. Degradation of pufLMX mRNA in *Rhodobacter capsulatus* is initiated by nonrandom endonucleolytic cleavage. *J Bacteriol* 172: 4578-86.
- Chen, H. Z., and G. Zubay. 1983. Prokaryotic coupled transcription-translation. *Methods Enzymol* 101: 674-90.
- Chen, L. H., S. A. Emory, A. L. Bricker, P. Bouvet, and J. G. Belasco. 1991. Structure and function of a bacterial mRNA stabilizer: analysis of the 5' untranslated region of ompA mRNA. *J Bacteriol* 173: 4578-86.
- Chung, H. H., D. R. Benson, and P. G. Schultz. 1993. Probing the structure and mechanism of Ras protein with an expanded genetic code. *Science* 259: 806-9.
- Coburn, G. A., and G. A. Mackie. 1996. Differential sensitivities of portions of the mRNA for ribosomal protein S20 to 3'-exonucleases dependent on oligoadenylation and RNA secondary structure. *J Biol Chem* 271: 15776-81.
- Cole, P. A. 1996. Chaperone-assisted protein expression. *Structure* 4: 239-42.
- Culver, G. M. 2001. Meanderings of the mRNA through the ribosome. *Structure (Camb)* 9: 751-8.
- de Smit, M. H., and J. van Duin. 1994a. Control of translation by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*. A quantitative analysis of literature data. *J Mol Biol* 244: 144-50.
- de Smit, M. H., and J. van Duin. 1994b. Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction. *J Mol Biol* 235: 173-84.
- Deutscher, M. P., and N. B. Reuven. 1991. Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3277-80.
- DeVries, J. K., and G. Zubay. 1967. DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the alpha-fragment of the enzyme beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57: 1010-2.
- Donis-Keller, H. 1979. Site specific enzymatic cleavage of RNA. *Nucleic Acids Res* 7: 179-92.
- Draper, D. E. 1996. Strategies for RNA folding. *Trends Biochem Sci* 21: 145-9.
- Ehretsmann, C. P., A. J. Carpousis, and H. M. Krisch. 1992. mRNA degradation in prokaryotes. *Faseb J* 6: 3186-92.
- Emory, S. A., P. Bouvet, and J. G. Belasco. 1992. A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 6: 135-48.
- Farwick, M., R. M. Siewe, and R. Kramer. 1995. Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 177: 4690-5.
- Gales, E., and J. Folkes. 1954. Effect of nucleic acids on protein synthesis and amino acid incorporation in disrupted staphylococcal cells. *Nature* 173: 1223-1227.
- Gold, L. 1988. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 57: 199-233.
- Gold, L. M., and M. Schweiger. 1969. Synthesis of phage-specific alpha- and beta-glucosyl transferases directed by T-even DNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 62: 892-8.
- Green, R., and H. F. Noller. 1997. Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* 66: 679-716.
- Grunberg-Manago, M. 1999. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu Rev Genet* 33: 193-227.

- Gualerzi, C., G. Risuleo, and C. L. Pon. 1977. Initial rate kinetic analysis of the mechanism of initiation complex formation and the role of initiation factor IF-3. *Biochemistry* 16: 1684-9.
- Gunzl, A., Z. Palfi, and A. Bindereif. 2002. Analysis of RNA-protein complexes by oligonucleotide-targeted RNase H digestion. *Methods* 26: 162-9.
- Hartz, D., D. S. McPheeters, and L. Gold. 1991. Influence of mRNA determinants on translation initiation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 218: 83-97.
- Heilman-Miller, S. L., J. Pan, D. Thirumalai, and S. A. Woodson. 2001. Role of counterion condensation in folding of the *Tetrahymena* ribozyme. II. Counterion-dependence of folding kinetics. *J Mol Biol* 309: 57-68.
- Helling, R. B., H. M. Goodman, and H. W. Boyer. 1974. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambda-doid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 14: 1235-44.
- Herschlag, D. 1995. RNA chaperones and the RNA folding problem. *J Biol Chem* 270: 20871-4.
- Hirao, I., S. Yoshizawa, and K. Miura. 1993. Stabilization of mRNA in an *Escherichia coli* cell-free translation system. *FEBS Lett* 321: 169-72.
- Hui, A., and H. A. de Boer. 1987. Specialized ribosome system: preferential translation of a single mRNA species by a subpopulation of mutated ribosomes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4762-6.
- Invitrogen. 2001. pBAD TOPO® TA; Expression Kit; Version L; 110601; 25-0196.
- Invitrogen. 2002. *Novex® Pre-Cast Gel Electrophoresis Guide*. Invitrogen.
- Iost, I., J. Guillerez, and M. Dreyfus. 1992. Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes in vivo. *J Bacteriol* 174: 619-22.
- Ivanovski, G., F. Gubensek, and J. Pungercar. 2002. mRNA secondary structure can greatly affect production of recombinant phospholipase A(2) toxins in bacteria. *Toxicon* 40: 543-9.
- Jacob, W. F., M. Santer, and A. E. Dahlberg. 1987. A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4757-61.
- Jacques, N., and M. Dreyfus. 1990. Translation initiation in *Escherichia coli*: old and new questions. *Mol Microbiol* 4: 1063-7.
- Janosi, L., H. Hara, S. Zhang, and A. Kaji. 1996. Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF)--an important but overlooked step of protein biosynthesis. *Adv Biophys* 32: 121-201.
- Jonasson, P., S. Liljeqvist, P. A. Nygren, and S. Stahl. 2002. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* 35: 91-105.
- Karimi, R., M. Y. Pavlov, R. H. Buckingham, and M. Ehrenberg. 1999. Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol Cell* 3: 601-9.
- Kennell, D. 2002. Processing endoribonucleases and mRNA degradation in bacteria. *J Bacteriol* 184: 4645-57; discussion 4665.
- Kennell, D., and H. Riezman. 1977. Transcription and translation initiation frequencies of the *Escherichia coli* lac operon. *J Mol Biol* 114: 1-21.
- Khesin, R. 1953. Formation of amylase by cytoplasmic granules isolated from pancreas cells. *Biokhimiya(USSR)* 18: 462-474.
- Kigawa, T., T. Yabuki, and S. Yokoyama. 1999. [Large-scale protein preparation using the cell-free synthesis]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 44: 598-605.
- Kigawa, T., and S. Yokoyama. 1991. A continuous cell-free protein synthesis system for coupled transcription-translation. *J Biochem (Tokyo)* 110: 166-8.

- Kirby, K. S. 1965. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J.* 64: 405-408.
- Kochetkov, S. N., E. E. Rusakova, and V. L. Tunitskaya. 1998. Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. *FEBS Lett* 440: 264-7.
- Kudlicki, W., G. Kramer, and B. Hardesty. 1992. High efficiency cell-free synthesis of proteins: refinement of the coupled transcription/translation system. *Anal Biochem* 206: 389-93.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lederman, M., and G. Zubay. 1967. DNA-directed peptide synthesis. 1. A comparison of T2 and Escherichia coli DNA-directed peptide synthesis in two cell-free systems. *Biochim Biophys Acta* 149: 253-8.
- Li, H., and A. W. Nicholson. 1996. Defining the enzyme binding domain of a ribonuclease III processing signal. Ethylation interference and hydroxyl radical footprinting using catalytically inactive RNase III mutants. *Embo J* 15: 1421-33.
- Lima, W. F., B. P. Monia, D. J. Ecker, and S. M. Freier. 1992. Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics. *Biochemistry* 31: 12055-61.
- Lin-Chao, S., and S. N. Cohen. 1991. The rate of processing and degradation of antisense RNAi regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo. *Cell* 65: 1233-42.
- Lotspeich, F., Zorbach, H. 1998. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Mackie, G. A. 1991. Specific endonucleolytic cleavage of the mRNA for ribosomal protein S20 of Escherichia coli requires the product of the *ams* gene in vivo and in vitro. *J Bacteriol* 173: 2488-97.
- Mackie, G. A. 1998. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* 395: 720-3.
- Makrides, S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. *Microbiol Rev* 60: 512-38.
- Mattheakis, L. C., and M. Nomura. 1988. Feedback regulation of the *spc* operon in Escherichia coli: translational coupling and mRNA processing. *J Bacteriol* 170: 4484-92.
- Matzura, O., and A. Wennborg. 1996. RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows. *Comput Appl Biosci* 12: 247-9.
- McCarthy, J. E., and R. Brimacombe. 1994. Prokaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation. *Trends Genet* 10: 402-7.
- McCormick, J. R., J. M. Zengel, and L. Lindahl. 1994. Correlation of translation efficiency with the decay of lacZ mRNA in Escherichia coli. *J Mol Biol* 239: 608-22.
- McDowall, K. J., and S. N. Cohen. 1996. The N-terminal domain of the *rne* gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J Mol Biol* 255: 349-55.
- Miczak, A., V. R. Kabardin, C. L. Wei, and S. Lin-Chao. 1996. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3865-9.
- Misra, T. K., and D. Apirion. 1979. RNase E, an RNA processing enzyme from Escherichia coli. *J Biol Chem* 254: 11154-9.
- Misra, V. K., and D. E. Draper. 1998. On the role of magnesium ions in RNA stability. *Biopolymers* 48: 113-35.
- Misra, V. K., and D. E. Draper. 2002. The linkage between magnesium binding and RNA folding. *J Mol Biol* 317: 507-21.
- Moffatt, B. A., J. J. Dunn, and F. W. Studier. 1984. Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol* 173: 265-9.

- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50.
- Murthy, V. L., and G. D. Rose. 2000. Is counterion delocalization responsible for collapse in RNA folding? *Biochemistry* 39: 14365-70.
- Nakano, H., T. Shinbata, R. Okumura, S. Sekiguchi, M. Fujishiro, and T. Yamane. 1999. Efficient coupled transcription/translation from PCR template by a hollow-fiber membrane bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 64: 194-9.
- Neidhardt, F. C. 1987. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium : cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nellen, W., and C. Lichtenstein. 1993. What makes an mRNA anti-sense-itive? *Trends Biochem Sci* 18: 419-23.
- Nirenberg, M., and J. Matthaei. 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47: 1588-1602.
- Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, and T. A. Steitz. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920-30.
- Nussinov, R., and I. Tinoco, Jr. 1981. Sequential folding of a messenger RNA molecule. *J Mol Biol* 151: 519-33.
- O'Hara, E. B., J. A. Chekanova, C. A. Ingle, Z. R. Kushner, E. Peters, and S. R. Kushner. 1995. Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1807-11.
- Ohuchi, S., H. Nakano, and T. Yamane. 1998. In vitro method for the generation of protein libraries using PCR amplification of a single DNA molecule and coupled transcription/translation. *Nucleic Acids Res* 26: 4339-46.
- Pedersen-Lane, J., G. F. Maley, E. Chu, and F. Maley. 1997. High-level expression of human thymidylate synthase. *Protein Expr Purif* 10: 256-62.
- Peterson, E., and D. Greenberg. 1952. Characteristics of the amino acid-incorporating system of liver homogenates. *J Biol Chem* 194: 359-375.
- Phillips, C., C. B. Kyriakopoulou, and A. Virtanen. 1999. Identification of a stem-loop structure important for polyadenylation at the murine IgM secretory poly(A) site. *Nucleic Acids Res* 27: 429-38.
- Precht, M. 1993. *Biostatistik 2*. Oldenburg Verlag, München, Wien.
- Py, B., C. F. Higgins, H. M. Krisch, and A. J. Carpousis. 1996. A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* 381: 169-72.
- Rajendrakumar, C. S., T. Suryanarayana, and A. R. Reddy. 1997. DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Lett* 410: 201-5.
- Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108: 557-72.
- Regnier, P., M. Grunberg-Manago, and C. Portier. 1987. Nucleotide sequence of the pnp gene of *Escherichia coli* encoding polynucleotide phosphorylase. Homology of the primary structure of the protein with the RNA-binding domain of ribosomal protein S1. *J Biol Chem* 262: 63-8.
- Resto, E., A. Iida, M. D. Van Cleve, and S. M. Hecht. 1992. Amplification of protein expression in a cell free system. *Nucleic Acids Res* 20: 5979-83.
- Rittenhouse, J., and F. Marcus. 1984. Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal Biochem* 138: 442-8.

- Roberts, B. E., and B. M. Paterson. 1973. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 2330-4.
- Robertson, H. D., and J. J. Dunn. 1975. Ribonucleic acid processing activity of Escherichia coli ribonuclease III. *J Biol Chem* 250: 3050-6.
- Ross, J. 1995. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59: 423-50.
- Russell, R., I. S. Millett, M. W. Tate, L. W. Kwok, B. Nakatani, S. M. Gruner, S. G. Mochrie, V. Pande, S. Doniach, D. Herschlag, and L. Pollack. 2002. Rapid compaction during RNA folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4266-71.
- Ryabova, L. A., I. Morozov, and A. S. Spirin. 1998. Continuous-flow cell-free translation, transcription-translation, and replication-translation systems. *Methods Mol Biol* 77: 179-93.
- Sambrook, J., Russel D.W., Sambrook J. 2001. *Molecular Cloning: A Labarotaory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
- Santoro, M. M., Y. Liu, S. M. Khan, L. X. Hou, and D. W. Bolen. 1992. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* 31: 5278-83.
- Selinger, D. W., R. M. Saxena, K. J. Cheung, G. M. Church, and C. Rosenow. 2003. Global RNA half-life analysis in Escherichia coli reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res* 13: 216-23.
- Siekevitz, P. 1952. Uptake of radioactive alanine in vitro into proteins of rat liver fractions. *J Biol Chem* 195: 549-565.
- Siekevitz, P., and P. Zamecnik. 1951. In vitro incorporation of l-C¹⁴-DL-alanine into proteins of rat-liver granular fractions. *Fed Proc* 10: 246-247.
- Sigler, P. B. 1975. An analysis of the structure of tRNA. *Annu Rev Biophys Bioeng* 4: 477-527.
- Sigma. 1998. Productinformation SYBR Green II. www.sigma-aldrich.com.
- Singer, M. A., and S. Lindquist. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell* 1: 639-48.
- Spieß, A. N., and R. Ivell. 2002. A highly efficient method for long-chain cDNA synthesis using trehalose and betaine. *Anal Biochem* 301: 168-74.
- Spieß, A. N., Ivell, R. 1999. Normalization of RNA Hybridisation Signals by Means of SYBR Green II-Stained 28S or 18S Ribosomal RNA and a Phosphor Imager. *Bio Techniques* 26: 46-50.
- Spirin, A. S., V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Y. Ovodov, and Y. B. Alakhov. 1988. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242: 1162-4.
- Stahl, S. J., and K. Zinn. 1981. Nucleotide sequence of the cloned gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol* 148: 481-5.
- Stenstrom, C. M., H. Jin, L. L. Major, W. P. Tate, and L. A. Isaksson. 2001. Codon bias at the 3'-side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in Escherichia coli. *Gene* 263: 273-84.
- Swartz, J. R. 2001. Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 12: 195-201.
- Switzer, W. M., and W. Heneine. 1995. Rapid screening of open reading frames by protein synthesis with an in vitro transcription and translation assay. *Biotechniques* 18: 244-8.
- Tang, J. Y., J. Temsamani, and S. Agrawal. 1993. Self-stabilized antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioates: properties and anti-HIV activity. *Nucleic Acids Res* 21: 2729-35.

- Tessier, L. H., P. Sondermeyer, T. Faure, D. Dreyer, A. Benavente, D. Villeval, M. Courtney, and J. P. Lecocq. 1984. The influence of mRNA primary and secondary structure on human IFN- gamma gene expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 12: 7663-75.
- Thirumalai, D., N. Lee, S. A. Woodson, and D. Klimov. 2001. Early events in RNA folding. *Annu Rev Phys Chem* 52: 751-62.
- Thirumalai, D., and S. A. Woodson. 2000. Maximizing RNA folding rates: a balancing act. *Rna* 6: 790-4.
- Thomas, J. G., A. Ayling, and F. Baneyx. 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* 66: 197-238.
- Tinoco, I., Jr., and C. Bustamante. 1999. How RNA folds. *J Mol Biol* 293: 271-81.
- van Meerten, D., G. Girard, and J. van Duin. 2001. Translational control by delayed RNA folding: identification of the kinetic trap. *Rna* 7: 483-94.
- Vogelstein, B., and D. Gillespie. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 615-9.
- Voss, B. 2001. Untersuchungen zur Erhöhung der Erfolgsrate und der Expressionsmenge von in vitro Proteinexpressionssystemen.
- Watzel, M., Nemetz C., Metzler T., Fernholz E., Hoffmann T., Mutter W. 2001. Rapid Translation System RTS 100 - a High throughput Cell-free Protein Expression. *Biochemica* 3: 27-28.
- Watzel M., N. C., Metzler T., Fernholz E., Hoffmann T., Mutter W. 2001. Rapid Translation System RTS 100 - a High throughput Cell-free Protein Expression. *Biochemica* 3: 27-28.
- Weber, K., and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406-12.
- Winnick, T. 1950a. Incorporation of labeled amino acids into protein of embryonic and tumor tissue homogenates. *Fed Proc* 9: 247.
- Winnick, T. 1950b. Studies on the mechanism of protein synthesis in embryonic and tumor tissues. II. Inactivation of fetal rat liver homogenates by dialysis and reactivation by the adenylic acids system. *Arch Biochem* 28: 338-347.
- Wong, H. C., and S. Chang. 1986. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3233-7.
- Wood, W., and P. Berg. 1962. The effect of enzymatically synthesized ribonucleic acid on amino acid incorporation by soluble protein-ribosome system from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 94-104.
- Woodson, S. A. 2000. Compact but disordered states of RNA. *Nat Struct Biol* 7: 349-52.
- Yang, J., K. Kobayashi, Y. Iwasaki, H. Nakano, and T. Yamane. 2000. In vitro analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas* sp. strain KWI-56 lipase. *J Bacteriol* 182: 295-302.
- Yoshizawa, S., T. Ueda, Y. Ishido, K. Miura, K. Watanabe, and I. Hirao. 1994. Nuclease resistance of an extraordinarily thermostable mini-hairpin DNA fragment, d(GCGAAGC) and its application to in vitro protein synthesis. *Nucleic Acids Res* 22: 2217-21.
- Young, S., and R. W. Wagner. 1991. Hybridization and dissociation rates of phosphodiester or modified oligodeoxynucleotides with RNA at near-physiological conditions. *Nucleic Acids Res* 19: 2463-70.
- Yusupova, G. Z., M. M. Yusupov, J. H. Cate, and H. F. Noller. 2001. The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* 106: 233-41.
- Zhang, K., and A. W. Nicholson. 1997. Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antideterminants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13437-41.

- Zilhao, R., F. Cairrao, P. Regnier, and C. M. Arraiano. 1996. PNPase modulates RNase II expression in *Escherichia coli*: implications for mRNA decay and cell metabolism. *Mol Microbiol* 20: 1033-42.
- Zubay, G. 1973. In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet* 7: 267-87.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31: 3406-15.

7. **Begriffsdefinitionen**

¹*Abwärtspaarungen*: Paarungen der regulatorischen Sequenzelemente⁴ der mRNA mit den mRNA-Sequenzen des Strukturgens. Dabei werden nur Paarungen der regulatorischen Sequenzelemente⁴ mit mRNA-Sequenzen der Strukturgene für die Klassifizierung der Abwärts Paarung gewertet, die 3' abwärts der eingeführten synthetischen RST-Sequenzen liegen. Paarungen der regulatorischen Sequenzelemente⁴ innerhalb der 5' UTR und der eingeführten RST-Sequenzen bleiben unberücksichtigt.

²*Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen*: Summe der Häufigkeiten der jeweiligen Abwärts paarungen¹ in einer mRNA nach Berücksichtigung (Gewichtung) der jeweiligen strukturellen Stabilität des Paarungsereignisses.

³*Freisetzungspotential*: Fähigkeit der eingeführten synthetischen RSTs bei der mRNA-Sekundärstrukturausbildung die Affinität zu abwärts gelegenen mRNA-Sequenzen² zu verringern.

⁴*regulatorische Elemente/Sequenzelemente/Initiationsbereich*: Funktionelle Strukturelemente der bakteriellen Translationsinitiation, die Ribosomenbindestelle und das Start-Kodon.

8. Abkürzungen

%		Prozent
° C		Grad Celsius
µg		Mikrogramm
µl		Mikroliter
Abb.		Abbildung
AK		Antikörper
AS		Aminosäure
bp		Basenpaare
cal		Kalorie
Carb.		Carbenicillin
CECF	Continuous-exchange cell-free	Zellfreier kontinuierlicher Austausch
CFCF	Continuous-flow cell-free	
CFU	Colony forming unit	Koloniebildende Einheit
C-Terminus		Carboxyl-Ende eines Proteins
ΔG		Differenz der Freien Enthalpie zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand
DNA		Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>		Escherichia coli
<i>et al.</i>		et alteri
G	Gibbs free energy	Freie Enthalpie
GFP	green fluorescence protein	Grün fluoreszierendes Protein
h	hour	Stunde
His ₆ -		Hexa-Histidin
IPTG		isopropyl-[beta]-D-thiogalactopyranosid
J		Joule
kDa		Kilodalton
LB		Luria-Bertani
M		Molarität
MAK		monoklonaler Antikörper
MES		2-(N-morpholino)-Ethan Sulfonsäure

Abkürzungen

mg		Milligramm
min	minute	Minute
ml		Milliliter
mM		Millimol
mRNA		Botenribonukleinsäure
ng		Nanogramm
nt		Nukleotide
N-Terminus		Amino-Ende eines Proteins
P		Pellet
PAA		Polyacrylamid
PAGE		PAA-Gelelektrophorese
PAK		Polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerase Kettenreaktion
POD		Peroxidase
r.p.		ribosomales Protein
RBS		Ribosomenbindestelle
RNA		Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute	Umdrehungen pro Minute
RST	RNA-Stem-Loop	RNA-Haarnadelschleifenstruktur
RTS	Rapid Translation System	
SD	Shine&Dalgarno Sequenece	Shine-Dalgarno Sequenz (RBS)
SDS	Sodiumdodecylsulfat	Natriumdodecylsulfat
Stem-Loop	Stem-Loop	Haarnadelschleifenstruktur
Tab.		Tabelle
TBST		Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
Tris		2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Ü		Überstand
ÜN		Über Nacht
UTR	untranslated region	Nicht translatierte Region
V		Volt

Die hier dargestellte Arbeit wurde von Januar 2002 bis Dezember 2003 bei der Firma Roche Diagnostics, in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Watzele, durchgeführt.

Herrn Dr. Watzele danke ich für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die Stellung des interessanten und herausfordernden Themas und seine Unterstützung meiner Arbeit während der gesamten Zeit.

Prof. Dr. Johannes Buchner bin ich für die Betreuung der Arbeit, für seine wertvollen Ratschläge und Anregungen, sehr dankbar.

Der Firma Roche Diagnostics danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen meiner Promotionsstelle. Den Kolleginnen und Kollegen der jeweiligen Abteilungen der Firma Roche danke ich für die allseits freundliche Bereitschaft zu offener und reibungsloser Zusammenarbeit.

Für die vielen Anregungen und Diskussionen und die hervorragende Durchsicht meiner schriftlichen Arbeiten gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Dr. Martin Haslbeck.

Anette Seidl, Claudia Kirr, Markus Schmidt, Doris Giessen, Thomas Nikolaus und Tobias Frankl danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im Laboralltag.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei Barbara bedanken, die mich immer mit guter Laune versorgt hat und durch ihre Unterstützung diese Arbeit ermöglicht hat.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen entnommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Augsburg, den