

Untersuchungen an einem zellfreien
Proteinsynthesesystem
basierend auf S30 Extrakten von *Escherichia coli*



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Axel Freischmidt
aus Günzburg

Regensburg, März 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 08.03.2011

Das Promotionskolloquium fand statt am: 07.07.2011

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dresselhaus

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Wagner

3. Prüfer: Apl. Prof. Dr. Werner Kremer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung in die prokaryotische Translation	2
1.1.1 Das prokaryotische Ribosom	3
1.1.2 Initiation	4
1.1.3 Elongation	6
1.1.4 Termination und Ribosomenrecycling	9
1.1.5 Post-transkriptionelle Regulationsmechanismen	10
1.2 Zellfreie Proteinsynthese	16
1.2.1 Geschichte	16
1.2.2 Zellfreie Proteinsynthese basierend auf <i>E. coli</i> Extrakten	18
1.2.3 Apparative Durchführung der zellfreien Proteinsynthese	24
1.2.4 Haupteigenschaften der wichtigsten zellfreien Systeme	26
1.2.5 Anwendungsgebiete der zellfreien Proteinsynthese	28
1.2.6 Chancen und Limitationen	32
1.3 RNA Chaperone – ein Überblick	34
1.4 Ziele der Arbeit	38
2. Material	40
2.1 Biologisches Material	40
2.1.1 Bakterienstämme	40
2.1.2 Eukaryotische Zellen	42
2.1.3. Antikörper	42
2.2 Mikrobiologisches Material	43
2.2.1 Plasmidvektoren	43
2.2.2 Enzyme/Proteine	47
2.2.3 Oligonukleotide	48
2.2.4 Kits und Kitbestandteile	50
2.3 Chemikalien	50
2.4 Geräte	51

2.5 Computerprogramme	52
2.6 Ausgangsmaterial	53
2.6.1 DNA Konstrukte	53
2.6.2 Proteine	54
3. Methoden	55
 3.1 Mikrobiologische Methoden	55
3.1.1 Flüssigkulturen von Bakterien	55
3.1.2 Flüssigkulturen von Hefe	55
3.1.3 Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte	56
3.1.4 Glycerinkulturen von Bakterien und Hefen	56
3.1.5 Bakterienkulturen auf Agarplatten	56
3.1.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	57
3.1.7 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid DNA	58
 3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden	58
3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	58
3.2.2 Isolierung genomicscher DNA aus Bakterien	59
3.2.3 Isolierung der gesamt RNA aus Bakterien, Hefe und HeLa-Zellen	59
3.2.4 Reverse Transkription von mRNA (RT-PCR)	60
3.2.5 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	61
3.2.5.1 Primerdesign	61
3.2.5.2 PCR mit der Phusion TM DNA Polymerase	62
3.2.5.3 Kolonie-PCR	63
3.2.6 Restriktionsverdau	64
3.2.7 „Blunten“ von DNA Fragmenten	65
3.2.8 Dephosphorylierung des Vektors	66
3.2.9 Aufreinigung von DNA Fragmenten und Vektoren in Lösung	67
3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese	67
3.2.11 Gelextraktion	68
3.2.12 Zwischenklonierungen mit dem TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	69
3.2.13 Ligation	70
3.2.14 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	70
3.2.15 DNA Sequenzierung	71

3.3 Klonierung von DNA Fragmenten	71
3.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden	72
3.4.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)	72
3.4.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	74
3.4.3 Western Blot	75
3.4.3.1 Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran	75
3.4.3.2 Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern	76
3.4.3.3 Spezifischer Nachweis von His ₆ - und (HN) ₆ -tags	77
3.4.4 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	77
3.4.5 Reinigung von Proteinen mit His ₆ -tag mit Ni-NTA Spin Columns	78
3.4.6 Reinigung von Proteinen im Batch-Verfahren	80
3.4.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford)	83
3.4.8 Dialyse von Proteinen	83
3.4.9 Konzentrieren proteinhaltiger Lösungen	84
3.4.10 Fällen von Proteinen	84
3.4.11 Lyophilisieren von Proteinen	85
3.4.12 Gelfiltration	86
3.5 Methoden zur zellfreien Proteinsynthese	86
3.5.1 Entfernung von RNasen von Arbeitsmaterialien	86
3.5.2 Herstellung der <i>E. coli</i> S30 Extrakte	87
3.5.3 Isolierung translationsaktiver Ribosomen aus <i>E. coli</i> S30 Extrakten	88
3.5.4 Ribosomenisolierung nach Spedding (1990)	89
3.5.5 Zellfreie Proteinexpression im Batch-Verfahren	91
3.5.6 Zellfreie Proteinexpression im Dialysemodus (CECF)	92
3.5.7 Das S30 T7 High-Yield Protein Expression System	93
3.5.8 Das PURExpress [®] <i>In Vitro</i> Protein Synthesis Kit	93
3.5.9 Einfluss von Proteinen und anderer Substanzen auf die CFPS	94
3.5.10 Quantifizierung zellfrei exprimierter CAT	94
3.5.11 Quantifizierung zellfrei exprimierter DHFR	95
3.5.12 Isolation und Nachweis von miRNAs aus CFPS Reaktionen	96
3.6 „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)	97
3.6.1 EMSA mit CAT mRNA	97
3.6.2 EMSA mit <i>E. coli</i> tRNA	98
3.6.3 EMSA mit <i>E. coli</i> rRNA	99

3.6.4 Native Agarose-Gelelektrophorese	100
3.7 Schutz von DNA vor DNase-Verdau durch StpA	100
3.8 Nachweis der ATP-Hydrolyse von eIF-4A durch HPLC	101
4. Ergebnisse	103
4.1 Optimierung des <i>E. coli</i> CFPS Systems	103
4.1.1 Optimierung der S30 Extrakt Herstellung	103
4.1.2 Optimierung der CFPS Reaktion	107
4.1.3 Charakterisierung des optimierten Systems	108
4.2 Kopplung von CFPS und NASBA-Reaktion	110
4.2.1 Kompatibilität von S30 Extrakten und NASBA-Reaktion	111
4.2.2 Kompatibilität isolierter Ribosomen und NASBA-Reaktion	114
4.2.3 Expression der reversen Transkriptase eines Coliphagen	115
4.3 Rekonstitution der Translationsmaschinerie in <i>E. coli</i> S30 Extrakten	118
4.3.1 Einfluss zusätzlicher Bestandteile der Translationsmaschinerie	118
4.3.1.1 Gewinnung und Aktivität	118
4.3.1.2 Kontrollversuche	120
4.3.1.3 Einfluss auf die Produktivität der CFPS	121
4.3.1.4 Einfluss der GTPasen bei erhöhter GTP Konzentration	124
4.3.1.5 Quantifizierung der Translationsfaktoren in S30 Extrakten	124
4.3.2 CFPS mit niedrigeren Konzentrationen der Translationsfaktoren	126
4.4 Einfluss von RNA Chaperonen auf die CFPS	128
4.4.1 Gewinnung und Aktivität	129
4.4.2 Einfluss auf die Produktivität der CFPS	136
4.5 Kopplung von Transkription und Translation in der CFPS	138
4.5.1 Herstellung der DNA Konstrukte	138
4.5.2 Verwendung des <i>tac</i> Promotors in der CFPS	139
4.6 Einfluss einer miRNA auf die CFPS	142
4.6.1 Eingesetzte DNA Konstrukte	143
4.6.2 Auswirkungen einer miRNA auf die CFPS	143
4.7 CFPS unter Verwendung der 5' UTR der <i>cspA</i> mRNA	148
4.7.1 Herstellung der DNA Konstrukte	149
4.7.2 Einfluss der 5' UTR der <i>cspA</i> mRNA auf die CFPS	150

5. Diskussion	153
5.1 Kritische Einflussfaktoren bei der Herstellung von S30 Extrakten	153
5.2 Kopplung der NASBA-Reaktion mit der CFPS	158
5.3 Rekonstitution der Translationsmaschinerie in <i>E. coli</i> S30 Extrakten	161
5.4 Auswirkungen der Sekundärstrukturbildung der mRNA auf die CFPS	167
5.5 CFPS bei niedrigeren Temperaturen	176
5.6 Ausblick	178
6. Zusammenfassung	181
7. Literaturverzeichnis	184
8. Abkürzungsverzeichnis	197
9. Erklärung	200
10. Danksagung	201

1. Einleitung

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahre 2003 (Collins *et al.*, 2003) läutete die sog. post-genomische Ära ein, in der sich die biologische und medizinische Forschung zunehmend mit dem weitaus komplexeren und dynamischen Transkriptom, Proteom, sowie dem Metabolom beschäftigt. Jedes dieser relativ jungen Forschungsgebiete besitzt seine eigenen Fragestellungen und Methoden, diese zu beantworten. Eine wichtige Fragestellung der Proteomik beschäftigt sich mit der Struktur und Funktion von Proteinen. Zu ihrer Beantwortung wird meist eine homogene Lösung des zu untersuchenden Proteins benötigt, weshalb eine Vielzahl von Methoden entwickelt wurden, Proteine rekombinant in verschiedenen Organismen, allen voran in *Escherichia coli*, herzustellen und anschließend aufzureinigen (Übersicht z.B. in Farrokh *et al.*, 2009). Dabei ist es jedoch oft schwierig zu entscheiden, welche Methode sich für das jeweilige Protein am besten eignet, da jedes Protein unterschiedlich ist und sich entsprechend anders verhält. Zwar existieren Publikationen, die sich damit beschäftigen, welche Methoden sich in den letzten Jahren als vielversprechend herausgestellt haben und eine gewisse Orientierung bieten (z.B. Graslund *et al.*, 2008), dennoch muss für jedes Protein ein eigenes Expressions- und Reinigungsprotokoll herausgearbeitet werden. Auch ist längst nicht jede Proteinexpression und -aufreinigung erfolgreich. Im Durchschnitt konnten nur etwa 30% aller proteincodierender DNA-Sequenzen, die kloniert wurden, auch exprimiert und aufgereinigt werden (Graslund *et al.*, 2008).

Eine Methode, die das Potential besitzt auch schwer exprimierbare Proteine schnell und mit hohem Durchsatz herzustellen, ist die zellfreie Proteinsynthese. Hier wird das gewünschte Protein *in vitro* von Zellextrakten, meistens von *Escherichia coli* oder Weizenkeimen, synthetisiert. Dabei handelt es sich oft um gekoppelte Transkriptions/Translations-Systeme, so dass DNA als template für die Proteinsynthese verwendet werden kann. Im Folgenden sollen die auf *E. coli* basierenden, zellfreien Proteinsynthese-Systeme und einige Anwendungen, zu denen auch ein von der Kooperationspartnerin GENEART AG entwickeltes *in vitro* Evolutionsprojekt gehört, näher vorgestellt und die Chancen und Limitationen der zellfreien Proteinsynthese aufgezeigt werden. Dabei wird zum besseren Verständnis zuerst auf den Mechanismus und die Regulation der Translation bei Prokaryoten eingegangen. Ein weiteres wichtiges Thema dieser Arbeit ist die Auflösung von

Sekundärstrukturen der RNA durch spezielle Proteine, den sog. RNA Chaperonen, so dass schließlich auch diese hier vorgestellt werden sollen.

1.1 Einführung in die prokaryotische Translation

Als Translation bezeichnet man den Teil der Proteinbiosynthese, in dem die Nukleotidsequenz einer mRNA, die zuvor von einer RNA Polymerase anhand einer DNA Matrize synthetisiert worden ist (Transkription), in die Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt wird. Die Translation kann in drei Phasen unterteilt werden. In der ersten Phase, der Initiation, bindet die mRNA an das Ribosom und die erste Aminosäure der neuen Kette wird in Position gebracht. In der zweiten Phase, der Elongation, wird die neue Aminosäurekette anhand der Informationen auf der mRNA verlängert, während in der dritten Phase, der Termination, das neu synthetisierte Protein vom Ribosom freigesetzt wird. Anschließend wird das Ribosom recycelt, um für die Synthese von neuen Proteinen zur Verfügung zu stehen. An all diesen Schritten sind weitere Proteine, die als Translationsfaktoren (TFs) bezeichnet werden, sowie tRNAs beteiligt (siehe Abb. 1.2, 1.3 und 1.4).

Der Hauptunterschied der Proteinbiosynthese bei Pro- und Eukaryoten ergibt sich aus dem Fehlen eines echten Zellkerns bei Prokaryoten. Hier finden Transkription und Translation im gleichen Kompartiment statt. Das hat zur Folge, dass viele mRNA Moleküle bereits mit Ribosomen besetzt sind und translatiert werden, noch bevor ihre Synthese durch eine RNA Polymerase abgeschlossen ist. Dieser Umstand führte bei den Prokaryoten zu weniger Möglichkeiten der mRNA Sekundärstrukturbildung, mRNA Prozessierung und der post-transkriptionellen Regulation der Translation als bei den Eukaryoten, bei denen Transkription und Translation strikt getrennt durch den Zellkern ablaufen. Trotzdem besitzen auch Prokaryoten Mechanismen, ihre Proteinsynthese auch post-transkriptionell zu regulieren und ihre Proteinsynthese somit schnell an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen (Übersicht in Alberts *et al.*, 2010).

Im Folgenden sollen nun die drei Phasen der Translation, das Ribosomenrecycling und post-transkriptionelle Regulationsmechanismen der Prokaryoten näher betrachtet werden. Zum besseren Verständnis wird zuerst das prokaryotischen Ribosom kurz vorgestellt.

1.1.1 Das prokaryotische Ribosom

Die Translation findet bei allen Organismen an den Ribosomen, riesigen Komplexen aus ribosomaler RNA (rRNA) und Proteinen, statt. Das prokaryotische 70S Ribosom mit etwa 2,5 MDa (Nierhaus and Wilson, 2004) besteht aus zwei Untereinheiten, der kleinen 30S Untereinheit (ca. 900 kDa) und der großen 50S Untereinheit (ca. 1,6 MDa). Bei *E. coli* wird die kleine Untereinheit von 21 Proteinen, sowie der 1542 Nukleotide langen 16S rRNA gebildet. Die große ribosomale Untereinheit besteht aus 34 Proteinen und zwei rRNAs, der 120 Nukleotide langen 5S rRNA und der 2904 Nukleotide umfassenden 23S rRNA (Rostom *et al.*, 2000).

Einige strukturelle Eigenschaften von Ribosomen sind für ein Verständnis des Mechanismus der Translation wichtig. Ribosomen verfügen über drei Bindestellen für tRNAs, die als Aminoacyl- (A), Peptidyl- (P) und Exit- (E) -Stellen bezeichnet werden (Abb. 1.1). Die kleine ribosomale Untereinheit verfügt zusätzlich über eine Bindestelle für die mRNA, in der großen Untereinheit befindet sich, in unmittelbarer Nähe zur P-Stelle, das Peptidyltransferasezentrum, in dem vom Ribosom die Bildung von neuen Peptidbindungen der wachsenden Aminosäurekette katalysiert wird (Übersicht in Alberts *et al.*, 2010).

Jede ribosomale Untereinheit ist das Ergebnis einer komplexen Biosynthese (Übersicht in Wilson and Nierhaus, 2007) und zusammen, unterstützt von vielen weiteren Proteinen und RNAs, ermöglichen sie der Zelle als molekulare Maschinen die Nukleotidsequenz der mRNA in eine Aminosäuresequenz zu übersetzen.

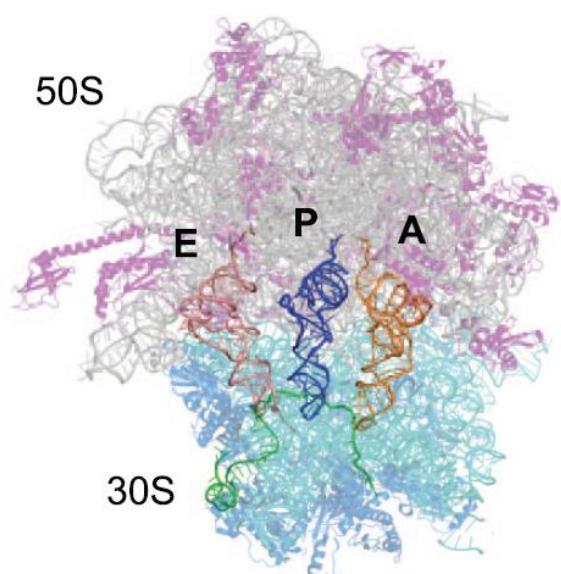


Abb. 1.1: Das prokaryotische Ribosom

Strukturmodell eines Ribosoms mit gebundener mRNA (grün) und tRNAs in den A-, P- und E-Stellen (orange, dunkelblau und rosa). Proteine und rRNA der kleinen Untereinheit sind in blau bzw. türkis, die der großen Untereinheit in lila bzw. grau dargestellt (aus Shoji *et al.*, 2009).

1.1.2 Initiation

Als Initiation der Translation bezeichnet man alle Vorgänge die ablaufen müssen, um die mRNA an das Ribosom zu binden und die Initiator-tRNA mit der ersten Aminosäure der neuen Kette in Position zu bringen, so dass diese im nächsten Schritt, der Elongation, verlängert werden kann. Das Endprodukt der Initiation wird als 70S Initiationskomplex bezeichnet und über den 30S Initiationskomplex als Zwischenprodukt gebildet (siehe Abb. 1.2). Neben RNAs und den Ribosomen sind an diesem Vorgang auch TFs beteiligt, die als Initiationsfaktoren (IFs) bezeichnet werden (Übersichten in Mysnikov *et al.*, 2009; Simonetti *et al.*, 2009).

Zu Beginn der Initiation liegt das Ribosom dissoziiert in seine Untereinheiten vor, wobei IF3 fest an die kleine ribosomale Untereinheit gebunden ist. Durch diese Bindung wird verhindert, dass sich die große und kleine ribosomale Untereinheit zu früh, also noch bevor die mRNA an die kleine Untereinheit gebunden hat, zusammenlagern. IF3 hält in der Zelle also einen Pool an freien kleinen ribosomalen Untereinheiten aufrecht, die mit der Initiation der Translation beginnen können (Grunberg-Manago *et al.*, 1975). An diese freie kleine Untereinheit binden dann zwei weitere Initiationsfaktoren, IF1 und IF2. Diese rekrutieren die mRNA und die Initiator-tRNA zur kleinen Untereinheit und der 30S Initiationskomplex entsteht. Die Initiator-tRNA ist eine besondere tRNA, die sich von den anderen, an der Elongation beteiligten tRNAs, strukturell unterscheidet. Sie wird zwar, wie die Methionyl-tRNA auch, von der Methionyl-tRNA Synthetase erkannt und mit der Aminosäure Methionin beladen (Mechulam *et al.*, 1999; siehe auch Punkt 1.1.3), aber zusätzlich wird das Methionin der Initiator-tRNA noch durch die Methionyl-tRNA Formyltransferase (MTF) formyliert (Dickerman *et al.*, 1967). Die Initiator-tRNA bindet an die P-Stelle der kleinen ribosomalen Untereinheit und ihr Anticodon interagiert mit dem Startcodon (meistens AUG) der mRNA. Die mRNA wiederum interagiert mit ihrer Shine Dalgarno (SD) Sequenz mit einer anti-SD Sequenz am 3' Ende der 16S rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit. Die etwa 5 Nukleotide lange SD Sequenz der mRNA befindet sich einige Nukleotide vor dem Startcodon in der 5' untranslatierten Region (5' UTR) und ihre Interaktion mit der anti-SD Sequenz der kleinen Untereinheit bringt das Startcodon in die Nähe der P-Stelle, wo es mit dem Anticodon der Initiator-tRNA interagieren kann (Shine and Dalgarno, 1974).

IF1, IF2 und IF3 sind alle an der korrekten Bildung des 30S Initiationskomplexes beteiligt. Neben seiner Aufgabe der Ribosomendissoziation fördert IF3 beispielsweise die Codon-Anticodon Erkennung zwischen der Initiator-tRNA und dem Startcodon der mRNA in der P-

Stelle, wobei gleichzeitig die Bindung von falsch gebundenen tRNAs destabilisiert wird (Hartz *et al.*, 1989). Die GTPase IF2 bindet in ihrer GTP gebundenen Form sowohl die 30S Untereinheit als auch, zu einem späteren Zeitpunkt der Initiation, die 50S Untereinheit des Ribosoms und ist somit an der Bildung des 70S Initiationskomplexes beteiligt (Allen *et al.*, 2005). Außerdem hilft IF2, durch seine Bindestelle für die Initiator-tRNA, bei der Rekrutierung derselben zur P-Stelle der 30S Untereinheit (Laursen *et al.*, 2004). IF1 bindet die 16S rRNA in der Nähe der A-Stelle, wobei konformationelle Veränderungen der 30S Untereinheit Einfluss auf das Assoziations-Dissoziations Gleichgewicht der ribosomalen Untereinheiten nehmen (Milon *et al.*, 2008). Weitere Funktionen von IF1 umfassen die Stärkung der Bindungen von IF2 und IF3 an die 30S Untereinheit, was eine Aktivitätssteigerung der beiden zur Folge hat, sowie die Kooperation von IF1 mit IF2 bei der korrekten Lokalisierung der Initiator-tRNA in der P-Stelle (Pon and Gualerzi, 1984).

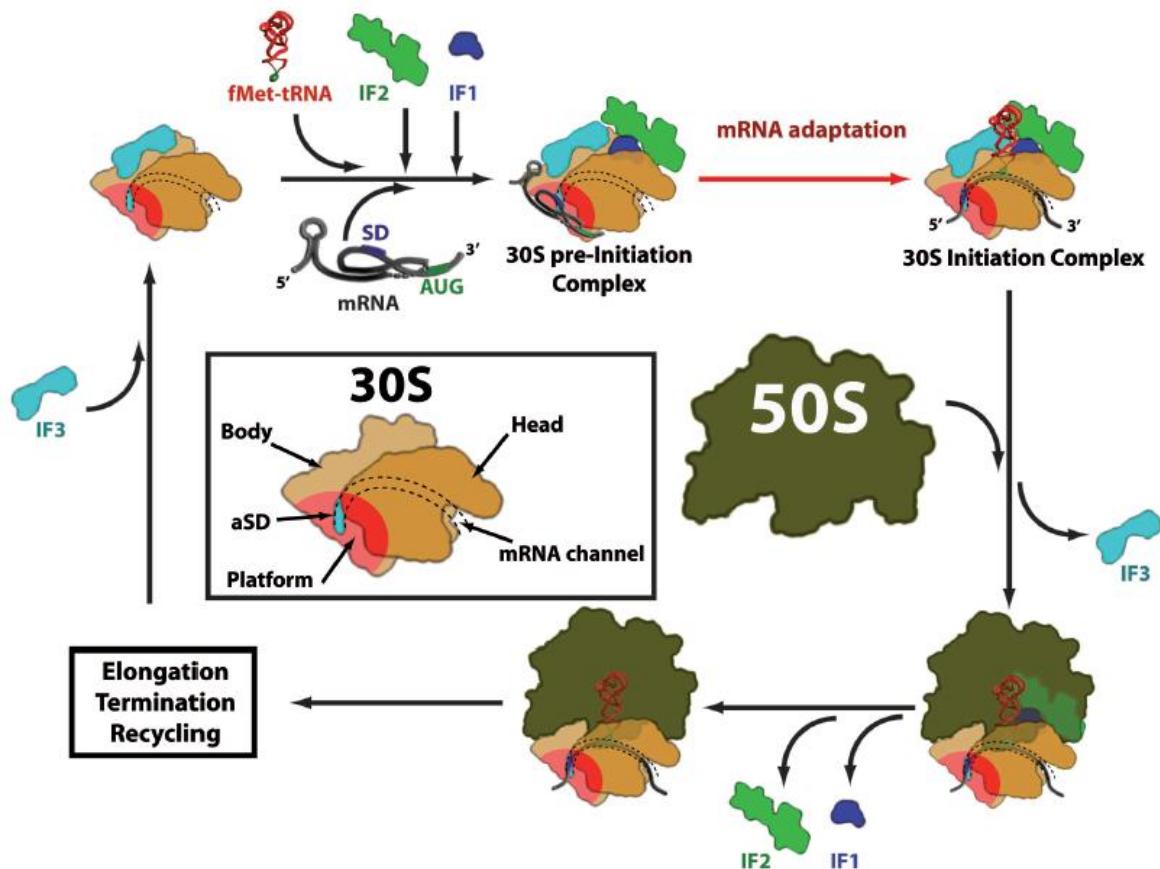


Abb. 1.2: Initiation der Translation

Bei der Initiation entsteht zuerst der 30S Initiationskomplex aus kleiner ribosomaler Untereinheit, Initiator-tRNA und mRNA, der sich schließlich mit der großen ribosomalen Untereinheit zum 70S Initiationskomplex zusammenlagert, wobei an allen Schritten IFs beteiligt sind. Genauere Erklärung siehe Text (aus Simonetti *et al.*, 2008).

Das finale Ereignis der Bildung des 30S Initiationskomplexes ist die Adaptation der mRNA in einen Kanal der 30S Untereinheit. Bei diesem relativ langsamem Vorgang müssen Sekundärstrukturen der mRNA aufgelöst werden und es scheinen sowohl ribosomale Proteine der kleinen Untereinheit, die IFs und die Initiator-tRNA daran beteiligt zu sein (La Teana *et al.*, 1995; Studer and Joseph, 2006). Erst nach der Adaptation der mRNA kann die Codon/Anticodon-Interaktion zwischen mRNA und Initiator-tRNA richtig stattfinden und die Bildung des 30S Initiationskomplexes ist abgeschlossen (Marzi *et al.*, 2007).

Der fertig ausgebildete 30S Initiationskomplex favorisiert nun, unter der Freisetzung von IF3, die Vereinigung mit der großen ribosomalen Untereinheit und somit die Ausbildung des 70S Initiationskomplexes. Dabei wird durch die Anwesenheit der großen ribosomalen Untereinheit die GTPase-Aktivität von IF2 angeregt, was zur GTP-Hydrolyse und zur Freisetzung von IF2 und IF1 führt (Grigoriadou *et al.*, 2007).

Der 70S Initiationskomplex, bestehend aus großer und kleiner ribosomaler Untereinheit, korrekt positionierter mRNA und der Initiator-tRNA mit der ersten Aminosäure der neuen Kette, dem N-Formylmethionin, in der P-Stelle des Ribosoms, ist nun bereit für die nächste Phase der Translation, die Elongation.

1.1.3 Elongation

Die Elongation der Translation ist ein Zyklus, in dem eine Aminosäure nach der anderen, anhand der Informationen auf der mRNA, an die wachsende Kette hinzugefügt wird. Auch hier sind wieder zusätzliche Proteine, die als Elongationsfaktoren (EFs) bezeichnet werden, beteiligt (Übersichten in Dunkle and Cate, 2010; Shoji *et al.*, 2009; Agirrezabala and Frank, 2009).

Der Elongationszyklus kann in drei aufeinander folgende Schritte unterteilt werden, die als Decodierung, Peptidyltransfer und Translokation bezeichnet werden (siehe Abb. 1.3). Wie bereits erwähnt hat der 70S Initiationskomplex die Initiator-tRNA an der P-Stelle gebunden. Die benachbarten tRNA Bindungsstellen E und A, die jeweils ein Codon Abstand zur P-Stelle entlang der mRNA aufweisen, sind zu diesem Zeitpunkt frei (siehe auch Abb 1.1). Neue Aminosäuren werden in Form von aminoacylierten tRNAs an das Ribosom geliefert. Diese Aminoacyl-tRNAs werden von den Aminoacyl-tRNA Synthetasen unter ATP-Verbrauch gebildet. Dabei sind es diese 20 Enzyme, die die verschiedenen Anticodons der tRNAs erkennen und diese mit der zugehörigen Aminosäure beladen. Sie entschlüsseln somit den

genetischen Code und verbinden damit die Welten der Nukleotide und der Proteine (RajBhandary, 1997).

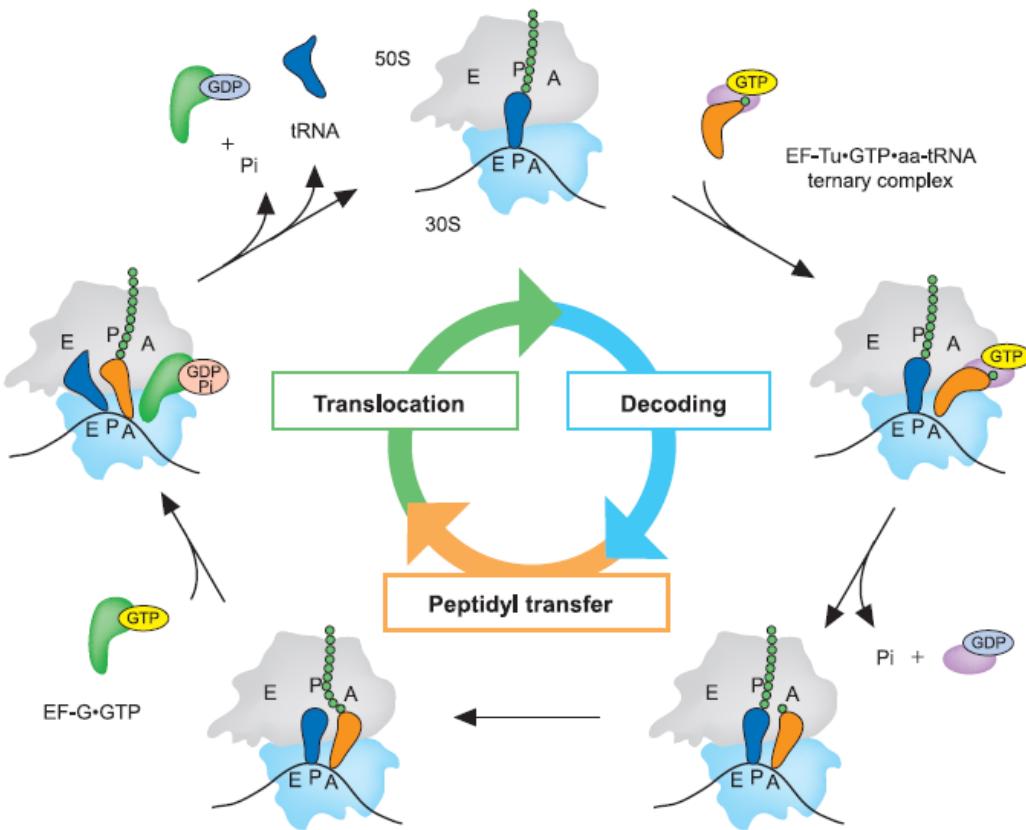


Abb. 1.3: Die drei Schritte des Elongationszyklus

Schematische Darstellung eines Elongationszyklus, unterteilt in die drei Schritte Decodierung, Peptidyltransfer und Translokation. Weitere Erklärungen siehe Text (aus Shoji *et al.*, 2009).

Die Aminoacyl-tRNAs werden als ternärer Komplex, zusammen mit GTP und der GTPase EF-Tu, zur A-Stelle des Ribosoms geliefert. Passen das Codon der mRNA und das Anticodon der Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle der 30S Untereinheit zusammen, wird die GTPase-Aktivität von EF-Tu stimuliert, was zur Bindung der Aminoacyl-tRNA an das Ribosom und zur Freisetzung von EF-Tu führt. Dadurch, dass EF-Tu sein gebundenes GTP nur hydrolysiert, wenn das Codon der mRNA und das Anticodon der Aminoacyl-tRNA zusammenpassen, sorgt EF-Tu dafür, dass die Nukleotidsequenz der mRNA korrekt in eine Aminosäuresequenz übersetzt wird (z.B. Gromadski and Rodnina, 2004; Moazed and Noller, 1989). Nachdem EF-Tu sein GTP hydrolysiert und die Aminoacyl-tRNA an das Ribosom übergeben hat, muss das nun gebundene GDP wieder gegen ein GTP ausgetauscht werden, damit EF-Tu weitere Aminoacyl-tRNAs liefern kann. Trotz eines GTP-Überschusses in der

Zelle, wird für diese Reaktion die Katalyse eines sog. Guaninnukleotid-Austauschfaktors benötigt. Diese Aufgabe übernimmt das Protein EF-Ts (z.B. Gromadski *et al.*, 2002).

Nachdem die neu angelieferte, zum nächsten Codon der mRNA passende, Aminoacyl-tRNA an der A-Stelle des Ribosoms gebunden hat, ist die Decodierung abgeschlossen und der Peptidyltransfer kann stattfinden. Hierbei wird die Aminosäure bzw. später die Aminosäurekette, die an der tRNA in der P-Stelle gebunden ist, auf die Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle übertragen. Dies hat zur Folge, dass nach dem Peptidyltransfer eine deacylierte tRNA an die P-Stelle des Ribosoms gebunden ist. Die tRNA an der A-Stelle trägt nun die Aminosäurekette, verlängert um die eine Aminosäure, die sie selbst an die A-Stelle des Ribosoms liefert hat. Dieser Vorgang, bei dem eine neue Peptidbindung entsteht, wird von der 23S rRNA, welche das Peptidyltransferasezentrum der großen ribosomalen Untereinheit bildet, katalysiert (Monro, 1967; Schmeing *et al.*, 2002).

Nach dem Peptidyltransfer muss die Peptidyl-tRNA in der A-Stelle, zusammen mit der mRNA, um ein Codon in die P-Stelle verschoben werden. Dieser, als Translokation bezeichnete Vorgang, bereitet das Ribosom auf den Einbau der nächsten Aminosäure der wachsenden Kette vor, indem es die A-Stelle freimacht und die nächste Aminoacyl-tRNA binden kann. An der Translokation, die dafür verantwortlich ist, dass sich das Ribosom an der mRNA entlangbewegt und diese, Codon für Codon, translatiert, ist die GTPase EF-G beteiligt. Dieses Protein bindet in der Nähe der A-Stelle des Ribosoms (Agrawal *et al.*, 1998). Es gibt verschiedene Ansichten, wie EF-G die Translokation katalysiert. Es scheint so, dass die für die Translokation benötigte Energie sowohl aus der Bindung von EF-G an das Ribosom, als auch aus der GTP Hydrolyse stammt. Die GTP Hydrolyse löst konformationelle Veränderungen in EF-G aus, durch die die tRNAs zusammen mit der mRNA um ein Codon verschoben wird. Die Energie aus der GTP Hydrolyse ist auch für das Ablösen von EF-G vom Ribosom verantwortlich. Bei der Translokation wandert die Peptidyl-tRNA von der A-Stelle in die P-Stelle und die deacylierte tRNA der P-Stelle wandert in die E-Stelle, von wo aus sie vom Ribosom abdiffundieren kann (z.B. Katunin *et al.*, 2002; Zavialov *et al.*, 2005).

An dieser Stelle ist ein Elongationszyklus abgeschlossen und das Ribosom ist bereit diesen zu wiederholen, um eine weitere Aminosäure in die wachsende Kette einzubauen. Diese Zyklen werden solange wiederholt, bis ein Stopcodon auf der mRNA erreicht ist, was zur Termination der Translation führt.

1.1.4 Termination und Ribosomenrecycling

Die Elongationszyklen der Translation finden solange statt, bis ein Stopcodon auf der mRNA signalisiert, dass die Synthese des Proteins abgeschlossen ist. Dies leitet die Termination (Abb. 1.4) ein, bei der das neu synthetisierte Polypeptid, mit der Hilfe weiterer TFs, die als Freisetzung-(‘Release’)-Faktoren (RFs) bezeichnet werden, vom Ribosom freigesetzt wird (Übersichten in Dunkle and Cate, 2010; Youngman *et al.*, 2008; Petry *et al.*, 2008; Poole and Tate, 2000).

Stopcodons auf der mRNA (UAA, UAG und UGA) in der A-Stelle werden nicht von Aminoacyl-tRNAs, sondern von RFs der Klasse I (RF1 und RF2) erkannt. Dabei ist RF1 spezifisch für UAG und RF2 für UGA. Das dritte Stop-Codon, UAA, wird von beiden erkannt (Scolnick *et al.*, 1968; Petry *et al.*, 2005). Die Exposition eines Stop-Codons an der A-Stelle des Ribosoms führt zur Bindung eines RFs der Klasse I. Diese wiederum katalysieren die Hydrolyse der Esterbindung zwischen tRNA und der synthetisierten Aminosäurekette in der P-Stelle (Frolova *et al.*, 1999). Dies führt zur Freisetzung des neu synthetisierten Peptids und RF3, ein weiterer RF, diesmal der Klasse II, kann an das Ribosom binden. Auch bei RF3, wie schon zuvor bei IF2, EF-Tu und EF-G, handelt es sich um eine GTPase. Diese bindet in ihrer GDP-Form an das Ribosom, welches als Guanninnukleotid-Austauschfaktor wirkt und das GDP durch ein GTP ersetzt (Zavialov *et al.*, 2001). RF3 mit gebundenem GTP löst konformationelle Veränderungen im Ribosom aus, die nicht mehr mit einer Bindung von RFs der Klasse I kompatibel sind, so dass diese freigesetzt werden (Gao *et al.*, 2007).

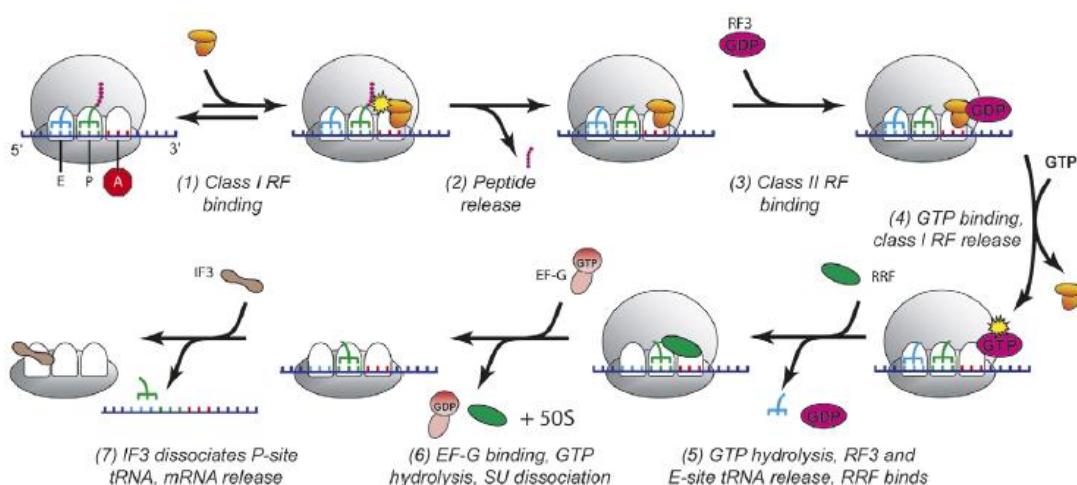


Abb. 1.4: Termination und Ribosomenrecycling

Stopcodons auf der mRNA werden von RFs der Klasse I erkannt und diese setzen das neu synthetisierte Polypeptid vom Ribosom frei. Die Bindung und GTP Hydrolyse eines RFs der Klasse II setzt alle RFs vom Ribosom frei und bereitet das Ribosom auf das EF-G und RRF abhängige Recycling vor, bei dem es in seine Untereinheiten dissoziiert. Genauere Erklärung siehe Text (aus Petry *et al.*, 2008).

Anschließend hydrolysiert RF3 sein gebundenes GTP, was zu seiner eigenen Freisetzung führt und ein Komplex aus mRNA und Ribosom mit einer deacylierten tRNA in der P-Stelle entsteht. Die Auflösung dieses Komplexes ist ein wichtiger Schritt, damit die Ribosomen recycelt werden und für neue Zyklen der Translation zur Verfügung stehen.

Beim Ribosomenrecycling (siehe Abb. 1.4) dissoziiert das Ribosom in seine Untereinheiten und die mRNA, sowie die deacylierte tRNA in der P-Stelle werden freigesetzt. Neben den bereits bekannten TFs EF-G und IF3 ist daran ein weiterer TF, der Ribosomenrecycling-Faktor (RRF) beteiligt (Übersichten in Petry *et al.*, 2008; Seshadri and Varshney, 2006).

Der RRF, der strukturell stark einer tRNA ähnelt (Kim *et al.*, 2000), bindet zusammen mit EF-G in der A-Stelle an das Ribosom, wobei die Bindung von RRF konformationelle Änderungen im Ribosom hervorruft, die die Kontaktfläche zwischen großer und kleiner Untereinheit betreffen. Die GTP Hydrolyse von EF-G spaltet das Ribosom dann reversibel in seine Untereinheiten, wobei EF-G und RRF freigesetzt werden (Hirokawa *et al.*, 2002). Um eine Reassoziation der Untereinheiten zu vermeiden, bindet IF3 die 30S Untereinheit (Karimi *et al.*, 1999; Hirokawa *et al.*, 2005). Der letzte und langsamste Schritt des Ribosomenrecyclings ist die von IF3 bewirkte Dissoziation der mRNA und der deacylierten tRNA in der P-Stelle der kleinen ribosomalen Untereinheit (Peske *et al.*, 2005).

An dieser Stelle ist das Ribosomenrecycling abgeschlossen und die ribosomalen Untereinheiten befinden sich wieder in einem Zustand, in dem sie mit der Initiation der Translation einer neuen mRNA beginnen können.

1.1.5 Post-transkriptionelle Regulationsmechanismen

Die mRNA hat als einzelsträngige Kette aus Nukleotiden die Eigenschaft, sich in komplexe Sekundärstrukturen zu falten. Prokaryoten nutzen diese Eigenschaft der mRNA aus, um ihre Proteinsynthese auch post-transkriptionell, meistens auf der Ebene der Initiation, zu regulieren und sich somit schnell an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Neben dem Abbau der mRNA durch RNasen ist es vor allem die für die Initiation wichtige 5' UTR der mRNA, die als Angriffspunkt für regulatorische Faktoren, wie z.B. bestimmte Proteine, kleine nichtcodierende RNAs (ncRNAs; auch ‚small‘ RNAs, sRNAs oder ‚micro‘ RNAs, miRNAs genannt) oder Effektoren mit niedrigem Molekulargewicht („low molecular weight“, LMW Effektoren) dient. Auch Veränderungen der Sekundärstruktur der 5' UTR,

hervorgerufen durch Veränderungen der Temperatur, kann die Translation einer mRNA regulieren (Abb. 1.5). Im Folgenden sollen die wichtigsten post-transkriptionellen Regulationsmechanismen der Prokaryoten kurz vorgestellt werden (Übersichten in Kaberdin and Bläsi, 2006; Romby and Springer, 2003; Geissmann *et al.*, 2009; Repoila and Darfeuille, 2009).

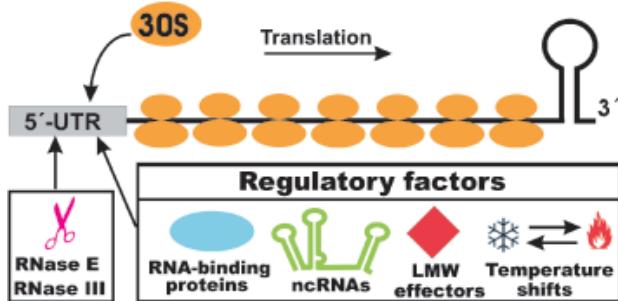


Abb. 1.5: Faktoren mit regulatorischem Einfluss auf die 5' UTR einer mRNA

Die Translation bereits synthetisierter mRNAs wird durch Abbau und Faktoren, die Einfluss auf die 5' UTR der mRNA nehmen, reguliert (aus Kaberdin and Bläsi, 2006).

Abbau der mRNA durch RNasen

Der mRNA-Umsatz, also das Gleichgewicht von Synthese und Abbau von mRNAs, in einer prokaryotischen Zelle ist ein sehr breites Thema. Aus diesem Grund soll hier nur ein wichtiger Regulationsmechanismus vorgestellt werden, der die Länge der Lebensdauer von mRNAs beeinflusst. An diesem Mechanismus ist die RNase E beteiligt. Diese RNase verdaut einzelsträngige RNA an A/U-reichen Regionen (McDowall *et al.*, 1994), bevorzugt dann, wenn sich noch zusätzlich ein G zwei Nukleotide vor der Spaltstelle befindet (Kaberdin, 2003). Solche A/U-reichen Sequenzen findet man häufig in der 5' UTR von mRNAs, besonders in der Nähe der SD-Sequenz (auch Ribosomenbindungsstelle, RBS genannt). A/U-reiche RNA-Sequenzen sind eher unstrukturiert und erleichtern die Interaktion der SD-Sequenz mit der 30S Untereinheit des Ribosoms bei der Initiation der Translation. Die 30S Untereinheit hat dabei die Eigenschaft, einen Bereich von etwa 54-57 Nukleotiden um das Startcodon der mRNA, vor einem Verdau durch RNasen zu schützen (Hüttenhofer and Noller, 1994). Folglich werden mRNAs mit einer starken SD-Sequenz, die häufig Initiationseignisse mit der kleinen ribosomalen Untereinheit auslösen, weniger oft von der RNase E verdaut als mRNAs mit schwacher SD-Sequenz, die häufiger für RNasen zugänglich ist. Eine starke SD-Sequenz erhöht also die Lebensdauer von mRNAs. Die häufigen Initiationseignisse haben einen weiteren stabilisierenden Effekt, nämlich dass die mRNA dicht mit translatierenden Ribosomen besetzt ist, was sie vor Spaltung durch andere RNasen schützt (Arnold *et al.*, 1998).

RNA-bindende Proteine

Die Translation einiger mRNAs wird durch die Bindung bestimmter Proteine an ihre 5' UTR reguliert. Meist ist es hier so, dass ein Protein für eine bestimmte mRNA spezifisch ist und nur die Translatierbarkeit dieser mRNA beeinflusst. Generell kann die Bindung eines Proteins an die 5' UTR einer mRNA entweder aktivierend oder inhibierend auf ihre Translation wirken, wobei es weitaus mehr Proteine zu geben scheint, die negativ auf die Translation von mRNAs wirken.

Aktivierend wirkende Proteine lösen bei ihrer Bindung an die mRNA oft Sekundärstrukturen der 5' UTR auf, wie z.B. stabile Stamm-Schleife Strukturen, die die SD-Sequenz (bzw. RBS) verbergen und eine Interaktion mit dem Ribosom verhindern. Erst nach dem Auflösen solcher Strukturen wird die SD-Sequenz für das Ribosom zugänglich und die mRNA translatierbar (Abb. 1.6). Ein Beispiel für ein positiv wirkendes Protein wäre das Com Protein des Bakteriophagen μ . Es bindet die mRNA des *mom* Genes in der 5' UTR und verändert die Sekundärstruktur so, dass die Bindung an das Ribosom verbessert und somit die Translatierbarkeit erhöht wird (Wulczyn and Kahmann, 1991).

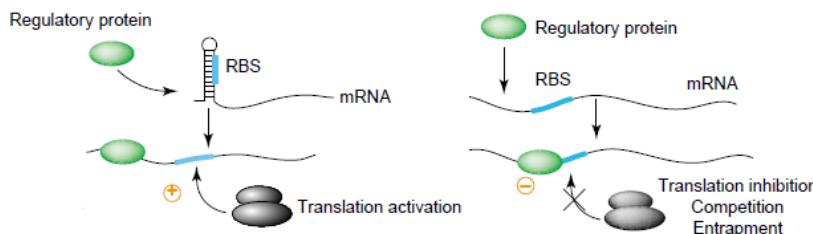


Abb. 1.6: Translationsregulation durch Proteine

Proteine können positiv (links) und negativ (rechts) auf die Translation wirken (verändert nach Romby and Springer, 2003).

Negativ wirkende Proteine setzen die Translatierbarkeit von mRNAs herab, indem sie entweder mit dem Ribosom um die Bindung an die SD-Sequenz konkurrieren, oder für die Bildung eines nicht translatierbaren Komplexes aus mRNA und 30S Untereinheit („Entrapment“) verantwortlich sind (Abb. 1.6). Die Threonyl-tRNA Synthetase z.B. kann die Translation ihrer eigenen mRNA inhibieren. Die 5' UTR dieser mRNA hat eine ähnliche Struktur wie eine tRNA, das Substrat dieses Enzyms. Bei ausreichend hohen Konzentrationen des Enzyms konkurriert es mit der kleinen ribosomalen Untereinheit um die Bindung an die 5' UTR ihrer mRNA und inhibiert so die Translation (Moine *et al.*, 1990; Caillet *et al.*, 2003). Ein Beispiel für negative Regulation, die einen nicht translatierbaren Komplex aus mRNA und 30S Untereinheit („Entrapment“) beinhaltet, ist das ribosomale Protein S15 (nur bei *E. coli*). Auch S15 reguliert die Translation seiner eigenen mRNA indem es an ein konserviertes Strukturmotiv in der 5' UTR der mRNA bindet, das einem Motiv seines normalen Bindepartners, der 16S rRNA, stark ähnelt. Übersteigt die Konzentration von S15 die von freier, für die Ribosomenbiogenese vorgesehener 16S rRNA, bindet S15 seine eigene mRNA

und bildet einen nicht translatierbaren Komplex mit der 30S Untereinheit (Philippe *et al.*, 1993; Mathy *et al.*, 2004).

Regulatorische RNAs

Die regulatorischen RNAs, die nicht für ein bestimmtes Protein codieren, sondern aktiv an regulatorischen Prozessen der Zelle beteiligt sind, haben in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen, sowohl in eukaryotischen, als auch in prokaryotischen Zellen. Diese ncRNAs sind auch an der post-transkriptionellen Translationsregulation der Prokaryoten beteiligt, indem sie durch einen antisense Mechanismus Basenpaarungen mit der mRNA eingehen. Die Ausbildung dieser Bindung benötigt oft, aber nicht immer, die Hilfe des RNA Chaperons Hfq (siehe unten). Die meisten identifizierten ncRNAs binden dabei in der Nähe der SD-Sequenz und regulieren die Translation, wie auch schon die Proteine, auf der Ebene der Initiation. Dabei wirken auch die ncRNAs, indem sie eine zuvor verborgene SD-Sequenz freilegen und damit die Translation aktivieren, oder indem sie eine zugängliche SD-Sequenz verbergen, entweder durch direkte Basenpaarung oder durch Änderungen der Sekundärstruktur der 5' UTR, und damit die Translation inhibieren (Abb. 1.7).

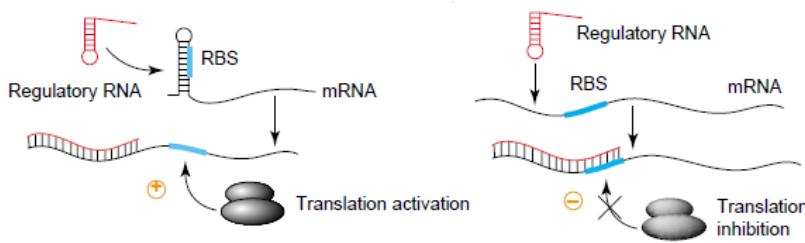


Abb. 1.7: Translationsregulation durch ncRNAs
ncRNAs können aktivierend (links) oder inhibierend (rechts) auf die Translation wirken (verändert nach Romby and Springer, 2003).

Wie auch schon bei den Proteinen, wirken auch die meisten ncRNAs translationsinhibierend. Ein Beispiel für eine positive Regulation, die für diese Arbeit wichtig ist, ist die Interaktion der *glmS* mRNA mit der 207 Nukleotide langen ncRNA GlmZ. Im freien Zustand ist die SD-Sequenz der *glmS* mRNA in einer stabilen Stamm-Schleife Struktur verborgen und die Translation ist inhibiert. Durch die Hfq-abhängige Bindung von 15 Basen der GlmZ ncRNA einige Nukleotide vor der SD-Sequenz wird diese Stamm-Schleife Struktur aufgelöst, die SD-Sequenz freigelegt und somit die Translation aktiviert (Abb. 1.8). Die GlmZ ncRNA besitzt dabei keine eigene SD-Sequenz zur Paarung mit der anti-SD der 5' UTR der *glmS* mRNA, sondern überbrückt diese Region mit einem fünf Nukleotide (Nukleotid 158-162) langen Linker (Urban and Vogel, 2008).

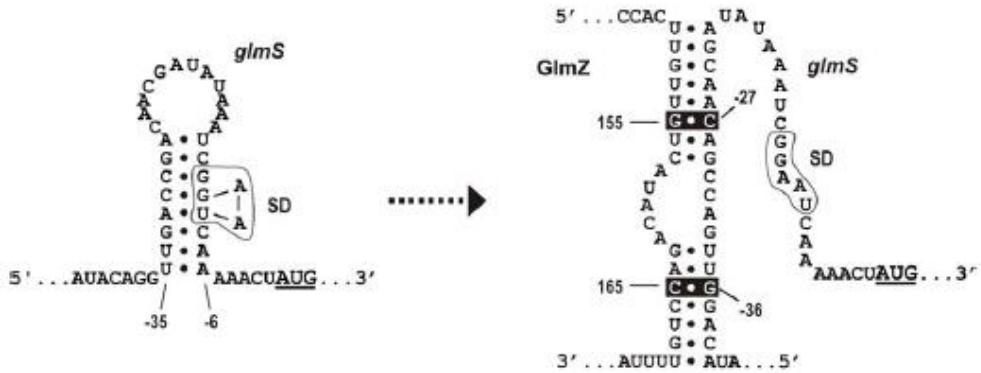


Abb. 1.8: Aktivierung der *glmS* mRNA durch die ncRNA *GlmZ*

Die Hybridisierung der 5' UTR der *glmS* mRNA mit der ncRNA *GlmZ* löst eine Stamm-Schleife Struktur auf und legt die vorher verborgene SD-Sequenz frei, die dann die Initiation der Translation erlaubt (aus Urban and Vogel, 2008).

LMW Effektoren

Auch Moleküle mit geringem Molekulargewicht, wie z.B. Aminosäuren, Nukleotide oder Vitamine, in diesem Zusammenhang oft als LMW Effektoren bezeichnet, können Einfluss auf die Sekundärstruktur der 5' UTR bestimmter mRNAs nehmen und dadurch ihre Translatierbarkeit regulieren (Abb. 1.9). Dabei gibt es Beispiele für positive Regulationen, wie z.B. die Bindung von Adenin an die 5' UTR der *ydhL* mRNA von *Bacillus subtilis* (Mandal and Breaker, 2004), als auch für negative Regulationen, wie z.B. mRNAs der Thiamin-Biosynthese, deren SD-Sequenzen in Anwesenheit von Thiamin in einer Stamm-Schleife Struktur verborgen werden (Miranda-Ríos *et al.*, 2001).

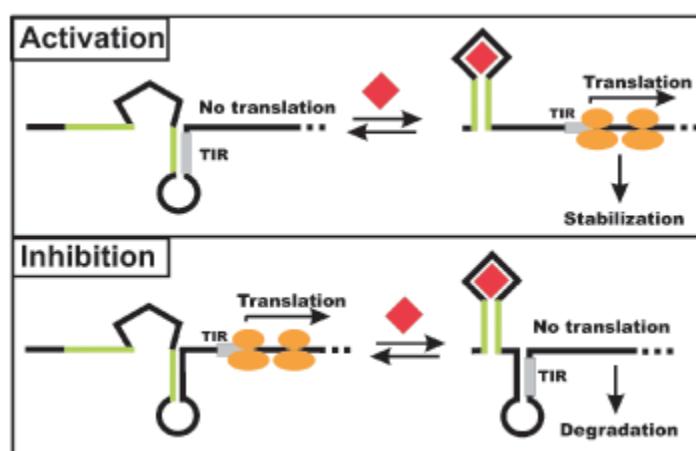


Abb. 1.9: Translationsregulation durch LMW Effektoren

Kleine Moleküle (rotes Karo) können auch die Sekundärstruktur der Translations-Initiations-Region (TIR) von mRNAs beeinflussen und damit ihre Translation regulieren (aus Kaberdin and Bläsi, 2006).

Temperaturveränderungen

Das Gleichgewicht zwischen alternativen RNA Sekundärstrukturen, mit unterschiedlichen thermodynamischen Stabilitäten, ist stark von der Temperatur abhängig. Die 5' UTRs

bestimmter mRNAs können als sog. Thermosensoren fungieren, indem sie bei unterschiedlichen Temperaturen verschiedene Sekundärstrukturen annehmen, die eine Initiation der Translation, wieder meist über die Zugänglichkeit der SD-Sequenz für die 30S Untereinheit, zulassen oder nicht (Abb. 1.10).

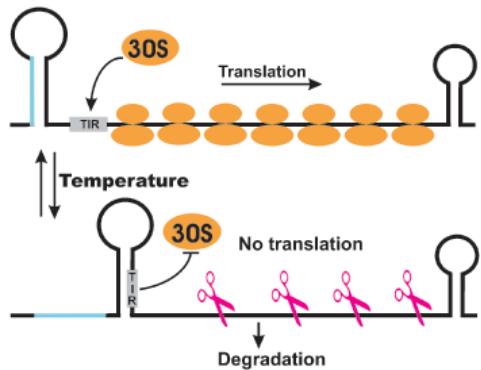


Abb. 1.10: Translationsregulation durch Temperaturveränderungen

Temperaturveränderungen können die Sekundärstruktur der TIR verändern und somit die Translatierbarkeit von mRNAs beeinflussen (aus Kaberdin and Bläsi, 2006).

Viele mRNAs, deren Translation über die Temperatur reguliert wird, codieren für Proteine, die an der Hitze- oder Kälteschockantwort beteiligt sind. Beispielsweise wird die Translation der *rpoH* mRNA, welche für σ 32, eine spezielle Untereinheit der *E. coli* RNA Polymerase codiert, über die Temperatur reguliert. σ 32 ist das wichtigste Hitzeschockprotein in *E. coli* und an der Transkription der Hitzeschockgene beteiligt. Bei 30° C besitzt die *rpoH* mRNA eine stabile Sekundärstruktur, die keine oder kaum Initiationsereignisse zulässt. Bei 42° C, der Hitzeschocktemperatur, dagegen wird diese Sekundärstruktur destabilisiert und die Initiation der Translation vereinfacht (Morita *et al.*, 1999a, b).

Ein anderes Beispiel ist die Translationsregulation des Haupt-Kälteschockproteins CspA aus *E. coli*. Die 160 Nukleotide lange 5' UTR der *cspA* mRNA nimmt bei 37° C eine Sekundärstruktur an, bei der sowohl die SD-Sequenz (Nukleotid 148-151), als auch das Startcodon AUG (Nukleotid 161-163) Basenpaarungen mit einem Bereich weiter vorne (Nukleotid 74-93) in der 5' UTR eingehen. Dadurch werden die Elemente, die wichtig für die Initiation sind, in einer doppelsträngigen Struktur verborgen und die Translation inhibiert (Abb. 1.11). Weiter stabilisiert wird diese Struktur, indem der vordere Bereich der 5' UTR der *cspA* mRNA (Nukleotid 26-70) immer wieder Basenpaarungen mit der codierenden Region (Nukleotid 192-229) eingeht. Bei der Kälteschocktemperatur (10°-20° C) nimmt die *cspA* mRNA eine ganz andere Sekundärstruktur an. Hier bildet der vordere Bereich der 5' UTR (Nukleotid 1-118) eine eigene Sekundärstruktur, ohne Einfluss auf die regulatorischen Elemente. Der hintere Bereich der 5' UTR, sowie der Anfang der codierenden Region (Nukleotid 119-190) liegen relativ unstrukturiert vor und bilden lediglich drei Stamm-Schleife

Strukturen. Der loop der Stamm-Schleife Struktur von Nukleotid 141-155 exponiert die SD-Sequenz und macht sie gut zugänglich für die 30S Untereinheit. Das Startcodon ist im Stamm einer weiteren Stamm-Schleife Struktur (Nukleotid 158-181) verborgen. Diese Helix ist jedoch nicht sehr stabil und kann leicht vom Ribosom aufgeschmolzen werden, so dass die Translation stattfinden kann (Abb. 1.11). Interessant ist, dass die Sekundärstruktur der *cspA* mRNA bei 37° C nicht einfach in die bei 10°-20° C umwandelbar ist, so dass die Temperatur bei der Transkription entscheidend für die Struktur der mRNA ist (Giuliodori *et al.*, 2010).

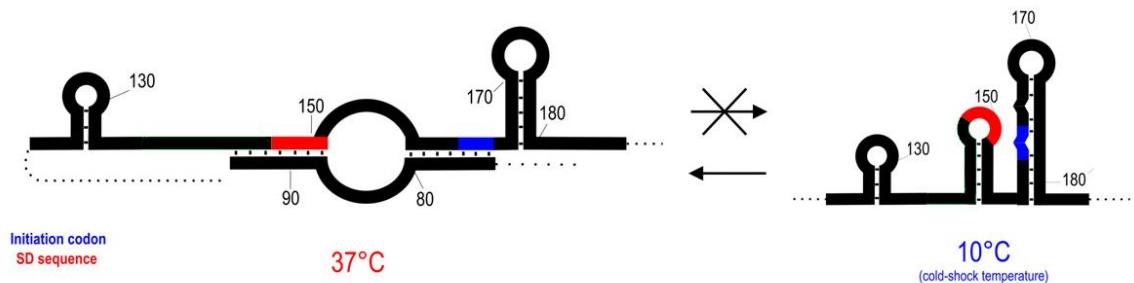


Abb. 1.11: Partielle, schematische Darstellung der Sekundärstruktur der *cspA* mRNA bei 37° C und 10° C
Bei 37° C sind regulatorische Elemente der *cspA* mRNA (SD-Sequenz und Startcodon) in doppelsträngigen Bereichen verborgen und die Initiation der Translation wird erschwert. Bei 10° C sind diese Bereiche für das Ribosom zugänglich (verändert nach Giuliodori *et al.*, 2010).

1.2 Zellfreie Proteinsynthese

Die zellfreie Proteinsynthese (Übersicht in Spirin and Swartz, 2008), die mittlerweile eine echte Alternative zur *in vivo* Expression von Proteinen darstellt, beruht darauf, dass Zellextrakte, die alle Komponenten der Translationsmaschinerie in aktiver Form enthalten, auch ohne die Integrität einer lebenden Zelle die Fähigkeit besitzen, eine mRNA in ihr Proteinprodukt zu translatieren. Im Folgenden sollen zellfreie Proteinsynthesesysteme, sowie einige Anwendungen, näher vorgestellt und die Vor- und Nachteile dieser Methode aufgezeigt werden. Dabei liegt der Fokus besonders auf Systemen, die auf Extrakten von *Escherichia coli* basieren, da diese hauptsächlich für diese Arbeit verwendet wurden. Zuvor werden jedoch einige Meilensteine, die zu der Entwicklung der heutigen, modernen zellfreien Proteinsynthesesysteme geführt haben, kurz aufgezeigt.

1.2.1 Geschichte

Die zellfreie Proteinsynthese (‘cell-free protein synthesis’, CFPS) hat ihren Ursprung in den frühen 50er Jahren, als entdeckt wurde, dass Homogenate aus tierischen Geweben, ohne die

Beteiligung lebender Zellen, in der Lage sind, Aminosäuren in Proteine einzubauen (z.B. Winnick, 1950; Siekevitz, 1952). Kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass auch Lysate bakterieller Zellen noch Proteinsyntheseaktivität besitzen (Gale and Folkes, 1954) und die Ribosomen konnten als Partikel, an denen die Translation abläuft, identifiziert werden (Roberts, 1958). Der nächste Schritt bei der Entwicklung der modernen CFPS Systeme war die Zentrifugation der Zellextrakte, um sie von Zelltrümmern zu befreien, und die Zugabe von Aminosäuren, ATP und GTP (z.B. Keller and Zamecnik, 1956; Tissieres *et al.*, 1960). Diese Systeme waren jedoch nur in der Lage, endogene mRNAs, die bereits in den Extraktten enthalten waren, zu translatieren.

Die Entdeckung, dass *E. coli* Extrakte durch eine einfache Inkubation bei 30-37° C von endogener mRNA befreit werden können, ermöglichte erstmals die Translation exogener RNAs (mRNAs oder synthetische Polyribonukleotide) in einem zellfreien System (Nirenberg and Matthaei, 1961). Basierend auf diesen Experimenten war auch die Entschlüsselung des genetischen Codes möglich. Etwas später konnten exogene mRNAs auch in eukaryotischen Systemen translatiert werden. Vor allem Systeme basierend auf Weizenkeimen oder Retikulocyten von Kaninchen waren vielversprechend. Weizenkeimextrakte z.B. enthalten so geringe Mengen an endogenen mRNAs, dass ohne weitere Behandlung der Extrakte auch exogene mRNAs effizient translatiert werden (z.B. Marcus *et al.*, 1968). Die Extrakte aus Retikulocyten mussten zwar erst von endogenen mRNAs befreit werden, stellten sich aber als sehr produktives System heraus (Pelham and Jackson, 1976). Auch heute noch werden diese drei Systeme, basierend auf Extraktten von *E. coli*, Weizenkeimen und Retikulocyten, am häufigsten verwendet.

Der letzte große Schritt auf dem Weg zu den modernen CFPS Systemen war die Kombination von Transkription und Translation, so dass die sehr viel stabilere und besser handhabbare DNA statt mRNA als template für die Proteinsynthese eingesetzt werden konnte. Durch die kontinuierliche Transkription der DNA wurde die CFPS enorm verbessert, da mRNA in den Extraktten schnell abgebaut wird. Zuerst wurde Transkription und Translation in Extraktten aus *E. coli* kombiniert, wobei die Transkription von der in den Extraktten enthaltenen *E. coli* RNA Polymerase übernommen wurde (z.B. DeVries and Zubay, 1967). Die Verwendung der viel produktiveren viralen RNA Polymerasen, allen voran der T7 RNA Polymerase, in *E. coli* Systemen (Nevin and Pratt, 1991), war schließlich die Grundlage der Kombination von Transkription und Translation auch in eukaryotischen Systemen (Craig *et al.*, 1992).

1.2.2 Zellfreie Proteinsynthese basierend auf *E. coli* Extrakten

Der Zellextrakt ist der wichtigste Bestandteil eines jeden CFPS Systems. Er enthält alle Komponenten der Translationsmaschinerie und seine Herstellung hat großen Einfluss auf die spätere Syntheseleistung. Neben dem Zellextrakt enthalten moderne CFPS Systeme noch viele andere, teilweise für die Aktivität des Systems kritische, Komponenten. Das auf Extrakten von *E. coli* basierende CFPS System ist das produktivste (siehe auch Punkt 1.2.4) und im Folgenden sollen nun sowohl die Herstellung der Zellextrakte näher betrachtet, als auch andere wichtige Bestandteile dieses Systems kurz vorgestellt werden (Übersicht in Spirin and Swartz, 2008).

Herstellung von E. coli S30 Extrakten

Bevor man mit der Präparation eines S30 Extraktes beginnen kann, muss zuerst der richtige *E. coli* Stamm ausgewählt werden. Ein häufig verwendeter Stamm, der durch genetische Modifikationen für die CFPS optimiert wurde, ist *E. coli* K-12 A19. Durch Deletionen einiger Gene werden bei diesem Stamm bestimmte Aminosäuren (Michel-Reydellet *et al.*, 2004; Calhoun and Swartz, 2006) oder lineare DNA (Michel-Reydellet *et al.*, 2005) in den Extrakten stabilisiert und dadurch die Ausbeute der CFPS Reaktion gesteigert. Andere, häufig verwendete Stämme aus denen sehr aktive Extrakte gewonnen werden können, sind die kommerziell erhältlichen, auf *E. coli* BL21 basierenden Stämme. Diesen fehlt sowohl eine zytoplasmatische als auch eine extrazelluläre Protease, wodurch synthetisierte Proteine stabilisiert werden. Häufig verfügen diese Stämme auch über ein DE3 Element in ihrem Genom, das für eine durch Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induzierbare T7 RNA Polymerase codiert und somit deren spätere Zugabe überflüssig macht. Beispielsweise trägt der RosettaTM Stamm (Novagen) das pRARE Plasmid, welches für einige tRNAs codiert, die in *E. coli* selten sind und somit die Expression vor allem eukaryotischer Proteine verbessern kann (z.B. Chumpolkulwong *et al.*, 2006). Ein anderes Beispiel ist der Stamm BL21 StarTM (DE3) (Invitrogen), bei dem die RNase E ausgeschaltet wurde, was zu einer Stabilisierung der mRNA und somit zu einer höheren Ausbeute, vor allem wenn lineare DNA templates verwendet werden, beiträgt (Jun *et al.*, 2008). Neben diesen gibt es noch viele weitere Stämme mit unterschiedlichen Mutationen für verschiedene Anwendungen, die in der CFPS verwendet werden.

Mittlerweile existieren viele detaillierte Protokolle zur Herstellung der S30 Extrakte (z.B. Kigawa *et al.*, 2004; Kigawa, 2010; Shirokov *et al.*, 2007; Klammt *et al.*, 2007), die fast ausschließlich Modifikationen des Protokolls von Pratt (1984) darstellen. Grundlegend sind

die meisten Protokolle gleich aufgebaut und bestehen aus dem Wachstum einer *E. coli* Kultur, dem Waschen der Zellen, dem Zellaufschluss, einer Zentrifugation bei 30000g (daher der Name S30 Extrakt), der Präinkubation gefolgt von einer Dialyse und eventuell dem Aufkonzentrieren der Extrakte, wobei jeder Schritt bereits auf seine Auswirkungen auf die Produktivität der Extrakte untersucht wurde (Liu *et al.*, 2005).

Für die Herstellung von *E. coli* S30 Extrakten werden schnell wachsende Kulturen benötigt, die eine hohe Proteinsyntheseleistung aufweisen. Um dies zu erreichen werden reiche Nährmedien verwendet und die Kulturen meistens bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Es haben sich aber auch andere Inkubationstemperaturen als förderlich für die CFPS herausgestellt. Beispielsweise führen niedrigere Inkubationstemperaturen zu Extrakten, in denen der Abbau gerade von linearer DNA reduziert ist und dadurch die Ausbeute an synthetisiertem Protein erhöht wird (Seki *et al.*, 2008). Ausreichende Belüftung der Kultur wird durch ein kleines Verhältnis von Kultur-/Kolbenvolumen (etwa 1:4) erreicht. Entscheidend ist die Ernte der Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase, da hier die Proteinsyntheseleistung am höchsten ist (z.B. Kigawa *et al.*, 2004). Zu dicht gewachsene Kulturen ergeben unproduktive Extrakte, da in der stationären Phase die Ribosomen durch Dimerisierung inaktiviert werden (Übersicht dazu in Wilson and Nierhaus, 2007). Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit den optimalen Wachstumsbedingungen, wobei z.B. der Zusatz von Phosphat und Glukose zum Nährmedium die Phosphataseaktivität der Extrakte senken und dadurch die Produktivität steigern soll (Kim and Choi, 2000).

Vor der Zellernte werden die Kulturen in der Regel so schnell wie möglich auf $\leq 10^{\circ}$ C abgekühlt, um sie in ihrem Wachstum zu arretieren und ein Erreichen der späten logarithmischen oder sogar der stationären Wachstumsphase zu verhindern. Auf die Zellernte folgt ein intensives Waschen der Zellen, wonach die Zellen entweder eingefroren (z.B. Shirokov *et al.*, 2007), oder sofort weiterverarbeitet werden (z.B. Klammt *et al.*, 2007).

Aufgeschlossen werden die *E. coli* Zellen in der Regel mit einer ‚French press‘ (z.B. Klammt *et al.*, 2007). Alternativ dazu werden auch ‚Multi Beads Shocker‘ (z.B. Kigawa *et al.*, 2004), die normalerweise für den Aufschluss von Hefen verwendet werden, oder Ultraschall eingesetzt. Die Sonifikation als Methode für den Zellaufschluss ist umstritten, manche Autoren sehen sie als echte Alternative (z.B. Sitaraman and Chatterjee, 2009), andere als ungeeignet, da dabei die Ribosomen beschädigt werden und sich die Extrakte zu stark erwärmen (z.B. Shirokov *et al.*, 2007; Kigawa *et al.*, 2004).

Anschließend werden die Lysate bei 30000g zentrifugiert. Dies entfernt Zelltrümmer und andere unlösliche Bestandteile, sowie die genomische DNA aus den Extrakten, die nun als S30 Extrakte bezeichnet werden und die, u.a., die komplette Translationsmaschinerie beinhalten. Von endogenen mRNAs befreit werden die Extrakte durch einen als Präinkubation bezeichneten Schritt. Meistens werden die Extrakte, nachdem ihnen Energie in Form von ATP und GTP, sowie Aminosäuren zugesetzt wurden, für 80 min bei 37° C inkubiert (z.B. Kigawa *et al.*, 2004; Shirokov *et al.*, 2007). Dadurch sollen die endogenen mRNAs degradiert werden. Ribosomen, die gerade mit endogenen mRNAs assoziiert sind, können diese zu Ende translatieren und stehen somit später für die Translation exogener mRNAs zur Verfügung. Eine alternative Methode mit dem gleichen Effekt ist die Inkubation der S30 Extrakte in Anwesenheit erhöhter NaCl Konzentrationen bei 42° C (Klammt *et al.*, 2007).

An die Präinkubation schließt sich noch eine Dialyse an, bei der die Aktivität der Extrakte durch die Entfernung von niedermolekularen Nebenprodukten der Proteinsynthese gesteigert wird. Abschließend werden die Extrakte noch einmal durch eine Zentrifugation geklärt und eventuell, je nach Proteinkonzentration, aufkonzentriert (z.B. Kim *et al.*, 1996; Klammt *et al.*, 2007). Die fertigen S30 Extrakte sind zwar sehr empfindlich, können aber direkt in flüssigem N₂ oder bei -80° C mehrere Wochen bis Monate gelagert werden.

Neben dem hier vorgestellten CFPS System, basierend auf *E. coli* S30 Extrakten, gibt es noch ein weiteres, ähnlich produktives System, das auf *E. coli* S12 Extrakten, die also bei 12000g statt bei 30000g zentrifugiert wurden, basiert (Kim *et al.*, 2006a). Dieses System wurde jedoch, trotz vereinfachter Herstellung der Extrakte, kaum von anderen Autoren übernommen und am öftesten werden die *E. coli* S30 Systeme verwendet.

Energieregenerationssysteme

Die Translation ist ein sehr energieaufwendiger Prozess, der zugesetztes ATP sehr schnell verbraucht. Zusätzlich enthalten die *E. coli* Extrakte auch viele Proteine, die ATP hydrolysieren und nicht mit der Translationsmaschinerie in Verbindung stehen. Aus diesem Grund werden CFPS Systemen immer auch Enzyme und Substrate zugesetzt, mit deren Hilfe ATP regeneriert werden kann (Übersichten in Kim and Kim, 2009; Calhoun and Swartz, 2007).

Klassische Energieregenerationssysteme bestehen aus Verbindungen mit energiereichen Phosphatbindungen und Kinasen, die diese Phosphate auf ADP übertragen, um ATP zu regenerieren (Abb. 1.12). Beispiele hierfür sind u.a. das System aus Phosphoenolpyruvat und

der Pyruvatkinase, oder das aus Creatinphosphat und der Creatinkinase. Die Wahl der Energiequelle kann hierbei Auswirkungen auf die Entstehung von Nebenprodukten bei der Proteinsynthese haben. Beispielsweise können hohe Konzentrationen von Creatinphosphat verhindern, dass bestimmte Stopcodons überlesen werden, was zur Entstehung eines Proteinproduktes höheren Molekulargewichtes führen kann (Ahn *et al.*, 2005). Ein anderes Problem der klassischen Energieregenerationssysteme ist die Akkumulation von anorganischem Phosphat, das inhibitorisch auf die Proteinsynthese wirkt (siehe unten).

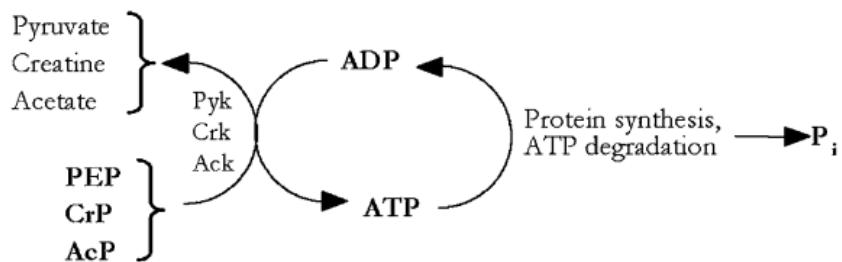


Abb. 1.12: Klassische Energieregenerationssysteme

(PEP: Phosphoenolpyruvat; CrP: Creatinphosphat; AcP: Acetylphosphat; Pyk: Pyruvatkinase; Crk: Creatinkinase; Ack: Acetatkina- se; aus Calhoun and Swartz, 2007).

Modernere Energieregenerationssysteme, die aber nicht zwangsläufig zu höheren Proteinausbeuten führen (vgl. z.B. Kigawa *et al.*, 2004 und Calhoun and Swartz, 2007), bestehen meist aus mehrstufigen enzymatischen Reaktionen und der Aktivierung ganzer Stoffwechselwege, wobei oft endogene Enzyme ausgenutzt und die Akkumulation von anorganischem Phosphat verhindert werden. Ein Beispiel der Energieregeneration durch mehrstufige enzymatische Reaktionen ist das Pyruvatoxidasesystem. Hier werden den CFPS Reaktionen Pyruvat und eine Pyruvatoxidase zugesetzt. Die Pyruvatoxidase katalysiert die Bildung von Acetylphosphat aus Pyruvat und anorganischem Phosphat, so dass in einer Reaktion sowohl eine Verbindung mit einer energiereichen Phosphatbindung entsteht, die von der endogenen Acetatkina- se zur Regeneration von ATP verwendet werden kann, als auch die Akkumulation von anorganischem Phosphat verhindert wird (Abb. 1.13; Kim and Swartz, 1999). Eine Weiterentwicklung dieses Systems stellt das PANOX System dar, im dem zusätzliches Acetylphosphat durch die Aktivierung zweier endogener Enzyme gebildet wird. Die Pyruvatdehydrogenase katalysiert, nach Zugabe ihrer Cofaktoren NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) und CoA (Coenzym A), die Kondensation von Pyruvat mit CoA zum Acetyl-CoA, das wiederum durch eine Phosphotransacetylase in Acetylphosphat umgewandelt wird. Dadurch, dass im PANOX System Phosphoenolpyruvat statt Pyruvat eingesetzt wird, erschließt sich noch eine weitere Quelle der ATP-Regeneration, bei der

Umwandlung von Phosphoenolpyruvat in Pyruvat durch die Pyruvatkinase (Kim and Swartz, 2001).

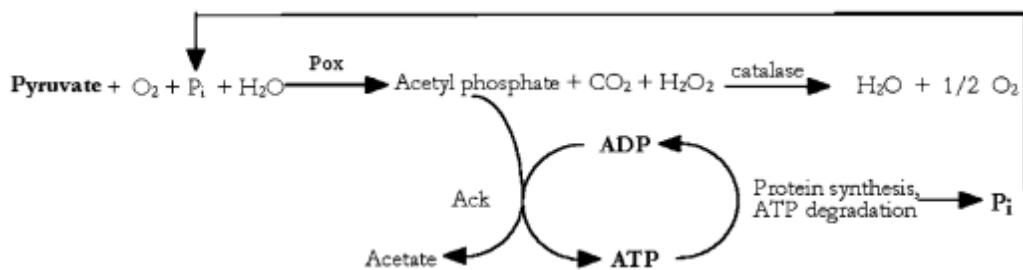


Abb. 1.13: Das Pyruvatoxidasesystem

(Pox: Pyruvatoxidase; Ack: Acetatkinasen; aus Calhoun and Swartz, 2007)

Mittlerweile werden so gut wie alle Zwischenprodukte der Glykolyse zur Energieregeneration genutzt, wobei vor allem Fructose-1-6-Bisphosphat (Kim *et al.*, 2007a) und Glukose (Calhoun and Swartz, 2005) kostengünstige und effiziente Alternativen zu Pyruvat bzw. Phosphoenolpyruvat darstellen. Auch die Kombination zweier Energieregenerationssysteme, z.B. aus Creatinphosphat/Creatinkinase-System und dem Glukose-System, hat sich als förderlich für CFPS Reaktionen herausgestellt (Kim *et al.*, 2007b).

Magnesiumionen und anorganisches Phosphat

Magnesiumionen sind, neben dem S30 Extrakt und dem Energieregenerationssystem, der dritte wichtige Faktor mit großem Einfluss auf die Produktivität einer CFPS Reaktion. Magnesiumionen werden hier für fast alle biochemischen Vorgänge benötigt an denen Nukleotide beteiligt sind, da die meisten Enzyme nur Komplexe aus Nukleotid und Magnesiumion erkennen. Die Anhäufung von anorganischem Phosphat, verursacht durch die klassischen Energieregenerationssysteme, kann ein Problem bei CFPS Reaktionen werden, da das Phosphat mit dem Magnesium Komplexe bildet. Dadurch wird die Magnesiumkonzentration, die der CFPS zur Verfügung steht, verringert, was zur Verlangsamung und schließlich zum Stillstand der Reaktion führt (Kim *et al.*, 2006b). Die Konzentration an Magnesiumionen hat sogar so großen Einfluss auf die Produktivität des Systems, dass einige Autoren diese für jeden hergestellten S30 Extrakt neu optimieren (z.B. Kigawa *et al.*, 2004; Kigawa, 2010).

Andere Faktoren

CFPS Reaktionen enthalten, neben den bereits genannten, noch viele weitere Komponenten, die für den Erfolg der Reaktion kritisch sind. Für die Transkription werden neben einer RNA Polymerase und dem DNA template auch die Nukleotide ATP, GTP, CTP und UTP benötigt. Die Transkription kann zwar auch von der endogenen *E. coli* RNA Polymerase übernommen werden, meist wird jedoch die effizientere T7 RNA Polymerase verwendet. Bei der Verwendung viraler RNA Polymerasen wird oft die endogene *E. coli* RNA Polymerase durch Rifampicin inhibiert, um die Bildung von Nebenprodukten zu verhindern. Das DNA template kann als Plasmid oder lineares PCR Produkt eingesetzt werden, wobei die Reinheit der verwendeten DNA großen Einfluss auf die Produktivität des Systems hat. Präparationen von Plasmid DNA können z.B. eine der Hauptquellen für Kontaminationen des Systems mit RNasen sein, auf die es sehr empfindlich mit reduzierten Proteinausbeuten reagiert (z.B. Kigawa *et al.*, 2004). Die Nukleotide dienen nicht nur als Substrate für die RNA Polymerase, sondern ATP und GTP liefern gleichzeitig die nötige Energie für die Translation und andere Reaktionen.

Substrate für die Proteinsynthese stellen Aminoacyl-tRNAs dar. Diese Bausteine werden von den Aminoacyl-tRNA Synthetasen in den S30 Extrakten unter ATP Verbrauch synthetisiert und es werden lediglich tRNAs und Aminosäuren zugegeben. Um die Bildung der formylierten Initiator-tRNA zu fördern, enthalten CFPS Reaktionen auch oft Zwischenprodukte aus dem Folat-Stoffwechsel, die für diese Reaktion benötigt werden.

Daneben beinhalten CFPS Reaktionen auch noch weitere Komponenten, wie z.B. ein Puffersystem, das meist auf HEPES basiert, oder Salze. Kalium- und Ammoniumacetat werden oft zusammen mit hohen Konzentrationen von Kaliumglutamat verwendet, da die Glutaminsäure in den S30 Extrakten schnell abgebaut wird. Außerdem werden häufig Nukleotide und RNAs in den Reaktionen durch die Zugabe von Polyethylenglycol (PEG) und RNase-Inhibitoren stabilisiert. Um die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern und das reduzierte Milieu aufrechtzuerhalten, das auch normalerweise in *E. coli* herrscht, wird meistens Dithiothreitol (DTT) in den Reaktionen verwendet (z.B. Kim *et al.*, 1996; Kigawa *et al.*, 2004).

1.2.3 Apparative Durchführung der zellfreien Proteinsynthese

CFPS Reaktionen werden in der Regel in vier verschiedenen Formaten durchgeführt. Bei der Wahl des geeigneten Formats ist nicht die Herkunft des verwendeten Zellextraktes entscheidend, sondern die benötigte Proteinausbeute. In den letzten Jahren wurden vier grundlegende Reaktionsmodi entwickelt, das Batch-Verfahren, das CFCF (‘continuous flow cell-free’), das CECF (‘continuous exchange cell-free’) und eine relativ neue Methode, bei der ein zweischichtiges System (Bilayer) ohne Membranen verwendet wird (Abb. 1.14; Übersichten in Katzen *et al.*, 2005; Spirin and Swartz, 2008; Spirin, 2004).

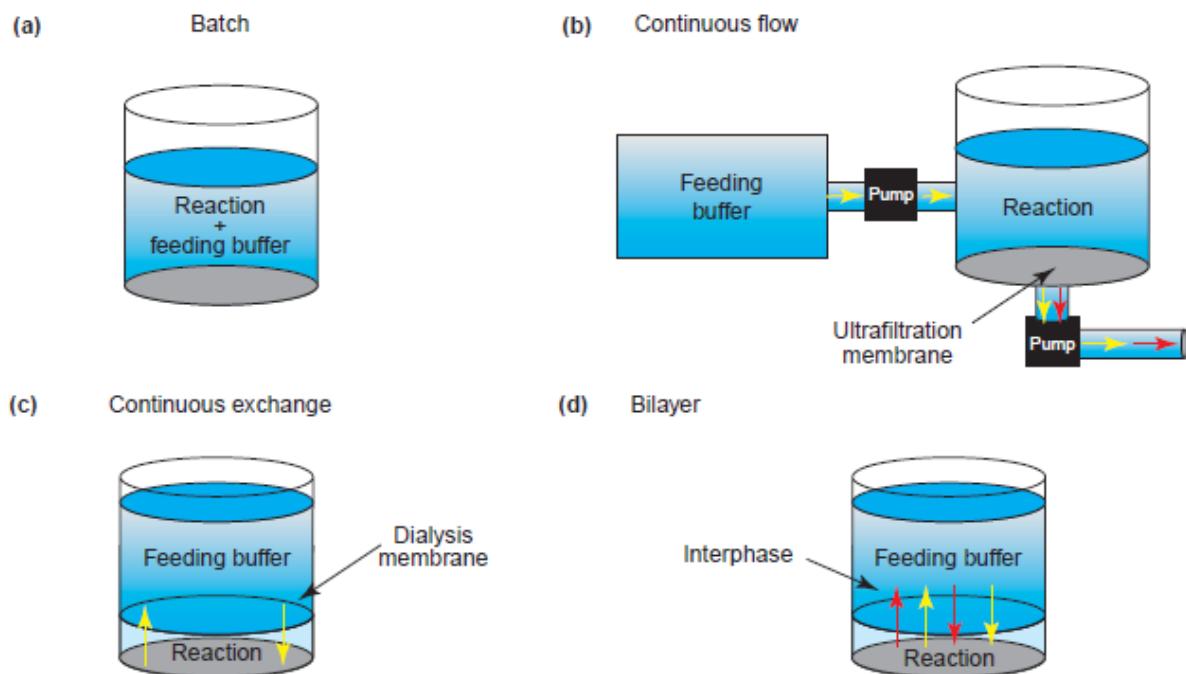


Abb. 1.14: Formate der CFPS

(a) Batch-Verfahren, (b) CFCF, (c) CECF, (d) Bilayer (aus Katzen *et al.*, 2005).

Das am häufigsten verwendete Format ist das Batch-Verfahren, da diese Methode am einfachsten durchzuführen ist und den geringsten apparativen Aufwand benötigt. Hier werden lediglich alle Komponenten einer CFPS Reaktion in ein Reaktionsgefäß gegeben und dieses bei der entsprechenden Temperatur für eine bestimmte Zeit inkubiert. Die Proteinausbeute im Batch-Verfahren ist relativ gering, da die zugefügte Energie in Form von ATP, trotz der Verwendung von Energieregenerationssystemen, recht schnell verbraucht ist und sich inhibitorische Nebenprodukte der Proteinsynthese ansammeln, wie beispielsweise anorganisches Phosphat (Kim *et al.*, 2006b). Dieser Effekt tritt sogar ohne aktiv ablaufende

Proteinsynthese auf und CFPS Reaktionen im Batch-Verfahren kommen in der Regel nach 20-60 min zum Stillstand, obwohl viele Anstrengungen unternommen werden, diese Reaktionen zu verlängern (z.B. Kim and Swartz, 1999; Kim *et al.*, 2007b). Ein weiterer Nachteil ist die abnehmende Proteinausbeute bei steigendem Volumen der CFPS Reaktion. Dies ist vor allem auf die schlechtere Durchlüftung der Reaktion bei höheren Volumen zurückzuführen. Auch scheint sich eine möglichst große Kontaktfläche zwischen Reaktionslösung und der hydrophoben Oberfläche des Reaktionsgefäßes positiv auf die Proteinsynthese auszuwirken (Voloshin and Swartz, 2008). Trotzdem ist das Batch-Verfahren unverzichtbar und wird meist bei der Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen oder bei anderen Testexpressionen verwendet, bei denen das System verbessert werden soll (z.B. Pedersen *et al.*, 2010).

Das CFCF-Verfahren war die erste apparative Neuerung, mit der die Reaktionszeit der CFPS auf etwa 20 h verlängert und die Proteinausbeute enorm gesteigert werden konnte. Hier wird eine normale CFPS Reaktion, wie sie auch bei den Batch-Ansätzen verwendet wird, kontinuierlich über eine Pumpe mit frischer Nährlösung versorgt, die u.a. die Substrate der Reaktion, Nukleotide und Aminosäuren, enthält. Gleichzeitig wird das Reaktionsvolumen konstant gehalten, indem mit einer zweiten Pumpe wieder Flüssigkeit aus den Ansätzen abgesaugt wird, die mit Hilfe einer proteinundurchlässigen Membran gefiltert wird. Kleine Substrate der Proteinsynthese oder anorganisches Phosphat können diese Membran jedoch passieren. Auf diese Weise wird die Reaktion kontinuierlich mit Substraten und Energie für die Transkription und Translation versorgt, und inhibitorische Nebenprodukte der Proteinsynthese werden entfernt (Spirin *et al.*, 1988). Das CFCF-Verfahren konnte sich jedoch aufgrund des apparativen Aufwandes und der unpraktischen Handhabung kaum durchsetzen.

Eine ähnliche Methode, die sehr weit verbreitet ist, ist das CECF-Verfahren. Hier wird die Reaktionslösung gegen eine Nährlösung dialysiert. Die Dialysemembran ist undurchlässig für Proteine und nur kleine Verbindungen können passieren. Auf diese Weise wird die Reaktionszeit auch hier, wie schon beim CFCF, durch die kontinuierliche Versorgung mit Substraten und die Verdünnung inhibitorischer Nebenprodukte auf 14 h und mehr verlängert (Kim and Choi, 1996). Mit modernen CECF Systemen kann die Proteinausbeute, im Vergleich zum Batchverfahren, verzehnfacht werden (z.B. Kigawa *et al.*, 2004). Seit seiner Einführung wurde das CECF Format für die unterschiedlichsten Anwendungen modifiziert,

wobei viele Entwicklungen eine Automatisierung von CECF Reaktionen mit hohem Durchsatz ermöglichen sollen (z.B. Mei *et al.*, 2010).

Das letzte Reaktionsformat, das hier vorgestellt werden soll, basiert auf dem gleichen Prinzip wie das CECF-Verfahren und wird als sog. Bilayer bezeichnet. Der einzige Unterschied zum CECF besteht darin, dass der Austausch von Substraten und Nebenprodukten zwischen Nähr- und Reaktionslösung nicht durch eine Dialysemembran erfolgt, sondern dass die Reaktionslösung direkt mit der Nährlösung überschichtet wird, so dass ein Austausch durch Diffusion stattfinden kann (Sawasaki *et al.*, 2002a).

1.2.4 Haupteigenschaften der wichtigsten zellfreien Systeme

Obwohl der Fokus dieser Arbeit auf CFPS Systemen liegt, die auf *E. coli* Extrakten basieren, existieren noch viele weitere, ebenso bedeutende Systeme, in denen die Extrakte vor allem eukaryotischer Organismen verwendet werden. Zu den wichtigsten gehören hier die CFPS Systeme aus Weizenkeimen, Retikulocyten und Insektenzellen. Zusätzlich existiert noch ein weiteres *E. coli* CFPS System, das nicht auf S30 Extrakten beruht, sondern bei dem die Translationsmaschinerie rekonstituiert wurde, das sog. PURE (‘protein synthesis using recombinant elements’) System (Übersicht in Spirin and Swartz, 2008; Madono *et al.*, 2010; Ueda, 2008).

Wie bereits erwähnt ist das auf *E. coli* S30 Extrakten basierende System das produktivste. Im Batch-Verfahren kann dieses System in einer Stunde bis zu 800 µg eines Testproteins pro ml Reaktionslösung synthetisieren. Wird die Magnesiumkonzentration während der Reaktion kontrolliert, sind sogar bis zu 1,3 mg/ml in 2 h möglich. Im CECF Format, bei Inkubation über Nacht, werden in etwa Mengen bis knapp 10 mg/ml erreicht (z.B. Kigawa *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006b). Es gibt zwar Berichte, in denen ähnliche Mengen an Protein, ebenfalls im CECF-Verfahren, mit Weizenkeimextrakten erzielt wurden, jedoch dauerte hier die Reaktion 14 Tage und alle 48 h musste sie mit frischer Nährlösung und mRNA versorgt werden (Sawasaki *et al.*, 2002b). Im Allgemeinen ist die Proteinausbeute in eukaryotischen Systemen um ein Vielfaches geringer als in den *E. coli* S30 Systemen, wie der Vergleich eines kommerziellen Herstellers verdeutlicht, der sowohl pro- als auch eukaryotische Systeme anbietet (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Vergleich kommerziell erhältlicher CFPS Systeme im Batch-Verfahren

CFPS System basierend auf	Maximale Ausbeute*
<i>E. coli</i> S30 Extrakt	500 µg/ml
Insektenzellen	75 µg/ml
Weizenkeimen	100 µg/ml
Kaninchen Retikulozyten	6 µg/ml

(*Herstellerangaben; Daten von www.promega.com

Trotz der geringeren Syntheseleistung bietet die langsamere eukaryotische Translationsmaschinerie aber auch viele Eigenschaften, die, vor allem für die korrekte Faltung von großen, aus mehreren Domänen bestehenden, eukaryotischen Proteinen, von Vorteil sein können. Auch finden in eukaryotischen Systemen post-transkriptionale Modifikationen, wie z.B. Glykosylierungen, noch ganz oder teilweise statt, die oft an eukaryotischen Proteinen gefunden werden und manchmal für deren Aktivität entscheidend sind. Mittlerweile werden auch schon erfolgreich sog. Hybrid CFPS Systeme verwendet, bei denen kombinierte Extrakte unterschiedlicher Organismen eingesetzt werden, um beispielsweise die hohe Syntheseleistung von *E. coli* Extrakten mit den positiven Protein-Faltungseigenschaften von Weizenkeimextrakten zu verbinden (Zárate *et al.*, 2010).

Neben den CFPS Systemen, die auf Zellextrakten beruhen, hat sich ein weiterer Ansatz der CFPS als vielversprechend herausgestellt, das PURE System. Hier wird die komplette *E. coli* Translationsmaschinerie aus aufgereinigten Komponenten rekonstituiert. Neben isolierten *E. coli* Ribosomen enthält das System nur die Translationsfaktoren und Aminoacyl-tRNA Synthetasen, sowie die Methionyl-tRNA Formyltransferase (MTF) und einige Enzyme zur Energieregeneration. Alle enthaltenen Proteine (außer den ribosomalen) sind rekombinant hergestellt und zudem mit einem His₆-tag versehen, was die Aufreinigung des synthetisierten Proteins stark vereinfacht. Im Batch-Verfahren kann dieses System laut Hersteller (New England Biolabs) bis zu 200 µg/ml Protein synthetisieren. Ein großer Vorteil der PURE Technologie sind die definierten Bedingungen, unter denen die Translation hier stattfindet. Extrakt-basierte Systeme enthalten neben der Translationsmaschinerie noch viele weitere Proteine, von denen viele gar nicht mit der Proteinsynthese in Verbindung stehen, oder die Reaktion sogar stören können. Die Rekonstitution der *E. coli* Translationsmaschinerie im PURE System demonstriert auch, dass das Wissen um den Vorgang der Translation bei *E. coli* bereits sehr weit fortgeschritten ist (Shimizu *et al.*, 2001, 2005; Shimizu and Ueda, 2010).

Zu den hier kurz angesprochenen CFPS Systemen kommen noch viele weitere, u.a. aus menschlichen Zellen (z.B. Mikami *et al.*, 2010), Xenopus Oozyten (z.B. Pratt and Mowry,

2010), *Dictyostelium discoideum* (Sonnemann *et al.*, 1993) oder hyperthermophilen Archaeen (Endoh *et al.*, 2006), auf die aber nicht weiter eingegangen werden soll.

1.2.5 Anwendungsgebiete der zellfreien Proteinsynthese

Früher war die CFPS fast ausschließlich eine Methode, um die Mechanismen der Translation aufzuklären. Heute, nachdem die Proteinsynthese anhand exogener Nachrichten möglich wurde und die Syntheseaktivität enorm gesteigert werden konnte, haben sich viele Anwendungen entwickelt. Diese machen sich alle die Hauptvorteile der CFPS zunutze, nämlich den Einsatz von PCR Fragmenten als DNA template, die Abwesenheit der Physiologie einer lebenden Zelle und die Offenheit des Systems, die die Zugabe aller möglicher Substanzen zu den Translationsreaktionen erlaubt (Übersichten in Jackson *et al.*, 2004; Katzen *et al.*, 2005; He, 2008).

Schwer exprimierbare Proteine

Viele Proteine lassen sich *in vivo* nur sehr schwer oder gar nicht exprimieren. Sie werden nur in geringen Mengen synthetisiert oder in Einschlussskörperchen verpackt, sind falsch gefaltet, aggregieren und Bilden unlösliche Präzipitate oder wirken zytotoxisch. Die Möglichkeiten, die Expression solch eines Proteins z.B. in *E. coli* zu verbessern, sind begrenzt. Die Offenheit von CFPS Systemen, verursacht durch das Fehlen von Membranen, erlaubt weitreichende Manipulationen der Translationsreaktion, um die Expression problematischer Proteine zu verbessern.

Die wichtigste Gruppe der schwer exprimierbaren Proteine, deren Herstellung durch die CFPS enorm verbessert wurde, sind die Membranproteine, die etwa ein Drittel des proteincodierenden Anteils nahezu aller bekannten Genome ausmachen und oft Angriffspunkte für Medikamente sind. Durch ihre Hydrophobizität sind sie meist schlecht löslich und bilden bei Expression in *E. coli* oft unzugängliche Aggregate. Zellfrei ist die Expression von Membranproteinen als zugängliche Aggregate, die wieder in Lösung aufgenommen werden können, oder direkt in löslicher Form möglich. Um Membranproteine löslich zu exprimieren werden den CFPS Reaktionen micellenbildende Detergenzien oder Liposomen zugesetzt, in die die Membranproteine dann, wie *in vivo* auch, hineinsynthetisiert werden und dabei ihre native Konformation annehmen (Abb. 1.15). Mittlerweile existieren zahlreiche Protokolle zur zellfreien Synthese von Membranproteinen (z.B. Schneider *et al.*, 2010) und immer mehr werden erfolgreich hergestellt (z.B. Junge *et al.*, 2010).

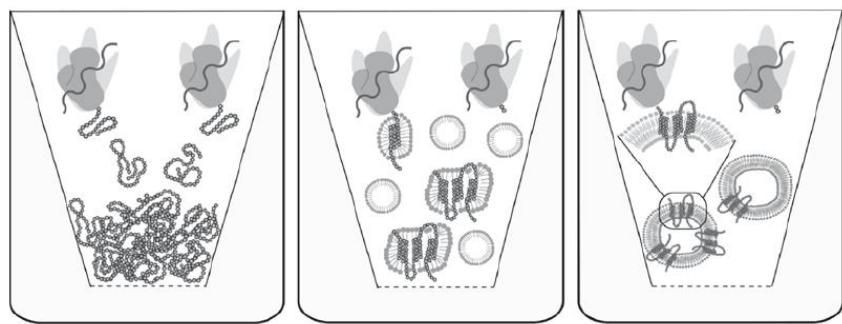


Abb. 1.15: Zellfreie Synthese von Membranproteinen

Links: Synthese als Präzipitat; die aggregierten Membranproteine können nach ihrer Synthese mit geeigneten Puffern resolubilisiert werden; mitte: lösliche Synthese nach Zugabe micellenbildender Detergenzen; rechts: lösliche Synthese nach Zugabe von Liposomen; (aus Schneider *et al.*, 2010).

Eine andere wichtige Gruppe von Proteinen, deren Expression durch die zellfreie Technologie verbessert wurde, sind zytotoxisch wirkende Proteine. Dadurch, dass in CFPS Reaktionen die Integrität von lebenden Zellen aufgehoben wurde, können auch toxische Proteine, solange sie nicht auf den Translationsapparat wirken, synthetisiert werden (z.B. Orth *et al.*, 2010).

Weitere Anwendungen auf dem Gebiet der schwer exprimierbaren Proteine umfassen sowohl die Zugabe von bestimmten Chaperonen, um nativ gefaltete Proteine zu erhalten (z.B. Jiang *et al.*, 2002), die Schaffung des richtigen Milieus für die Bildung von Disulfidbrücken (z.B. Yin and Swartz, 2004), oder die Peptidsynthese (Lee *et al.*, 2010). Bei der Verwendung eukaryotischer Systeme sind außerdem, wie im vorigen Punkt bereits erwähnt, bestimmte post-translationale Modifikationen möglich.

Labeln von Proteinen

Die CFPS hat sich ebenfalls als kostengünstige Alternative beim Labeln von Proteinen mit bestimmten markierten Aminosäuren herausgestellt, was vor allem in der Strukturbioologie eine gängige Methode ist. Durch den exklusiven Einbau in das gewünschte Protein, sind viel kleinere Mengen der oft teuren gelabelten Aminosäuren notwendig als *in vivo* (z.B. Yokoyama *et al.*, 2010). CFPS Systeme haben sich auch beim Einbau von unnatürlichen Aminosäuren, wie z.B. von chlorierten Aminosäureanalogons, in Proteine bewährt (z.B. Stigers *et al.*, 2010).

Hoher Durchsatz und Automatisierung

CFPS Reaktionen eignen sich hervorragend für Automatisierungen, da keine lebenden Zellen mehr beteiligt sind, die z.B. kultiviert und aufgeschlossen werden müssen. Die Möglichkeit, viele Proteine gleichzeitig zu exprimieren, sowie lineare DNA templates zu verwenden, was das enorm zeitaufwendige Klonieren überflüssig macht, könnte den Fortschritt in der Erforschung des Proteoms enorm beschleunigen. Mittlerweile werden ganze DNA Bibliotheken mit Hilfe der CFPS in ihre Proteinprodukte translatiert und auf potentielle Bindungspartner (andere Proteine, DNA, RNA, Liganden usw.) oder auf bestimmte enzymatische Aktivitäten gescreent. Erstmals können auch sog. „protein arrays“, durch die kombinierte Transkription und Translation von DNA „microarrays“, hergestellt werden und ermöglichen die Erforschung ganzer Proteome (z.B. Ramachandran *et al.*, 2008).

In vitro Evolution

Die CFPS ermöglichte erstmals die Evolution bestimmter Eigenschaften von Proteinen *in vitro*. Die bekanntesten Methoden hierzu sind das Ribosomen-Display (Hanes and Plückthun, 1997), das mRNA-Display (Roberts and Szostak, 1997) und die *in vitro* Kompartimentierung (Tawfik and Griffiths, 1998). Allen drei Methoden liegt zugrunde, dass das translatierte Proteinprodukt mit seiner codierenden Nukleotidsequenz, mRNA oder DNA, verbunden bleibt. Fehlerbehaftete PCRs können einen fast endlos großen Pool an codierenden Sequenzen erschaffen, die alle für Variationen eines Proteins mit den unterschiedlichsten Mutationen codieren. Nach der zellfreien Transkription und Translation eines solchen Pools, kann auf Variationen eines Proteins mit einer bestimmten Eigenschaft, z.B. die Bindung an ein anderes Protein, selektiert werden. Dadurch, dass die Proteinprodukte mit ihren codierenden Sequenzen verbunden bleiben, kann nach der Selektion z.B. die mRNA des selektierten Proteins in DNA umgeschrieben und erneut als template für fehlerbehaftete PCRs verwendet werden, wobei der daraus entstehende Pool an codierenden Sequenzen erneut in CFPS Reaktionen eingesetzt und nochmals auf die gleiche Eigenschaft hin selektiert wird. Wird dieser Zyklus noch einige weitere Male wiederholt, wird in jeder Runde die Eigenschaft des Proteins, auf die selektiert wird, bis zu einem gewissen Grad ausgeprägter sein. Die verschiedenen Methoden unterscheiden sich dabei lediglich, wie das zu evolvierende Protein mit seiner codierenden Sequenz in Verbindung bleibt (Abb. 1.16).

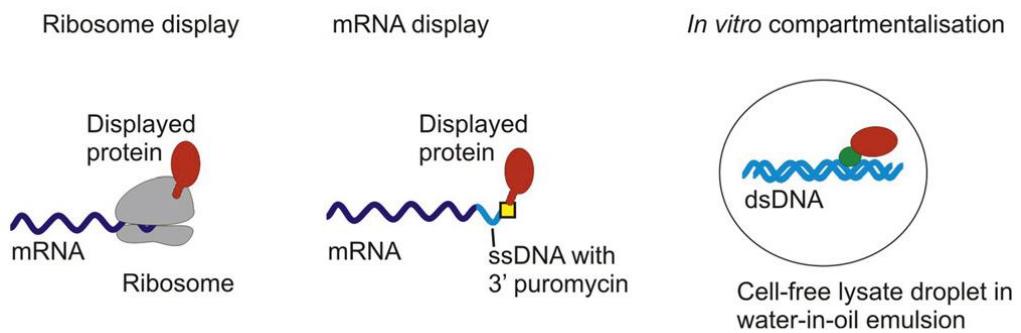


Abb. 1.16: Verschiedene Methoden der in vitro Evolution

Beim Ribosomen-Display entstehen Komplexe aus synthetisiertem Protein, zugehöriger mRNA und Ribosom, auf die selektiert werden kann, indem mRNAs ohne Stopcodons verwendet werden. Beim mRNA-Display wird auf kovalente Verbindungen aus synthetisiertem Protein und zugehöriger mRNA selektiert, die durch die Verwendung modifizierter mRNAs entstehen. Diese mRNAs tragen an ihrem 3' Ende eine kurze, einzelsträngige DNA Sequenz, an die Puromycin gekoppelt ist. Erreicht das Ribosom bei der Translation die Grenze von RNA und DNA hält es an und katalysiert die kovalente Bindung des neu synthetisierten Proteins an das Puromycin seiner mRNA. Bei der *in vitro* Kompartimentierung findet die Transkription und Translation einzelner DNA Moleküle in winzigen Kompartimenten statt (z.B. Wasser in Öl Emulsionen). Proteinprodukte werden dabei an ihre DNA Sequenzen gekoppelt, indem sie als Fusionsproteine mit DNA Bindungsdomänen exprimiert werden. Die Komplexe aus DNA und Protein werden dann für die Selektion verwendet (aus He, 2008).

Im Gegensatz zu den anderen hier vorgestellten Systemen soll das von der GENEART AG entwickelte *in vitro* Evolutionssystem eine kontinuierliche Evolution von hochaffinen Proteinliganden ermöglichen. Dabei soll sowohl die fehlerbehaftete DNA Amplifikation, die Transkription und Translation des Pools an codierenden DNA Sequenzen, als auch die Selektion auf verbesserte Bindungseigenschaften des evolvierten Proteins kontinuierlich in nur einer einzigen Reaktion stattfinden. Grundlage dieses Systems ist eine spezifische und im Gegensatz zur PCR isotherme Amplifikationsmethode, die ‚nucleic acid sequence based amplification‘ (NASBA)-Reaktion. Hier wird ein DNA template mit T7 Promotor von der T7 RNA Polymerase in viele Kopien der entsprechenden mRNA transkribiert. Diese mRNAs können dann, durch den Einsatz eines spezifischen Primers und einer reversen Transkriptase wieder in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden, die wiederum als template für die T7 RNA Polymerase dienen. Auf diese Weise wird das DNA template sowohl amplifiziert, als auch, durch die fehlende ‚Proofreading‘-Aktivität der T7 RNA Polymerase und der reversen Transkriptase, mutiert. Eine Koppelung der NASBA-Reaktion an ein CFPS System sollte somit zur Synthese von vielen Variationen eines gewünschten Proteins führen. In einem solchen System kann eine gerichtete Evolution stattfinden, indem das eingesetzte DNA template für ein Fusionsprotein aus reverser Transkriptase und des zu evolvierenden Proteins Y codiert. Die verwendete T7 RNA Polymerase wird als Fusionsprotein mit dem Bindepartner X eingesetzt, an den die Bindung des zu evolvierenden Proteins Y verbessert

werden soll. Höher affine Variationen von Y reichern sich in einem solchen System an, da sie, aufgrund der räumlichen Nähe, bevorzugt von dem Fusionsprotein aus T7 RNA Polymerase und X an ihre eigene mRNA rekrutiert werden und diese revers transkribieren, wobei die dabei entstehende doppelsträngige DNA wiederum als template für die T7 RNA Polymerase dient (Meysing, 2010; Doktorarbeit).

1.2.6 Chancen und Limitationen

Wie im vorigen Abschnitt bereits erwähnt bietet die CFPS viele Vorteile gegenüber der *in vivo* Expression von Proteinen, woraus sich zahllose neue Anwendungen erschließen. Gerade Reaktionen im Batch-Verfahren sind vielversprechend, da diese einen hohen Durchsatz ermöglichen und leicht automatisierbar sind. Ein Grund, warum die CFPS die *in vivo* Synthese von Proteinen noch nicht als Standardmethode zur Proteinexpression abgelöst hat, ist die immer noch zu geringe Syntheseleistung dieser Systeme, gerade im Batch-Verfahren (Übersicht in Katzen *et al.*, 2005). Zwar gibt es Berichte, dass bereits 1,3 mg/ml an Protein im Batch-Verfahren synthetisiert wurden (Kim *et al.*, 2006b), jedoch handelte es sich dabei um die Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) und das ‚green fluorescent protein‘ (GFP), zwei Proteine die sich bekanntermaßen sehr gut zellfrei synthetisieren lassen und die oft eingesetzt werden, um die Produktivität von CFPS Systemen zu messen (z.B. Kigawa *et al.*, 2004). Ein realistischeres Bild, was moderne CFPS Systeme leisten können, vermittelt eine Studie, in der die zellfreie Expression von 134 *E. coli* Membranproteinen in einem *E. coli* S30 CFPS System im Batch-Verfahren, unter Zugabe von Detergenzien, verglichen wurde. Bei 50 der 134 Proteine konnte keine Expression festgestellt werden, 52 wurden nur in sehr geringen Mengen synthetisiert ($\leq 8 \mu\text{g}/\text{ml}$), 26 erreichten Expressionsraten von 8-25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und nur bei sechs wurden Proteinausbeuten von mehr als 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ermittelt (Schwarz *et al.*, 2010).

Mittlerweile gibt es sehr viele Studien, in denen versucht wird diese Limitation der CFPS auf den verschiedensten Wegen zu überwinden. Viele konzentrieren sich hierbei auf die Herstellung der Extrakte (z.B. Seki *et al.*, 2008), die Verbesserung der Energieregenerationssysteme (z.B. Kim *et al.*, 2007b) oder auf die Optimierung der Expressionsbedingungen (z.B. Pedersen *et al.*, 2010). Ein anderer Schwerpunkt ist die Optimierung der Translatierbarkeit der mRNA. Beispielsweise kann die Expression mancher Proteine gesteigert werden, wenn sie an ihrem N-Terminus ein bestimmtes Signalpeptid tragen (Ahn *et al.*, 2007), wobei sich auch die ersten 10 Codons der CAT als expressionssteigernd herausgestellt haben (Lee *et al.*, 2010). Diese Studien belegen auch, dass

die ersten 25 Nukleotide der codierenden Sequenz einen entscheidenden Einfluss auf die Translatierbarkeit von mRNAs haben, da gerade diese, abhängig von ihrer Sequenz, Sekundärstrukturen mit der 5' UTR ausbilden, die dann eventuell schlechter translatierbar sind. Aus diesem Grund kann auch eine optimierte 5' UTR niemals die Expression aller Proteine steigern (Voges *et al.*, 2004). All diese und viele weitere Versuche haben dazu beigetragen, die Produktivität der CFPS zu verbessern, wobei der große Durchbruch, der die zellfreie Synthese von Proteinen im Batch-Verfahren revolutioniert, noch fehlt.

Eine genaue Analyse der Translationsreaktion in einem *E. coli* CFPS System hat gezeigt, dass fast alle Phasen der Translation *in vitro* langsamer ablaufen als *in vivo*. Beispielsweise läuft die Elongation im zellfreien System etwa 12mal langsamer ab als *in vivo*. Dieser Limitation konnte teilweise durch zusätzliche EFs entgegengewirkt und die Ausbeute im Batch-Verfahren um ca. 20% gesteigert werden. Am auffälligsten ist jedoch die Verlangsamung der Initiation um etwa den Faktor 340 im zellfreien System, der von vielen Autoren auf eine Sekundärstrukturbildung der mRNA zurückgeführt wird (z.B. Spirin and Swartz, 2008; Underwood *et al.*, 2005), welche auch *in vivo* großen Einfluss auf die Translationseffizienz hat (De Smit and van Duin, 1990) und deren Ausbildung in zellfreien *E. coli* Systemen durch die Entkoppelung von Transkription und Translation, da die sehr viel schnelleren viralen RNA Polymerasen verwendet werden, verstärkt ermöglicht wird. Die verringerte Initiationsgeschwindigkeit ist auch dafür mitverantwortlich, dass *in vitro* durchschnittlich jede mRNA mit nur 2-3 Ribosomen besetzt ist, gegenüber durchschnittlich 7 Ribosomen pro mRNA *in vivo*. Zusätzlich ist in der lebenden *E. coli* Zelle auch die Konzentration an Ribosomen mit 42 μM um ein Vielfaches höher als in den zellfreien Ansätzen mit ca. 1,6 μM . Höhere Ribosomenkonzentrationen konnten die Ausbeute der CFPS, obwohl diese aktiv translatierten, nicht verbessern, da dadurch die Elongationsgeschwindigkeit weiter verringert wurde, was letztendlich in einem Gleichbleiben der Proteinausbeute resultierte. Diese und andere Faktoren sind letztendlich dafür verantwortlich, dass die Ausbeute der CFPS des *E. coli* Systems im Batch-Verfahren, sogar bei Synthese eines gut exprimierbaren Testproteins (CAT), etwa 300mal geringer ausfällt, als theoretisch von *E. coli* im gleichen Zeitraum produziert werden könnte (Underwood *et al.*, 2005).

Diese und andere Studien belegen, dass die CFPS noch lange nicht ihre maximale Produktivität erreicht hat. Selbst im CECF-Verfahren sollten noch Steigerungen um mindestens den Faktor 10 möglich sein. Wenn erst einmal die kritischen Faktoren identifiziert sind, die die Syntheseleistung von CFPS Systemen, vor allem im Batch-Verfahren, begrenzen,

sowie auch die Expression schwer synthetisierbarer Proteine deutlich gesteigert werden konnte, wird die CFPS wahrscheinlich zur neuen Standardmethode der Proteinexpression.

1.3 RNA Chaperone – ein Überblick

An der Translation sind, wie an vielen anderen metabolischen Prozessen auch, verschiedene RNAs, wie die tRNAs oder die mRNA, beteiligt, deren Sekundär- und Tertiärstrukturen essentiell für ihre Funktion sind. Die Faltung von RNAs in ihre native Konformation ist jedoch sehr komplex und beinhaltet viele Faltungsintermediate. Dabei können alternative Strukturen thermodynamisch genauso stabil sein, wie die native Konformation der RNA. Der Übergang von einer Konformation in die andere ist bei RNA besonders schwierig, da dabei oft sehr viele geknüpfte Kontakte wieder gelöst und große Bereiche entfaltet werden müssen. *In vitro* Faltungsexperimente von RNA resultieren oft in großen Fraktionen von falsch gefalteter RNA, weshalb die allgemeine Meinung besteht, dass *in vivo* an der RNA-Faltung spezielle Proteine beteiligt sind, die den RNAs bei der Faltung in ihre native Konformation helfen, oder alternative, thermodynamisch stabile Strukturen wieder auflösen. Diese Proteine, im Allgemeinen als RNA Chaperone, bezeichneten wirken dabei nach drei unterschiedlichen Mechanismen, warum manche Autoren sie auch in drei Gruppen klassifizieren. Die eigentlichen RNA Chaperone besitzen meist eine oder mehrere Bindedomänen für einzelsträngige RNA und destabilisieren alternative Sekundärstrukturen nicht durch ATP Hydrolyse, sondern durch transiente Interaktion, was Konformationsübergänge beschleunigt. RNA Chaperone unterscheiden sich von spezifischen RNA bindenden Proteinen dadurch, dass sie sequenzunspezifisch sind und nicht permanent mit der RNA assoziiert bleiben, um die Konformation der RNA aufrecht zu erhalten. RNA Annealer verbessern das Annealing von komplementären RNAs durch einen als ‚molecular crowding‘ bekannten Prozess. Dabei lösen sie auch Sekundärstrukturen in den RNAs auf, um das Annealing zu ermöglichen. Die letzte Gruppe beinhaltet die RNA Helikasen, eine Gruppe von Proteinen die RNAs aktiv durch ATP Hydrolyse entwinden und gebundene Proteine entfernen. Sie sind mit den DNA Helikasen verwandt, zeigen aber, falls überhaupt, eine stark verminderte Prozessivität. Die RNA Helikasen sind oft spezifisch für bestimmte Sequenz- bzw. Strukturmotive von RNAs, was ihre Einteilung in eine eigene Gruppe rechtfertigt, da Chaperone definitionsgemäß unspezifisch sind. Es gibt jedoch auch RNA Helikasen, die RNAs relativ unabhängig von ihrer Sequenz entwinden.

Mittlerweile konnten viele Proteine mit RNA Chaperonaktivität identifiziert werden, wobei die Daten hauptsächlich aus *in vitro* Experimenten stammen, da sich die Untersuchung von RNA Chaperonen *in vivo* schwierig gestaltet. Dabei ist auffällig, dass viele RNA Chaperone bekannte Proteine sind, die eigentlich andere Funktionen in der Zelle übernehmen. Die immer länger werdende Liste von RNA Chaperonen umfasst bis jetzt etwa acht Klassen, wobei eine Klasse davon die Proteine beinhaltet, die keiner der übrigen zugeordnet werden können. Im Folgenden sollen nun die anderen sieben Klassen von RNA Chaperonen bzw. von RNA Chaperonen, Annealern und Helikasen, kurz vorgestellt werden (Übersichten in Rajkowitsch *et al.*, 2007; Russell, 2008).

Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs)

Die hnRNPs sind eine Gruppe von Proteinen, die in eukaryotischen Zellkernen vorkommen und dort an der Biogenese von RNAs beteiligt sind. Die Prozesse, in die hnRNPs involviert sind, reichen vom Spleißen, Verpacken und dem Transport von mRNAs, bis zur Regulation der Genexpression auf Ebene von Transkription und Translation. Beim Menschen wurden bis jetzt etwa 20 hnRNPs charakterisiert, wobei das hnRNP A1 am besten untersucht wurde. Dieses Protein zeigt echte RNA Chaperonaktivität, da es komplementäre RNAs, ohne ATP-Verbrauch, nur durch unspezifische, transiente Interaktionen renaturieren kann (Pontius and Berg, 1990). Darüber hinaus zeigt das hnRNP A1 auch ATP-unabhängige Annealingaktivität von RNAs und DNAs, ermöglicht durch seine Affinität sowohl für RNA, als auch für einzelsträngige DNA (Kumar and Wilson, 1990).

Virale Nukleokapsid (NC)-Proteine

Manche retroviralen NC-Proteine sind ebenfalls echte RNA Chaperone, denen meist eine oder mehrere Zinkfingerdomänen die transienten Interaktionen mit verschiedenen RNAs, oder auch DNA, erlauben, die für ihre Chaperonaktivität verantwortlich sind. Ein gut charakterisiertes Beispiel ist das NC-Protein 7 (NCp7) von HIV-1 (humanes Immundefizienz-Virus-1), das für viele Prozesse der Virenreplikation, wie z.B. der Zerstörung von Sekundärstrukturen in den RNA templates der reversen Transkriptase (Wu *et al.*, 1996), die nötige RNA Chaperonaktivität liefert. Dieses kleine, basische Protein zeigte in einem Versuch, dass es, ähnlich wie das hnRNP A1, sowohl die Dissoziation als auch die Assoziation von doppelsträngigen RNA-Bereichen katalysieren kann, also neben der RNA Chaperon- auch Annealingaktivität besitzt (Herschlag *et al.*, 1994). Auch im Lebenszyklus des Virus wird eine Annealingreaktion von NCp7 katalysiert, nämlich die Hybridisierung des

tRNA Primers mit der viralen genomischen RNA, was zur Initiation der reversen Transkription führt (Feng *et al.*, 1999).

Ribosomale Proteine

Da die ribosomalen Proteine in der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit permanent mit der rRNA assoziiert sind, ist es nicht verwunderlich, dass einige von ihnen unspezifische RNA Bindungs- und RNA Chaperoneigenschaften besitzen. Beispielsweise dem Protein S12 der kleinen ribosomalen Untereinheit, das sich normalerweise in der Nähe der A-Stelle befindet, konnte, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, RNA Chaperonaktivität nachgewiesen werden, die gleichzeitig die stärkste der Proteine der kleinen Untereinheit zu sein scheint (Clodi *et al.*, 1999; Coetzee *et al.*, 1994). Ein anderes Beispiel ist das Protein S1, das größte Protein der kleinen Untereinheit und gleichzeitig das einzige, das nicht permanent mit dieser assoziiert ist. Dieses Protein bindet und rekrutiert bestimmte mRNAs zur kleinen ribosomalen Untereinheit, wobei es Sekundärstrukturen in der Translations-Initiations-Region auflöst und an der Bildung des Initiationskomplexes beteiligt ist (Kolb *et al.*, 1977). Auch etwa ein Drittel der Proteine der großen ribosomalen Untereinheit besitzen RNA Chaperonaktivität (Semrad *et al.*, 2004).

Bakterielle Histon-artige Proteine

Die beiden bakteriellen Proteine H-NS und StpA sind wie ihre eukaryotischen Verwandten, die Histone, an der Strukturgebung und Verpackung der genomischen DNA, und somit auch an der Genregulation beteiligt. Beiden Proteinen konnte eine zusätzliche RNA Chaperonaktivität, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, nachgewiesen werden. StpA zeigt stärkere RNA Chaperonaktivität als H-NS (z.B. Zhang *et al.*, 1996), wobei auch hier, wie bei allen echten RNA Chaperonen, Sekundärstrukturen durch transiente Interaktionen aufgelöst werden. Eine interessante Eigenschaft von StpA ist, dass es stabilere RNA Sekundärstrukturen bevorzugt entwindet, jedoch auf die Auflösung weniger stabiler RNA Sekundärstrukturen inhibitorisch wirken kann (Grossberger *et al.*, 2005). Außerdem, ermöglicht durch die Fähigkeit zu Dimerisieren, kann StpA auch Annealingreaktionen katalysieren, indem es gebundene RNA Stränge in unmittelbare Nähe zueinander bringt (Rajkowitsch and Schroeder, 2007).

Kälteschockproteine (‘cold shock proteins’; Csp)

Da die Faltung von RNAs stark von der Temperatur abhängt und auch die alternativen RNA Sekundärstrukturen gerade bei tiefen Temperaturen besonders stabil sind, haben viele Organismen eine Kälteschockantwort entwickelt, die u.a. die Expression von RNA

Chaperonen umfasst, die die richtige Faltung von RNAs unter diesen Bedingungen gewährleisten sollen. Beispielsweise das Haupt-Csp von *E. coli*, CspA, zeigt echte RNA Chaperonaktivität. Die Bindung an seine eigene *cspA* mRNA kann Sekundärstrukturen in der 5' UTR auflösen und sie somit sensitiver für den Verdau durch RNasen machen. Ohne CspA wird die 5' UTR durch die Ausbildung einer stabilen Struktur vor dem Verdau geschützt (Jiang *et al.*, 1997). Aufgrund ihrer Fähigkeit, Sekundärstrukturen aus mRNAs zu entfernen, wurden auch schon Csps aus meso-, thermo- und hyperthermophilen Bakterien auf ihren Einfluss auf die CFPS getestet, bei der die Sekundärstrukturbildung der mRNA ein limitierender Faktor sein könnte. Jedoch inhibierten alle drei die Synthese eines Testproteins (CAT), wahrscheinlich durch unspezifische Interaktionen mit den verschiedenen Nukleinsäuren (Hofweber *et al.*, 2005).

Das bakterielle Sm-artige Protein Hfq

Sm Proteine werden in allen Eukaryoten und Archaeen gefunden, wo sie als homo- oder heterogener, heptamerer Ring an der Prozessierung von RNAs beteiligt sind. Das Sm-artige Proteine Hfq aus *E. coli*, das *in vivo* an vielen Prozessen beteiligt ist, wird zu den RNA Annealern gezählt, da es RNAs nicht unspezifisch, sondern bevorzugt an A/U-reichen Regionen vor oder nach einer Stamm-Schleife Struktur bindet (Brescia *et al.*, 2003). Hfq vermittelt das Annealing zweier RNAs, indem es als homogener, hexamerer Ring zwei Bindestellen für RNAs bereitstellt und sie so in unmittelbare Nähe bringt. Eine der beiden RNA-Bindestellen scheint dabei spezifisch für mRNAs zu sein (Vecerek *et al.*, 2008), was gut mit einer seiner Hauptaufgaben, nämlich dem Annealing von ncRNAs mit der 5' UTR von mRNAs (z.B. Urban and Vogel, 2008), zusammenpasst. Neben der Funktion als RNA Annealer besitzt Hfq aber auch RNA Chaperonaktivität und kann beispielsweise strukturelle Änderungen in der 5' UTR von bestimmten mRNAs hervorrufen, was deren Translation inhibieren kann (Moll *et al.*, 2003).

RNA Helikasen

RNA Helikasen sind eine Gruppe von RNA-abhängigen ATPasen, die mit den bekannten DNA Helikasen verwandt sind. Diese ubiquitär exprimierten Proteine scheinen an fast allen Konformationsänderungen von RNAs beteiligt zu sein, die ATP benötigen. Im Gegensatz zu ihren Verwandten zeigen sie jedoch, wenn überhaupt, nur geringe Prozessivität. RNA Helikasen werden nicht zu den RNA Chaperonen gezählt, da sie zum einen ATP für das Entwinden von RNAs benötigen, zum anderen meist spezifisch für Sequenz- oder Strukturmotive der RNAs sind, wie z.B. 5'- oder 3'-Überhänge in doppelsträngiger RNA

(Übersicht in Linder, 2000). Es gibt jedoch auch Beispiele für RNA Helikasen, die RNAs relativ unabhängig von ihrer Sequenz entwinden, sowie gebundene Proteine entfernen können. Beispielsweise der eukaryotische Initiationsfaktor 4A (eIF-4A), die RNA Helikase die während der eukaryotischen Translationsinitiation Sekundärstrukturen in der 5' UTR der mRNAs entfernt, erkennt und entwindet doppelsträngige RNA Bereiche aufgrund ihrer Stabilität (Rogers *et al.*, 2001). Ein anderes Beispiel ist Mss116p, eine mitochondriale RNA Helikase von *Saccharomyces cerevisiae*, die an vielen Prozessen der RNA Prozessierung beteiligt ist und ein breites Spektrum von RNAs erkennt (Halls *et al.*, 2007). Mss116p ermöglicht auch die Translation einiger mRNAs bei tieferen Temperaturen, indem es Sekundärstrukturen auflöst und somit die Interaktion mit dem Ribosom ermöglicht (Huang *et al.*, 2005). Darüber hinaus zeigt Mss116p auch eine ATP unabhängige Katalyse von Annealingreaktionen, die durch die Anwesenheit von ADP verstärkt wird (Halls *et al.*, 2007).

1.4 Ziele der Arbeit

Die CFPS ist eine alternative Methode zur *in vivo* Expression von Proteinen, die viele Vorteile, wie die Verwendung von linearen DNA templates, die Abwesenheit der Physiologie einer lebenden Zelle, oder die Offenheit des Systems, bietet. Diese Vorteile garantieren sowohl einen hohen Durchsatz, da Klonierarbeiten überflüssig werden, als auch die Möglichkeit, durch Veränderungen der Reaktionsbedingungen, schwer exprimierbare Proteine herzustellen, die *in vivo* gar nicht oder nur in unlöslicher Form synthetisiert werden. In der Literatur gibt es bereits viele Beispiele für die Expression von zytotoxischen Proteinen oder Membranproteinen in großen Mengen, was erst durch die CFPS ermöglicht wurde. Darüber hinaus wurden einige neuere Methoden, vor allem der *in vitro* Evolution, erst durch CFPS Systeme möglich. Auch erlaubt die CFPS zum ersten Mal den Einsatz sog. „protein arrays“, mit denen das gesamte Proteom eines Organismus erforscht werden kann.

Ein entscheidender Nachteil der CFPS, der auch dafür verantwortlich ist, dass die CFPS die *in vivo* Expression von Proteinen noch nicht als Standardmethode der Proteinexpression abgelöst hat, ist die geringe und unzuverlässige Syntheseleistung der Systeme, gerade im Batch-Verfahren, das den höchsten Grad an Automatisierbarkeit aufweist. Zwar sind im *E. coli* S30 System bereits Proteinausbeuten bis über 1 mg/ml im Batch-Verfahren möglich, dabei handelt es sich aber um Testproteine, die sich sehr gut zellfrei exprimieren lassen. Andere Proteine erreichen nur einen Bruchteil dieser Ausbeuten oder lassen sich gar nicht synthetisieren. Eine

zuverlässige Vorhersage, welches Protein sich gut oder schlecht exprimieren lässt, existiert nicht.

CFPS Systeme sind heutzutage noch sehr weit davon entfernt, die Produktivitäten zu erreichen, die theoretisch möglich sein sollten, selbst im CECF-Verfahren. Aus diesem Grund wurden zahllose Studien durchgeführt, die zwar alle ihren Beitrag zur Verbesserung der CFPS Systeme geleistet haben, von denen jedoch keine diese Limitation der CFPS überwinden konnte. Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Arbeit ebenfalls mit der Verbesserung der Produktivität der CFPS, wobei neue Wege gefunden werden sollen, am Beispiel eines *E. coli* S30 Systems, die Proteinausbeute, nicht nur von Testproteinen, zu steigern. Zuerst sollte die Herstellung der S30 Extrakte, ausgehend von einem bereits existierenden, jedoch etwas veralteten, Protokoll optimiert werden, um ein solides Testsystem für weitere Versuche zur Verfügung zu haben. Außerdem sollte dieses System in dem *in vitro* Evolutionssystem der Projektpartnerin zum Einsatz kommen, wobei das Problem überwunden werden sollte, dass in Anwesenheit von *E. coli* S30 Extrakten in der NASBA-Reaktion keine Amplifikationsprodukte entstehen. Als nächstes sollte die Zusammensetzung der S30 Extrakte, über die bis jetzt nur sehr wenige Daten existieren, genauer analysiert und nach limitierenden Faktoren aus der Translationsmaschinerie gescreent werden. Ein anderer Ansatz sollte die Ausbeute der CFPS verbessern, indem durch den Zusatz von verschiedenen Klassen von RNA Chaperonen eventuell vorhandene Sekundärstrukturen in den mRNAs, die sich schlecht translatieren lassen, aufgelöst werden sollen. Auch sollte versucht werden, die Koppelung von Transkription und Translation, durch die Verwendung von starken *E. coli* Promotoren, wiederherzustellen, dadurch eine Sekundärstrukturbildung der mRNA zu verhindern und somit die Ausbeute zu erhöhen. Weitere zu prüfende Ansätze umfassen die Anwendung eines post-transkriptionellen Regulationsmechanismus von *E. coli* im CFPS System, bei dem durch die Hybridisierung einer ncRNA mit der mRNA regulatorische Sequenzen der mRNA besser für das Ribosom zugänglich gemacht werden sollen, sowie die Expression von Proteinen bei niedrigen Temperaturen mithilfe der 5' UTR der *cspA* mRNA, um eventuell mehr Energie in Form von ATP für die Proteinsynthese zur Verfügung zu haben, da bei niedrigeren Temperaturen die unspezifische ATP-Hydrolyseaktivität der Extrakte stark reduziert sein sollte. Im Folgenden sollen die verfolgten Ansätze genau vorgestellt und die erzielten Ergebnisse diskutiert werden.

2. Material

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Bakterienstämme

E. coli TG1 (Lucigen)

Genotyp: $F'[\text{traD36 lacI}^q \Delta(\text{lacZ})\text{M15 proA}^+ \text{B}^+] \text{glnV}(\text{supE}) \text{thi-1} \Delta(\text{mcrB-hsdSM})5 (r_K^- m_K^- \text{McrB}^-) \text{thi} \Delta(\text{lac-proAB})$

Dieser *E. coli* Stamm wurde für Klonierungen und zur standardmäßigen Vermehrung von Plasmiden verwendet. Eine wichtige Eigenschaft ist das Vorhandensein des *lacI*^q-Gens, welches für den Lac-Repressor, ein Protein welches die Transkription von *lac* Promotoren inhibiert, codiert und somit auch die Klonierung und Vermehrung von Plasmiden mit *lac* oder *lac*-ähnlichen Promotoren (z.B. *tac* Promotor), ohne dass eine ungewollte Expression stattfindet, erlaubt.

E. coli XL1-Blue (Stratagene)

Genotyp: $\text{endA1 gyrA96 (nal}^R\text{)} \text{thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[\text{:Tn10 proAB}^+ \text{lacI}^q \Delta(\text{lacZ})\text{M15}] hsdR17 (r_K^- m_K^+)$

Ebenfalls für Klonierungen und die Vermehrung von Plasmiden eingesetzter Stamm. Auch dieser Stamm trägt das *lacI*^q-Gen und verfügt zusätzlich über eine Tetracyclinresistenz, von der im Rahmen dieser Arbeit aber kein Gebrauch gemacht wurde.

E. coli BL21 (Novagen)

Genotyp: $F \text{ompT hsdS}_B (r_B^- m_B^-) \text{gal dcm}$

Expressionsstamm für Plasmide mit *E. coli* Promotoren, bei dem eine zytoplasmatische und eine extrazelluläre Protease ausgeschaltet wurden, was zu einer Stabilisierung der synthetisierten Proteine führt. Dieser Stamm wurde sowohl zur Proteinexpression, als auch zur Herstellung von S30 Extrakten verwendet. Der Stamm verfügt über kein eigenes *lacI*^q-Gen, so dass dieses Gen im verwendeten Plasmid vorhanden sein sollte, um eine Kontrolle der Expression durch IPTG zu gewährleisten.

E. coli BL21(DE3)pLysS (Novagen)

Genotyp: $F \text{ompT hsdS}_B (r_B^- m_B^-) \text{gal dcm (DE3) pLysS (Cam}^R\text{)}$

Expressionsstamm wie *E. coli* BL21. Das zusätzliche DE3 Element codiert für eine T7 RNA Polymerase, sowie für den Lac-Repressor, was die durch IPTG induzierbare Expression von Plasmiden mit T7 Promotor ermöglicht. Das pLysS Plasmid trägt eine Chloramphenicolresistenz und codiert für das T7 Lysozym, einen Inhibitor der T7 RNA Polymerase, der die basale Expression von T7 Promotoren, bis zur Zugabe von IPTG, unterdrückt. Dieser Stamm wurde für Proteinexpressionen benutzt.

***E. coli* RosettaTM(DE3)pLysS (Novagen)**

Genotyp: $F^+ \text{ompT} \text{hsdS}_B (r_B^- m_B^-) \text{gal} \text{dcm} (\text{DE3}) \text{pLysSRARE2} (\text{Cam}^R)$

Identischer Expressionsstamm wie *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Einziger Unterschied ist das pLysS Plasmid, das bei RosettaTM zusätzlich zu den oben bereits erwähnten Eigenschaften für einige in *E. coli* seltene tRNAs codiert und damit die Expression vor allem eukaryotischer Proteine verbessert. Auch dieser Stamm wurde für Proteinexpressionen benutzt.

***E. coli* CK600K (Stratagene)**

Genotyp: *McrA*-, *supE44*, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*

Weiterer Expressionsstamm für Plasmide mit *E. coli* Promotoren. Wie schon *E. coli* BL21 besitzt auch der CK600K kein eigenes *lacI^q*-Gen.

***E. coli* BL21 StarTM (DE3) (Invitrogen)**

Genotyp: $F^+ \text{ompT} \text{hsdS}_B (r_B^- m_B^-) \text{gal} \text{dcm} \text{rne131} (\text{DE3})$

Identischer Expressionsstamm wie *E. coli* BL21, bei dem zusätzlich die endogene RNase E ausgeschaltet wurde, was zu einer Stabilisierung von mRNAs führen soll. Auch dieser Stamm verfügt über ein DE3 Element zur Proteinexpression von Plasmiden mit T7 Promotor. Dieser Stamm wurde ausschließlich zur Herstellung von S30 Extrakten verwendet.

E. coli* KP7600 ΔRNase HI (National BioResource Project (NIG, Japan)): *E. coli

Genotyp: *W3110 lacI^q lacZΔM15 rnhA*

Dieser Stamm ist ein Derivat des bekannten *E. coli* K12 Stammes, bei dem die RNase HI deletiert und durch eine Kanamycinresistenz ersetzt wurde. Dieser Stamm wurde zur Herstellung RNase HI-freier S30 Extrakte verwendet.

One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen)

Genotyp: $F^+ \text{mcrA} \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \varphi 80 \text{lacZ} \Delta \text{M15} \Delta \text{lacX74} \text{recA1} \text{araD139} \Delta(\text{ara-leu} 7697 \text{galU} \text{galK} \text{rpsL} (\text{StrR}) \text{endA1} \text{nupG} \lambda^-)$

Diese bereits chemisch kompetenten *E. coli* Zellen sind Bestandteil des TOPO® TA Cloning® Kits (Invitrogen) und wurden ausschließlich für Klonierungen mit dem pCR®2.1-TOPO® Vektor benutzt.

2.1.2 Eukaryotische Zellen

***Saccharomyces cerevisiae* Y187 (Clontech)**

Genotyp: *MATa, ura3-52, his3-200, ade 2-101, trp 1-901, leu 2-3, 112, gal4Δ, met*⁻, *gal80Δ, URA3 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1*

Dieser Stamm der Bäckerhefe ist Bestandteil der Matchmaker™ Yeast Two-Hybrid Systeme (Clontech) und wurde für die Isolierung von Hefe RNA verwendet.

***Homo sapiens* HeLa-Zellen (Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie, Regensburg)**

HeLa-Zellen, menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, wurden freundlicherweise vom Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt und ebenfalls für RNA Isolierungen verwendet.

2.1.3 Antikörper

Es wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen His₆- und GST-tags verwendet. Die His₆ Antikörper (His-Probe (H-15), Santa Cruz Biotechnology) stammten aus Hase und wurden im Western Blot in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Die zur Sichtbarmachung benötigten, markierten Sekundärantikörper (ECL™-HRP linked anti rabbit antibody, Amersham) gegen Immunglobuline aus Hase waren an eine Peroxidase gekoppelt. Sie stammten aus Ziege und wurden bei Einsatz im Western Blot 1:10000 verdünnt.

Zur Sichtbarmachung von GST-tags im Western Blot wurde ein Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet, der bereits an eine Peroxidase gekoppelt war (Anti-GST HRP Conjugate, GE Healthcare) und somit die Detektion dieses Antikörpers mit einem Sekundärantikörper überflüssig machte.

2.2 Mikrobiologisches Material

2.2.1 Plasmidvektoren

pET-14b (Novagen)

Der pET-14b (Abb. 2.1) ist ein Expressionsplasmid mit T7 Promotor und Ampicillinresistenz.

Er codiert außerdem für ein N-terminales, durch Thrombin abspaltbares, His₆-tag.

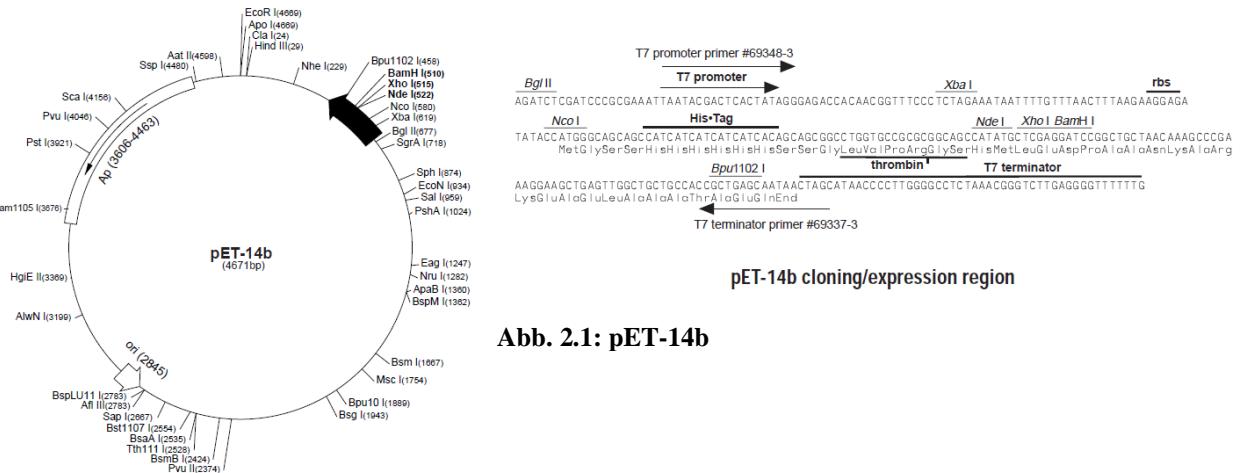


Abb. 2.1: pET-14b

pET-20b(+) (Novagen)

Dieser Vektor ist ebenfalls für die Proteinexpression mit einem T7 Promotor ausgestattet (Abb. 2.2). Er codiert außerdem für ein C-terminales His₆-tag und einen N-terminalen pelB-Leader, der für die Lokalisation der synthetisierten Proteine im Periplasma von *E. coli* verantwortlich ist. Der pelB-Leader kann bei Klonierungen einfach entfernt werden, indem das Restriktionsenzym NdeI in Kombination mit einem zweiten, das innerhalb der ‚Multiple Cloning Site‘ (MCS) schneidet, eingesetzt wird. Zur Selektion in Bakterien trägt er ein Ampicillinresistenzgen.

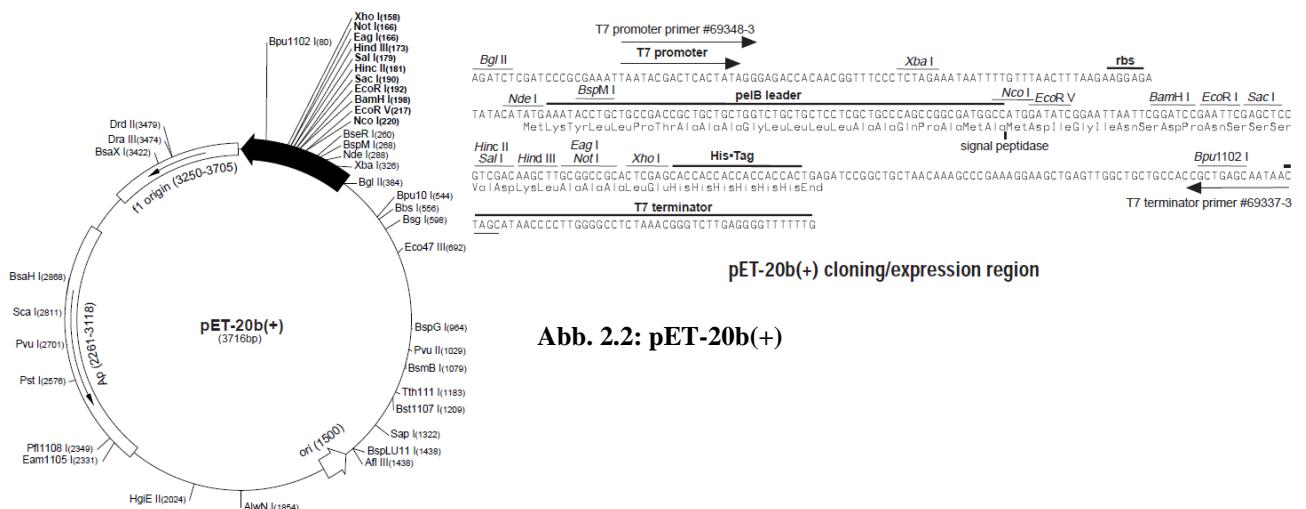
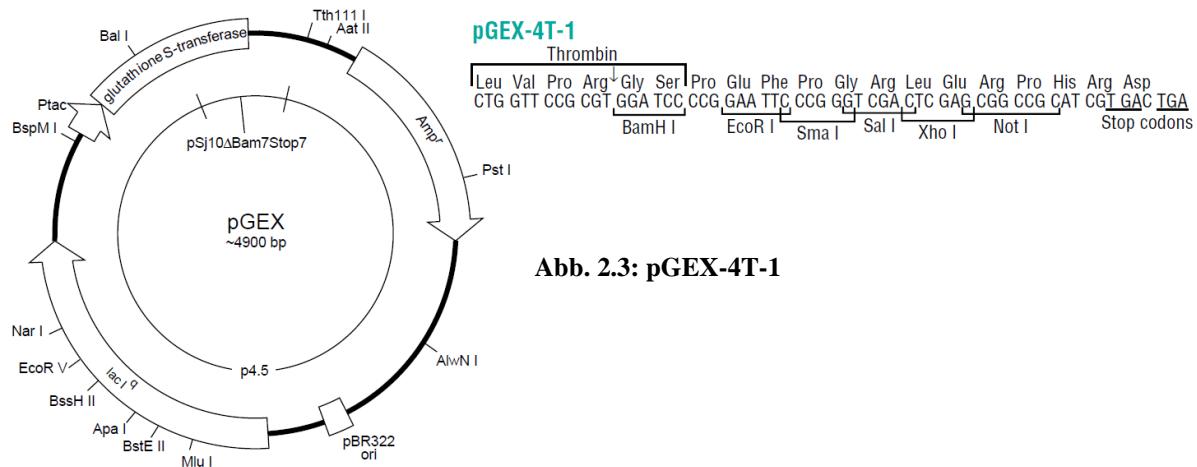


Abb. 2.2: pET-20b(+)

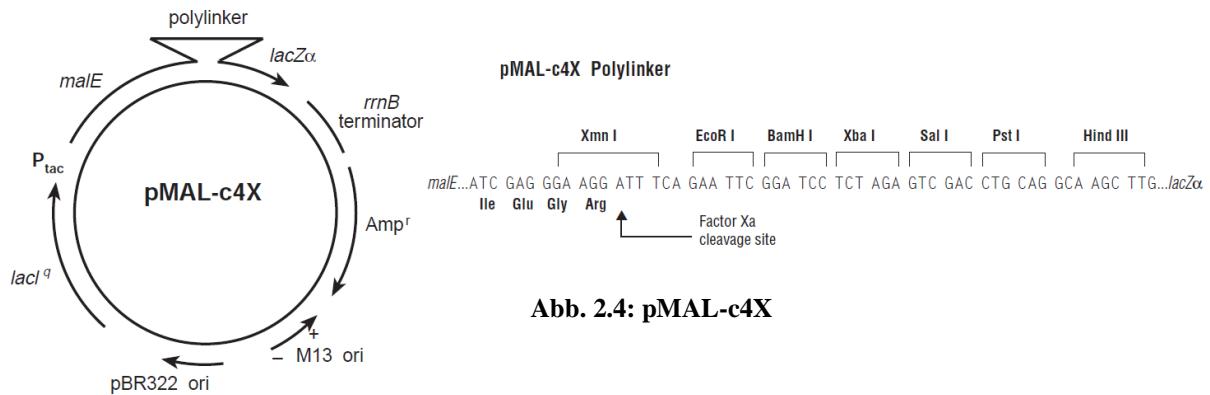
pGEX-4T-1 (GE Healthcare)

Expressionsvektoren der pGEX-Reihe codieren alle für eine N-terminale Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (GST; ~26 kDa) und tragen ein Ampicillinresistenzgen. Sie unterscheiden sich lediglich in den Proteasen, die zur Abspaltung des GST verwendet werden können, sowie in der MCS, die verschiedene Leseraster und Restriktionsschnittstellen bietet. Der in dieser Arbeit verwendete pGEX-4T-1 (Abb. 2.3) ermöglichte die Abspaltung von GST durch Thrombin. Als Promotor für die Proteinexpression dient beim pGEX der starke *tac* Promotor, der von der *E. coli* RNA Polymerase erkannt wird. Um die Expression vom Vektor kontrollierbar durch IPTG zu machen, codiert er auch für den Lac-Repressor, der auch *tac* Promotoren erkennt und den Einsatz des Vektors in Bakterienstämmen ohne eigenes *lacI^q*-Gen erlaubt. Die Fusion eines Proteins mit GST-tag kann sowohl die Expression, als auch die Löslichkeit des Proteins steigern.



pMAL-c4X (New England Biolabs)

Dieser Expressionsvektor ist dem pGEX sehr ähnlich. Er ermöglicht die Proteinexpression von N-terminalen Fusionsproteinen mit dem Maltose Bindepotein (MBP; ~40 kDa), ebenfalls unter Einfluss des *tac* Promotors. Auch der pMAL-c4X trägt eine Ampicillinresistenz, sowie das *lacI^q*-Gen (Abb. 2.4). Fusion eines Proteins mit MBP kann ebenfalls Löslichkeit und Expression steigern, wobei es durch die Faktor Xa-Protease abgespalten werden kann.



pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen)

Dieser Vektor ist Bestandteil des TOPO® TA Cloning® Kits (Invitrogen; Abb. 2.5). Er wurde für die Zwischenklonierung von PCR Produkten verwendet. Er besitzt zur Selektion in Bakterien sowohl eine Kanamycin- als auch eine Ampicillinresistenz. Bei diesem Vektor wird ein *lacZα*-Gen, das für die β-Galaktosidase unter Einfluss des *lac* Promotors codiert, von der MCS unterbrochen, was eine blau/weiß-Selektion transformierter Klone auf X-Gal beschichteten Platten ermöglicht.

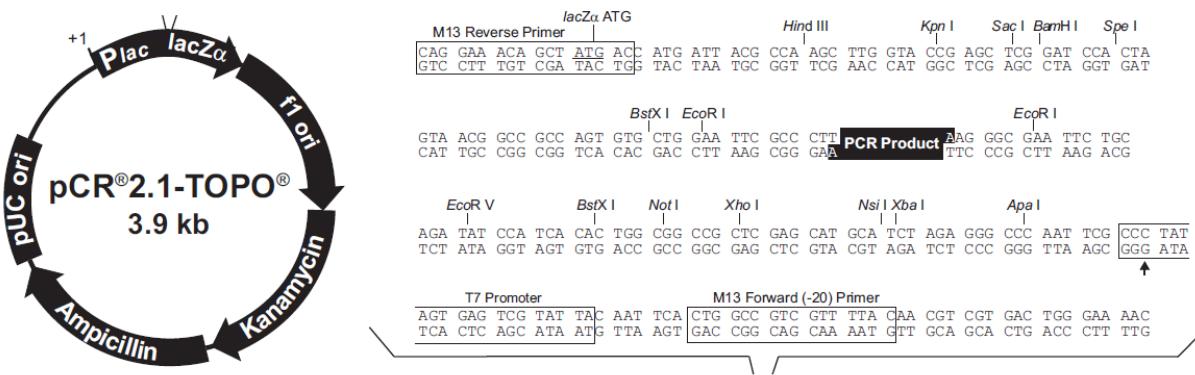


Abb. 2.5: pCR®2.1-TOPO®

pK7-CAT (Kim *et al.*, 1996)

Dieses Expressionsplasmid codiert für die CAT unter Einfluss des T7 Promotors. Es besitzt eine identische 5' UTR wie der pET-14b oder der pET-20b(+) (vgl. Abb. 2.1 und 2.2). Dabei entspricht das Startcodon der CAT dem ATG der NdeI-Schnittstelle (CATATG) der pET-Vektoren. Der pK7-CAT trägt eine Kanamycinresistenz und wurde in CFPS Reaktionen als Test-Plasmid verwendet.

S30 T7 Control DNA (Promega)

Dieses Expressionsplasmid (Abb.2.6), das für eine synthetische, zellfrei besonders gut synthetisierbare *Renilla Luciferase* (hRluc) mit einem N-terminalen HQ-tag unter Einfluss eines T7 Promotors codiert, ist das Kontrollplasmid des S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega). Es kann für Klonierungen verwendet werden und trägt eine Ampicillinresistenz.

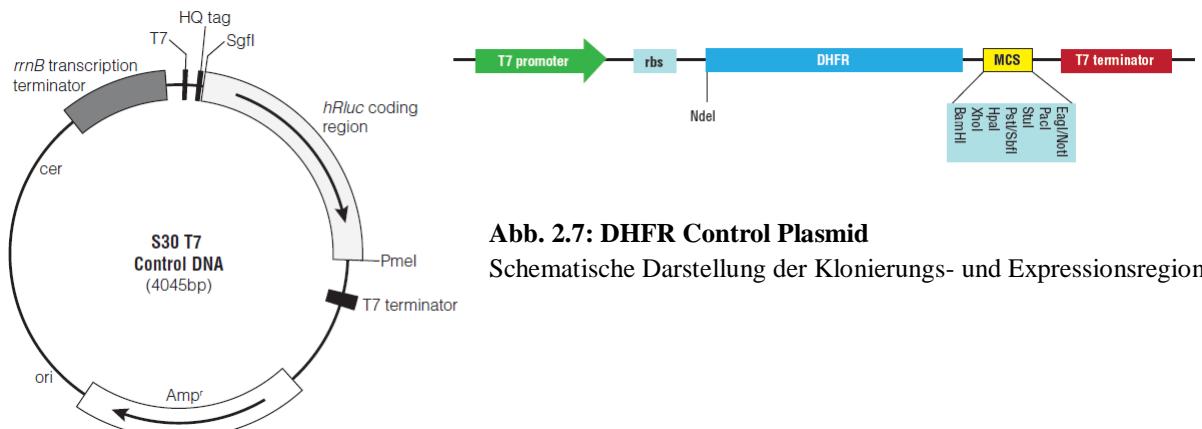


Abb. 2.6: S30 T7 Control DNA

DHFR Control Plasmid (New England Biolabs)

Dieses Kontrollplasmid des PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kits (New England Biolabs; Abb. 2.7) codiert für die *E. coli* Dihydrofolatreduktase (DHFR). Es besitzt einen T7 Promotor und eine Ampicillinresistenz. Auch dieses Plasmid kann für Klonierungen verwendet werden.

pIVEX2.3-MCS (Roche)

pIVEX-Vektoren sind Expressionsvektoren, die speziell für die CFPS in *E. coli* S30 Systemen entwickelt wurden, wobei der T7 Promotor benutzt wird. Sie tragen ein Ampicillinresistenzgen und der pIVEX2.3-MCS (Abb. 2.8) codiert zusätzlich für ein C-terminales His₆-tag. Die pIVEX-Vektoren können auch zur *in vivo* Expression eingesetzt werden.

pc-wtgag (Lehrstuhl für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg)

Dieses eukaryotische Expressionsplasmid, das freundlicherweise vom Lehrstuhl für medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt wurde, codiert für das Gag Polypeptid von HIV-1 (Isolat des Referenzstammes HXB2) unter dem CMV (Cytomegalovirus) Promotor (Abb. 2.9). Es trägt

zusätzlich einen *E. coli* Replikationsursprung und eine Ampicillinresistenz zur Vermehrung und Selektion in Bakterien. Es wurde lediglich als DNA template in PCR Reaktionen eingesetzt.

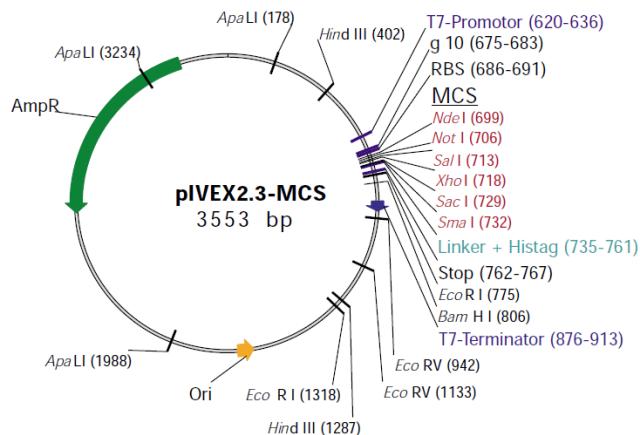


Abb. 2.8: pIVEX2.3-MCS

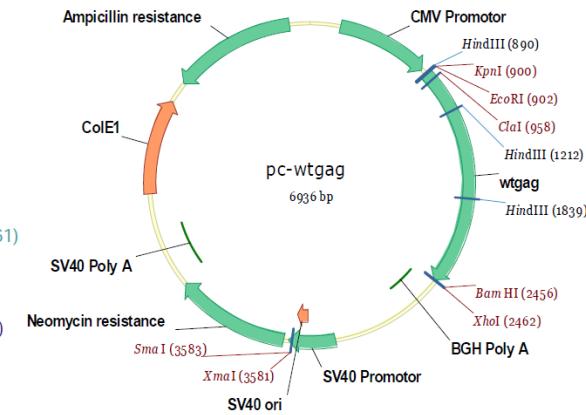


Abb. 2.9: pc-wtgag

2.2.2 Enzyme/Proteine

In der Folgenden Tabelle (Tab. 2.1) sind alle verwendeten Enzyme/Proteine mit Hersteller(n) aufgelistet, die für diese Arbeit verwendet wurden und nicht Bestandteil eines Kits waren.

Tab. 2.1: Verwendete Enzyme/Proteine samt Hersteller

Enzyme/Proteine	Hersteller
Aminoacyl-tRNA Synthetasen von <i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	GERBU Biotechnik GmbH
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
Creatinkinase	Roche
DNase I	Roche
Factor Xa	New England Biolabs
Lysozym	GERBU Biotechnik GmbH
M-MLV reverse Transkriptase	usb
Murine RNase Inhibitor	New England Biolabs
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes über New England Biolabs
Restriktionsenzyme	Fermentas und New England Biolabs
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas
RNase A/T1-Mix	Fermentas
RNase-free DNase Set	Qiagen
T4 DNA Ligase	Fermentas und New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	Fermentas, Qiagen, New England Biolabs
Thrombin	Merck

2.2.3 Oligonukleotide

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 2.2) listet alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, die als Primer für PCR Reaktionen und Sequenzierungen benötigt wurden und die nicht Bestandteil eines Kits waren, auf. Dabei sind Vorsequenzen kursiv und Restriktionsschnittstellen unterstrichen dargestellt. Start- und Stopcodons sind grau, T7 Promotoren gelb hervorgehoben. Tabelle 2.2 beinhaltet auch die Annealingtemperaturen (T_{Ann}), sowie die Sequenz einer in dieser Arbeit verwendeten miRNA. Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon bezogen.

Tab.2.2: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'→3'	T_{Ann}
<i>Translationsfaktoren</i>		
IF1-5'-Nde	<i>GGAATTCCATATGG</i> CCAAAGAAGACAATA	52° C
IF1-3'-Xho	<i>CCGCTCGAGT</i> CAGCGACTACGGAAGA	52° C
IF2-5'-Nde	<i>GGAATTCCATATG</i> ACAGATGTAACGATTAA	52° C
IF2-3'-Bam	<i>CGGGATCCTTAA</i> AGCGATGGTACGTTG	52° C
IF3-5'-Nde	<i>GGAATTCCATATG</i> AAAGGCGGAAAACGA	52° C
IF3-3'-Bam	<i>CGGGATCCTTACT</i> GTTCTTCTTAGGAG	54° C
EFG-5'-Nde	<i>GGAATTCCATATGG</i> CTCGTACAACACC	52° C
EFG-3'-Bam	<i>CGGGATCCTTATT</i> TACCAACGGGCTTC	52° C
EFTu-5'-Nde	<i>GGAATTCCATATGT</i> CTAAAGAAAAGTTGAA	52° C
EFTu-3'-Bam	<i>CGGGATCCTT</i> AGCTCAGAACCTTGCTA	54° C
EFTs-5'-Nde	<i>GGAATTCCATATGG</i> GCTGAAATTACCGCA	52° C
EFTs-3'-Bam	<i>CGGGATCCTTAA</i> AGACTGCTGGACATC	54° C
RF1-5'-Nde	<i>GGAATTCCATATGA</i> AGCCTTCTATCGTTG	54° C
RF1-3'-Bam	<i>CGGGATCCTTATT</i> CCTGCTCGGACAA	52° C
RF2-5'-Nde	<i>GGAATTCCATATG</i> TTGAAATTAAATCCGGA	54° C
RF2-3'-Bam	<i>CGGGATCCTCATA</i> ACCCTGCTTCAAAC	56° C
RF3-5'	<i>ATGACGTTGTCT</i> CTTATTG	58° C
RF3-3'	<i>TTAATGCTCGCGGG</i> CTG	56° C
RRF-5'-Nde	<i>GGAATTCCATATG</i> ATTAGCGATATCAGAAA	52° C
RRF-3'-Bam	<i>CGGGATCCTCAGA</i> ACTGCATCAGTTC	52° C
MTF-5'-Nde	<i>CATATGGTGT</i> CAGAACATCACTACGTA	54° C
MTF-3'-Xho	<i>CTCGAGGACCAGACGG</i> TTGCC	54° C
<i>RNA Chaperone</i>		
116p-5'	TTATACAATGATGGAAACAG	52° C
116p-3'	<i>CTA</i> ATATATGTTGCTGTTTC	52° C
eIF-5'-Nde	<i>GGGAATTCCATATG</i> TCTGCGAGCCAGG	52° C
eIF-3'-Bam	<i>CGCGGATCCTCAGA</i> TGAGGTCAGCAAC	54° C

Hfq-5'-Nde	<u>CATATGG</u> CTAAGGGGCAATC	52° C
Hfq-3'-Bam	<u>GGATCCTT</u> ATTCGGTTCTCGCTG	54° C
HfqC-3'-Xho	<u>CTCGAG</u> TTCGGTTCTCGCTGTC	54° C
p7-5'-Nde	<u>GGGAATTCC</u> CAT <u>ATGC</u> CAGAGAGGAATTTC	50° C
p7-3'-Bam	<u>GC</u> <u>GGATCCTT</u> AAAATTCCCTGGCCTTCC	50° C
p7(1-55)-3'-Bam	<u>CGCGGATCCTT</u> AAATTAGCCTGTCTCTCAG	50° C
S1-5'-Nde	<u>CATATG</u> ACTGAATCTTTGCTC	52° C
S1-3'-Bam	<u>GGATCCTT</u> ACTCGCCTTAGCTGC	54° C
S12-5'-Nde	<u>CATATGG</u> CAACAGTTAACAG	52° C
S12-3'-Bam	<u>GGATCCTT</u> AAAGCCTTAGGACGCTTC	56° C
StpA-5'-Nde	<u>CATATGT</u> CCGTAATGTTACAAAG	54° C
StpA-3'-Bam	<u>GGATCCTT</u> AGATCAGGAAATCGTCG	54° C
UP1-5'-Eco	<u>CCGGAATT</u> CATGTCTAACAGTCAGAGTCTC	54° C
UP1-3'-Xho	<u>CCGCTCGAG</u> TTATCGACCTCTTGGCTGG	54° C

Weitere Proteine

CAT-5'-Nde	<u>GAATTCC</u> CAT <u>ATGG</u> GAGAAAAAAACTACTGG	62° C
CAT-3'-Bam	<u>CGGGATCCTT</u> ACGCCCGCCCTGCCA	62° C
CspA-5'-Nde	<u>GGAATTCC</u> CAT <u>ATGT</u> CCGGTAAAATGACTG	50° C
CspA-3'-Xho	<u>CCGCTCGAG</u> CAGGCTGGTTACGTTACC	50° C
DHFR-5'-Nde	<u>GGAATTCC</u> CAT <u>ATG</u> ATCAGTCTGATTG	52° C
DHFR-3'-Xho	<u>CCGCTCGAG</u> CCGCCGCTCCAGAAC	54° C
hRluc-5'-Nde	<u>GGAATTCC</u> CAT <u>ATGG</u> CTCCAAGGTGTACG	58° C
hRluc-3'-Xho	<u>CCGCTCGAG</u> CTGCTCGTTCTCAGCAC	56° C
P2RT-5'-Bam	<u>GGATCC</u> CATGCAGATTGATGCCG	48° C
P2RT-3'-Xho	<u>CTCGAG</u> TTAATTGCTATGTTCTTAAAAAA	48° C
PDZ2-5'-Nde	<u>GGAATTCC</u> CAT <u>ATGA</u> AGGTACATTGG	54° C
PDZ2-3'-Xho	<u>CCGCTCGAG</u> CTCATCTCTTGCCTACC	56° C
PDZ2His-3'-Bam	<u>CGCGGATCCT</u> CACTGGTGGTGGTGGTG	58° C

CspA 5' UTR

Csp-T7-5'	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> AACGGTTGACGTA CAGAC	56° C
T7-5'-Bgl	<u>GGAAGATCTCGATCCCGCGAAAT</u> TAATACGACTCACT <u>ATAGGG</u>	56° C
Csp-3'-Nde	<u>GGGAATTCC</u> CAT <u>ATG</u> AGTGTATTACCTTAATAATTAAAG	58° C
Csp-3'-Seq	GGCCGTAATATCCAGCTG	56° C

Vektor-Primer

T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGG	52° C
T7 Terminator	TATGCTAGTTATTGCTCAG	52° C
pGEX-5'	GGGCTGGCAAGCCAC	52° C
pMAL-5'	GGTCGTCAGACTGTCTG	52° C

pTAC-5'	GAGCTGTTGACAATTAATC	52° C
<i>Reverse Transkription</i>		
Oligo-dT	TTTTTTTTTTTTTTTT (18)	33° C
<i>miRNA</i>		
miRNA	AAGUUAAAUAACAUUAUUUCUAG	42° C

2.2.4 Kits und Kitbestandteile

Tabelle 2.3 zeigt alle Fertigkits, sowie einzeln erhältliche Kitbestandteile samt Hersteller, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tab. 2.3: Verwendete Kits und Kitbestandteile

Kit bzw. Kitbestandteil	Hersteller
Dihydrofolate Reductase Assay Kit	Sigma-Aldrich
illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit	GE Healthcare
miRNeasy® Mini Kit	Qiagen
miScript® Reverse Transcription Kit	Qiagen
Ni-NTA Spin Columns	Qiagen
PURExpress® Δ Ribosome Kit	New England Biolabs
PURExpress® <i>In Vitro</i> Protein Synthesis Kit	New England Biolabs
QIAEX II® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
QIAshredder® Cell-Lysate Homogenizers	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
S30 T7 High-Yield Protein Expression System	Promega
TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen
Universal His Western Blot Kit 2.0	Clontech
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

2.3 Chemikalien

Die Grundausrüstung an Chemikalien wurde von Merck, usb, Roth, MP Biomedicals und Sigma-Aldrich in Analysequalität bezogen. Die Hersteller spezieller Chemikalien sind im Methodenteil angegeben.

2.4 Geräte

Nachfolgende Tabelle (Tab. 2.4) listet die in dieser Arbeit benutzten Geräte, inklusive genauer Typ-Bezeichnung und Hersteller auf.

Tab. 2.4: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
4° C Kühlschrank	„öko“	Privileg
-20° C Kühlschrank	„Comfort“	Liebherr
-80° C Kühlschrank	VX530 Series 2	Jouan
Brutschrank	EB 53	Jouan
CCD Kamera	E.A.S.Y. 429 K	Herolab
Digital Graphic Printer	UP-D890	Sony
Eismaschine	AF 100	Scotsman
Feinwaage	CP64	Sartorius
FPLC	ÄKTA™ FPLC mit Frac-900	Amersham
Heizblöcke	Dri-Block® DB·2D, QBD1	Techne Grant
Heizblöcke mit Schüttler	Thermomixer compact bzw. comfort	Eppendorf
HPLC	System Gold® 125 Solvent Module mit System Gold® 166 Detector	Beckman
Inkubator	AJ 110	INFORS AG
Lyophilisiersystem	Kühlfalle RCT 60 mit SpeedVac RC 10	Jouan
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph
Mikrowelle	R-26ST	Sharp
Netzgerät	Power Pac 300	Bio-Rad
Ofen	Bis 250° C	Heraeus
pH-Meter	Φ 32 pH Meter	Beckman
Photometer	Lambda Bio +	PerkinElmer
Schüttler	PROMAX 1020	Heidolph
SDS-Gelkammer	Für Mini-Gele	cti
Sterilbank	MSC.12 GS V G 2XE	Jouan
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf
Tischzentrifugen	Biofuge pico, mini Spin	Heraeus Eppendorf
Transilluminator	White/UV Transilluminator	Ultra-Violet Products
Ultraschallgerät	J-17A	Branson
Ultrazentrifuge	L-70	Beckman
Vortex	Vortex-Genie 2™	Scientific Industries
Waage	PM600	Mettler
Wasseraufbereitung	PURELAB Ultra	Elga
Wasserbäder	Mit/ohne Schüttelfunktion	Memmert

Western Blot Apparatur	Pierce® Fast Semi-Dry Blotter	Thermo Scientific
Zentrifugen	Model J-6B, Avanti™ J-20, Avanti™ J-25	Beckman

2.5 Computerprogramme

Tabelle 2.5 umfasst alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme, inklusive Verwendung und Hersteller. Falls es sich um Freeware aus dem Internet handelt, wird die URL angegeben.

Tab. 2.5: Verwendete Computerprogramme

Programm	Verwendung	Hersteller/URL
Bioedit	DNA Sequenzanalysen	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html
Compute pI/Mw tool	Berechnung von Mw und pI von Aminosäuresequenzen	http://expasy.org/tools/pi_tool.html
EMBL und NCBI databases	Datenbanken für DNA- und Proteinsequenzen	http://www.ebi.ac.uk/embl/ und http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/
EASY Image Plus Enhanced Analysis System	Steuerung der CCD Kamera	Herolab
Gold Chromatography Data System Version 1.7	Steuerung der HPLC	Beckman
NEBcutter V2.0	Restriktionsanalyse von DNA Sequenzen	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
NCBI Blast	Sequenzvergleiche	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Office Excel 2007	Erstellung von Graphen	Microsoft
Office Word 2007	Erstellung dieser Arbeit	Microsoft
Photoshop Elements 6.0	Bildbearbeitung	Adobe
Reverse Complement	Umschreiben von DNA Sequenzen in rückwärts-komplementäre Form	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
RNAfold	Berechnung von RNA Sekundärstrukturen	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi
Translate tool	Translation von DNA Sequenzen	http://expasy.org/tools/dna.html

UNICORN™ Control System	Steuerung der ÄKTA™ FPLC	Amersham
-------------------------	--------------------------	----------

2.6 Ausgangsmaterial

2.6.1 DNA Konstrukte

pET-14b PDZ2

Dieses Plasmid mit der einklonierten cDNA der zweiten PDZ Domäne (AS 186-264) des Proteins Zonula Occludens 1 (*rattus norvegicus*) wurde freundlicherweise von Malte Andrasch zur Verfügung gestellt. Es wurde zur Expression und Aufreinigung der PDZ2 Domäne mit N-terminalem His₆-tag und zur Umklonierung der PDZ2 Domäne in andere Plasmide verwendet.

pET-14b AI-BP

Dieses Plasmid mit der cDNA des humanen Proteins AI-BP (Apo AI Bindeprotein), ohne ein N-terminales Signalpeptid (AS 25-288), wurde für Tests in der CFPS eingesetzt und von Johannes Hiltl zur Verfügung gestellt.

pK7-CAT

Dieses Test-Plasmid der CFPS (siehe auch Punkt 2.2.1) stammt ursprünglich von Takanori Kigawa (Riken, Japan) und wurde von Roland Hofweber für die Versuche zur Verfügung gestellt.

pGEX-4T-1 M-MLV

Dieses von Maren Meysing zur Verfügung gestellte Plasmid codiert für die reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus, die in dem *in vitro* Evolutionsprojekt der GENEART AG verwendet wird. Es wurde zur Expression und Aufreinigung der reversen Transkriptase als Fusionsprotein mit GST benutzt.

pIVEX2.3-MCS P2RT

Auch dieses Plasmid wurde von Maren Meysing von der GENEART AG zur Verfügung gestellt und es enthielt die codierende Region der reversen Transkriptase des P2-artigen Coliphagen EC30, wobei es sich um eine Codon-optimierte Version dieser Sequenz mit einem N-terminalen (HN)₆-tag handelte. Das Plasmid wurde für Umklonierungen und die zellfreie Expression der P2RT verwendet.

2.6.2 Proteine

T7 RNA Polymerase

Ausreichende Mengen an rekombinanter T7 RNA Polymerase standen zur Verfügung. Sie wurde von Roland Hofweber ausgehend vom Plasmid pAR1219 nach Anleitung von Zawadzki und Gross (1991) in *E. coli* BL21 exprimiert und aufgereinigt.

PDZ2 Domäne

Ein Versuch dieser Arbeit benötigte eine aufgereinigte PDZ2 Domäne (siehe oben) ohne fusioniertes tag. Diese wurde von Malte Andrasch zur Verfügung gestellt, der sie als GST Fusionsprotein, ausgehend vom Plasmid pGEX-4T-1 PDZ2 exprimierte, aufreinigte und anschließend das GST-tag mit Thrombin entfernte.

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Flüssigkulturen von Bakterien

- Lösungen:*
- LB-Medium:

10 g/l Bakto-Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
→ autoklavieren, Lagerung bei 4° C;
 - Antibiotika Stammlösungen: siehe Tabelle 3.1;

Tab. 3.1 Antibiotika Stammlösungen

Antibiotikum	Stammlösung	Lösungs-mittel	Lagerung	Verdünnung im Medium
Ampicillin	50 mg/ml	H ₂ O	-20° C (kurz 4° C)	1:1000 (50 µg/ml)
Carbenicillin*	50 mg/ml	H ₂ O	-20° C (kurz 4° C)	1:1000 (50 µg/ml)
Kanamycin	50 mg/ml	H ₂ O	-20° C (kurz 4° C)	1:1000 (50 µg/ml)
Chloramphenicol	34 mg/ml	Ethanol	-20° C	1:1000 (34 µg/ml)

(*) wird auch bei Ampicillinresistenz verwendet

Flüssigkulturen von Bakterien wurden meist als Übernachtkulturen (ÜNKs) angelegt. Dazu wurde das gewünschte Volumen des Mediums mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit etwas Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur, von einer Agarplatte oder aus einer anderen Flüssigkultur, mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze, angeimpft. Wichtig war, falls die Bakterien zwei Plasmide mit unterschiedlichen Resistenzgenen trugen, immer beide Antibiotika zuzusetzen, da Plasmide ohne Selektionsdruck auch wieder verloren gehen können. Inkubiert wurden die Kulturen in der Regel über Nacht (üN) bei 37° C unter Schütteln (160-220 rpm).

3.1.2 Flüssigkulturen von Hefe

- Lösungen:*
- YPD-Medium:

20 g/l Bakto-Pepton
10 g/l Hefeextrakt
→ pH 6,5, erst auf 950 ml auffüllen, autoklavieren;
→ nach Abkühlen 50 ml 40% Glucose (sterilfiltriert)
zugeben; Lagerung bei 4° C;

Flüssigkulturen von Hefe wurden ausschließlich ohne Selektionsdruck in Vollmedium (YPD) angelegt. Selektion auf z.B. transformierte Plasmide erfolgt bei Hefe, anders als bei Bakterien nicht über Antibiotikaresistenzen, sondern meist über die Komplementierung von Aminosäure-Auxotrophien. Die Kulturen wurden, wie bei Bakterien, mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze angeimpft und üN bei 30° C unter Schütteln (160-220 rpm) inkubiert.

3.1.3 Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte

Gerade bei Proteinexpressionen und der Herstellung von S30 Extrakten ist oft die genaue Kenntnis der Bakteriendichte in einer Flüssigkultur nötig. Diese wurde bestimmt, indem von 1 ml der Flüssigkultur die Extinktion (oder optische Dichte; OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm am Photometer bestimmt wurde, gemessen gegen 1 ml des verwendeten Mediums als Leerwert. Bei 1 cm Schichtdicke der Küvetten entspricht eine OD₆₀₀ von 1 einer Bakteriendichte von 8x10⁸ Zellen/ml.

3.1.4 Glycerinkulturen von Bakterien und Hefen

Um Bakterien bzw. Hefen, z.B. nach erfolgreicher Transformation mit einem Plasmid, über lange Zeit aufzubewahren zu können, wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 900 µl einer ÜNK mit 200 µl 87% Glycerin (bzw. 150 µl 100% Glycerin; Endkonzentration ~15%) vermischt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei -80° C sind die Kulturen jahrelang haltbar.

3.1.5 Bakterienkulturen auf Agarplatten

Lösungen:

- LB-Agar: LB-Medium (siehe 3.1.1) mit 15 g/l Agar
→ autoklavieren; Lagerung bei 4° C;
- Antibiotika Stammlösungen (siehe Tab. 3.1);

Zur Herstellung der Agarplatten wurde der LB-Agar bei etwa 95° C im Wasserbad verflüssigt und anschließend unter Rühren auf ca. 60° C abgekühlt. Der LB-Agar konnte auch direkt nach dem Autoklavieren verwendet werden. Nach dem Abkühlen setzte man der Lösung die entsprechenden Antibiotika zu und goss die noch warme Lösung zügig in sterile Petrischalen,

so dass der Boden der Schalen gerade mit der Lösung bedeckt war. Nach Erstarren des Agars drehte man die Petrischalen um und öffnete sie einen Spalt, damit das Kondenswasser verdunsten konnte (ca. 2 h bis üN). Anschließend konnten die Agarplatten bei 4° C mehrere Wochen gelagert werden. Bakterien wurden entweder mit einem sterilen (abgeflammten) Drygalski-Spatel auf den Platten ausgestrichen, oder mit einer sterilen Pipettenspitze auf die Platten übertragen. Das Wachstum der Kolonien auf den Platten erfolgte im Brutschrank üN bei 37° C.

3.1.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Lösungen: • TSS: LB-Medium (siehe 3.1.1) mit
10% (w/v) PEG 3350 oder 8000
5% (v/v) DMSO
40 mM Mg²⁺ (MgSO₄ oder MgCl₂)
→ pH 6,5; sterilfiltrieren; Lagerung bei -20° C;

Für die Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA, muss der gewünschte Bakterienstamm erst für die Aufnahme von DNA aus der Umgebung, durch chemische Modifikation der Lipiddoppelschicht, kompetent gemacht werden. Dazu wurden, nach Chung *et al.* (1989), 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit 1 ml einer ÜNK des kompetent zu machenden Bakterienstammes angeimpft. Diese Kultur wurde dann unter Schütteln bei 37° C inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von etwa 0,3-0,4 (~1,5-3 h) erreichte. Die Bakterien wurden dann bei 4° C und 3000g für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 2,5 ml (= $\frac{1}{40}$ des Kulturvolumens) eiskaltem TSS („transformation and storage solution“) resuspendiert und zügig à 100 µl auf 1,5 ml Reaktionsgefäß (vorgekühlt auf Eis) verteilt. Die Aliquots wurden anschließend sofort in flüssigem N₂ eingefroren und waren bei -80° C monatelang haltbar. Kritisch für den Erfolg dieser Methode ist, dass nach dem Aufnehmen der Bakterien in TSS sehr zügig gearbeitet wird und sich die Bakterien auf keinen Fall erwärmen.

Die Kompetenz der Bakterien lässt sich ausdrücken in „colony forming units“ (cfu) pro µg eingesetzter Plasmid DNA, bezogen auf den pUC Vektor. Zur Bestimmung dieses Wertes wurden mehrere Aliquots der kompetenten Bakterien mit verschiedenen Mengen (z.B. 10 pg, 100 pg und 1 ng) des pUC Vektors transformiert (s.u.), ausplattiert, üN bei 37° C inkubiert und die gebildeten Kolonien ausgezählt. Akzeptable Werte liegen in etwa bei 10⁷-10⁹ cfu/µg pUC Vektor.

3.1.7 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid DNA

Lösungen: • LB-Medium (siehe 3.1.1)

Das Einbringen von Plasmid DNA in kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Nur ringförmige DNA mit einem geeigneten Replikationsursprung kann stabil transformiert und bei Vermehrung der Bakterien weitergegeben werden. Lineare DNA wird schnell abgebaut. Außerdem benötigt das Plasmid ein Antibiotikaresistenzgen, um erfolgreich transformierte Bakterien selektieren zu können. Bei Transformationen wurde ein Aliquot (100 µl) des benötigten, kompetenten Bakterienstammes auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid DNA vermischt und für 30-60 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 30 sekündiger Hitzeschock bei 42° C, wonach der Ansatz sofort wieder auf Eis gestellt wurde. Anschließend gab man 900 µl LB-Medium zu und inkubierte den Ansatz für 1 h unter Schütteln bei 37° C. Die Bakterien wurden dann für 2-3 min bei 3000-5000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert und ca. 90% des Überstandes abgenommen. Das Bakterienpellet wurde dann in der verbleibenden Flüssigkeit (~100 µl) resuspendiert und zur Selektion auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert, die dann üN bei 37° C im Brutschrank inkubiert wurden. Bei vielen erwarteten Kolonien empfahl es sich, den Transformationsansatz auf zwei Agarplatten (z.B. $1/10$ und $9/10$) zu verteilen.

Für erfolgreiche Transformationen der auf BL21 basierenden *E. coli* Stämme oder von *E. coli* CK600K wurden etwa 100-200 ng Plasmid DNA benötigt. Bei den Klonierungsstämmen TG1 und XL1-Blue war deutlich weniger Plasmid DNA (ca. 10 ng) ausreichend. Ligationsansätze (20 µl; s.u.) wurden immer komplett für die Transformation der Klonierungsstämmen eingesetzt.

3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der diese ihr Absorptionsmaximum aufweisen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die OD₂₆₀ der entsprechenden Nukleinsäure, gemessen gegen das gleiche Volumen Lösungsmittel (meist H₂O) als Leerwert, ermittelt. In der Regel wurden 100 µl einer 1:100 Verdünnung in UV-durchlässigen Küvetten gemessen, wobei die

Verdünnung entsprechend angepasst wurde, falls die erhaltenen Werte außerhalb des messbaren Bereiches lagen. Das verwendete Photometer gab zusätzlich das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} und von OD_{260}/OD_{230} an, was ein Indikator für Verunreinigungen der Probe mit Proteinen (Absorptionsmaximum bei 280 nm) bzw. mit aromatischen Verbindungen und Kohlenhydraten (beide absorbieren bei ~230 nm) ist. Nachfolgende Tabelle (Tab. 3.2) gibt an, welcher Konzentration eine OD_{260} von 1 der verschiedenen Nukleinsäuren entspricht, und welche Werte für die OD_{260}/OD_{280} und die OD_{260}/OD_{230} angestrebt werden.

Tab. 3.2: Konzentrationsbestimmung und Reinheit von Nukleinsäuren

Nukleinsäure	$OD_{260} = 1$ entspricht	$OD_{260}/OD_{280} \geq$	$OD_{260}/OD_{230} \geq$
DNA	50 ng/ μ l	1,8	2,2
RNA	40 ng/ μ l	2,0	2,2
Oligonukleotide	30 ng/ μ l	1,8	2,2

3.2.2 Isolierung genommischer DNA aus Bakterien

Für Isolierungen von genommischer DNA aus *E. coli* BL21 wurde das illustraTM bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) benutzt. Dabei wurde exakt nach dem Herstellerprotokoll für grammnegative Bakterien vorgegangen. Die Ausbeute betrug in etwa 20-40 μ g genommische DNA (200 μ l mit 100-200 ng/ μ l). Die isolierte DNA wurde bei -20° C gelagert.

3.2.3 Isolierung der gesamt RNA aus Bakterien, Hefe und HeLa-Zellen

Für sämtliche RNA Isolierungen wurde das RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben benutzt. Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über verwendetes Ausgangsmaterial, welches der verschiedenen Protokolle im Handbuch (Mai 1999) benutzt und welche Ausbeuten erzielt wurden. Bei allen Isolierungen wurde auf den optionalen DNase-Verdau verzichtet. Die optionale Verwendung der QIAshredder[®] Cell-Lysate Homogenizers (Qiagen) wirkte sich sehr positiv auf die erzielte Ausbeute aus (mindestens 10fache Steigerung). Standardmäßig wurde bei allen Isolierungen mit 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Die isolierte RNA wurde mit flüssigem N₂ eingefroren und bei -80° C gelagert.

Tab. 3.3: Übersicht RNA Isolierungen

Organismus	Ausgangsmaterial	Protokoll	Ausbeute
<i>E. coli</i> BL21	10 ml ÜNK	Bacteria	~50 µg (1,7 µg/µl)
Hefe (Y187)	10 ml ÜNK	Yeast I. Enzymatic Lysis – Standard Version	~30 µg (1 µg/µl)
HeLa-Zellen	1x10 ⁷ Zellen	Animal Cells	~120 µg (4 µg/µl)

3.2.4 Reverse Transkription von mRNA (RT-PCR)

Bei Klonierungen eukaryotischer, proteincodierender DNA Sequenzen kann nicht einfach die genomische DNA des entsprechenden Organismus als template für PCR Reaktionen verwendet werden, wie das bei Bakterien der Fall ist. Die codierende DNA Sequenz ist im eukaryotischen Genom immer wieder durch nicht-codierende Bereiche, die Introns, unterbrochen, die erst nach der Transkription, bei der mRNA Prozessierung, entfernt werden. Aus diesem Grund muss die nur noch aus Exons bestehende mRNA in cDNA umgeschrieben werden, um als template für PCR Reaktionen eingesetzt werden zu können. Dafür werden reverse Transkriptasen und ein Oligonukleotid, das mit dem Poly(A)-Schwanz eukaryotischer mRNAs hybridisiert, verwendet.

Für einen 20 µl Ansatz wurden 1-2 µg gesamt RNA in 8 µl RNase-freiem Wasser eingesetzt. Die Reaktion fand im Thermocycler mit dem in Tabelle 3.4 eingestellten Programm statt. Zuerst wurde die RNA für 3 min bei 70° C denaturiert. Während der 5 minütigen Inkubation bei 40° C wurde der Ansatz mit den folgenden Substanzen ergänzt und gut vermischt:

Tab. 3.4: Programm RT-PCR

Zeit	Temperatur	
3 min	70° C	• 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µl; Fermentas)
5 min	40° C	• 4 µl RT-Puffer (5x; usb)
1 h	37° C	• 5 µl dNTPs (2 mM je Nukleotid; New England Biolabs)
5 min	95° C	• 1 µl Oligo-dT (18) Primer (100 µM)
∞	4° C	• 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl; usb)

Die eigentliche reverse Transkription fand während der einstündigen Inkubation bei 37° C statt, wonach das Enzym hitzeinaktiviert wurde. In sich anschließenden PCR Reaktionen (s.u.) wurden 2 µl der cDNA als template eingesetzt, wobei keine weitere Aufreinigung nötig war. Gelagert werden konnte die cDNA bei -20° C.

3.2.5 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR ermöglicht die selektive Vervielfältigung von DNA Sequenzen. Dabei wird ausgenutzt, dass die normalerweise doppelsträngige DNA bei hohen Temperaturen schmilzt, sich also die Einzelstränge, die durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden, voneinander lösen. Hitzestabile DNA Polymerasen, meist aus thermophilen Bakterien, erlauben dann die Synthese neuer DNA Stränge, wobei die eingesetzte template DNA als Matrize dient. DNA Polymerasen können jedoch keine neuen DNA Stränge beginnen, so dass kurze, einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) benötigt werden, die mit dem 5'- und dem 3'-Ende der Zielsequenz hybridisieren und anschließend von der DNA Polymerase in 5'→3' Richtung verlängert werden. Daraus ergibt sich, dass der 5' Primer mit dem Gegenstrang, der 3' Primer mit dem Hauptstrang hybridisieren muss, um eine Verdoppelung der Zielsequenz zu erreichen. Mehrere Zyklen aus Schmelzen der template DNA (Denaturierung), Hybridisierung der Primer (Annealing) und Verlängerung dieser durch die DNA Polymerase (Elongation) sorgen für eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz. Neben der template DNA und den Primern benötigen DNA Polymerasen außerdem dNTPs für die Synthese der neuen DNA Stränge, sowie Mg²⁺-Ionen für ihre Aktivität.

3.2.5.1 Primerdesign

Die verwendeten Oligonukleotide bzw. Primer sind für den Erfolg von PCR Reaktionen kritisch, weshalb diese besondere Anforderungen erfüllen müssen. Sie dürfen nicht mit sich selbst oder dem zweiten in der Reaktion verwendeten Primer hybridisieren, sowie keine intramolekularen Schleifen bilden. Auch sollte ihre komplementäre Sequenz, wenn möglich, nur einmal in der eingesetzten template DNA vorkommen und sie sollten einen G/C-Gehalt von etwa 40-60% aufweisen, wobei ein T am 3'-Ende zu vermeiden ist. Die Annealingtemperaturen beider verwendeter Primer müssen in etwa gleich sein und idealerweise zwischen 50° und 60° C (meist ca. 15-20 hybridisierende Nukleotide) liegen, wobei bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen die niedrigere in der PCR Reaktion verwendet wird. Falls in der PCR unspezifische Nebenprodukte entstehen, kann versucht werden, deren Bildung durch schrittweise Erhöhung der Annealingtemperatur um 2° C zu verhindern. Umgekehrt, falls kein PCR Produkt in der Reaktion entsteht, kann die Annealingtemperatur, ebenfalls schrittweise um 2° C, erniedrigt werden, um eine bessere

Hybridisierung der Primer mit ihrer Zielsequenz zu erreichen. Die Annealingtemperatur kann mit der folgenden Formel berechnet werden, wobei nur die Basen in die Rechnung mit einfließen, die mit der template DNA hybridisieren.

$$T_{\text{Ann}} = 2^{\circ} \text{ C} \cdot (A + T) + 4^{\circ} \text{ C} \cdot (G + C)$$

Die Primer können auch dazu verwendet werden, die Zielsequenz am 5'- und/oder 3'-Ende zu modifizieren. Es können Start- oder Stopcodons bzw. Restriktionsschnittstellen an die Zielsequenz angefügt werden. Das Anfügen von Restriktionsschnittstellen ist für Klonierungen essentiell. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die meisten Restriktionsenzyme nicht direkt an den Enden von DNA schneiden können, so dass ebenfalls kurze Vorsequenzen verwendet werden müssen, falls das PCR Produkt direkt, ohne z.B. eine Zwischenklonierung in den pCR®2.1-TOPO® (s.u.), verdaut wird. Das Anfügen von Start- und Stopcodons ist wichtig und abhängig vom Vektor, in den das PCR Produkt kloniert werden soll. Beispielsweise muss auf das Stopcodon am 3' Ende verzichtet werden, wenn durch den Vektor ein C-terminales His₆-tag angefügt werden soll, usw.

Laut Konvention werden von DNA Sequenzen nur die Hauptstränge in 5'→3' Richtung dargestellt. Auch die Primer werden in 5'→3' Richtung geschrieben. Daraus ergibt sich, dass die Sequenz des 5' Primers, der mit dem Gegenstrang hybridisiert, einfach von der Zielsequenz abgeschrieben werden kann. Der 3' Primer, der mit dem Hauptstrang hybridisiert, muss rückwärts-komplementär zur Zielsequenz geschrieben werden.

3.2.5.2 PCR mit der Phusion™ DNA Polymerase

Für die Vermehrung von Zielsequenzen, die für Klonierungen benötigt wurden, verwendete man ausschließlich die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes). Diese Polymerase zeichnet sich durch eine hohe Geschwindigkeit bei gleichzeitiger sehr niedriger Fehlerquote aus, wobei PCR Produkte mit glatten Enden, also ohne 5'- oder 3'-Überhänge synthetisiert werden. Die verwendete template DNA stammte aus unterschiedlichen Quellen. Es wurde sowohl bakterielle, genomische DNA (ca. 200-500 ng), cDNA aus RT-PCRs (2 µl; s.o.) als auch Plasmid DNA (ca. 1-100 ng) verwendet. Die für die Aktivität der Polymerase benötigten Mg²⁺-Ionen waren bereits im mitgelieferten Reaktionspuffer enthalten. Standardmäßig wurden 50 µl Ansätze verwendet, die auf Eis pipettiert wurden.

Pipettierschema für eine PhusionTM-PCR (50 µl):

- template DNA
- 10 µl 5x PhusionTM Reaktionspuffer HF (Finnzymes)
- 1 µl 5' Primer (10 µM)
- 1 µl 3' Primer (10 µM)
- 5 µl dNTPs (2 mM je Nukleotid; New England Biolabs)
- 0,5 µl PhusionTM DNA Polymerase (2 U/µl; Finnzymes)
- add. H₂O 50 µl

Die Polymerase wurde als letztes zugegeben und der Ansatz gut vermischt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler mit dem in Tabelle 3.5 angegebenen Programm.

Tab. 3.5: PCR Programm für die PhusionTM DNA Polymerase

Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Denaturierung	2 min	98° C	
Denaturierung	30 s	98° C	
Annealing	30 s	Primer-abhängig	30-35 Zyklen
Elongation	ca. 20 s/1000 bp	72° C	
Finale Elongation	7 min	72° C	
Kühlung	∞	4° C	

Nachdem die Reaktion beendet war, analysierte man den Erfolg der Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (s.u.).

3.2.5.3 Kolonie-PCR

Die PCR eignet sich auch dazu, bei Klonierungen von DNA Fragmenten in bakterielle Vektoren die erhaltenen Kolonien auf eine erfolgreiche Ligation hin zu überprüfen. Dabei ist es durch die Wahl der Primer möglich zu prüfen, ob das Insert vorhanden ist (5' und 3' Primer binden innerhalb der Zielsequenz), in welcher Orientierung das Insert vorliegt (5' Primer bindet im Vektor vor der Zielsequenz, der 3' Primer am 3' Ende des Inserts oder umgekehrt) bzw. ob das Insert mehrmals einkloniert wurde (5' und 3' Primer binden im Vektor vor und nach der Zielsequenz).

Kolonie-PCRs wurden immer mit der Taq DNA Polymerase (verschiedene Hersteller) in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Dazu setzte man zuerst einen Master Mix auf Eis an, der à 25 µl auf die Reaktionsgefäße verteilt wurde.

Pipettierschema für eine Kolonie-PCR (25 µl):

- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM; nur dann, wenn nicht schon im Reaktionspuffer enthalten)
- 2,5 µl Taq DNA Polymerase 10x Reaktionspuffer
- 2,5 µl dNTPs (2 mM je Nukleotid; New England Biolabs)
- 0,25 µl 5‘ Primer (10 µM)
- 0,25 µl 3‘ Primer (10 µM)
- 0,5 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl; New England Biolabs, Qiagen, Fermentas)
- add. H₂O 25 µl

Die zu testenden Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze zuerst auf eine zweite Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika übertragen, um positive Klone identifizieren zu können. Der Rest des an der Pipettenspitze haftenden Bakterienmaterials vermischt man mit dem PCR Ansatz. Die Agarplatte inkubierte man mehrere Stunden bis üN bei 37° C, um Kolonien zur Verfügung zu haben, mit denen eventuell ÜNKs angeimpft werden konnten. Kolonie-PCRs wurden mit dem in Tabelle 3.6 angegebenen Programm im Thermocycler durchgeführt.

Tab. 3.6: PCR Programm für Kolonie-PCRs

Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Denaturierung	2 min	95° C	
Denaturierung	30 s	95° C	
Annealing	30 s	Primer-abhängig	25-30 Zyklen
Elongation	ca. 1 min/1000 bp	72° C	
Finale Elongation	10 min	72° C	
Kühlung	∞	4° C	

Die Analyse der Kolonie-PCR erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (s.u.), wobei etwa die Hälfte jedes Ansatzes auf das Gel aufgetragen wurde.

3.2.6 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme, oder genauer Restriktionsendonukleasen, schneiden DNA an definierten, kurzen, palindromischen Sequenzen. Viele Restriktionsenzyme produzieren dabei kurze 5‘- oder 3‘-Überhänge, die wieder ligiert werden können. Dies macht man sich bei Klonierungen zu Nutze, indem man den Vektor und das einzufügende Insert mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Die dabei entstehenden Enden im Vektor und im Insert sind zueinander komplementär und können leicht ligiert werden.

Restriktionsverdau wurden mit Enzymen von New England Biolabs oder Fermentas durchgeführt und auf Eis pipettiert.

Standardansatz Restriktionsverdau (20 µl):

- 1 µg DNA
- 2 µl 10x Reaktionspuffer (passend zum Enzym)
- 1 µl Restriktionsenzym
- add. H₂O 20 µl

Diese Restriktionssysteme waren sehr flexibel. Das Volumen konnte einfach vergrößert werden, wobei lediglich die Menge an 10x Reaktionspuffer angepasst werden musste. Auch konnte deutlich mehr DNA eingesetzt werden, wobei ab ca. 5-6 µg 2 µl des entsprechenden Enzyms verwendet wurden. Auch der Einsatz zweier unterschiedlicher Enzyme in einer Reaktion war möglich. In dieser Arbeit wurden meist 40 µl Ansätze gewählt, in denen bis zu 10 µg DNA mit einem oder zwei verschiedenen Enzymen verdaut wurden.

Nachdem man einen Restriktionsansatz pipettiert hatte, inkubierte man ihn bei der für das/die Enzym/e idealen Temperatur (meist 37° C). Die Inkubationsdauer variierte zwischen wenigen Stunden für Plasmide, bis zu üN für PCR Produkte. Anschließend hitzeinaktivierte man die Restriktionsenzyme standardmäßig für 10 min bei 80° C, wonach die DNA für mindestens 10 min auf Eis renaturiert wurde. Analysiert werden konnte der Erfolg des Verdaus (außer bei PCR Produkten) durch Agarose-Gelelektrophorese (s.u.).

3.2.7 ,Blunten‘ von DNA Fragmenten

In bestimmten Fällen können bei Klonierungen der Vektor und das Insert nicht mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut werden, z.B. wenn die Schnittstellen des Vektors innerhalb des Inserts vorkommen. Um solch ein DNA Fragment trotzdem klonieren zu können, nutzt man aus, dass auch ‚blunt ends‘, also Enden ohne 5‘- oder 3‘-Überhänge, ligiert werden können. Oft muss jedoch der Vektor mit einem Restriktionsenzym geöffnet werden, das Überhänge produziert. Um solche Überhänge zu entfernen verwendet man gewöhnlich DNA Polymerasen mit 3‘→5‘ Exonuklease-Aktivität. Solche DNA Polymerasen füllen 5‘-Überhänge auf und entfernen 3‘-Überhänge.

In dieser Arbeit wurde zum ‚blunten‘ von DNA Fragmenten die PhusionTM DNA Polymerase benutzt (die Taq DNA Polymerase ist dazu nicht geeignet, da sie 3‘ A-Überhänge an DNA Fragmente anhängt; s.u.). Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert.

Standardansatz zum ‚blunten‘ von DNA Fragmenten (50 µl):

- 100 ng – 6 µg DNA (aufgereinigt, s.u.; PCR Produkt bzw. verdauter Vektor)
- 10 µl 5x PhusionTM Reaktionspuffer HF (Finnzymes)
- 5 µl dNTPs (2 mM je Nukleotid; New England Biolabs)
- 0,5 µl PhusionTM DNA Polymerase (2 U/µl; Finnzymes)
- add. H₂O 50 µl

Nachdem der Ansatz gründlich gemischt wurde, inkubierte man ihn für 10-15 min bei 72° C. Eine Hitzeinaktivierung des Enzyms war nicht möglich. Anschließend musste die DNA aufgereinigt (s.u.) werden.

3.2.8 Dephosphorylierung des Vektors

Klonierungen können mit einem oder zwei verschiedenen Restriktionsenzymen, oder auch ‚blunt‘ durchgeführt werden. Da bei der Verwendung nur eines Restriktionsenzymen komplementäre Enden entstehen, ist es in der sich anschließenden Ligation sehr wahrscheinlich, dass der verwendete Vektor einfach religiert, ohne das gewünschte Insert aufgenommen zu haben. Auf diese Weise entstehen bei derartigen Klonierungen sehr viele falsch positive Klone. Das gleiche Problem existiert auch bei ‚blunt‘ Klonierungen. Aus diesem Grund entfernt man enzymatisch die 5‘ Phosphatgruppen des geöffneten Vektors, die von der Ligase für das Knüpfen einer kovalenten Bindung benötigt werden und kann somit die Religation des Vektors und die damit verbundene hohe Zahl an falsch positiven Klonen deutlich reduzieren. Bei Klonierungen mit 2 Restriktionsenzymen ist dieser Schritt optional.

Zum Dephosphorylieren von Vektoren wurde in dieser Arbeit die Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP; New England Biolabs) verwendet. Die Ansätze pipettierte man auf Eis.

Standardansatz zum Dephosphorylieren von Vektoren (40 µl):

- bis zu 6 µg verdauter Vektor (aufgereinigt)
- 4 µl 10x CIP Reaktionspuffer (New England Biolabs)
- 2 µl CIP (10 U/µl; New England Biolabs)
- add. H₂O 40 µl

Nach Mischen des Ansatzes inkubierte man ihn für 1-2 h bei 37° C. Anschließend hitzeinaktivierte man das Enzym für 10 min bei 80° C. Bevor der Vektor für Ligationen eingesetzt werden konnte, musste er noch aufgereinigt werden (s.u.).

3.2.9 Aufreinigung von DNA Fragmenten und Vektoren in Lösung

Bei Klonierungen müssen die DNA Fragmente bzw. die Vektoren häufig von Puffern und Enzymen vorher stattgefunder Reaktionen befreit werden, um in der nächsten Reaktion wieder eingesetzt werden zu können. Dazu wurden in dieser Arbeit das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) bzw. das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben benutzt. Eluiert wurde bei beiden Kits standardmäßig mit 30 µl H₂O.

3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

- SB-Puffer: 10 mM NaOH
 - Borat zugeben, bis ein pH von 8,0 erreicht ist;
 - als 20x Puffer herstellen;
- 6x DNA Ladepuffer: 60% Glycerin
60 mM EDTA
0,25% Xylenxyanol
0,25% Bromphenolblau
- Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml; GERBU Biotechnik GmbH)
 - Lagerung lichtgeschützt bei 4° C;

Nukleinsäuren, die aufgrund ihrer vielen Phosphatgruppen eine negative Ladung besitzen, wandern im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Findet diese Wanderung in einer Matrix wie einem Agarose-Gel statt, hat dies eine Auf trennung der Nukleinsäuren nach der Größe zur Folge, da kleine Fragmente schneller durch das polymere Netzwerk der Agarose wandern als große. Die Trennschärfe ist dabei von der Agarosekonzentration im Gel abhängig, weshalb diese an die erwartete Größe der Fragmente angepasst werden sollte (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Trennbereiche und optimale Agarosekonzentration

Fragmentgröße (bp)	Agarose- konzentration (w/v)
1000-30000	0,5%
800-12000	0,7%
500-7000	1,0%
400-6000	1,2%
200-3000	1,5%
100-2000	2,0%

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, aufgrund der aufzutrennenden Fragmentgrößen (ca. 100-7000 bp), nur 1%ige Agarose-Gele verwendet. Dazu wurden 0,6 g Agarose (low EEO, PEQLAB) in 60 ml SB-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Nachdem die Lösung auf ca. 50° C abgekühlt war, gab man zur späteren Sichtbarmachung der DNA 3-6 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung dazu (Endkonzentration 0,5-1 µg/ml). Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV Licht orange. Die noch warme Lösung goss man in eine abgedichtete Flachbettgelkammer (Eigenbau der technischen Zentrale) und setzte einen geeigneten Kamm ein. Nachdem das Gel erstarrt war (ca. 20 min), entfernte man den Kamm und die Dichtungen und füllte die Kammer mit SB-Puffer, wobei das Gel komplett mit Puffer bedeckt wurde. Aufzutrennende Proben versetzte man mit dem entsprechenden Volumen (mindestens $\frac{1}{6}$ oder mehr) 6x DNA Ladepuffer und pipettierte sie in die Taschen des Gels. Zusätzlich trug man immer 10 µl eines Markers mit auf das Gel auf, der ein Gemisch aus definierten DNA Fragmenten enthielt, um die Größen der aufgetrennten Fragmente bestimmen zu können. Die verwendeten Marker der Firma New England Biolabs waren die 100 bp DNA Ladder (100-1500 bp), die 1 kb DNA Ladder (500-10000 bp) und die 2-Log DNA Ladder (100-10000 bp), die ja nach erwarteten Fragmentgrößen eingesetzt wurden.

Die Elektrophorese fand meist bei konstanten 100-200 V statt, konnte aber auch bei bis zu 300 V durchgeführt werden, wobei die Qualität der Auftrennung mit steigender Spannung abnahm. Nach der Elektrophorese konnte die DNA im Gel mit Hilfe eines UV Transilluminators sichtbar gemacht und mit einer CCD Kamera dokumentiert werden.

3.2.11 Gelextraktion

Die Gelextraktion dient dem Wiedergewinnen von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass auch nur DNA Fragmente einer bestimmten Größe isoliert und von anderen, unerwünschten Fragmenten abgetrennt werden können. Dazu wurde einfach die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Gelextraktionen wurden mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) oder dem QIAEX II® Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Eluiert wurde bei beiden Kits standardmäßig mit 30 µl (Promega) bzw. 20 µl H₂O (Qiagen).

3.2.12 Zwischenklonierungen mit dem TOPO® TA Cloning® Kit

Für Zwischenklonierungen von PCR Produkten wurde das TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) benutzt. Der Vorteil hier ist, dass man ein PCR Produkt stabil in den pCR®2.1-TOPO® Vektor inserieren und in *E. coli* vermehren kann. Außerdem kann man somit die oft unvollständigen und nicht kontrollierbaren Restriktionsverdaue von PCR Produkten umgehen, indem das Insert aus dem pCR®2.1-TOPO® Vektor herausgeschnitten, durch Agarose-Gelelektrophorese von diesem abgetrennt und durch Gelextraktion zurückgewonnen wird. Auf diese Weise kann der Erfolg von Ligationen mit dem eigentlichen Zielvektor gesteigert werden. Diese Methode basiert darauf, dass der Vektor im Kit bereits in einem linearisierten Zustand vorliegt. Er besitzt 3'-T Überhänge, die kovalent an die Topoisomerase I gebunden sind. Ein PCR-Produkt mit 3'-A Überhängen kann sich, durch komplementäre Basenpaarung, in den Vektor einfügen. Durch die Ligationsaktivität der Topoisomerase I wird das PCR-Produkt schließlich kovalent in den pCR®2.1-TOPO® integriert und das Enzym dissoziiert vom Vektor ab. 3'-A Überhänge werden von bestimmten DNA Polymerasen, wie der Taq oder der Tfl DNA Polymerase, an ihre PCR Produkte angefügt.

In Rahmen dieser Arbeit wurden PCR Produkte ausschließlich mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes), aufgrund ihrer sehr niedrigen Fehlerquote, hergestellt. Daher mussten die 3'-A Überhänge nachträglich mit der Taq DNA Polymerase angefügt werden. Dafür wurde auf Eis folgender Ansatz pipettiert.

Pipettierschema für das Anfügen von 3'-A Überhängen an PCR Produkte (50 µl):

- aufgereinigtes oder gelextrahiertes PCR Produkt einer 50 µl Reaktion
- 3 µl MgCl₂ (25 mM; nur dann, wenn nicht schon im Reaktionspuffer enthalten)
- 5 µl Taq DNA Polymerase 10x Reaktionspuffer
- 5 µl dNTPs (2 mM je Nukleotid; New England Biolabs)
- 0,5 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl; New England Biolabs, Qiagen, Fermentas)
- add. H₂O 50 µl

Diesen Ansatz inkubierte man anschließend für 10 min bei 72° C und stellte ihn danach bis zum Einsatz bei der TOPO®-Klonierung auf Eis. Alternativ konnte er auch bei -20° C gelagert werden. Der Ansatz konnte ohne weitere Reinigungsschritte verwendet werden. Die Ligation mit dem pCR®2.1-TOPO®, sowie die anschließende Transformation in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, im Kit enthalten) erfolgte nach Herstellerangaben. Positive Klone wurden durch Kolonie-PCR (s.o.) identifiziert und für Plasmidisolierungen (s.u.) verwendet.

3.2.13 Ligation

Für Ligationen, also das kovalente Einfügen eines DNA Fragments in ein Plasmid, wurde die T4 DNA Ligase benutzt, die sowohl komplementäre ‚sticky ends‘, als auch ‚blunt ends‘ miteinander verbinden kann. Ligationsansätze wurden auf Eis pipettiert.

Pipettierschema eines Ligationsansatzes (20 µl):

- 100-150 ng vorbereiteter Vektor
- ca. 3-20facher molarer Überschuss des Inserts (ca. 5-10 µl bei Inserts \leq 500 bp bzw. 10-15 µl bei Inserts $>$ 500 bp)
- 2 µl T4 DNA Ligase 10x Reaktionspuffer (Fermentas oder New England Biolabs)
- 1 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl; Fermentas oder New England Biolabs)
- add. H₂O 20 µl

Ligationsansätze wurden für 1-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei galt, umso größer das Insert, desto länger die Inkubationszeit. Alternativ konnten schwierige Ligationen auch üN bei 16° C durchgeführt werden. Ligationsansätze wurden immer komplett für die Transformation (s.o.) eines *E. coli* Klonierungsstammes verwendet.

3.2.14 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Isolierte Plasmid DNA wurde im Rahmen dieser Arbeit für Klonierungen, Transformationen, Sequenzierungen (s.u.) und die CFPS benötigt. Je nach benötigter Menge wurden dafür verschiedene Kits verwendet.

Kleine Mengen Plasmid DNA für z.B. Sequenzierungen und Transformationen anderer *E. coli* Stämme wurden ausgehend von 10 ml einer *E. coli* ÜNK mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) durchgeführt. Eluiert wurde hier standardmäßig in 30 µl H₂O, wobei DNA Konzentrationen von etwa 50-150 ng/µl erreicht wurden.

Große Mengen Plasmid DNA, z.B. für Restriktionsverdaue oder für die CFPS, wurden mit dem QIAGEN® Plasmid Midi Kit (Qiagen), ausgehend von 100-200 ml einer *E. coli* ÜNK nach Herstellerangaben isoliert. Bei Elution in 50 µl H₂O bewegten sich die DNA Konzentrationen zwischen 500 ng/µl und 6 µg/µl.

Plasmid DNA wurde bei -20° C gelagert.

3.2.15 DNA Sequenzierung

DNA Sequenzierungen wurden von der GENEART AG (Regensburg) durchgeführt. Benötigt wurden dafür 150-350 ng DNA in einem Volumen von 7 µl. Standardprimer (z.B. T7 Promotor oder T7 Terminator) wurden zur Verfügung gestellt. Sollte ein anderer Primer für die Sequenzierung benutzt werden, wurde von diesem 1 µl (10 µM) zur DNA dazugegeben.

3.3 Klonierung von DNA Fragmenten

DNA Fragmente, deren Sequenzen in verschiedenen Datenbanken (z.B. EMBL oder NCBI) frei zugänglich sind, wurden, bevor mit den Klonierungsarbeiten begonnen wurde, zuerst mit dem NEBcutter V2.0 auf eventuell vorhandene Restriktionsschnittstellen überprüft. Im Folgenden sind alle Schritte für die Klonierung von DNA Fragmenten, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, kurz zusammengefasst.

Gewinnung des Inserts

Die Inserts, bei denen es sich ausschließlich um proteincodierende Sequenzen handelte, wurden alle durch PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes; siehe 3.2.5.2) gewonnen. Als template DNA diente genomische DNA aus *E. coli* BL21 (siehe 3.2.2), RT-PCRs unterschiedlicher Organismen (siehe 3.2.3 und 3.2.4) oder Plasmide, in die das gewünschte Insert bereits einkloniert war. Die PCR Produkte trennte man durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.10) auf und gewann sie anschließend durch Gelextraktion (siehe 3.2.11) zurück. Die so hergestellten Inserts wurden entweder direkt mit dem/n entsprechenden Restriktionsenzym/en verdaut und waren nach einer weiteren Aufreinigung (siehe 3.2.9) bereit für die Ligation (siehe 3.2.13), oder sie wurden, nach dem Anfügen von 3'-A Überhängen, in den pCR®2.1-TOPO® Vektor inseriert und in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* transformiert (siehe 3.2.12). Positive Klone identifizierte man durch Kolonie-PCR (siehe 3.2.5.3). 10 µg der isolierten Plasmide verdaute man anschließend mit dem/n entsprechenden Restriktionsenzym/en, trennte sie durch Agarose-Gelelektrophorese vom Vektor ab und gewann sie durch Gelextraktion zurück, wonach sie für Ligationen mit dem eigentlichen Zielvektor eingesetzt wurden. Bei „blunt“-Klonierungen entfernte man zusätzlich die von den Restriktionsenzymen erzeugten Überhänge mit der Phusion™ DNA Polymerase (siehe 3.2.7) und reinigte die Fragmente erneut auf.

Vorbereitung des Vektors

4-6 µg des Vektors, in den eine Zielsequenz einkloniert werden sollte, wurden mit dem/n entsprechenden Restriktionsenzym/en verdaut (siehe 3.2.6), anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.10) aufgetrennt und mittel Gelextraktion (siehe 3.2.11) zurückgewonnen. Bei der Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen war der Vektor nun schon bereit für die Ligation (siehe 3.2.13) mit dem Insert. Wurde nur ein Restriktionsenzym verwendet, dephosphorylierte man den Vektor (siehe 3.2.8) und reinigte ihn anschließend erneut auf (siehe 3.2.9). Auch bei „blunt“-Klonierungen dephosphorylierte man den Vektor, wobei Überhänge vorher noch mit der PhusionTM DNA Polymerase entfernt wurden (3.2.7).

Ligation, Transformation und Test der Klone

Ligationsansätze (20 µl; siehe 3.2.13) wurden immer komplett für die Transformation (siehe 3.1.7) eines kompetenten (siehe 3.1.6) *E. coli* Klonierungsstammes eingesetzt und auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (siehe 3.1.5) ausplattiert. Die gewachsenen Klone überprüfte man durch Kolonie-PCR (siehe 3.2.5.3) und legte ÜNKs (siehe 3.1.1) von den Klonen an, in denen das Insert nachgewiesen werden konnte. Die daraus isolierten Plasmide (siehe 3.2.14) sequenzierte (3.2.15) man, wobei geprüft wurde, ob das Insert im gleichen Leseraster wie N- oder C-terminale tags des Vektors vorlagen. Auch wurde immer die komplette Sequenz des Inserts überprüft (NCBI Blast), um eventuelle Fehler der DNA Polymerase auszuschließen. Von fehlerfreien Klonen legte man Glycerinkulturen (siehe 3.1.4) an, um sie zu sichern und aufzubewahren. Die isolierten Plasmide dienten auch der Transformation von *E. coli* Expressionsstämmen, wobei die hierbei erhaltenen Klone nicht weiter getestet werden mussten. Auch von diesen legte man Glycerinkulturen an und konnte mit der Expression (s.u.) der klonierten, proteincodierenden Sequenz beginnen.

3.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

3.4.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Lösungen:

- Lösung A Rotiphorese[®] Gel 30 (37,5:1; 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid; Roth)
→ Lagerung lichtgeschützt;
- Lösung B 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

- Lösung D 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- 20% (w/v) SDS (Natriumdodecylsulfat)
- 10% (w/v) APS (Ammoniumpersulfat, Lagerung kurz 4°C; länger -20°C)
- TEMED (Lagerung 4° C; Roth)
- Laufpuffer 6 g/l Tris
28,8 g/l Glycin
1 g/l SDS
→ keine Einstellung des pH notwendig;
- 1x Probenpuffer 100 mM Tris-HCl (pH 6,8)
1% (w/v) SDS
10% (v/v) Glycerin
5% (v/v) β -Mercaptoethanol
Spatelspitze Bromphenolblau, bis Lösung tiefblau;
→ Lagerung lichtgeschützt;

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine sehr weit verbreitete Methode zur Auf trennung und Reinheitskontrolle von Proteinen. Sie basiert darauf, dass Proteine, die im elektrischen Feld normalerweise sehr unterschiedlich wandern, durch die Anlagerung von SDS mit negativen Ladungen versehen werden und daher alle zur positiv geladenen Anode wandern. Zusätzlich werden die Proteine durch das SDS denaturiert und Disulfidbrücken werden durch den im Probenpuffer enthaltenen β -Mercaptoethanol reduziert. Wandern diese denaturierten Polypeptidketten nun durch ein Acrylamid-Gel, hat dies eine Auf trennung nach der Größe zur Folge, da kurze Polypeptidketten das polymere Netzwerk schneller Durchwandern können als große.

Zum Gießen eines SDS-Gels säuberte man zunächst zwei Glasplatten, zwei Spacer, eine Dichtung und einen Gelkamm mit 70% Ethanol bzw. Isopropanol. Anschließend fixierte man die beiden Glasplatten mit eingesetzter Dichtung und seitlichen Spacern mit mehreren Klammern. Dann wurde der Gelkamm eingesetzt, etwa 1-1,5 cm darunter eine Markierung gesetzt und der Kamm wieder entfernt. Bis zu dieser Markierung goss man anschließend das, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine konzentrierte, Trengel (Tab. 3.8) und überschichtete es sofort mit H_2O bzw. Isopropanol. Nach ca. 10-15 min war das Trengel polymerisiert und man entfernte das H_2O bzw. den Isopropanol und goss das Sammelgel (Tab. 3.9) darauf und setzte den Gelkamm ein. Etwa 20-30 min war auch das Sammelgel polymerisiert und die Klammern, der Gelkamm sowie die Dichtung wurden entfernt. Das Gel

war nun bereit zum Beladen oder konnte bis zu einer Woche, eingewickelt in ein feuchtes Tuch und eine Plastiktüte, bei 4° C gelagert werden.

Tab. 3.8: Zusammensetzung Trenngel (2 Minigele)

	8%	10%	12%	15%	16%
Lösung A	2,5 ml	3,125 ml	3,75 ml	4,5 ml	4,8 ml
Lösung B			5 ml		
20% SDS			50 µl		
H₂O	2,35 ml	1,7 ml	1,05 ml	0,35 ml	50 µl
10% APS			100 µl		
TEMED			10 µl		

Tab. 3.9: Zusammensetzung Sammelgel (2 Minigele)

	5%
Lösung A	1,5 ml
Lösung D	2,55 ml
20% SDS	50 µl
H₂O	5,85 ml
10% APS	100 µl
TEMED	10 µl

Zum Beladen wurden die Gele in eine Gelkammer eingesetzt, die mit Laupuffer gefüllt wurde. Aufzutrennende Proben wurden mindestens 1:1 mit Probenpuffer gemischt und 2-10 min bei 95° C erhitzt. Nachdem die Proben abgekühlt waren, konnten sie in die Taschen des Gels pipettiert werden. Zusätzlich wurden immer 10 µl eines Größenstandards auf das Gel mit aufgetragen, um die aufgetrennten Polypeptide identifizieren zu können. Die verwendeten Standards waren der SDS7 Molecular Weight Marker (14-66 kDa; Sigma-Aldrich) und der Page RulerTM Unstained Protein Ladder (10-200 kDa; Fermentas). Falls das Gel für einen späteren Western Blot (s.u.) verwendet werden sollte, wurde auch gelegentlich der Page RulerTM Prestained Protein Ladder (10-170 kDa; Fermentas) verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte anschließend bei konstanten 30-40 mA/Gel und wurde beendet, sobald die Bromphenolblaufront das untere Gelende erreicht hatte. Anschließend öffnete man die Glasplatten und färbte das Gel entweder mit Coomassie Brilliant Blue (s.u.) oder verwendete es im Western Blot (s.u.).

3.4.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

- Lösungen:*
- Coomassie-Färbelösung 2 g/l Coomassie Brilliant Blue R 250
0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue G 250
45% (v/v) Ethanol (100%)
10% Essigsäure (100%)
 - Coomassie-Entfärber 20% Ethanol (100%)
10% Essigsäure (100%)

Um Proteinbanden auf SDS-Gelen sichtbar zu machen, wurden die Gele ohne Sammelgel üN in Coomassie-Färbelösung geschwenkt, wodurch Proteine spezifisch angefärbt wurden. Alternativ konnten die Gele auch in der Färbelösung kurz aufgekocht (Mikrowelle) werden, wodurch sich die Färbezeit auf etwa 30 min verkürzte. Anschließend schwenkte man die Gele mehrere Stunden im Coomassie-Entfärbler, wobei dieser mehrmals gewechselt wurde. Auch die Entfärbzeit konnte durch Aufkochen verkürzt werden.

3.4.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine hochspezifische Methode, mit der auch kleine Mengen bestimmter Proteine (ab ca. 10 ng) in Proben nachgewiesen werden können, die durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

3.4.3.1 Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran

<i>Lösungen:</i>	<ul style="list-style-type: none"> • WB-Puffer • TBST • 10% Milch in TBST → pH 7,4-7,6 • Ponceau S 	<ul style="list-style-type: none"> 25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol → pH 8,3 150 mM NaCl 10 mM Tris 0,1% (v/v) Tween[®] 20 → pH 7,4 0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (v/v) Trichloressigsäure
------------------	--	--

Nach erfolgter SDS-PAGE markierte man die Orientierung des Gels (rechte untere Ecke weg), entfernte das Sammelgel und äquilibrierte es 10 min in WB-Puffer. In der Zwischenzeit schnitt man sechs Whatman Filterpapiere und eine Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran BA83 für Proteine \leq 20 kDa, Whatman Protran BA85 für Proteine $>$ 20 kDa) exakt auf Gelgröße zu. Die Orientierung der Membran wurde wie die des Gels markiert. Anschließend baute man den Western Blot, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, auf, wobei die Filterpapiere und die Membran in WB-Puffer getränkt wurden. Überschüssigen Puffer entfernte man mit einem Papiertuch.

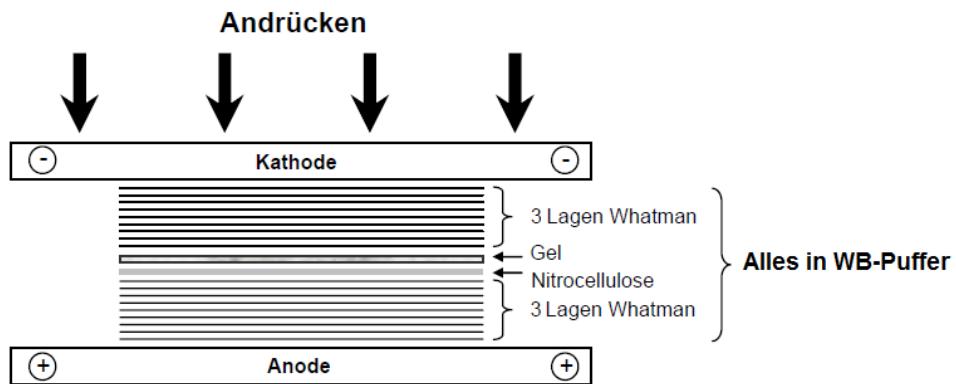


Abb. 3.1: Aufbau eines Western Blots

3 Lagen Whatman Filterpapier, getränkt in WB-Puffer, wurden mittig auf den Blotter gelegt, wobei nach jeder Lage Luftblasen mit einem Zentrifugenröhrenchen (vorsichtig darüber rollen) entfernt wurden. Dann wurden die Membran, die ebenfalls in WB-Puffer getränkt wurde, und das Gel aufgelegt. Es folgten noch einmal 3 Lagen Whatman Filterpapier, wobei man Luftblasen wieder mit dem Zentrifugenröhrenchen entfernte.

Der Proteintransfer erfolgte für 45 min bei konstanten 15 V. Nach dem Transfer inkubierte man die Membran für 3-5 min in Ponceau S, um die Proteine zu Färben und den Erfolg des Transfers zu überprüfen. Falls kein vorgefärbter Marker verwendet wurde, markierte man die nun sichtbaren Marker-Banden mit einem Spatel. Anschließend spülte man die Membran mehrmals in H₂O, um die Färbung wieder zu entfernen. Sollte die Detektion der Proteine über Antikörper erfolgen, sättigte man die Membran in 10% Milch in TBST ab (1-2 h Schwenken bei Raumtemperatur oder üN bei 4° C). Bei Detektion mit dem Universal His Western Blot Kit 2.0 (Clontech) inkubierte man die Membran in PBST1 (siehe Herstellerprotokoll; 30 min Schwenken bei Raumtemperatur oder üN bei 4° C).

3.4.3.2 Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern

Nach der Absättigung inkubierte man die Membran für 1 h unter Schwenken bei Raumtemperatur in 10 ml des in 10% Milch in TBST verdünnten Primärantikörpers (siehe 2.1.3). Der erste Antikörper war dabei spezifisch für das nachzuweisende Protein. Anschließend spülte man die Membran kurz mit TBST und wusch sie für 3x 10 min unter Schwenken in TBST. War der Primärantikörper bereits an eine Peroxidase gekoppelt, konnte bereits jetzt die Detektion per ECL („enhanced chemiluminescence“) erfolgen. War dies nicht der Fall, inkubierte man die Membran noch für 1 h unter Schwenken bei Raumtemperatur mit einem Sekundärantikörper, der ebenfalls in 10 ml 10% Milch in TBST verdünnt wurde (siehe 2.1.3). Der Sekundärantikörper war gegen den Primärantikörper gerichtet und an eine Peroxidase gekoppelt. Anschließend spülte und wusch man die Membran wie zuvor in TBST.

Die Detektion der Peroxidase erfolgte mit den ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham). Dazu mischte man Solution A und Solution B im Verhältnis 40:1 (z.B. 1 ml + 25 µl) und inkubierte darin die Membran für ca. 2-5 min. Anschließend packte man die Membran luftblasenfrei in Folie ein und legte in der Dunkelkammer einen Röntgenfilm (GE Healthcare) auf. Die Expositionszeit ist variabel und muss jedes Mal neu empirisch bestimmt werden (wenige Sekunden bis Stunden, am besten mit wenigen Minuten beginnen). Anschließend inkubierte man den Röntgenfilm wenige Minuten in einem Entwicklerbad, spülte ihn mit H₂O, inkubierte ihn wenige Minuten in einem Fixiererbad, spülte ihn noch einmal gründlich mit H₂O und ließ ihn trocknen.

3.4.3.3 Spezifischer Nachweis von His₆- und (HN)₆-tags

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen mit His₆- oder (HN)₆-tags wurde neben Antikörpern auch das Universal His Western Blot Kit 2.0 (Clontech) nach Herstellerangaben verwendet. Dieses Kit basiert auf der Bindung des TALON® Metal Affinity Resin mit gekoppeltem Biotin an His₆- oder (HN)₆-tags. Das Biotin wird wiederum von Streptavidin mit einer gekoppelten Peroxidase erkannt. Auch hier erfolgte die Detektion über ECL, wobei die erforderlichen Reagenzien im Kit enthalten waren.

3.4.4 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Lösungen: • 1 M IPTG → Lagerung bei -20° C

Für Proteinexpressionen musste die entsprechende proteincodierende Sequenz, einkloniert in ein entsprechendes Plasmid, unter dem Einfluss eines T7- oder *E. coli* Promotors, in einem geeigneten *E. coli* Expressionsstamm (siehe 2.1.1) vorliegen. Von dem entsprechenden Stamm legte man zuerst eine ÜNK an, mit der eine weitere Flüssigkultur (siehe 3.1.1) im Verhältnis von 1:20 angeimpft wurde. Diese Kultur inkubierte man, je nach zu exprimierenden Protein, unter Schütteln (160-220 rpm) meist bei 30° C oder 37° C, bis sie eine OD₆₀₀ (siehe 3.1.3) von etwa 0,5-0,8 erreichte (je nach Temperatur 1,5-4 h). Anschließend induzierte man die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG. Die Endkonzentration, die empirisch ermittelt werden muss, variiert hier zwischen 100 µM und 1 mM. Anschließend inkubierte man die Kultur weiter bei derselben Temperatur unter Schütteln. Die Expressionsdauer muss auch hier empirisch ermittelt werden und reicht von

etwa 2 h bis üN. Häufig verwendete Expressionsbedingungen waren 4 h bei 37° C und üN bei 30° C, jeweils in Anwesenheit von 1 mM IPTG. Nach der Expression erntete man die Bakterien durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 3000-4000g und 4° C. Die Pellets wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C gelagert.

Überprüft wurde die Proteinexpression, indem vor der Zugabe von IPTG eine 1 ml Probe der Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und dieses unter den gleichen Bedingungen wie die eigentliche Kultur inkubiert wurde. Nach Beendigung der Expression entnahm man eine weitere 1 ml Probe und zentrifugierte diese, zusammen mit der ersten, bei 13000 rpm für 5 min in der Tischzentrifuge. Die Bakterienpellets nahm man anschließend in je 80 µl Probenpuffer auf. Jeweils 10 µl dieser Proben trennte man dann in einer SDS-PAGE (siehe 3.4.1) auf und analysierte die Proteinexpression nach Coomassie-Färbung (siehe 3.4.2). Falls ein Protein das erste Mal exprimiert wurde, empfahl sich auch ein spezifischer Nachweis im Western Blot (siehe 3.4.3).

3.4.5 Reinigung von Proteinen mit His₆-tag mit Ni-NTA Spin Columns

Lösungen: siehe Tab. 3.10;

Tab. 3.10: Standardpuffer und -lösungen für His₆-tag Reinigungen von Proteinen

	Native Bedingungen (4° C)	Denaturierende Bedingungen
Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol → pH 8,0	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-HCl → pH 8,0
Lysozym/DNase I	100 mg/ml Lysozym mit Spatelspitze DNase I	-
Waschpuffer	Wie Lysepuffer, aber 20 mM Imidazol	Wie Lysepuffer → pH 6,3
Elutionspuffer	Wie Lysepuffer, aber 250 mM Imidazol	Wie Lysepuffer → pH 4,5
Neutralisierungspuffer	-	1 M Tris-HCl → pH 9,5

Im Rahmen dieser Arbeit wurden meist nur kleine Mengen an gereinigtem Protein benötigt, die man mit Hilfe der Ni-NTA Spin Columns (Qiagen), gewann. Die Reinigungen basieren auf der Bindung von His₆-tags an die Nickelionen der Säulenmatrix, wobei diese durch saure pH Werte oder hohe Imidazolkonzentrationen wieder eluiert werden können. Als Ausgangsmaterial dienten gefrorene Bakterienpellets (-20° C; 25-100 ml Kulturvolumen) aus Proteinexpressionen (siehe 3.4.4). Reinigungen wurden unter nativen und, wenn nötig, auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Allgemein arbeitete man unter nativen Bedingungen bei 4° C, unter denaturierenden Bedingungen bei Raumtemperatur. Die bei jedem Schritt erforderlichen Zentrifugationen der Spin Columns erfolgten in der Tischzentrifuge bei 2000-3000 rpm für 2 min.

Zellaufschluss und Klären der Lysate

Bei Reinigungen unter nativen Bedingungen taute man das entsprechende Bakterienpellet für 15 min auf Eis auf und resuspendierte es in 1 ml Lysepuffer. Dann gab man 10 µl der frisch angesetzten Lysozym/DNase I-Lösung (Endkonzentration Lysozym: 1 mg/ml) zu und inkubierte den Ansatz für 30 min auf Eis. Nach einer kurzen Sonifikation klärte man das Lysat durch eine 30 minütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 13000 rpm und 4° C. Der Überstand wurde anschließend für die Reinigung verwendet.

Wählte man für die Reinigung denaturierende Bedingungen, taute man das entsprechende Bakterienpellet für 15 min bei Raumtemperatur auf und resuspendierte es ebenfalls in 1 ml Lysepuffer. Nach einer 1 stündigen Inkubation unter Bewegung bei Raumtemperatur, wobei nach 30 min meist eine kurze Sonifikation erfolgte, zentrifugierte man das Lysat wie unter nativen Bedingungen, jedoch bei Raumtemperatur. Der daraus resultierende Überstand wurde weiterverwendet.

Reinigung

Die Reinigungen mit den Spin Columns waren unter nativen und denaturierenden Bedingungen, bis auf die verschiedenen Puffer und Temperaturen, identisch. Zuerst äquilibrierte man die Säule mit 600 µl Lysepuffer und belud sie anschließend mit 2x 500 µl des geklärten Lysats. Unspezifisch gebundene Proteine entfernte man dann durch Waschen der Säule mit 3x 600 µl Waschpuffer und eluierte die Proteine anschließend mit 2x 200 µl Elutionspuffer. Unter denaturierenden Bedingungen wurde zu den Elutionsfraktionen sofort jeweils $1/10$ Volumen (20 µl) Neutralisierungspuffer gegeben, um eine saure Hydrolyse des gereinigten Proteins zu vermeiden. Man kontrollierte den Verlauf der Reinigung, indem man

von jeder anfallenden Fraktion (Lysat, geklärtes Lysat, Wasch- und Elutionsfraktionen) Proben entnahm und davon 5 µl per SDS-PAGE analysierte.

Die Elutionsfraktionen vereinigte man und pufferete das gereinigt Protein eventuell durch eine Dialyse (s.u.) um. Anschließend bestimmte man den Proteingehalt der Lösung und stellte das gereinigte Protein, durch Verdünnen oder Aufkonzentrieren, auf die gewünschte Konzentration ein (s.u.). Die gereinigten Proteine fror man grundsätzlich mit flüssigem N₂ ein und lagerte sie bei -80° C.

Bei dem hier beschriebenen Protokoll handelt es sich um ein Standardprotokoll, mit dem nicht alle in dieser Arbeit benötigten Proteine gewonnen werden konnten. Bei einigen mussten andere Pufferbedingungen gewählt werden, um „saubere“ Proteine zu erhalten. Nötige, proteinspezifische Modifikationen dieses Protokolls sind im Ergebnisteil angegeben.

3.4.6 Reinigung von Proteinen im Batch-Verfahren

Lösungen: His₆-tag Reinigung: siehe Tab. 3.10;

GST-tag Reinigung:

- PBS 140 mM NaCl
2,6 mM KCl
6,4 mM Na₂HPO₄
1.4 mM KH₂PO₄
→ pH 7,4; Lagerung bei 4° C
- PBS mit 1% (v/v) Triton® X-100

MBP-tag Reinigung: • PBS (s.o.)

- Lysozym/DNase I 100 mg/ml Lysozym mit Spatelspitze DNase I

Proteine, die als Fusionsprotein mit MBP oder GST exprimiert wurden, reinigte man grundsätzlich im Batch-Verfahren auf, wobei gelegentlich auch His₆-tag Reinigungen auf diese Weise durchgeführt wurden. GST-, MBP- und native His₆-tag Reinigungen fanden bei 4° C statt, denaturierende His₆-tag Reinigungen bei Raumtemperatur. Tabelle 3.11 gibt einen Überblick über verwendetes Matrixmaterial sowie über benötigte Matrixvolumen. Die beim Waschen und Eluieren der Matrices benötigten Zentrifugationen fanden, unabhängig vom verwendeten Matrixmaterial, für 5 min bei 500g statt. Als Ausgangsmaterial dienten auch hier gefrorene Bakterienpellets aus Proteinexpressionen (-20° C; 200 ml - 1 l Kulturvolumen).

Tab. 3.11: Verwendete Matrixmaterialien und benötigte Volumen

Reinigung	Matrixmaterial	Hersteller	Matrixvolumen*	Benötigte Originalsuspension
GST-tag	Glutathion Sepharose™ 4B	Amersham	$\frac{1}{2000}$ des eingesetzten Kulturvolumens	Matrixvolumen x 1,33, da 75%ige Suspension
MBP-tag	Amylose Resin	New England Biolabs		Matrixvolumen x 1,33, da 75%ige Suspension
His₆-tag	Ni-NTA Superflow	Qiagen		Matrixvolumen x 2, da 50%ige Suspension

(*) Richtwert; muss je nach Expression des Zielproteins angeglichen werden;

Vorbereitung der Matrixmaterialien

Die entsprechenden Volumen der Originalsuspensionen (siehe Tab. 3.11) zentrifugierte man ab und verwarf den Überstand. Anschließend wurden die verschiedenen Matrixmaterialien 2x mit dem 10fachen Volumen des entsprechenden Puffers gewaschen und abschließend 1:1 in den entsprechenden Puffer aufgenommen. Bei His₆-tag Reinigungen verwendete man hierfür den Lysepuffer, bei GST- und MBP-tag Reinigungen PBS.

Zellaufschluss und Klären der Lysate

Die Bakterienpellets wurden in $\frac{1}{20}$ des ursprünglichen Kulturvolumens aufgenommen, wobei bei Proteinen mit His₆-tag Lysepuffer, bei GST-tag PBS mit 1% (v/v) Triton® X-100 und bei MBP-tag PBS verwendet wurde. Die Lyse erfolgte bei nativer His₆-tag und bei MBP-tag Reinigung durch die Zugabe von 10 µl/ml der frisch angesetzten Lysozym/DNase I-Lösung und dem anschließendem 30 minütigem Rühren auf Eis, worauf noch eine Sonifikation folgte. Bei denaturierenden His₆- und GST-tag Reinigungen lysierte man die Zellen durch 1 stündiges Rühren bei Raumtemperatur bzw. auf Eis, wobei nach 30 min sonifiziert wurde. Alle Lysate klärte man durch Zentrifugation bei 10000g für 15 min. Die Überstände wurden in den nächsten Schritten weiterverwendet.

Reinigung

Die geklärten Lysate inkubierte man für 2 h unter Bewegung mit den entsprechenden vorbereiteten Matrixmaterialien und zentrifugierte sie anschließend bei 500g für 5 min. Die Überstände wurden verworfen und das jeweilige Matrixmaterial anschließend 3x mit dem 10fachen Volumen Puffer gewaschen. Bei Proteinen mit His₆-tag verwendete man hier den entsprechenden Waschpuffer, während für Proteine mit GST- oder MBP-tag PBS verwendet wurde. Bei His₆-tag Reinigungen eluierte man das gebundene Protein nun 3x mit jeweils

einem Matrixvolumen Elutionspuffer und behandelte die Proteine weiter wie im vorigen Punkt beschrieben. Proteine mit GST- oder MBP-tag eluierte man nicht mit einem Puffer, sondern trennte das Zielprotein durch einen Proteaseverdau vom Matrixmaterial ab. Der Vorteil besteht darin, dass sich auf diese Weise das Zielprotein ohne tag von der Matrix löst und leicht von GST oder dem MBP getrennt werden kann, das an die Matrix gebunden bleibt. Dazu nahm man nach dem Waschen zunächst die Matrix 1:1 in PBS auf und überführte sie in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß.

Proteaseverdau

Das Abspalten der Zielproteine von den tags erfolgte in dieser Arbeit entweder durch Thrombin oder den Faktor Xa, je nachdem welche Schnittstelle im verwendeten Plasmid codiert war. Standardmäßig erfolgten die Proteaseverdaue üN unter Bewegung bei 4° C. Der Faktor Xa wurde in Mengen von 1-5% (w/w) des aufgereinigten Fusionsproteins zugesetzt. Thrombin verwendete man standardmäßig in Konzentrationen von 5 U/100 ml ursprünglichen Kulturvolumens, wobei hier zuerst eine frische Thrombinlösung in PBS hergestellt werden musste. Die Dauer und die Temperatur, bei der die Verdaue inkubiert werden, sowie die Mengen an zugesetzter Protease sind sehr variabel und müssen für jedes Protein empirisch ermittelt werden. Die hier angegebenen Bedingungen sind sehr mild und eignen sich für einen ersten Test. Bei unvollständigem Verdau wird entsprechend mehr Enzym und/oder eine höhere Inkubationstemperatur (z.B. Raumtemperatur oder 37° C) benötigt.

Nach dem Proteaseverdau zentrifugierte man die Ansätze bei 500g für 5 min und bewahrte den Überstand, der nun das Zielprotein ohne tag enthalten sollte, auf. Anschließend nahm man die Matrix noch zwei weitere Male 1:1 in PBS auf, zentrifugierte die Matrix ab und sammelte die Überstände. Diese drei Elutionsfraktionen wurden anschließend vereinigt und mussten noch von der verwendeten Protease gereinigt werden.

Entfernung verwendeter Proteasen durch Benzamidin

Zur Entfernung der Proteasen aus den Elutionsfraktionen verwendete man eine 1 ml HiTrap™ Benzamidine FF (high sub) Säule (Amersham). Benzamidin bindet spezifisch an Serinproteasen wie Thrombin oder den Faktor Xa. Dabei wurden, aufgrund der meist sehr kleinen Volumen, alle Lösungen bei Raumtemperatur langsam mit einer sterilen Spritze durch die Säule gedrückt. Zuerst spülte man die Säule mit etwa 5 Säulenvolumen H₂O, um den 20%igen Ethanol zu entfernen, in dem die Säule gelagert wird. Anschließend äquilibrierte man die Säule mit 5-10 Säulenvolumen PBS und trug dann die vereinigten Elutionsfraktionen auf die Säule auf. Dann drückte man weitere 5 Säulenvolumen PBS langsam durch die Säule

und der Durchlauf, der nun das gereinigte Protein ohne die verwendete Protease enthalten sollte, wurde gesammelt. Anschließend regenerierte man die Säule nach Herstellerangaben.

Das gereinigte Protein wurde dann, falls nötig, durch eine Dialyse (s.u.) umgepuffert und durch Verdünnen oder Aufkonzentrieren (s.u.) auf die gewünschte Konzentration eingestellt, mit flüssigem N₂ eingefroren und bei -80° C gelagert.

Der Verlauf der Reinigung wurde auch hier kontrolliert, indem man bei jedem Schritt und von jeder anfallenden Fraktion Proben entnahm und von diesen 5 µl in einer SDS-PAGE auftrennte und analysierte.

Auch bei diesem Protokoll handelt es sich um ein Standardprotokoll. Falls für die Reinigung bestimmter Proteine Modifikationen erforderlich waren, sind diese im Ergebnisteil angegeben.

3.4.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford)

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung wurde Roti[®]-Quant (5x Konzentrat; Roth) benutzt. Vor der Verwendung verdünnte man die Lösung 1:5 mit H₂O und filterte sie durch einen Faltenfilter. Bevor Proteinkonzentrationen bestimmt werden konnten, musste jede neu angesetzte Lösung geeicht werden. Dazu gab man je 1 µl von BSA-Lösungen in H₂O mit verschiedenen Konzentrationen (meist 0,5-20 mg/ml) zu jeweils 1 ml der Bradfordlösung, mischte gründlich, inkubierte sie für 5 min bei Raumtemperatur und bestimmte die OD₅₉₅ am Photometer, gemessen gegen die Bradfordlösung ohne Protein als Leerwert. Aus den erhaltenen Werten erstellte man eine Eichgerade. Zur Ermittlung von Proteinkonzentrationen mischte man 1-10 µl der Proteinlösung mit 1 ml der Bradfordlösung, inkubierte den Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur und ermittelte die OD₅₉₅ am Photometer, wieder gemessen gegen die Bradfordlösung ohne Protein als Leerwert. Mit Hilfe der Eichgeraden konnte dann die Proteinkonzentration berechnet werden.

3.4.8 Dialyse von Proteinen

Nach der Aufreinigung von Proteinen liegen diese oft in Puffern vor, die für Folgeexperimente ungeeignet sind. Die Dialyse ist eine einfache Methode, Proteine in einen

neuen Puffer zu überführen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Dialyseschläuche und DialyseSysteme der Firmen Roth und Pierce verwendet, wobei die Ausschlussgrößen je nach Protein ausgewählt wurden. Vor Gebrauch mussten die Dialyseschläuche bzw. -Systeme für mindestens 20 min in H₂O und anschließend noch einmal für 20 min in den Puffer, gegen den dialysiert werden sollte, eingelegt werden. Anschließend gab man die Proteinlösung hinein, verschloss sie sorgfältig und befestigte einen Schwimmer daran. Dialysiert wurde immer für mindestens 1-2 h bei 4° C unter leichtem Rühren gegen 2 l des neuen Puffers. Dann wechselte man den Puffer aus und dialysierte üN weiter.

3.4.9 Konzentrieren proteinhaltiger Lösungen

Waren proteinhaltige Lösungen für die gewünschte Anwendung nicht konzentriert genug, mussten diese aufkonzentriert werden. Dafür verwendete man Konzentratoren der Vivaspin-Serie (Sartorius Stedim Biotech), bei denen die Konzentrierung durch Ultrafiltration in der Zentrifuge stattfindet und die in verschiedenen Größen für unterschiedliche Volumen erhältlich sind. Die jeweilige Ausschlussgröße der Ultrafiltrationsmembran wurde passend zum Protein ausgewählt. Bevor diese Konzentratoren verwendet werden konnten, mussten sie zuerst mit dem entsprechenden Puffer, in dem sich auch das zu konzentrierende Protein befindet, gefüllt und in der Zentrifuge für 10 min gespült werden, um Reste von Glycerin auf der Membran zu entfernen. Anschließend gab man die Proteinlösung hinein und zentrifugierte schrittweise (z.B. immer für 15 min) bei 4° C, wobei der Fortschritt der Konzentrierung ständig kontrolliert wurde. Die benötigte Zentrifugalkraft war bei verschiedenen Konzentratoren unterschiedlich und wurde nach Herstellerangaben eingestellt. Wichtig hier war, dass das Konzentrat gelegentlich resuspendiert wurde, um ein Verstopfen der Ultrafiltrationsmembran zu verhindern. Auch beim Entnehmen des Konzentrats sollte zuvor gründlich resuspendiert werden, um Verluste gering zu halten.

3.4.10 Fällen von Proteinen

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden angewandt, um Proteine aus wässrigen Lösungen zu fällen. Proteine für die SDS-PAGE fällte man denaturierend mit Methanol/Chloroform, während Proteine, mit denen noch weitergearbeitet werden sollte, nativ mit Aceton gefällt wurden.

Denaturierende Fällung mit Methanol/Chloroform

Standardmäßig wurden immer 600 µl einer wässrigen Proteinlösung gefällt, wobei kleinere Volumen mit H₂O auf 600 µl aufgefüllt wurden. Dazu gab man 600 µl (1 Volumen) -20° C kalten Methanol (100%) und 150 µl (1/4 Volumen) Chloroform (100%). Den Ansatz mischte man gründlich durch kräftiges Schütteln, inkubierte ihn für 10 min auf Eis und zentrifugierte ihn bei 13000 rpm für 5 min in der Tischzentrifuge. Danach war der Ansatz in drei Phasen unterteilt, wobei eine weiße, pelletartige Interphase von den Proteinen gebildet wurde. Diese überführte man mit einem Spatel in ein frisches Reaktionsgefäß mit etwas Methanol und zentrifugierte erneut bei 13000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend konnte es in das entsprechende Volumen Probenpuffer aufgenommen werden.

Native Fällung mit Aceton

Zu wässrigen Proteinlösungen gab man 3 Volumen -20° C kaltes Aceton (100%) und mischte gründlich durch Schütteln. Anschließend inkubierte man den Ansatz für mindestens 30 min bis üN bei -20° C und zentrifugierte ihn anschließend bei 13000 rpm und 4° C für 15 min in der Tischzentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Dann konnte man die Proteine im entsprechenden Volumen eines neuen Puffers aufnehmen.

3.4.11 Lyophilisieren von Proteinen

Wässrige Proteinlösungen wurden in einigen Fällen zur Haltbarmachung der Proteine gefriergetrocknet. Dazu wurde ein Lyophilisiersystem aus Kühlfalle (RCT 60; Jouan) und SpeedVac (RC 10; Jouan) verwendet. Die Proteinlösungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden zuerst in flüssigem N₂ eingefroren und mit einem zweiten Deckel verschlossen, der von einem anderen 1,5 ml Reaktionsgefäß abgeschnitten wurde und in den man einige Löcher gestochen hatte. Lyophilisiert wurde, je nach Probenvolumen, für wenige Stunden (50 µl) bis üN (1 ml).

3.4.12 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach der Größe, die auf Wechselwirkungen von Proteinen mit den Poren eines Säulenmaterials beruht. Große Proteine wechselwirken dabei schwächer und verlassen eine Gelfiltrationssäule somit früher als kleine, die aufgrund der stärkeren Wechselwirkungen langsamer durch die Säule wandern. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Gelfiltrationssäulen verwendet. Eine große HiLoadTM 26/60 mit einem Volumen von etwa 320 ml und eine kleine HiLoadTM 16/60 mit einem Volumen von etwa 120 ml (beide GE Healthcare). Als Säulenmaterial diente bei beiden SuperdexTM 75 prep grade (GE Healthcare). Gelfiltrationen wurden an der FPLC (ÄKTATM) bei 4° C durchgeführt. Dazu wurde die Säule zuerst mit einigen Säulenvolumen H₂O durchgespült und anschließend mit ca. 2-3 Säulenvolumen Laupuffer (der Puffer, in denen sich auch die aufzutrennenden Proteine befinden) äquilibriert (Flussrate ca. 2-3 ml/min). Anschließend trug man die aufzutrennende Proteinlösung, dessen Volumen möglichst klein ($\leq 1,5$ ml) sein sollte, auf die Säule auf und startete den Lauf mit dem entsprechenden Laupuffer (Flussrate 1 ml/min). Das Volumen der gesammelten Fraktionen war variabel und von der Säulengröße und der Anwendung abhängig (siehe Ergebnisteil). Nach der Gelfiltration spülte man die Säule mit einigen Säulenvolumen H₂O und lagerte sie anschließend in 20% Ethanol bei 4° C (Flussrate ca. 2-3 ml/min).

3.5 Methoden zur zellfreien Proteinsynthese

3.5.1 Entfernung von RNasen von Arbeitsmaterialien

CFPS Reaktionen reagieren sehr empfindlich auf Kontaminationen mit RNasen, die praktisch überall zu finden sind. Aus diesem Grund verwendete man für die Herstellung der S30 Extrakte und die Durchführung von Reaktionen nur RNase-freie Plastikware (Pipettenspitzen, Falcons, 1,5 ml Reaktionsgefäß, usw.). Die für die Herstellung der Extrakte benötigten Glaswaren (Flaschen, 500 ml und 2x 2 l Messzylinder, 2 Bechergläser und 2 Glasstäbe), Rührfische, Spatel und Pinzetten verschloss bzw. verpackte man mit Alufolie und inkubierte sie zur Inaktivierung von RNasen für etwa 6-8 h bei 200° C im Ofen. Die benötigten Zentrifugenbecher (2x 1 l, 1x 250 ml und 2x 25 ml) und Dialyseklammern behandelte man mit RNase AWAY[®] (Roth), spülte sie mit RNase-freiem Wasser nach und ließ sie lufttrocknen. Auch das verwendete Wasser für alle Puffer ist eine Quelle für Kontaminationen

mit RNasen. Es wurde nur das Wasser aus der PURELAB Ultra (Elga) Wasseraufbereitungsanlage verwendet, das eine ausreichend hohe Qualität aufwies.

3.5.2 Herstellung der *E. coli* S30 Extrakte

Lösungen:

- 2x YT-Medium 16 g/l Bakto-Trypton
10 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
→ autoklavieren; Lagerung bei 4° C;
- S30-Puffer 10 mM Tris-Acetat, pH 8,2
60 mM KOAc
14 mM Mg(OAc)₂
→ als 50x Puffer herstellen, sterilfiltrieren;
→ Lagerung bei 4° C;
- β-Mercaptoethanol (210 µl vor Gebrauch zu 500 ml S30-Puffer geben;
→ Endkonzentration 6 mM)
- 1 M DTT (vor Gebrauch 1:1000 zu S30-Puffer geben; Lagerung bei -20° C;
→ Endkonzentration 1 mM)
- 4 M NaCl → sterilfiltrieren; Lagerung bei 4° C;

Das hier vorgestellte Protokoll der Herstellung der *E. coli* S30 Extrakte ist das Ergebnis der Optimierung des Protokolls von Roland Hofweber (Hofweber, 2006; Doktorarbeit) und basiert auf den Protokollen von Pratt (1984) und Kigawa *et al.* (2004). Die einzelnen Schritte, die zur Entwicklung dieses Protokolls geführt haben, sowie die damit verbundenen Verbesserungen, sind im Ergebnisteil beschrieben.

1,5 l 2x YT-Medium in einem 5 l Erlenmeyerkolben, den man üN auf 37° C vorwärmte, wurden mit 50 ml einer *E. coli* BL21 StarTM (DE3) (Invitrogen; siehe 2.1.1) ÜNK in 2x YT-Medium angeimpft und bei 37° C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,2 kultiviert (ca. 1,5-2 h). Diese Kultur kühlte man dann durch 10 minütiges Schwenken in einem Eiswasserbad ab und verteilte sie auf zwei in Eis vorgekühlte 1 l Zentrifugenbecher. Die Zellernte erfolgte bei ca. 2600g und 4° C für 30 min (Beckman Model J-6B mit Rotor JS-4.2). Die Bakterienpellets resuspendierte man mit Hilfe eines Glasstabes in insgesamt 200 ml kaltem S30-Puffer mit 6 mM β-Mercaptoethanol auf Eis und überführte sie in einen auf Eis vorgekühlten 250 ml Zentrifugenbecher. Diesen zentrifugierte man bei 4000g und 4° C für 10 min (Beckman AvantiTM J-25 mit Rotor JLA-16.250) und resuspendierte das Pellet, wieder

auf Eis, mit dem Glasstab in 100 ml kaltem S30-Puffer mit 6 mM β -Mercaptoethanol. Diesen Waschschritt wiederholte man noch zwei weitere Male, wobei beim letzten bei 10000g zentrifugiert wurde. Das daraus resultierende Bakterienpellet (~4-6 g) resuspendierte man auf Eis mit dem Glasstab in zwei Volumen (8-12 ml) kaltem S30-Puffer mit 1 mM DTT und überführte die Suspension in einen auf Eis vorgekühlten 25 ml Zentrifugenbecher, in dem der Zellaufschluss stattfand. Es wurde 2x für 2-3 s sonifiziert, wobei dazwischen ca. 1 min auf Eis gekühlt wurde. Anschließend zentrifugierte man das Lysat bei 30000g und 4° C für 30 min (Beckman Avanti™ J-25 mit Rotor JA-25.50), überführte den Überstand in einen frischen, vorgekühlten 25 ml Zentrifugenbecher und zentrifugierte erneut unter den gleichen Bedingungen. Den Überstand stellte man mit 4 M NaCl auf eine NaCl-Endkonzentration von 400 mM ein und inkubierte ihn für 45 min bei 42° C in einem Wasserbad (Präinkubation nach Klammt *et al.*, 2007). Anschließend dialysierte man den Extrakt bei 4° C gegen 2 l S30-Puffer mit 1 mM DTT (ZelluTrans V-Serie mit 15 kDa Ausschlussgröße; Roth; Vorbehandlung der Dialyseschläuche siehe 3.4.8). Nach 2 h wechselte man den Puffer aus und dialysierte üN weiter. Das Dialysat zentrifugierte man bei 10000g und 4° C für 20 min (Beckman Avanti™ J-20 mit Rotor JA-12) und bestimmte die Proteinkonzentration des Überstandes (siehe 3.4.7; ca. 8-12 mg/ml). Die Extrakte konzentrierte man bei 4° C und 6000g mit einem Vivaspin 20 Konzentrator mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa bis zu einer Proteinkonzentration von 50-60 mg/ml auf (siehe 3.4.9) und stellte das Konzentrat auf eine DTT-Endkonzentration von 6,5 mM ein (5,5 μ l 1 M DTT pro ml zugeben). Die nun fertigen S30 Extrakte aliquotierte man, fror sie mit flüssigem N₂ ein und lagerte sie bei -80° C, wo sie mehrere Wochen bis Monate stabil waren. Es war auch möglich, die Extrakte durch lyophilisieren längerfristig haltbar zu machen (siehe 3.4.11).

3.5.3 Isolierung translationsaktiver Ribosomen aus *E. coli* S30 Extrakten

CFPS Reaktionen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht nur mit *E. coli* S30 Extrakten durchgeführt, sondern auch mit isolierten, translationsaktiven Ribosomen. Die Ribosomen behalten bei dieser Methode ihre Fähigkeit aktiv zu translatieren, da auf intensive Waschschritte verzichtet wird und somit nicht nur die Ribosomen, sondern auch die assoziierten Translationsfaktoren mit isoliert werden. Derartige Ribosomen wurden nach Kudlicki *et al.* (1992) aus S30 Extrakten gewonnen.

Zuerst wurde, wie im vorigen Punkt beschrieben, ein *E. coli* S30 Extrakt hergestellt. Dabei wurde auf die Präinkubation mit NaCl verzichtet, da sonst die Ribosomen ihre Translationsaktivität fast vollständig verloren. Den hergestellten S30 Extrakt konzentrierte man nicht auf, sondern pelletierte die Ribosomen für 4 h bei 150000g und 4° C (Beckman Ultrazentrifuge L-70 mit type 55.2 Ti Rotor). Auf das Ribosomenpellet gab man vorsichtig 2x mehrere ml S30-Puffer mit 1 mM DTT (siehe 3.5.2) und goss den Puffer anschließend gleich wieder ab, um unerwünschte Proteine an der Wand des Zentrifugenröhrlchens und direkt auf dem Ribosomenpellet zu entfernen. Resuspendiert wurde das sehr dicht gepackte Pellet in 500 µl S30-Puffer mit 1 mM DTT durch eine Inkubation über Nacht auf Eis. Die Ribosomenkonzentration wurde nach Mankin und Polacek (2008) am Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm, gemessen gegen S30-Puffer mit 1 mM DTT als Leerwert, bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entsprach dabei einer Ribosomenkonzentration von 24 nM. Um vernünftige Messwerte zu erhalten mussten sehr hohe Verdünnungen (1:1000-1:5000) gemessen werden. Die Ribosomen konzentrierte man anschließend auf die gewünschte Konzentration auf (Vivaspin Konzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa; siehe 3.4.9), aliquotierte sie, fror sie mit flüssigem N₂ ein und lagerte sie bei -80° C. Optimale Konzentrationen für die CFPS mussten erst ermittelt werden und sind im Ergebnisteil beschrieben.

3.5.4 Ribosomenisolierung nach Spedding (1990)

- Lösungen:*
- Puffer A 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
10,5 mM Mg(OAc)₂
100 mM NH₄Cl
0,5 mM EDTA
3 mM β-Mercaptoethanol (erst vor Gebrauch zugeben)
→ sterilfiltrieren; Lagerung bei 4° C;
 - Puffer B wie Puffer A, aber 500 mM NH₄Cl
+ 1,1 M Saccharose
→ sterilfiltrieren; Lagerung bei 4° C;
 - Puffer C 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
10,5 mM Mg(OAc)₂
500 mM NH₄Cl
0,5 mM EDTA
7 mM β-Mercaptoethanol (erst vor Gebrauch zugeben)
→ sterilfiltrieren; Lagerung bei 4° C;

-
- Puffer E 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM Mg(OAc)₂
60 mM NH₄Cl
3 mM β -Mercaptoethanol (erst vor Gebrauch zugeben)
→ sterilfiltrieren; Lagerung bei 4° C;
 - Lysozym/DNase I 100 mg/ml Lysozym mit Spatelspitze DNase I

Für die Isolierung von Ribosomen ohne die assoziierten Faktoren, die dementsprechend keine Translationsaktivität mehr besaßen, wurde ein leicht verändertes Protokoll nach Spedding (1990) verwendet, wobei auch hier RNase-frei gearbeitet werden musste.

Eine *E. coli* BL21 StarTM (DE3) Kultur in 2x YT Medium wurde exakt wie unter Punkt 3.5.2 beschrieben kultiviert, abgekühlt und geerntet. Die Bakterienpellets resuspendierte man mit einem Glasstab auf Eis in insgesamt 200 ml Puffer A und überführte sie in einen auf Eis vorgekühlten 250 ml Zentrifugenbecher. Die Bakterien pelletierte man erneut bei 4000g und 4° C für 10 min (Beckman AvantiTM J-25 mit Rotor JLA-16.250) und nahm sie, erneut mit Hilfe des Glasstabes auf Eis, im 2fachen Volumen (~10 ml) Puffer A auf. Die Suspension überführte man in ein Becherglas und lysierte die Zellen durch Zugabe von 10 µl/ml der frisch angesetzten Lysozym/DNase I-Lösung für 30 min unter Rühren auf Eis. Das Lysat gab man in einen vorgekühlten 25 ml Zentrifugenbecher und sedimentierte unlösliche Bestandteile für 45 min bei 30000g und 4° C (Beckman AvantiTM J-25 mit Rotor JA-25.50). Mit dem Überstand überschichtete man vorsichtig ein gleiches Volumen Puffer B in einem kalten Ultrazentrifugenbecher und zentrifugierte bei 100000g und 4° C für \geq 15 h (Beckman Ultracentrifuge L-70 mit type 55.2 Ti Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Ribosomenpellet kurz mit 10 ml Puffer A gespült. Anschließend resuspendierte (1-2 h Inkubation auf Eis genügt) man die Ribosomen erneut in 10 ml Puffer A, überschichtete damit wieder ein gleiches Volumen Puffer B und zentrifugierte unter den gleichen Bedingungen wie zuvor. Das Pellet resuspendierte man dann in 20 ml Puffer C durch Inkubation auf Eis und zentrifugierte noch einmal unter den gleichen Bedingungen. Das Ribosomenpellet wurde dann, wieder durch Inkubation auf Eis, in 10 ml Puffer E aufgenommen und die Ribosomen bei 4° C gegen 2 l Puffer E dialysiert (ZelluTrans mit 8-10 kDa Ausschlussgröße; Roth; siehe 3.4.8). Nach 2 h wechselte man den Puffer und dialysierte weiter üN. Die Ribosomenkonzentration bestimmte man wie unter Punkt 3.5.3 beschrieben. Anschließend konzentrierte man die Ribosomen mit einem Vivaspin Konzentrator (siehe 3.4.9) mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa auf die gewünschte Konzentration auf, aliquotierte sie, fror sie mit flüssigem N₂ ein und lagerte sie bei -80° C.

In dieser Arbeit wurde das hier vorgestellte Protokoll mehrfach modifiziert, indem die Puffer leicht verändert oder einzelne Schritte weggelassen wurden, um Ribosomen unterschiedlicher Reinheit zu isolieren. Diese Modifikationen sind im Ergebnisteil beschrieben.

3.5.5 Zellfreie Proteinexpression im Batch-Verfahren

- Lösungen:*
- 400 mM Mg(OAc)₂ → Lagerung bei -20° C;
 - 20 mg/ml Cetinkinase in 100 mM HEPES-KOH, pH 7,5 (frisch ansetzen, auf Eis)
 - 1 Tablette/2 ml H₂O Complete Protease Inhibitor (EDTA-free; Roche)
→ Lagerung bei -20° C;
 - 1 M Creatinphosphat (frisch ansetzen, auf Eis)
 - 2,7 mg/ml T7 RNA Polymerase in 100 mM NaCl, 50% Glycerin;
→ Lagerung bei -20° C;
 - Aminosäure-Mix (je 10 mM; ohne Tyrosin) in 20 mM KOH, 5 mM DTT;
→ Lagerung bei -20° C;
 - LMY siehe Tab. 3.12; → Lagerung bei -20° C;

Tab. 3.12: Herstellung von 90,7 ml LMY

Komponente	Volumen (ml)	Endkonzentration in LMY	Endkonzentration in CFPS Reaktion
1 M HEPES-KOH, pH 7,5	18	198,46 mM	58,03 mM
40% PEG8000	31,4	13,85%	4,05%
3 M Kaliumglutamat	20,9	691,29 mM	202,14 mM
56,2 mg Tyrosin	-	3,42 mM	1 mM
17,5 mg/ml <i>E. coli</i> tRNA	3	579 µg/ml	169,3 µg/ml
0,55 M DTT	1	6,06 mM	1,77 mM
100 mM ATP	3,8	4,19 mM	1,23 mM
je 100 mM G,C,UTP	2,7	je 2,98 mM	je 0,87 mM
2,7 mg/ml Folinic Acid	4	119 µg/ml	34,8 µg/ml
100 mM cAMP	2	2,21 mM	646 µM
2,2 M NH ₄ OAc	3,9	94,6 mM	27,66 mM

CFPS Reaktionen im Batch-Verfahren (nach Kigawa *et al.*, 2004) wurden standardmäßig in einem Volumen von 30 µl auf Eis pipettiert, wobei man 1 µg template DNA einsetzte. In Tabelle 3.13 ist das Pipettierschema eines solchen Standardansatzes dargestellt.

Tab. 3.13: Pipettierschema einer CFPS Reaktion (30 µl)

Komponente	Volumen	Endkonzentration*
H ₂ O	2,455 µl	-
400 mM Mg(OAc) ₂	0,3 µl	4 mM
Aminosäure-Mix (10x)	3 µl	je 1 mM
9,07 µl LMY + 2,51 µl 1 M Creatinphosphat	11,2 µl	Tab 3.12; 80,92 mM
Creatinkinase	0,375 µl	0,25 mg/ml
Protease Inhibitor	1,2 µl	1x
T7 RNA Polymerase	0,42 µl	37,8 µg/ml
S30 Extrakt (50-60 mg/ml)	10,55 µl	17,58-21,1 mg/ml
template DNA (2 µg/µl)	0,5 µl	33,33 µg/ml

(*) Pufferkomponenten aus dem S30 Extrakt sind hier nicht berücksichtigt

Die Ansätze inkubierte man, je nach Anwendung, bei unterschiedlichen Temperaturen für verschiedene Zeiten bei 500 rpm im Thermomixer compact (Eppendorf), wobei meist 1 h bei 37° C gewählt wurde. Gestoppt hat man die Reaktionen durch Inkubation auf Eis. Den Erfolg der Expression kontrollierte man anschließend qualitativ per SDS-PAGE und, falls nötig, im Western Blot, wobei standardmäßig 1 µl der Reaktionslösung auf das Gel aufgetragen wurde. Bei Expression der Enzyme CAT und DHFR konnte die Menge des synthetisierten Proteins quantifiziert werden (s.u.).

3.5.6 Zellfreie Proteinexpression im Dialysemodus (CECF)

Um größere Mengen an Protein zellfrei zu synthetisieren, wurde auch das CECF-Verfahren nach Kigawa *et al.* (2004) angewandt. Dazu wurde die Reaktionslösung wie in Tabelle 3.13, meist in einem Volumen von 300 µl, angesetzt und in ein Dialysesystem überführt. Dabei verwendete man verschiedene Systeme mit unterschiedlichen Ausschlussgrößen, die zuvor für mindestens 20 min in H₂O eingelegt wurden. Diese sind im Ergebnisteil genauer beschrieben. Dialysiert wurde gegen ein 10faches Volumen Nährlösung, die die gleiche Zusammensetzung hatte wie die Reaktionslösung, außer dass man statt Creatinkinase, T7 RNA Polymerase und template DNA H₂O und statt des S30 Extraktes S30-Puffer mit 6,5 mM DTT (siehe 3.5.2) verwendete. Die Nährlösung gab man zusammen mit dem Dialysesystem in ein 15 ml Falcon und inkubierte unter Schütteln üN bei 30° C im Wasserbad. Die Analyse des synthetisierten Proteins erfolgte wie unter Punkt 3.5.5 beschrieben.

3.5.7 Das S30 T7 High-Yield Protein Expression System

Für die zellfreie Expression von Proteinen im Batch-Verfahren verwendete man auch das auf *E. coli* Extrakten basierende S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) nach Herstellerangaben, wobei aber nicht das vorgeschlagene Reaktionsvolumen von 50 µl verwendet wurde. CFPS Reaktionen führte man auch hier in einem Volumen von 30 µl durch, wobei ebenfalls 1 µg template DNA pro Reaktion eingesetzt wurde. Man inkubierte die Ansätze auch hier, je nach Anwendung, unterschiedlich lange bei verschiedenen Temperaturen im Thermomixer compact (Eppendorf) bei 500 rpm, wobei die Expression auf Eis gestoppt und wie unter Punkt 3.5.5 analysiert wurde.

3.5.8 Das PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit

Das PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (New England Biolabs), das lediglich aus rekombinanten Translationsfaktoren, *E. coli* Ribosomen und einigen Enzymen für die Energieregeneration besteht, wurde ebenfalls für CFPS Reaktionen im Batch-Verfahren verwendet. Dabei ging man nach Herstellerangaben vor und exprimierte das gewünschte Protein in einem Volumen von 25 µl, wobei 250 ng template DNA eingesetzt wurden. Auch der im Protokoll vorgeschlagene Murine RNase Inhibitor (20 U/Reaktion; New England Biolabs) wurde verwendet. Die Inkubationsdauer und –temperatur im Thermomixer compact (500 rpm; Eppendorf) war auch hier abhängig von der Anwendung. Die Reaktionen stoppte man durch Inkubation auf Eis und die Analyse der synthetisierten Proteine erfolgte wie in Punkt 3.5.5, wobei unterschiedliche Mengen auf die SDS-Gele aufgetragen wurden. Zusätzlich war es hier möglich, die Ribosomen durch Ultrafiltration zu entfernen, was zu weniger störenden Banden auf den Gelen führte. Dazu füllte man die Ansätze mit 300 mM NaCl, 10 mM Mg(OAc)₂ auf 300 µl auf und konzentrierte sie mit Amicon® Ultra Centrifugal Filters (0,5 ml; Ausschlussgröße 100 kDa; Millipore; siehe auch 3.4.9) bei 4000 rpm und 4° C für 30-60 min in der Tischzentrifuge. Den ribosomenfreien Durchlauf fällte man anschließend mit Aceton (3.4.10) und nahm das Proteinpellet in 25 µl (gleiches Volumen wie Reaktion) Probenpuffer auf.

3.5.9 Einfluss von Proteinen und anderer Substanzen auf die CFPS

Der Einfluss von Proteinen und anderer Substanzen auf die CFPS erfolgte ausschließlich im Batch-Verfahren mit den selbst hergestellten S30 Extrakten, sowie mit den unter Punkt 3.5.7 und 3.5.8 beschriebenen Kits. Die zu testende Substanz gab man in der gewünschten Konzentration zu den Ansätzen (meist 2 µl mit der entsprechenden Konzentration), wobei dementsprechend weniger H₂O zugegeben wurde. Die Puffer, in denen die zu testenden Substanzen gelöst waren, überprüfte man in Vorversuchen zuerst auf ihren Einfluss auf die CFPS. Als Vergleich diente eine Kontrolle, zu der man nur das entsprechende Volumen Puffer, ohne die gelöste Substanz, gab. Für den Erhalt von reproduzierbaren Ergebnissen war es sehr wichtig, dass alle Ansätze einer Versuchsreihe aus demselben Master Mix stammten.

3.5.10 Quantifizierung zellfrei exprimierter CAT

- Lösungen:*
- 100 mM Tris-HCl, pH 7,8
 - 5 mg/ml Acetyl-CoA (als Trilithiumsalz; Applichem)
→ à 175 µl aliquotieren, Lagerung bei -80° C;
 - 5 mM Chloramphenicol → Lagerung bei -20° C
 - DTNB (5,5'-Dithio-Bis (2-Nitrobenzoic Acid); Sigma-Aldrich)
 - CAT-Testlösung (frisch auf Eis ansetzen); siehe Tab. 3.14;

Tab. 3.14: Herstellung von 10 ml CAT-Testlösung

Substanz	Volumen/ Menge	Endkonzentration
Tris-HCl	9,6 ml	96 mM
DTNB	4 mg	0,4 mg/ml
Chloramphenicol	200 µl	100 µM
Acetyl-CoA	164 µl	100 µM
H ₂ O	36 µl	-

Wenn in einer CFPS Reaktion die CAT exprimiert wurde, war es möglich die synthetisierte Menge an Protein genau zu quantifizieren (nach Shaw, 1975; Kigawa *et al.*, 2004). Dabei wurde die enzymatische Aktivität der CAT, das Übertragen einer Acetylgruppe vom Acetyl-CoA auf Chloramphenicol, ausgenutzt. Die dabei entstehende freie Thiolgruppe des Coenzyms A spaltet wiederum das DTNB, was die Bildung eines gelben Farbstoffes (2-Nitro-5-thiobenzoat) zur Folge hat, dessen Entstehung photometrisch bei einer Wellenlänge von

412 nm verfolgt werden kann. Die Intensität der Färbung ist dabei direkt proportional zur Menge des eingesetzten Enzyms.

Um die Expression der CAT im Batch-Ansatz zu quantifizieren verdünnte man eine Probe der entsprechenden CFPS Reaktion 1:300 in kaltem 100 mM Tris-HCl, pH 7,8. Davon gab man 6 µl zu 800 µl der kalten CAT-Testlösung und inkubierte für 30 min bei 37° C und 300 rpm im Thermomixer compact (Eppendorf). Es wurde immer auch eine 0-Kontrolle (Batch-Ansatz ohne zugegebene DNA) auf die gleiche Weise behandelt, mit der die spontane Entstehung des Farbstoffes bestimmt werden konnte. Anschließend stoppte man die Reaktion auf Eis und bestimmte die OD₄₁₂ am Photometer, gemessen gegen CAT-Testlösung als Leerwert. Da immer die gleichen Bedingungen für die Quantifizierung der CAT verwendet wurden, vereinfachten sich die Formeln zur Berechnung der Konzentration der CAT (siehe z.B. Kigawa *et al.*, 2004; Kigawa, 2010) auf:

$$c(\text{CAT in } \mu\text{g/ml}) = 653,6 \times (\text{OD}_{412 \text{ Probe}} - \text{OD}_{412 \text{ 0-Kontrolle}})$$

Falls die Konzentration der CAT nach Expression im Dialysemodus bestimmt werden sollte, verdünnte man eine Probe des Ansatzes 1:3000 in kaltem 100 mM Tris-HCl, pH 7,8 und fuhr wie oben beschrieben fort. Das erhaltene Ergebnis multiplizierte man aufgrund der höheren Verdünnung mit 10.

3.5.11 Quantifizierung zellfrei exprimierter DHFR

Die Quantifizierung zellfrei synthetisierter DHFR erfolgte mit dem Dihydrofolate Reductase Assay Kit (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben. Auch hier wird die enzymatische Aktivität des Enzyms, die NADPH-abhängige Reduktion von 7,8-Dihydrofolat zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolat, ausgenutzt. Die Abnahme der NADPH Konzentration konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden.

Am Photometer wurden 2,5 – 10 µl der 1:10 in Assay Buffer verdünnten Reaktionslösung bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen, wobei die Testlösung als Leerwert diente. Da kein geeignetes Photometer zur Verfügung stand, wurde abweichend vom Herstellerprotokoll jede Probe 3 min bei Raumtemperatur gemessen, wobei jede Minute eine Messung erfolgte. Die erhaltenen Werte (negativ!) rechnete man gegebenenfalls auf die Messung von 1 µl der Reaktionslösung hoch und ermittelte den Mittelwert. Auch hier wurden die erhaltenen Werte der Proben um die Werte einer gleich behandelten 0-Kontrolle (Batch-Ansatz ohne

zugegebene DNA) bereinigt, um nur die tatsächlich synthetisierte DHFR zu erfassen. Eine exakte Quantifizierung war mit diesem Kit leider nicht möglich und die Menge an exprimierter DHFR musste als $-(\Delta \text{OD}_{340} \text{ min}^{-1} \mu\text{l}^{-1})$ angegeben werden.

3.5.12 Isolation und Nachweis von miRNAs aus CFPS Reaktionen

Im Laufe der Arbeit sollte geprüft werden, ob und wie lange eine in der CFPS eingesetzte miRNA in den Batch-Ansätzen stabil ist. Dazu wurde mit Hilfe des S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) ein 255 μl Batch-Ansatz ohne template DNA hergestellt, der die miRNA in einer Konzentration von 200 nM enthielt. Diesen inkubierte man für 4 h bei 37° C und 500 rpm im Thermomixer compact (Eppendorf), wobei man zu verschiedenen Zeitpunkten 30 μl Proben entnahm, die sofort in flüssigem N₂ eingefroren wurden. Aus diesen Proben isolierte man die gesamt RNA, inklusive der miRNAs, mit dem miRNeasy[®] Mini Kit (Qiagen). Dazu gab man im ersten Schritt je 700 μl des QIAzol[®] Lysis Reagent zu den Proben und ging dann weiter nach Herstellerprotokoll (‘Purification of total RNA from Animal Cells’) vor. Auch der optionale DNase-Verdau mit dem ‘RNase-free DNase Set’ (Qiagen) wurde durchgeführt. Die isolierte RNA eluierte man in 30 μl RNase-freies H₂O, wobei Konzentrationen von etwas mehr als 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erreicht wurden. Jeweils 200 ng dieser RNA wurden direkt im Anschluss mit dem miScript[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Das Umschreiben der RNA basiert hier darauf, dass durch eine Poly(A)-Polymerase ein ca. 80 Nukleotide langer Poly(A)-Schwanz an die RNAs angehängt wird. Dies ermöglicht im gleichen Schritt ein Umschreiben der RNA in cDNA durch eine reverse Transkriptase und einen Oligo-dT Primer. Es wurden auf diese Weise auch 200 ng der miRNA als Kontrolle in cDNA umgeschrieben. Die Ansätze konnten ohne weitere Reinigungsschritte in PCR Reaktionen eingesetzt werden und wurden bei -20° C gelagert.

Der Nachweis der miRNA erfolgte durch PCR mit der PhusionTM DNA Polymerase in einem Volumen von 20 μl , wobei die eingesetzte Menge an cDNA erst ermittelt werden musste. Als Primer verwendete man einen 3[‘] miScript[®] Universal Primer (Qiagen), der spezifisch für den an die cDNAs angehängten Schwanz war, sowie einen 5[‘] miScript[®] Primer Assay, der eine Mischung verschiedener Primer enthielt, die spezifisch für die nachzuweisende, in cDNA umgeschriebene miRNA waren und von der Firma Qiagen designt wurde.

Pipettierschema PhusionTM PCR zum Nachweis revers transkribierter miRNAs (20 µl):

- cDNA
- 4 µl 5x PhusionTM Reaktionspuffer HF (Finnzymes)
- 2 µl 10x miScript[®] Universal Primer (Qiagen)
- 2 µl 10x miScript[®] Primer Assay
- 2 µl dNTPs (2 mM je Nukleotid)
- 0,2 µl PhusionTM DNA Polymerase (2 U/µl; Finnzymes)
- add. H₂O 20 µl

Das verwendete PCR Programm war mit dem in Tabelle 3.5 (siehe 3.2.5.2) identisch, wobei eine Elongationszeit von 10 s und 35 Zyklen gewählt wurden. Eine Annealingtemperatur von 58° C lieferte die besten Ergebnisse. Etwa 15 µl der Ansätze analysierte man nach der PCR durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.10).

3.6 „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)

EMSA dienten in dieser Arbeit dem Nachweis der Aktivität verschiedener RNA Chaperone. Diese Methode basiert darauf, dass eine DNA oder RNA ihr Wanderungsverhalten in einem nativen Agarose-Gel verändert, wenn sie an ein bestimmtes Protein gebunden ist. Dabei kann die erwartete Bande nach oben, also hin zu höheren Molekulargewichten, „shiften“, da durch die Bindung von Proteinen das Molekulargewicht erhöht wird. Es sind aber auch „shifts“ hin zu niedrigeren Molekulargewichten, also nach unten, möglich, wenn das gebundene Protein die DNA oder RNA in eine kompaktere Konformation zwingt, die das polymere Netzwerk eines Agarose-Gels schneller durchwandern kann. Da bei allen EMAs RNA verwendet wurde, war hier ein RNase-freies Arbeiten sehr wichtig.

3.6.1 EMSA mit CAT mRNA

- Lösungen:*
- LM wie LMY (siehe Tab. 3.12); statt Tyrosin, *E. coli* tRNA, Folinic Acid und cAMP wird ein gleiches Volumen H₂O zugegeben; außerdem Zugabe von 25,1 ml zusätzlichem H₂O;
→ Lagerung bei -20° C;
 - weitere Lösungen siehe Punkt 3.5.5

Um die Aktivität der in dieser Arbeit getesteten RNA Chaperone und deren Interaktion mit der CAT mRNA nachzuweisen, wurden alle einem EMSA unter möglichst gleichen Bedingungen wie in einem Batch-Ansatz (siehe Punkt 3.5.5) unterzogen. Dazu musste die CAT mRNA zuerst *in vitro*, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, transkribiert werden. Ansätze hierzu pipettierte man à 30 µl auf Eis.

Pipettierschema zur in vitro Transkription der CAT mRNA (30 µl):

- 5,83 µl H₂O
- 0,3 µl 400 mM Mg(OAc)₂
- 11,2 µl LM
- 10,55 µl S30-Puffer mit 6,5 mM DTT (siehe 3.5.2)
- 0,5 µl pK7-CAT (2 µg/µl)
- 1,2 µl RiboLockTM RNase Inhibitor (40 U/µl; Fermentas)
- 0,42 µl T7 RNA Polymerase (2,7 mg/ml)

Die *in vitro* Transkription fand bei 37° C und 500 rpm für 30 min im Thermomixer compact (Eppendorf) statt. Anschließend gab man 28 µl der Ansätze zu 2 µl des entsprechend konzentrierten RNA Chaperons und inkubierte für 30 min auf Eis. Es wurde auch immer eine Kontrolle durchgeführt, bei dem 28 µl des Ansatzes zu 2 µl des entsprechenden Puffers gegeben wurde, um später eine Referenzbande auf dem Gel zu erhalten. In der anschließenden 1%igen, nativen Agarose-Gelelektrophorese (s.u.) setzte man jeweils 4 µl der Ansätze ein.

3.6.2 EMSA mit *E. coli* tRNA

Lösungen:

- 1 mg/ml *E. coli* tRNA from MRE 600 (Roche)
- weitere Lösungen sie Punkt 3.6.1 und 3.5.5

Bei einigen RNA Chaperonen war bekannt, dass diese mit tRNA interagieren, so dass diese Eigenschaft ausgenutzt wurde, um ihre Aktivität nachzuweisen (Methode verändert nach Lee and Feig, 2008). Auch hier wurde versucht, den Bedingungen in einem Batch-Ansatz (siehe Punkt 3.5.5) möglichst nahe zu kommen. Ansätze pipettierte man in einem Volumen von 30 µl auf Eis.

Pipettierschema zum Nachweis der Interaktion von Proteinen mit tRNA (30 µl):

- 3,75 µl H₂O
- 0,3 µl 400 mM Mg(OAc)₂

-
- 11,2 μ l LM
 - 10,55 μ l S30-Puffer mit 6,5 mM DTT (siehe 3.5.2)
 - 1,2 μ l RiboLockTM RNase Inhibitor (40 U/ μ l; Fermentas)
 - 3 μ l *E. coli* tRNA (1 mg/ml)

Die Ansätze inkubierte man zum Denaturieren der tRNA für 2 min bei 90° C und ließ sie anschließend für 2-3 min auf Raumtemperatur abkühlen. Jeweils 28 μ l davon gab man dann zu 2 μ l des entsprechend konzentrierten Proteins und inkubierte für 30 min bei Raumtemperatur. Auch hier wurde eine Kontrolle, bei der 28 μ l des Ansatzes zu 2 μ l des entsprechenden Puffers gegeben wurde, durchgeführt. Jeweils 10 μ l wurden in einer 2%igen, nativen Agarose-Gelelektrophorese (s.u.) analysiert.

Ein Spezialfall war der Nachweis der Interaktion der MTF mit aminoacylierter tRNA. Dazu mussten die tRNAs zuerst durch die Aminoacyl-tRNA Synthetasen mit den entsprechenden Aminosäuren beladen werden. Ansätze hierzu wurden auch in einem Volumen von 30 μ l auf Eis pipettiert.

Pipettierschema zur Aminoacylierung von tRNAs (30 μ l):

- 1,18 μ l H₂O
- 0,3 μ l 400 mM Mg(OAc)₂
- 3 μ l Aminosäure-Mix (je 10 mM; ohne Tyrosin)
- 8,77 μ l LMY
- 10,55 μ l S30-Puffer mit 6,5 mM DTT (siehe 3.5.2)
- 1,2 μ l RiboLockTM RNase Inhibitor (40 U/ μ l; Fermentas)
- 3 μ l *E. coli* tRNA (1 mg/ml)
- 2 μ l *E. coli* Aminoacyl-tRNA Synthetasen (38,88 U/ μ l; Sigma-Aldrich)

Die Ansätze inkubierte man bei 37° C und 500 rpm für 30 min im Thermomixer compact (Eppendorf). Auch hier gab man je 28 μ l zu 2 μ l der entsprechend konzentrierten MTF bzw. zu 2 μ l des verwendeten Puffers und inkubierte für 30 min auf Eis. In der anschließenden 2%igen, nativen Agarose-Gelelektrophorese (s.u.) wurden jeweils 10 μ l eingesetzt.

3.6.3 EMSA mit *E. coli* rRNA

Ein RNA Chaperon, mit dem gearbeitet wurde (S12), war für seine Interaktion mit der 16S rRNA von *E. coli* bekannt. Diese Eigenschaft nutzte man zum Nachweis der Aktivität des Proteins aus. Die auf Eis pipettierten Ansätze in einem Volumen von 30 μ l waren identisch zu

denen, die für den Nachweis der Interaktion von Proteinen mit *E. coli* tRNA benutzt wurden. Der einzige Unterschied war, dass pro Ansatz statt 3 µg der *E. coli* tRNA 3 µg *E. coli* gesamt RNA (besteht zu ca. 80% aus rRNA; isoliert aus *E. coli* BL21; siehe 3.2.3) eingesetzt wurde. 28 µl dieser Ansätze gab man wieder zu 2 µl des entsprechend konzentrierten Proteins bzw. des verwendeten Puffers und inkubierte für 30 min auf Eis. In der anschließenden 1%igen, nativen Agarose-Gelelektrophorese (s.u.) setzte man jeweils 10 µl ein.

3.6.4 Native Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

- TBE 100 mM Tris
 2 mM EDTA
 → Borat zugeben, bis ein pH von 8,0 erreicht ist;
 → als 5x Puffer herstellen
- 5x Ladepuffer 50% Glycerin
 0,2% Bromphenolblau
 0,2% Xylenxyanol
- Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml; GERBU Biotechnik GmbH)
 → Lagerung lichtgeschützt bei 4° C;

Die native Agarose-Gelelektrophorese führte man durch, wie eine normale Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.10) mit dem Unterschied, dass statt des SB-Puffers TBE, und statt des 6x DNA Ladepuffers der EDTA-freie 5x Ladepuffer verwendet wurde. Auch hier verwendete man zum Sichtbarmachen der RNA-Banden Ethidiumbromid. Es war sehr wichtig, sowohl die Elektrophoresekammer, als auch alle Puffer RNase-frei zu halten, um eine Degradation der RNA während der Elektrophorese zu verhindern. Außerdem fand die native Agarose-Gelelektrophorese immer bei konstanten 65 V statt, da nur bei langsamer Wanderung der RNA scharfe Banden auf den Gelen erreicht wurden.

3.7 Schutz von DNA vor DNase-Verdau durch StpA

Lösungen:

- siehe 3.6.1
- 250 mM EDTA (löst sich bei 37° C);
- 6 µg/ml DNase I (frisch ansetzen; Roche);

Die Aktivität des putativen RNA Chaperons StpA wurde in dieser Arbeit nach Keatch *et al.* (2005) nachgewiesen. Grundlage dieses Versuchs war, dass StpA die Eigenschaft besitzt an doppelsträngige DNA zu binden und sie dadurch vor einem Verdau durch die DNase I zu schützen. Als DNA, die vor Verdau geschützt werden sollte, wählte man die proteincodierende Region von EF-Ts (852 bp), die durch PhusionTM PCR (siehe 3.2.5.2), ausgehend von etwa 80 ng des Plasmids pET-14b EF-Ts (siehe Ergebnisteil), mit Hilfe der Primer EFTs-5'-Nde und EFTs-3'-Bam vermehrt wurde. Dieses PCR Fragment wurde vor dem Einsatz in diesem Versuch noch aufgereinigt (siehe 3.2.9). Auch hier versuchte man wieder den Bedingungen in einem Batch-Ansatz möglichst nahe zu kommen und pipettierte folgende Ansätze à 30 µl auf Eis.

Pipettierschema Aktivitätstest StpA (30 µl):

- 3,95 µl H₂O
 - 0,3 µl 400 mM Mg(OAc)₂
 - 11,2 µl LM
 - 10,55 µl S30-Puffer mit 6,5 mM DTT (siehe 3.5.2)
 - 4 µl PCR Produkt EF-Ts

Jeweils 28 µl dieser Ansätze gab man dann zu 2 µl des entsprechend konzentrierten StpA bzw. zu 2 µl des verwendeten Puffers und inkubierte für 30 min bei Raumtemperatur. Dann gab man zu jedem Ansatz 1 µl der DNase I-Lösung (Endkonzentration ~0,2 µg/ml) und inkubierte für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Eine StpA-freie Kontrolle, in die man H₂O statt DNase I gab, wurde ebenfalls unter gleichen Bedingungen mit angesetzt, um später eine Referenzbande auf dem Gel zu erhalten. Anschließend stoppte man den DNase-Verdau durch die Zugabe von 10 µl 250 mM EDTA und setzte jeweils 12,5 µl der Ansätze in einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.10) ein.

3.8 Nachweis der ATP Hydrolyse von eIF-4A durch HPLC

Lösungen:

- Puffer A 25 mM HEPES-KOH, pH 6,5
- 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP in Puffer A
- 1 mg/ml Poly-U (Sigma-Aldrich) in Puffer A

-
- HPLC-Puffer
 - 3,22 g/l TBA (Tribromoanisole)
 - 5,749 g/l K₂HPO₄
 - 9,325 g/l KH₂PO₄
 - filtrieren
 - + 5-10% (v/v) Acetonitril (gerätespezifisch)

Der Nachweis der Aktivität von eIF-4A erfolgte über seine ATPase-Aktivität in Anwesenheit von RNA (oder Poly-U als RNA-Ersatz) nach Du *et al.* (2002). Folgender Ansatz wurde dazu auf Eis pipettiert.

Pipettierschema zum Nachweis der Aktivität von eIF-4A (200 µl):

- 155 µl Puffer A
- 10 µl Poly-U in Puffer A (Endkonzentration: 50 µg/ml)
- 20 µl MgCl₂/ATP in Puffer A (Endkonzentration je 100 µM)
- 15 µl eIF-4A (60 µM in Elutionspuffer; Endkonzentration: 4,5 µM)

Ein zweiter Kontroll-Ansatz, in den man statt des eIF-4A nur den Elutionspuffer gab, wurde ebenfalls hergestellt. Beide Ansätze inkubierte man anschließend für mehrere Stunden bei 30° C, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten 30 µl Proben abgenommen und sofort mit flüssigem N₂ eingefroren wurden. Die Bestimmung des ATP/ADP-Verhältnisses erfolgte anschließend per HPLC (Säule: Microsorb-MV 100-5 C18, 250 x 4,6) bei einer Flussrate des HPLC-Puffers mit 10% Acetonitril von 0,9 ml/min, wobei jeweils 20 µl der Proben auf die Säule aufgetragen wurden.

4. Ergebnisse

4.1 Optimierung des *E. coli* CFPS Systems

Zu Beginn der Arbeit existierte am Lehrstuhl bereits ein Protokoll zur Herstellung der *E. coli* S30 Extrakte und zur Durchführung von CFPS Reaktionen. Diese basierten auf dem Protokoll von Kigawa *et al.* (2004) und wurden von Roland Hofweber weiterentwickelt. Eine Expression für 1 h bei 37° C im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) führten nach diesen Protokollen durchschnittlich zur Synthese von etwa 200 µg/ml des Testproteins CAT (Hofweber, 2006; Doktorarbeit). Mittlerweile ist im Batch-Verfahren jedoch die Synthese weitaus größerer Mengen von Testproteinen möglich, wobei sich realistische Mengen bei einer Inkubationsdauer von 1 h, ohne dass während der Reaktion verbrauchte Substrate erneut zugegeben werden, zwischen 400 und 800 µg/ml bewegen (siehe z.B. Kigawa *et al.*, 2004; Calhoun and Swartz, 2007). Aus diesem Grund wurden die Protokolle von Roland Hofweber weiter optimiert, um ein solides und produktives Testsystem für weitere Versuche zur Verfügung zu haben.

4.1.1 Optimierung der S30 Extrakt Herstellung

Die Herstellung der *E. coli* S30 Extrakte, die die komplette Translationsmaschinerie beinhalten, hat einen großen Einfluss auf die spätere Syntheseleistung des Systems, so dass hier bei der Optimierung des CFPS Systems begonnen wurde. In Tabelle 4.1 sind die wichtigsten Arbeitsschritte der Herstellung der Extrakte, sowohl des ursprünglichen Protokolls (siehe Hofweber, 2006; Doktorarbeit), als auch der optimierten Version (siehe 3.5.2), gegenübergestellt. Medien bzw. Puffer wurden nicht verändert. Die eingeführten Änderungen werden nachfolgend in chronologischer Reihenfolge erläutert.

Tab. 4.1: Vergleich des ursprünglichen und des optimierten Protokolls zur Herstellung der S30 Extrakte

Arbeitsschritt	Ursprüngliches Protokoll	Optimierte Version
Verwendeter Bakterienstamm	<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> BL21 Star TM (DE3)
Wachstum der Zellen	bis OD ₆₀₀ von 1,0	bis OD ₆₀₀ von 1,2
Abkühlen der Kultur	10 min in Eiswasser	10 min in Eiswasser

Ernte der Zellen	bei 2600g und 4° C für 30 min	bei 2600g und 4° C für 30 min
Waschen der Zellen	3x	3x
Einfrieren der gewaschenen Zellen	ja	nein
Zellaufschluss	Sonifikation 6x 5 s	Sonifikation 2x 2-3 s
30000g Zentrifugation	2x für 30 min bei 4° C	2x für 30 min bei 4° C
Präinkubation	verändert nach Kigawa <i>et al.</i> (2004) oder keine	nach Klammt <i>et al.</i> (2007)
Dialyse	4x für 45 min gegen je 2 l	1x 2 h, dann üN, jeweils gegen 2 l
Klären des Extrakts	10 min bei 4000g und 4° C	20 min bei 10000g und 4° C
Aufkonzentrieren	nein	auf ca. 50-60 mg/ml

Sehr früh wurde bei der Optimierung des Protokolls auf ein Einfrieren der gewaschenen Zellen verzichtet, sowie die Dialyse der S30 Extrakte über Nacht verlängert, wobei weniger Pufferwechsel stattfanden. Diese Änderungen hatten keine merklichen Auswirkungen auf die Syntheseleistung des Systems und wurden wegen der zeitlichen Einteilung der Herstellung der Extrakte eingeführt. Auch die Kultivierung der Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2, statt zuvor 1,0, führte nicht zu Veränderungen der Produktivität der Extrakte, sondern erhöhte lediglich die erzielte Ausbeute an S30 Extrakt.

Der Zellaufschluss durch Sonifikation wird von einigen Autoren als ungeeignet für die Herstellung produktiver Extrakte angesehen (z.B. Shirokov *et al.*, 2007; Kigawa *et al.*, 2004), so dass diesem Schritt besondere Beachtung geschenkt wurde. Dazu stellte man identische *E. coli* S30 Extrakte aus BL21 her, bei denen auf eine Präinkubation verzichtet wurde und die sich lediglich in der Intensität der Sonifikation unterschieden (siehe 3.5.2). Bei der Synthese des Testproteins CAT im Batch-Verfahren, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT (siehe 3.5.5), wurde deutlich, dass die Ausbeute an synthetisiertem Protein, durch eine Verkürzung der Sonifikation auf 2x 2-3 s, statt zuvor 6x 5 s, verdoppelt werden kann (Abb. 4.1). Weitere Verkürzungen der Sonifikation hatten keinen Effekt auf die Syntheseleistung und führten lediglich zu niedrigeren Proteinkonzentrationen der Extrakte.

Der nächste analysierte Schritt war die Präinkubation, die ursprünglich verändert nach Kigawa *et al.* (2004) stattfand. Dazu gab man nach den 30000g Zentrifugationen 0,3 Volumen eines Präinkubationspuffers (293,3 mM Tris-Acetat, pH 8,2, 9,2 mM Mg(OAc)₂, 13,2 mM ATP, 260 mM Creatinphosphat, 4,4 mM jeder Aminosäure, 1 mg/ml Creatinkinase) zu den Extrakten und fuhr dann sofort mit der Dialyse fort. Es wurde jedoch schnell bemerkt, dass ein komplettes Weglassen der Präinkubation die Produktivität der Extrakte nicht beeinflusste.

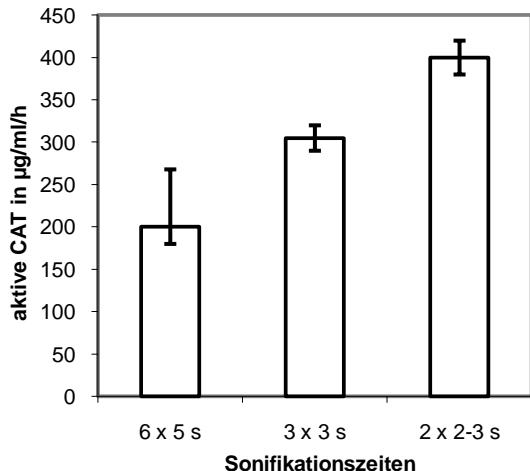


Abb. 4.1: Einfluss der Sonifikation auf die Produktivität von S30 Extrakten

Eine Verkürzung der Sonifikation steigerte die Synthese des Testproteins CAT deutlich, von etwa 200 µg/ml auf durchschnittlich 400 µg/ml. Die Expression fand bei 37° C für 1 h im Batch-Verfahren statt (siehe 3.5.5), wonach die synthetisierte CAT quantifiziert wurde (siehe 3.5.10). Die Extrakte stammten von *E. coli* BL21 und wurden in einer Konzentration von 40 mg/ml eingesetzt. Bei der Herstellung verzichtete man auf die Präinkubation.

Da jedoch in fast allen veröffentlichten Protokollen (z.B. Klammt *et al.*, 2007, Shirokov *et al.*, 2007) nicht auf diesen Schritt verzichtet wird, wurden verschiedene Methoden miteinander verglichen. Dabei verwendete man, zur optimalen Vergleichbarkeit, ein einziges S30 Extrakt aus *E. coli* BL21, teilte es nach den 30000g Zentrifugationen in drei gleiche Teile auf und wendete jeweils eine andere Methode der Präinkubation an. Bei einem Teil verzichtete man auf diesen Schritt, bei den anderen verwendete man die Methoden nach Klammt *et al.* (2007) und Shirokov *et al.* (2007). Nach Klammt stellte man den Extrakt auf 400 mM NaCl ein und inkubierte ihn für 45 min bei 42° C im Wasserbad. Nach Shirokov gab man 70 µl/ml eines leicht veränderten „Run-off“ Puffers, der statt Acetylphosphat die gleiche Menge Creatinphosphat und zusätzlich die Creatinkinase enthielt zu (0,75 M Tris-Acetat, pH 8,2, 7,5 mM DTT, 21 mM Mg(OAc)₂, 0,5 mM jeder Aminosäure, 6 mM ATP, 0,5 M Creatinphosphat, 1,53 mg/ml Creatinkinase) und inkubierte unter Bewegung für 80 min bei 37° C. Danach fuhr man mit allen drei Ansätzen wie im Protokoll beschrieben weiter fort (siehe 3.5.2). Diese Extrakte testete man anschließend in unterschiedlichen Konzentrationen (30-75 mg/ml) auf die Synthese des Testproteins CAT im Batch-Verfahren (Abb. 4.2; siehe 3.5.5), wobei der Extrakt ohne Präinkubation die besten Ergebnisse lieferte, wenn er mit einer Proteinkonzentration von 40 mg/ml eingesetzt wurde. Der Extrakt mit NaCl Präinkubation synthetisierte in einer Konzentration von 60 mg/ml nur etwas weniger des Testproteins. Die Methode nach Shirokov führte zu Extrakten mit der geringsten Produktivität. In einem zweiten Versuch unter gleichen Bedingungen wurden noch einmal Extrakte ohne bzw. mit NaCl Präinkubation, beide in der optimalen Proteinkonzentration, miteinander verglichen, wobei diesmal der Extrakt mit der NaCl Präinkubation eine etwas höhere Syntheseleistung aufwies (Abb. 4.2). Somit können beide Methoden als gleichwertig betrachtet werden. Dennoch wurde die NaCl Präinkubation nach Klammt *et al.* (2007) in das Protokoll integriert,

da diese zu weniger viskosen und besser handelbaren Extrakten führte. Da durch die NaCl Präinkubation bei der anschließenden Dialyse sehr viel Protein ausfällt, intensivierte man das Klären des S30 Extrakts in der anschließenden Zentrifugation (siehe Tab. 4.1).

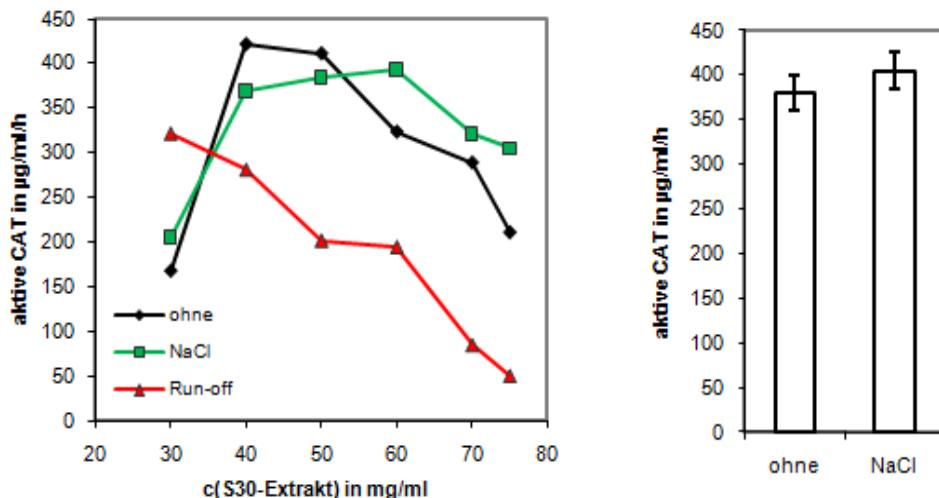


Abb. 4.2: Abhängigkeit der CAT-Synthese von Proteinkonzentration und Präinkubation der Extrakte

Links: Vergleich der verschiedenen Präinkubationsmethoden bei Verwendung unterschiedlich konzentrierter Extrakte. Die Reaktionen fanden ausgehend vom Plasmid pK7-CAT im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) für 1 h bei 37° C statt, wonach die synthetisierte CAT quantifiziert wurde (siehe 3.5.10). Die besten Ergebnisse lieferte der Extrakt ohne Präinkubation in einer Konzentration von 40 mg/ml (ca. 420 µg/ml) und der Extrakt mit NaCl Präinkubation in einer Konzentration von 60 mg/ml (ca. 390 µg/ml). Die Methode nach Shirokov führte zu Extrakten mit der geringsten Produktivität (ca. 320 µg/ml bei einer Proteinkonzentration von 30 mg/ml; dies entspricht dem Maximum, was durch weitere, hier nicht gezeigte Versuche, bestätigt wurde).

Rechts: Wiederholung des Versuchs unter den gleichen Bedingungen. Je ein Extrakt ohne Präinkubation wurde in der optimalen Proteinkonzentration von 40 mg/ml mit einem Extrakt mit NaCl Präinkubation, ebenfalls in der optimalen Proteinkonzentration von 60 mg/ml, verglichen. Hier wurde von dem Extrakt mit NaCl Präinkubation (405 µg/ml) mehr des Testproteins CAT synthetisiert, als von einem Extrakt ohne Präinkubation (380 µg/ml). Hier wurde ein Fehler von etwa 5% angenommen, da der Versuch nur einmal durchgeführt wurde.

Die letzte eingeführte Änderung bei der Herstellung der S30 Extrakte war die Verwendung des *E. coli* Stammes BL21 StarTM (DE3), durch dessen Einsatz die Ausbeute an synthetisiertem Testprotein, im Vergleich zum vorher verwendeten Stamm BL21, um durchschnittlich 7,5% gesteigert werden konnte (Abb. 4.3). Da der neue Stamm durch das Fehlen der RNase E zu einer erhöhten Stabilität der mRNA führen soll (siehe 2.1.1), wurde auch geprüft, ob nun eine niedrigere Konzentration des DNA templates positive Auswirkungen auf die Syntheseleistung der Extrakte hat, was aber nicht der Fall war (Abb. 4.3). Somit wurde die Konzentration der template DNA von 1 µg/30 µl Reaktionsansatz beibehalten.

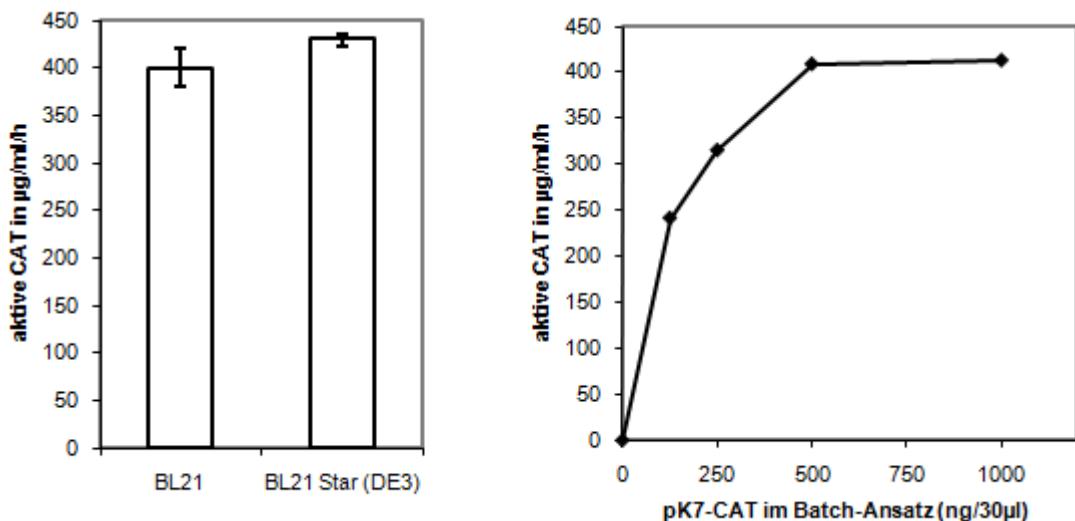


Abb. 4.3: Vergleich der Produktivität von Extrakten aus BL21 und BL21 StarTM (DE3) und Einfluss der Konzentration der template DNA bei Verwendung des neuen Stammes

Links: Extrakte aus *E. coli* BL21 und BL21 StarTM (DE3) wurden hergestellt (siehe 3.5.2; mit NaCl Präinkubation in der optimalen Proteinkonzentration von 50-60 mg/ml) und im Batch-Verfahren, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, für 1 h bei 37° C auf die Synthese des Proteins getestet (siehe 3.5.5), wonach die synthetisierte CAT quantifiziert wurde (siehe 3.5.10). Im Durchschnitt synthetisierten Extrakte aus BL21 400 µg/ml, Extrakte aus BL21 StarTM (DE3) 430 µg/ml des Testproteins.

Rechts: Wie oben testete man Extrakte aus BL21 StarTM (DE3) auf die Synthese der CAT im Batch-Verfahren, wobei unterschiedliche Konzentrationen der template DNA pK7-CAT eingesetzt wurden. Niedrigere Konzentrationen als die standardmäßig eingesetzten 1 µg/30 µl Reaktionsansatz führten zu niedrigeren Ausbeuten der CAT.

4.1.2 Optimierung der CFPS Reaktion

Bei der Durchführung der CFPS Reaktionen wurde ein bereits optimiertes Protokoll nach Kigawa *et al.* (2004) verwendet. Bei der Arbeit mit den *E. coli* Aminoacyl-tRNA Synthetasen (s.u.; Sigma-Aldrich) war jedoch auffällig, dass der Puffer, in dem diese Enzyme gelöst waren (10 mM Tris-HCl, pH 7,2, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 30 mM β-Mercaptoethanol, 50% (v/v) Glycerin) zu einer Steigerung der Proteinsyntheseaktivität von CFPS Reaktionen führte. Daher testete man alle diese Substanzen einzeln in der angegebenen Konzentration in einem Volumen von 2 µl auf ihren Einfluss auf die Synthese der CAT im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5 und 3.5.9), wobei der β-Mercaptoethanol als die aktivitätssteigernde Substanz identifiziert werden konnte. Die anderen Komponenten des Puffers hatten keinen Einfluss auf die Syntheseleistung. Nach Ermittlung der optimalen Endkonzentration von 2 mM (Abb. 4.4), wurde versucht, den β-Mercaptoethanol durch gleiche Konzentrationen des ähnlich wirkenden DTT auszutauschen, was zu einer weiteren Steigerung der synthetisierten Menge an Testprotein führte (Abb. 4.4). Noch höhere Konzentrationen an DTT erhöhten jedoch die Syntheseleistung des Systems nicht mehr. Auffällig war, dass vor allem beim Einsatz von S30

Extrakten mit unterdurchschnittlicher Produktivität ($\leq 300 \text{ } \mu\text{g/ml CAT/h}$ bei 37° C) zusätzliches DTT zu teilweise großen Steigerungen führte (bis zu 40%). Bei Extracten mit durchschnittlicher ($\sim 430 \text{ } \mu\text{g/ml CAT}$) oder überdurchschnittlicher ($> 450 \text{ } \mu\text{g/ml CAT}$) Produktivität steigerte das DTT die Syntheseleistung, wenn überhaupt, nur wenig ($\leq 5\%$).

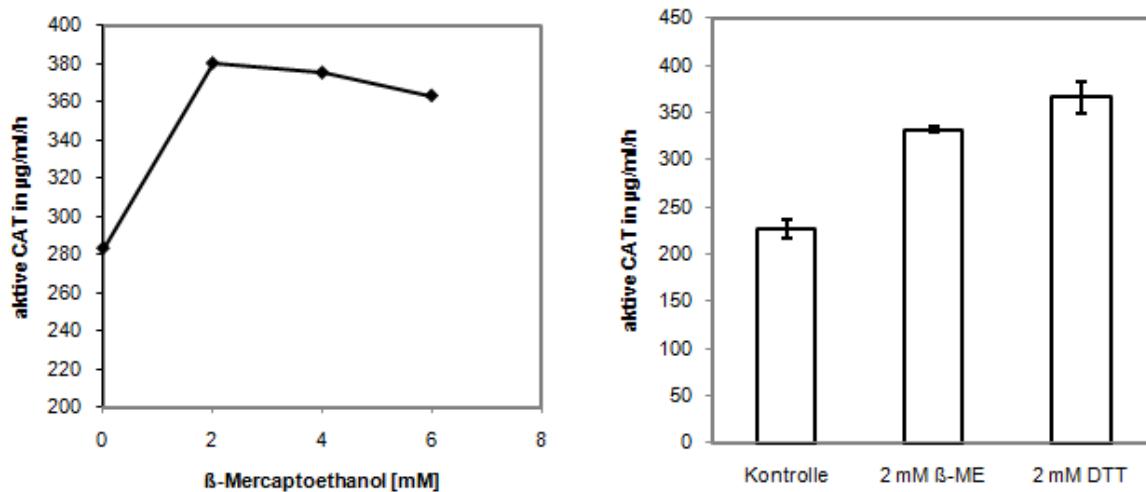


Abb. 4.4: Ermittlung der optimalen Endkonzentration an β -Mercaptoethanol und Einsatz von DTT
Links: Die optimale Endkonzentration an β -Mercaptoethanol ermittelte man im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5 und 3.5.9) anhand der Synthese der CAT bei 37° C für 1 h, wonach diese quantifiziert wurde (siehe 3.5.10). 2 mM erwiesen sich hier als optimal. Niedrigere Konzentrationen als 2 mM konnten in einem hier nicht gezeigten Vorversuch als optimal ausgeschlossen werden.
Rechts: Wurde im gleichen Versuch, wie oben beschrieben, statt der 2 mM β -Mercaptoethanol eine gleiche Endkonzentration an zusätzlichem DTT verwendet, wurde der positive Effekt auf die Synthese der CAT weiter verstärkt.

Die Verwendung der zusätzlichen 2 mM DTT wurde in die Herstellung der S30 Extracte integriert, indem man diese nach dem Aufkonzentrieren auf eine DTT-Endkonzentration von 6,5 mM einstellte (siehe 3.5.2).

4.1.3 Charakterisierung des optimierten Systems

Die in den vorigen beiden Punkten dargestellten Optimierungen führten insgesamt zu einer Steigerung der Syntheseleistung der CAT im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5; 1 h bei 37° C) von durchschnittlich $200 \text{ } \mu\text{g/ml}$ auf $450 \text{ } \mu\text{g/ml}$, wobei einige Extracte auch über $530 \text{ } \mu\text{g/ml}$ der CAT synthetisierten. Dies hatte zur Folge, dass die CAT nun auch auf Coomassie-gefärbten SDS-Gelen als klare Bande zu erkennen war, wenn nur 1 μl der Reaktionslösung auf das Gel aufgetragen wurde (Abb. 4.5). Verfolgte man die Synthese der CAT im Batch-Verfahren über

die Zeit war ersichtlich, dass in den ersten 20-30 min die Reaktion sehr schnell ablief und dann mit stark verminderter Geschwindigkeit noch mindestens 2,5 h andauerte (Abb. 4.5).

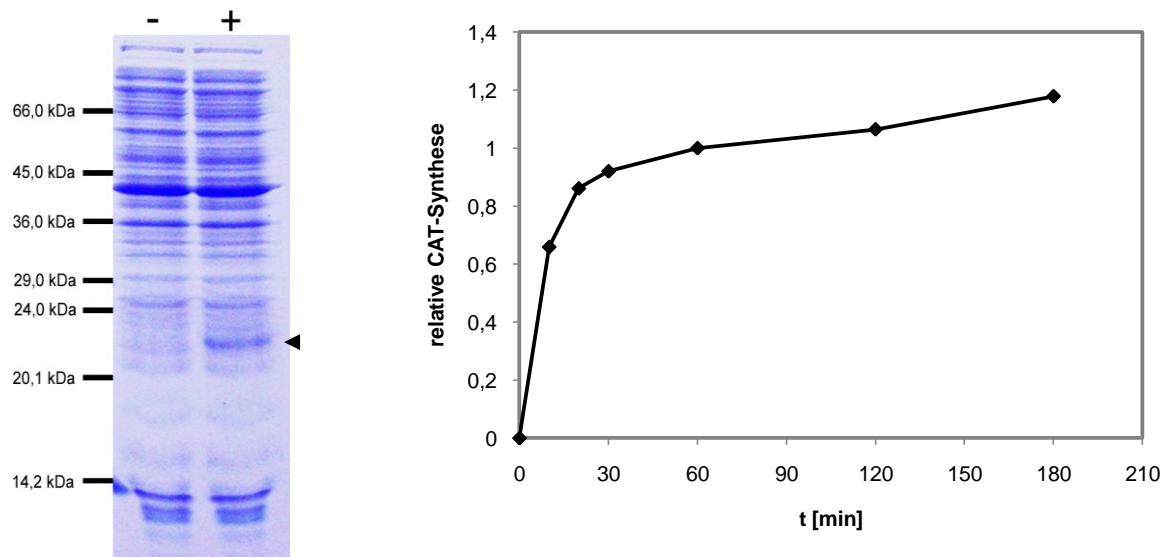


Abb. 4.5: SDS-PAGE eines Batch-Ansatzes und Synthese der CAT über die Zeit

Links: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind jeweils 1 µl eines Batch-Ansatzes (siehe 3.5.5) ohne (-) und mit (+) der template DNA pK7-CAT nach einer einstündigen Expression bei 37° C. Die synthetisierte CAT (Pfeil) ist deutlich zu erkennen.

Rechts: Relative Synthese der CAT im Batch-Verfahren bei 37° C (siehe 3.5.5). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils eine Probe entnommen und die synthetisierte CAT quantifiziert (siehe 3.5.10). Die Menge an CAT nach 1 h Expression wurde als Standardwert 1 gesetzt und die weiteren Werte entsprechend verrechnet. Nach 30 min waren bereits über 90% der CAT synthetisiert, danach lief die Reaktion sehr langsam weiter und erreichte bei 3 h etwas weniger als 120% vom Standardwert. In beiden Abbildung wurde exakt nach dem optimierten Protokoll vorgegangen.

Das optimierte *E. coli* CFPS System wurde auch im Dialysemodus (siehe 3.5.6) getestet, wobei erst ermittelt werden musste, welches Dialysesystem und welche Ausschlussgröße der Membran sich am besten eignete. Dabei wurde festgestellt, dass bei Verwendung eines 1 ml Spectra/Por® CE Irradiated DispoDialyzer (Spectrum) mit einer Ausschlussgröße von 50 kDa die Ausbeute an synthetisiertem Testprotein, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, am größten war (~2 mg/ml CAT; siehe 3.5.10; Abb. 4.6). Dabei blieb die CAT (ca. 25,6 kDa), trotz der relativ großen Ausschlussgröße, innerhalb der Dialysemembran und nur < 1% des insgesamt synthetisierten Proteins konnten in der Nährlösung nachgewiesen werden. Kleinere Ausschlussgrößen (10-20 kDa), die oft in der Literatur vorgeschlagen werden (z.B. Kigawa *et al.*, 2004), führten zu deutlich verringerten Ausbeuten der CAT (1,1-1,2 mg/ml). Andere getestete Dialysesysteme erwiesen sich als ungeeignet, da sie entweder undicht waren (Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Units, Pierce) oder einen zu großen Querschnitt besaßen, was zu

einem schlechten Austausch während der Reaktion und damit zu geringen Ausbeuten führte (Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2, Spectrum).

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die verwendeten Extrakte, zur längeren Haltbarmachung, lyophilisierbar waren. Dazu wurden S30 Extrakte, von denen ein Teil mit N₂ eingefroren, ein anderer lyophilisiert (siehe 3.4.11) und vor dem Versuch wieder in einem gleichen Volumen H₂O aufgenommen wurde, auf ihre Syntheseleistung der CAT im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) getestet. Dabei zeigte sich bei beiden in etwa die gleiche Ausbeute an synthetisierter CAT, wobei mal der eingefrorene, mal der lyophilisierte S30 Extrakt etwas mehr des Testproteins synthetisierte (Schwankungen von etwa 10%). Ein Versuch, bei dem nicht nur die S30 Extrakte, sondern ganze Batch-Ansätze ohne DNA template lyophilisiert wurden, war leider nicht erfolgreich. Nach dem Aufnehmen im Ausgangsvolumen H₂O und der Zugabe des DNA templates (pK7-CAT) konnte hier keine Synthese des Testproteins festgestellt werden.

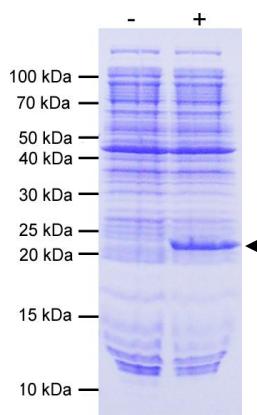


Abb. 4.6: Expression der CAT im Dialysemodus

16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind 1 µl der Reaktionslösung einer Expression der CAT (Pfeil) im Dialysemodus (+, siehe 3.5.6), sowie 1 µl einer 0-Kontrolle ohne template DNA (-), die nicht gegen eine Nährlösung dialysiert, sondern lediglich unter gleichen Bedingungen inkubiert wurde. Die Expression fand üN bei 30° C, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, statt. Dabei wurden 300 µl der Reaktionslösung gegen 3 ml der Nährlösung dialysiert und ein 1 ml Spectra/Por® CE Irradiated Dispodialyzer (Spectrum) mit einer Ausschlussgröße von 50 kDa verwendet.

4.2 Kopplung von CFPS und NASBA-Reaktion

Eine NASBA-Reaktion, die Bestandteil des *in vitro* Evolutionssystems ist, das von der GENEART AG entwickelt wird, sollte an das hier vorgestellte *E. coli* CFPS System gekoppelt werden. Dabei war zu Beginn der Arbeit bereits bekannt, dass bei einer NASBA-Reaktion in Anwesenheit von CFPS Systemen, die auf *E. coli* S30 Extrakten basieren, kein Amplifikationsprodukt mehr gebildet wird. Die Anwesenheit eukaryotischer CFPS Systeme inhibierte die NASBA-Reaktion dagegen nicht. Ein Ausweichen auf solch ein System war jedoch nicht möglich, da die benötigten Konzentrationen an Mg²⁺-Ionen von NASBA-Reaktion und eukaryotischer Translation nicht miteinander vereinbar waren. Der Befund, dass NASBA-Reaktionen in Anwesenheit des PURE Systems nicht gestört werden zeigte jedoch,

dass nicht die prokaryotische Translation an sich für die Inhibition der Reaktion verantwortlich war, sondern andere Bestandteile der S30 Extrakte, die vermutlich gar nicht mit der Translation in Verbindung stehen. Auch konnte ausgeschlossen werden, dass die in der NASBA-Reaktion verwendete T7 RNA Polymerase durch die S30 Extrakte beeinflusst wird, da man diese auch bei CFPS Reaktionen einsetzt. Damit war zu Versuchsbeginn bereits bekannt, dass die in der NASBA-Reaktion verwendete reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV), im Folgenden einfach als M-MLV bezeichnet, bzw. die Bildung ihrer Zwischenprodukte (RNA/DNA-Hybridnen) oder Produkte (doppelsträngige DNA), in irgendeiner Weise von den S30 Extrakten gestört wird. Nachdem man Pufferbestandteile als Grund für die Inhibition ausgeschlossen hatte, wurde versucht, S30 Extrakte durch verschiedene Modifikationen mit der NASBA-Reaktion kompatibel zu machen.

4.2.1 Kompatibilität von S30 Extrakten und NASBA-Reaktion

Es wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, warum die S30 Extrakte die Bildung von Produkten in der NASBA-Reaktion verhinderten, die alle überprüft wurden. Diese sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

RNase-Verdau der S30 Extrakte

Eine sehr frühe Hypothese war, dass in den S30 Extrakten, bedingt durch die Sonifikation, sehr viele einzelsträngige RNA-Fragmente enthalten waren, die in der NASBA-Reaktion als unspezifische Primer für die M-MLV wirkten und die Entstehung eines Produktes definierter Länge, das als Bande auf einem Agarose-Gel sichtbar ist, verhinderten. Es wurde auch die Möglichkeit diskutiert, dass diese einzelsträngigen RNA-Fragmente mit der eigentlichen template RNA um die Bindung an die M-MLV konkurrierten und dadurch die Amplifikationsreaktion störten.

Getestet wurde diese Hypothese, indem man einen S30 Extrakt, wie unter Punkt 3.5.2 beschrieben herstellte. Während der Präinkubation mit NaCl gab man zusätzlich, zum Verdau der RNA, 5 µl/ml eines RNase A/T1 Mixes (enthält 2 mg/ml RNase A und 5 U/µl RNase T1; Fermentas) zu. Es entstand jedoch auch unter Anwesenheit dieser S30 Extrakte kein Produkt in der NASBA-Reaktion.

Zu diesem Zeitpunkt konnte von der Projektpartnerin außerdem die störenden Bestandteile der S30 Extrakte auf Proteine eingegrenzt werden, da S30 Extrakte, die man zum Denaturieren der Proteine kurz auf über 90° C erhielt, die NASBA-Reaktion nicht mehr störten.

Gelfiltration der S30 Extrakte

Ein weiterer verfolgter Ansatz war, einen S30 Extrakt per Gelfiltration zu fraktionieren. Anschließend sollten die inhibitorisch wirkenden Fraktionen identifiziert und die vereinigten Fraktionen, die die NASBA-Reaktion nicht stören, auf verbleibende Translationsaktivität getestet werden. Dazu wurden 1,5 ml eines S30 Extraktes mit einer Proteinkonzentration von 42 mg/ml mittels Gelfiltration mit der größeren HiLoad™ 26/60-Säule (Volumen ca. 320 ml; siehe 3.4.12) bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt, wobei S30-Puffer mit 1 mM DTT als Laufmittel verwendet wurde. Die Fraktionen sammelte man à 10 ml, konzentrierte die proteinhaltigen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa auf etwa 0,5 ml auf (siehe 3.4.9) und analysierte die Auftrennung durch SDS-PAGE (Abb. 4.7).

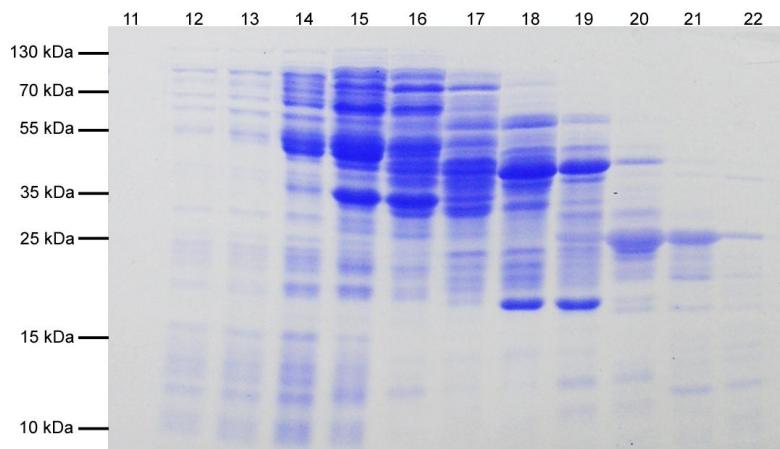


Abb. 4.7: Analyse proteinhaltiger Fraktionen durch SDS-PAGE

16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 3,3 µl der konzentrierten, proteinhaltigen Fraktionen der Gelfiltration eines S30 Extraktes. 11-22 entspricht den zugehörigen, gesammelten Fraktionen. Alle, außer Fraktion 11, enthielten Protein. Die Gelfiltration war erfolgreich, da alle Fraktionen eine unterschiedliche Zusammensetzung aufwiesen, wobei das Molekulargewicht der enthaltenen Proteine in späteren Fraktionen abnimmt.

In einem anschließenden Test der Projektpartnerin wurde jedoch festgestellt, dass alle proteinhaltigen Fraktionen (12-22; siehe Abb. 4.7) die NASBA-Reaktion störten, so dass dieser Ansatz nicht mehr weiter verfolgt wurde.

GST-Pulldown Assay mit der M-MLV

Eine weitere Hypothese war, dass eventuell ein Protein der S30 Extrakte an die M-MLV bindet und dadurch ihre Aktivität stört. Dies sollte durch einen GST-Pulldown Assay geprüft werden. Hierfür exprimierte man die M-MLV als N-terminales Fusionsprotein mit GST, ausgehend vom Plasmid pGEX-4T-1 M-MLV, das von der GENEART AG zur Verfügung gestellt wurde, in *E. coli* BL21. Eine Expression für 4 h bei 37° C in Anwesenheit von 1 mM IPTG (siehe 3.4.4) führte zu einer ausreichenden Synthese des Fusionsproteins. Die anschließende Reinigung (siehe 3.4.6) erfolgte ausgehend von einer 200 ml Kultur, wobei jedoch kein Proteaseverdau stattfand. Stattdessen resuspendierte man die Matrix mit dem gebundenen Fusionsprotein nach dem Waschen 1:1 PBS (Endvolumen 200 µl) und inkubierte jeweils 100 µl dieser Suspension üN unter Bewegung bei 4° C mit 10 ml eines nicht aufkonzentrierten S30 Extraktes (9,7 mg/ml) bzw. als Kontrolle mit NASBA-Puffer (40 mM Tris, pH 8,3, 12 mM MgCl₂, 70 mM KCl, 5 mM DTT). Der verwendete S30 Extrakt wurde vor seinem Einsatz beim GST-Pulldown Assay ebenfalls in NASBA-Puffer überführt, indem man bei der Herstellung (siehe 3.5.2) gegen diesen Puffer, statt gegen S30-Puffer mit 1 mM DTT, dialysierte. Nach der Inkubation wurden die Matrices (jeweils 50 µl), wie in Punkt 3.4.6 beschrieben, jeweils 3x mit 10 Matrixvolumen NASBA-Puffer gewaschen und anschließend 1:1 in NASBA-Puffer aufgenommen. Diese Suspensionen analysierte man anschließend per SDS-PAGE, wobei jedoch kein Protein identifiziert werden konnte, das aufgrund seiner Bindung an die M-MLV zu einer zusätzlichen Bande auf dem Gel führte (Abb.4.8).

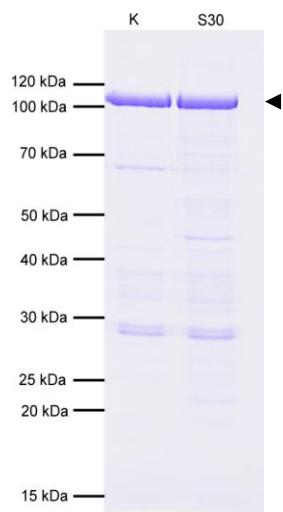


Abb. 4.8: Analyse des GST-Pulldown Assays durch SDS-PAGE

12% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 5 µl der gewaschenen Matrices (1:1 in NASBA-Puffer), die zuvor in 10 ml NASBA-Puffer (K) bzw. in 10 ml S30 Extrakt (S30) inkubiert wurden. Das GST-M-MLV Fusionsprotein (Pfeil; ca. 104 kDa) ist gut erkennbar. In der S30-Spur war keine Bande eines Proteins identifizierbar, das durch Bindung an die M-MLV aus dem S30 Extrakt isoliert wurde. Lediglich die Verunreinigungen waren in dieser Spur, im Vergleich zur Kontrolle, leicht erhöht.

Verwendung RNase HI-freier S30 Extrakte

Ein letzter Versuch, S30 Extrakte doch noch kompatibel zur NASBA-Reaktion zu machen war die Verwendung RNase HI-freier Extrakte. Grundlage für diesen Versuch war eine

Veröffentlichung von Ma und Crouch (1996), in der beschrieben war, dass die *E. coli* RNase HI die Zwischenprodukte der M-MLV (RNA/DNA-Hybride) verdaut und dadurch die Produktbildung verhindert. Aus diesem Grund stellte man einen S30 Extrakt (siehe 3.5.2) aus einem *E. coli* Stamm her bei dem die RNase HI deletiert war (*E. coli* KP7600 Δ RNAse HI, National BioResource Project (NIG, Japan): *E. coli*). Diese Extrakte zeigten eine sehr schwache Syntheseleistung der CAT im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5; 38 μ g/ml bei Expression von 1 h bei 37° C, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT) und verhinderten ebenfalls die Produktbildung in der NASBA-Reaktion.

4.2.2 Kompatibilität isolierter Ribosomen und NASBA-Reaktion

Da verschiedene Versuche, die S30 Extrakte kompatibel zur NASBA-Reaktion zu machen, nicht erfolgreich waren, sollte im nächsten Schritt ausgenutzt werden, dass die auf *E. coli* basierende CFPS auch mit isolierten Ribosomen möglich ist, wenn diese nicht gewaschen wurden (Kudlicki *et al.*, 1992). Anfängliche Befunde waren, dass nach Kudlicki isolierte, ungewaschene Ribosomen (siehe 3.5.3) noch Translationsaktivität besaßen (s.u.), jedoch die NASBA-Reaktion, wie schon die S30 Extrakte, störten. Isolierte man die Ribosomen nach Spedding (1990; siehe 3.5.4), dessen Protokoll ein intensives waschen der Ribosomen miteinschließt, wurde die NASBA-Reaktion nicht mehr beeinflusst. Derart isolierte Ribosomen wiesen jedoch auch keine Translationsaktivität mehr auf, da durch die vielen Waschschritte die assoziierten Translationsfaktoren mit entfernt wurden. Aus diesem Grund wurde versucht, ein Protokoll der Ribosomenisolierung zu entwickeln, das einen Mittelweg der Methoden nach Kudlicki *et al.* (1992) und Spedding (1990) darstellt und zu translationsaktiven Ribosomen führt, die die NASBA-Reaktion nicht stören.

Im ersten Versuch kultivierte, erntete, wusch, lysierte und zentrifugierte man die *E. coli* Zellen wie nach Spedding beschrieben (siehe 3.5.4), wonach 10 ml eines geklärten Lysats in Puffer A vorlagen. Dieses zentrifugierte man, anders als beschrieben, bei 100000g und 4° C für 4 h und spülte das Ribosomenpellet anschließend 2x mit S30-Puffer mit 1 mM DTT. Dann resuspendierte man die Ribosomen in 10 ml des gleichen Puffers und dialysierte sie üN gegen 2 l dieses Puffers (Ausschlussgröße 15 kDa; siehe 3.4.8). Anschließend konzentrierte man die Ribosomen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa auf (siehe 3.4.9) und stellte sie auf eine Ribosomenkonzentration von 12 μ M ein. Diese Ribosomen machten einen „saubereren“ Eindruck als Ribosomen, die nach Kudlicki isoliert wurden (klarere Lösung mit weniger

Gelbfärbung). Da sie jedoch die NASBA-Reaktion ebenfalls störten, verzichtete man auf weitere Versuche.

In einem zweiten Versuch ging man zunächst wie im ersten vor (s.o.). Mit den etwa 10 ml des geklärten Lysats in Puffer A überschichtete man dann, wie in Punkt 3.5.4 beschrieben, ein gleiches Volumen Puffer B, wobei jedoch ein modifizierter Puffer B mit nur 100 mM statt 500 mM NH₄Cl verwendet wurde, um die Ribosomen weniger zu waschen als von Spedding vorgeschlagen. Dann zentrifugierte man bei 100000g und 4° C für ≥ 15 h, spülte, resuspendierte und dialysierte das Ribosomenpellet wie im ersten Versuch beschrieben (s.o.), wobei wieder der S30-Puffer mit 1 mM DTT verwendet wurde. Auch diese Ribosomen konzentrierte man wie im ersten Versuch auf und stellte sie auf eine Ribosomenkonzentration von 12 μ M ein. Derart isolierte Ribosomen störten sie NASBA-Reaktion zwar auch, aber in einem viel geringeren Ausmaß, so dass die Entstehung des Amplifikationsproduktes mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte. Daher testete man diese Ribosomen auf ihre Fähigkeit, das Testprotein CAT, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) zu synthetisieren, wobei die Expressionen für 1 h bei 37° C stattfanden. Es wurden verschiedene Endkonzentrationen der Ribosomen zwischen 0,6 und 4 μ M getestet, jedoch konnte bei keiner die Synthese der CAT nachgewiesen werden (siehe 3.5.10).

Da die im zweiten Versuch isolierten Ribosomen schon eine leichte Inhibition der NASBA-Reaktion verursachten, obwohl sie ihre Translationsaktivität bereits komplett verloren hatten, wurde an dieser Stelle die Arbeit mit isolierten Ribosomen eingestellt, da Translationsaktivität und Kompatibilität mit der NASBA-Reaktion nicht vereinbar schienen.

4.2.3 Expression der reversen Transkriptase eines Coliphagen

In den vorherigen beiden Punkten wurde beschrieben, dass es mit den angewandten Methoden nicht möglich war, die NASBA-Reaktion in Anwesenheit von *E. coli* S30 Extrakten bzw. translationsaktiven Ribosomen durchzuführen. Daher entschied man sich, nicht das CFPS System, sondern die NASBA-Reaktion selbst zu modifizieren, um beide Reaktionen gleichzeitig ablaufen lassen zu können. Dabei sollte in der NASBA-Reaktion eine andere reverse Transkriptase verwendet werden, die nachweislich in Anwesenheit von *E. coli* S30 Extrakten funktioniert. Solch eine reverse Transkriptase ist die des P2-ähnlichen Coliphagen EC30 (Odegrip *et al.*, 2006), im Folgenden als P2RT bezeichnet, die exprimiert und

aufgereinigt werden sollte, um in einer NASBA-Reaktion getestet werden zu können. Die GENEART AG stellte ein Plasmid zur Verfügung (pIVEX2.3-MCS P2RT), das für eine Codon-optimierte Version der P2RT mit einem N-terminalen (HN)₆-tag codierte, mit dem sie aber keine Expression der P2RT *in vivo* erreichen konnte.

Ausgehend von diesem Plasmid wurde die codierende Sequenz der P2RT, ohne das (HN)₆-tag, per PCR mit Hilfe der Primer P2RT-5'-Bam und P2RT-3'-Xho (siehe Tab. 2.2) vermehrt und in den pCR®2.1-TOPO® zwischenkloniert. Ausgehend von diesem Vektor konnte das P2RT-Insert dann in die Bam HI und Xho I Schnittstellen des pGEX-4T-1, im Leseraster des N-terminalen GST-tags, eingefügt werden (siehe 3.3). Anschließend wurde geprüft, ob mit diesem Plasmid eine Expression der P2RT, als Fusionsprotein mit GST, in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS erreicht werden kann. Dazu führte man verschiedene lange (2 h bis üN) Expressionstests bei unterschiedlichen Temperaturen (30° C und 37° C) und IPTG Konzentrationen (0,3-1 mM; siehe 3.4.4) durch. Jedoch konnte bei keinem dieser Tests, auch nicht im Western Blot unter Verwendung eines Anti-GST-Antikörpers (siehe 3.4.3), das Fusionsprotein nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die codierende Sequenz der P2RT zwar im *E. coli* Stamm TG1, nicht aber in BL21 (DE3)pLysS, durch PCR nachgewiesen werden kann. Ein Versuch, in dem die isolierten und linearisierten Plasmide aus TG1 und BL21 (DE3)pLysS auf ein Agarose-Gel aufgetragen wurden, zeigte, dass das Plasmid pGEX-4T-1 P2RT in BL21 (DE3)pLysS modifiziert wurde und die codierende Sequenz der P2RT vermutlich gar nicht mehr enthielt (Abb.4.9).

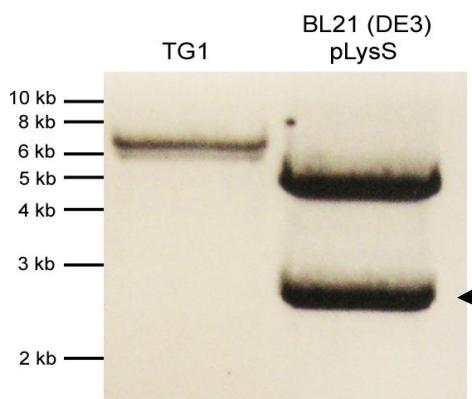


Abb. 4.9: pGEX-4T-1 P2RT aus TG1 und BL21 (DE3)pLysS
 1%iges Agarose-Gel, auf dem etwa 500 ng des pGEX-4T-1 P2RT, isoliert aus TG1, bzw. 2 µg des gleichen Plasmids isoliert aus BL21 (DE3)pLysS in linearisierter Form aufgetragen wurden. Das aus TG1 isolierte Plasmid wurde mit Xho I linearisiert, die aus BL21 (DE3)pLysS isolierten Plasmide mit Xho I und EcoR I. Wurde das Plasmid aus TG1 isoliert, lief es auf dem Gel auf der erwarteten Höhe von ca. 6,5 kb. Bei Isolation der Plasmide aus BL21 (DE3)pLysS war das pLysS Plasmid auf der erwarteten Höhe von etwa 4,85 kb zu finden. Eine modifizierte Version des pGEX-4T-1 P2RT (Pfeil) lief auf einer Höhe von etwa 2,5 kb.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Expression des GST-P2RT Fusionsproteins in BL21 (DE3)pLysS nicht möglich war. Daraufhin wurde die Expression bei unterschiedlichen Bedingungen (s.o.) ausgehend vom pGEX-4T-1 P2RT in *E. coli* CK600K versucht. In diesem Stamm konnte das P2RT-Insert, wie in TG1, durch PCR nachgewiesen werden. Allerdings

konnte auch bei Expression in diesem Stamm das Fusionsprotein nicht detektiert werden, auch nicht im Western Blot. Daher entschied man sich für die Expression der P2RT *in vitro*, wobei wieder, aufgrund des T7 Promotors, das ursprünglich von der GENEART AG zur Verfügung gestellte Plasmid pIVEX2.3-MCS P2RT verwendet wurde.

Zuerst exprimierte man die P2RT für 4 h bei 37° C im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5), wobei weder auf SDS-Gelen, noch im Western Blot unter Verwendung des Universal His Western Blot Kit 2.0 (Clontech; siehe 3.4.3), eine Detektion der P2RT über das (HN)₆-tag möglich war. Auch wenn man so einen Batch-Ansatz mit Hilfe der Ni-NTA Spin Columns (Qiagen; erlaubt auch die Aufreinigung von Proteinen mit (HN)₆-tag) unter denaturierenden Bedingungen nach Standardprotokoll aufreinigte (siehe 3.4.5), die vereinigten Elutionsfraktionen mit Aceton fällte (siehe 3.4.10), das Proteinpellet in Probenpuffer aufnahm und davon eine Menge auf das Gel auftrug, das 10 µl des Batch-Ansatzes entsprach, war keine Detektion der P2RT im Western Blot möglich. Ein zur Kontrolle durchgeführter Batch-Ansatz, der aus dem gleichen Master Mix stammte, synthetisierte dagegen unter gleichen Bedingungen über 520 µg/ml der CAT (siehe 3.5.10).

Bei der Expression der P2RT mit dem PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (siehe 3.5.8) für 4 h bei 37° C konnte schließlich im Western Blot eine Expression festgestellt werden. Dabei handelte es sich aber nicht um die P2RT (ca. 67,4 kDa inklusive (HN)₆-tag), sondern lediglich um ein ca. 23 kDa großes, N-terminales Fragment der P2RT (Abb. 4.10). Es musste sich um ein N-terminales Fragment handeln, da es mit dem Universal His Western Blot Kit 2.0 (Clontech; siehe 3.4.3) detektiert wurde und sich der (HN)₆-tag am N-terminus des Proteins befand.

Trotz intensiver Versuche konnte die P2RT also nicht exprimiert werden und die Arbeiten an diesem Protein wurden eingestellt.

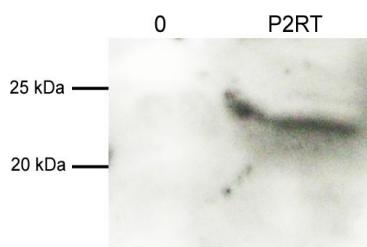


Abb. 4.10: Expression der P2RT im PURE System

Western Blot nach 16% SDS-PAGE. Aufgetragen wurden jeweils 5 µl der Reaktionslösung nach Expression der P2RT mit dem PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (siehe 3.5.8), einmal ohne (0) und einmal mit (P2RT) der template DNA pIVEX2.3-MCS P2RT. Die Detektion des (HN)₆-tags erfolgte mit dem Universal His Western Blot Kit 2.0 (Clontech; siehe 3.4.3). Es konnte lediglich ein etwa 23 kDa großes, N-terminales Fragment der P2RT (ca. 67,4 kDa inklusive (HN)₆-tag) detektiert werden.

4.3 Rekonstitution der Translationsmaschinerie in *E. coli* S30 Extrakten

Zahllose Studien beschäftigen sich mit der Verbesserung von CFPS Systemen, wobei noch nicht bekannt ist, ob die Translationsmaschinerie in den verwendeten, groben Zellextrakten optimal rekonstituiert ist, oder ob eventuell bei der Präparation der Extrakte Teile der Translationsmaschinerie verloren gehen bzw. inaktiviert werden und die Produktivität von CFPS Systemen dadurch limitiert wird. Einen Hinweis, dass eventuell tatsächlich Teile der Translationsmaschinerie im *E. coli* System in zu niedrigen Konzentrationen vorliegen, lieferte die Arbeit von Underwood *et al.* (2005), in der gezeigt wurde, dass zusätzliche EFs die Syntheseleistung des Systems steigern konnten. Aus diesem Grund wurden alle Teile der *E. coli* Translationsmaschinerie einzeln auf ihren Einfluss auf die Produktivität des hier vorgestellten *E. coli* CFPS Systems getestet.

4.3.1 Einfluss zusätzlicher Bestandteile der Translationsmaschinerie

Zum Test der Hypothese, dass eventuell Teile der Translationsmaschinerie in den *E. coli* S30 Extrakten in zu niedrigen Konzentrationen vorliegen und dadurch die Produktivität der CFPS limitiert wird, testete man alle für die Translation benötigten Faktoren, die auch im PURE System (Shimizu *et al.*, 2001, 2005; Shimizu and Ueda, 2010) verwendet werden, auf ihren Einfluss auf die Produktivität des Systems. Zuvor mussten die meisten Faktoren gewonnen und einige Kontrollversuche durchgeführt werden.

4.3.1.1 Gewinnung und Aktivität

Die meisten der für die Versuche benötigten Faktoren mussten erst gewonnen werden, lediglich die *E. coli* Amioacyl-tRNA Synthetasen waren als Mischung aller 20 Enzyme kommerziell erhältlich (Sigma-Aldrich). Zur Gewinnung der translationsaktiven Ribosomen verwendete man das Protokoll nach Kudlicki *et al.* (1992; siehe 3.5.3). Die anderen Translationsfaktoren mussten erst kloniert und aufgereinigt werden.

Die codierenden Sequenzen aller Translationsfaktoren wurden ausgehend von genomischer DNA von *E. coli* BL21 durch PCR vermehrt und in das Plasmid pET-14b (N-terminaler His₆-tag) eingefügt, nur die MTF klonierte man nach Ramesh *et al.* (1997) in den pET-20b(+) (C-terminaler His₆-tag). Die dafür verwendeten Primer und Restriktionsenzyme sind Tabelle 2.2

zu entnehmen. Dabei entschied man sich bei allen, außer bei IF1, für eine Zwischenklonierung in den pCR®2.1-TOPO®. Eine Besonderheit war die Klonierung von RF3, da diese codierende Sequenz eine interne Schnittstelle für das Restriktionsenzym Nde I aufwies. Das RF3-Insert klonierte man in den pCR®2.1-TOPO®, ohne dass zuvor durch die Primer zusätzlich Schnittstellen angefügt wurden. Zum Herausschneiden des Inserts verwendete man das Restriktionsenzym EcoR I, dessen Schnittstellen im Vektor codiert waren, und fügte es „blunt“ in den pET-14b ein, der mit Nde I geöffnet und ebenfalls „blunt“ eingesetzt wurde (Klonierungen siehe 3.3).

Die Expression der Translationsfaktoren fand bei allen für 4 h bei 37° C in Anwesenheit von 1 mM IPTG in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS statt. Die anschließende Reinigung unter nativen Bedingungen mit den Ni-NTA Spin Columns (Qiagen; siehe 3.4.5), ausgehend von 100 ml Kulturvolumen, lieferte bereits bei Verwendung der Standardpuffer sehr saubere Translationsfaktoren (Abb. 4.11). Molekulare Massen der Translationsfaktoren, ohne angefügte His₆-tags, sind Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Tab. 4.2: Molekulare Massen

Faktor	Mw (kDa)
IF1	8,3
IF2	97,4
IF3	20,6
EF-G	77,6
EF-Tu	43,3
EF-Ts	30,4
RF1	39,9
RF2	41,3
RF3	59,6
RRF	20,6
MTF	34,2

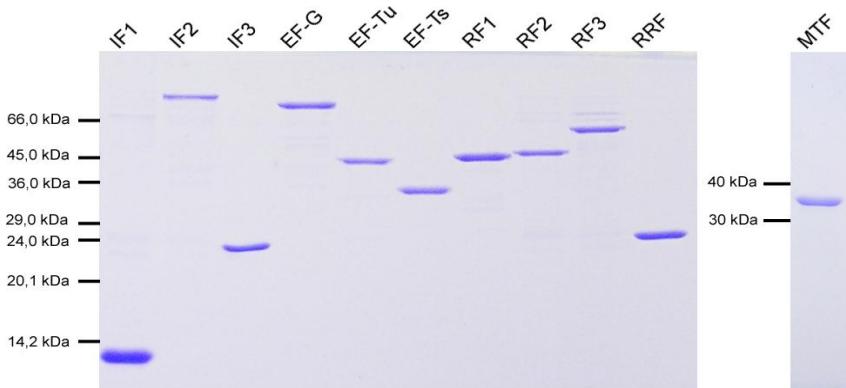


Abb. 4.11: Reinheitskontrolle durch SDS-PAGE

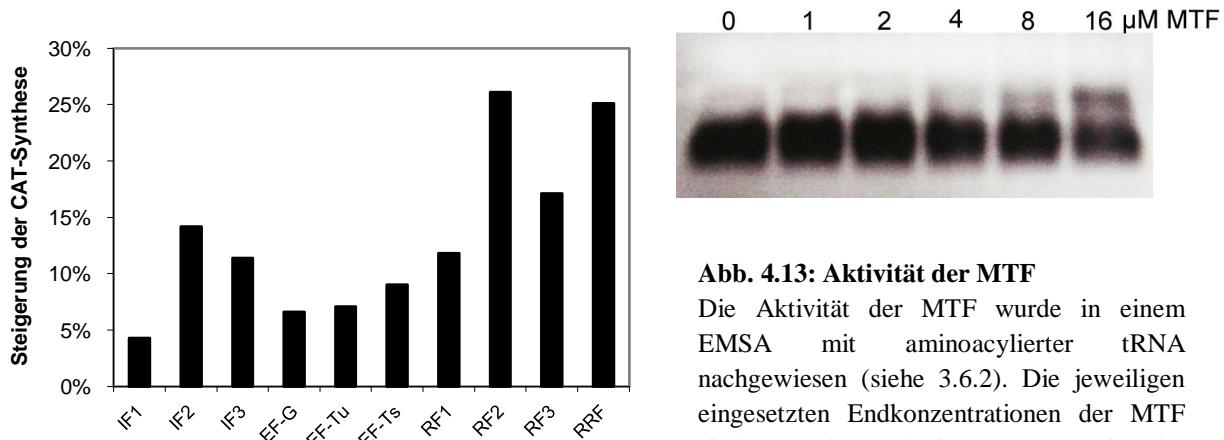
Jeweils 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind jeweils etwa 1.5 µg der aufgereinigten Translationsfaktoren, die in sehr hoher Reinheit gewonnen werden konnten.

Die gereinigten Translationsfaktoren wurden, je nach Ausbeute durch Aufkonzentrieren (siehe 3.4.9) oder Verdünnen, auf Proteinkonzentrationen zwischen 60 und 120 µM eingestellt. Ein Wechsel des Puffers war nicht erforderlich (s.u.).

Die IFs, EFs, RFs und den RRF testete man auf Aktivität, indem CFPS Reaktionen mit translationsaktiven Ribosomen nach Kudlicki *et al.* (1992) im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) durchgeführt wurden. Die Ribosomen wurden dabei in der optimalen Endkonzentration von 10 µM eingesetzt (s.u., hier nicht mit DTT eingestellt). Der Zusatz der einzelnen gereinigten

Faktoren (siehe 3.5.9) führte bei allen zu einer Steigerung der Synthese des Testproteins CAT, verglichen mit einer Kontrolle, so dass alle als aktiv angesehen werden konnten (Abb. 4.12). Der Elutionspuffer, in dem die Faktoren gelöst waren, hatte in den eingesetzten Volumen (1 μ l) keinen Einfluss auf die Synthese des Testproteins. Hierbei wurde gleichzeitig gezeigt, dass die nach Kudlicki gewonnenen Ribosomen Translationsaktivität besaßen.

Die Aktivität der MTF wurde in einem EMSA mit aminoacylierter tRNA nachgewiesen (siehe 3.6.2; Abb. 4.13). Die dabei verwendeten *E. coli* Aminoacyl-tRNA Synthetasen, die auch später im CFPS System getestet wurden, mussten ebenfalls aktiv sein, da in einem EMSA der MTF mit tRNA, die nicht aminoacyliert war, kein „shift“ der tRNA-Bande beobachtet werden konnte.



4.3.1.2 Kontrollversuche

Bevor der Einfluss der einzelnen Bestandteile der Translationsmaschinerie auf die CFPS der *E. coli* S30 Extrakte erfolgen konnte, mussten noch einige Kontrollversuche durchgeführt werden. Zuerst testete man die verschiedenen Puffer, in denen die isolierten Faktoren vorlagen, auf ihren Einfluss auf die CFPS. Bei diesen Tests verglich man die Menge an synthetisierter CAT (1 h bei 37° C) im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5, 3.5.9 und 3.5.10) in Anwesenheit der verschiedenen Puffer (Elutionspuffer, siehe 3.4.5; Aminoacyl-tRNA

Synthetase Puffer, siehe 4.1.2; S30 Puffer mit 1 mM DTT, siehe 3.5.2; PBS, siehe 3.4.6) mit einer Kontrolle. Keiner dieser Puffer beeinflusste dabei in den eingesetzten Volumen (bis 2 μ l) die Reaktion.

In einem anderen Versuch sollte festgestellt werden, ob die CFPS durch zusätzliches Protein allgemein, oder durch die zusätzlichen negativen Ladungen der His₆-tags der Translationsfaktoren beeinflusst wird. Um dies zu überprüfen wurde die PDZ2-Domäne des Proteins Zonula Occludens 1 (*rattus norvegicus*; AS 186-264) gewählt. Eine rekombinante Version dieser Domäne ohne fusioniertes tag wurde von Malte Andrasch in PBS zur Verfügung gestellt. Eine andere Variante dieser Domäne, mit N-terminalem His₆-tag, musste erst exprimiert und gereinigt werden. Das Plasmid pET-14b PDZ2 wurde ebenfalls von Malte Andrasch zur Verfügung gestellt und für die Expression der PDZ2-Domäne mit N-terminalem His₆-tag in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS verwendet. Die Expression fand üN bei 37° C in Anwesenheit von 100 μ M IPTG statt, wonach die Domäne im Batch-Verfahren, ausgehend von 1 l Kulturvolumen, unter nativen Bedingungen aufgereinigt wurde (siehe 3.4.6). Dabei konnte mit den Standardpuffern eine hohe Reinheit erzielt werden (Abb.4.14). Nach der Reinigung dialysierte (siehe 3.4.8) man die Domäne noch gegen PBS, damit beide Varianten im gleichen Puffer vorlagen und stellte beide auf eine Proteinkonzentration von 120 μ M ein. Anschließend testete man beide bis zu einer Konzentration von 8 μ M auf ihren Einfluss auf die CFPS, wobei kein Effekt festgestellt werden konnte (Abb 4.14).

4.3.1.3 Einfluss auf die Produktivität der CFPS

Der Einfluss der einzelnen Bestandteile der Translationsmaschinerie wurde jeweils unter den gleichen Bedingungen ermittelt. Im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) synthetisierte man das Testprotein CAT, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, in Anwesenheit verschiedener Endkonzentrationen der einzelnen Faktoren (siehe 3.5.9) für 1 h bei 37° C. Anschließend quantifizierte man die synthetisierte CAT (siehe 3.5.10) und verglich die Menge mit einer Kontrolle ohne zugesetzten Faktor. Die verwendeten S30 Extrakte wiesen unter diesen Bedingungen alle eine Syntheseleistung von mindestens 430 μ g/ml der CAT auf (Abb. 4.15).

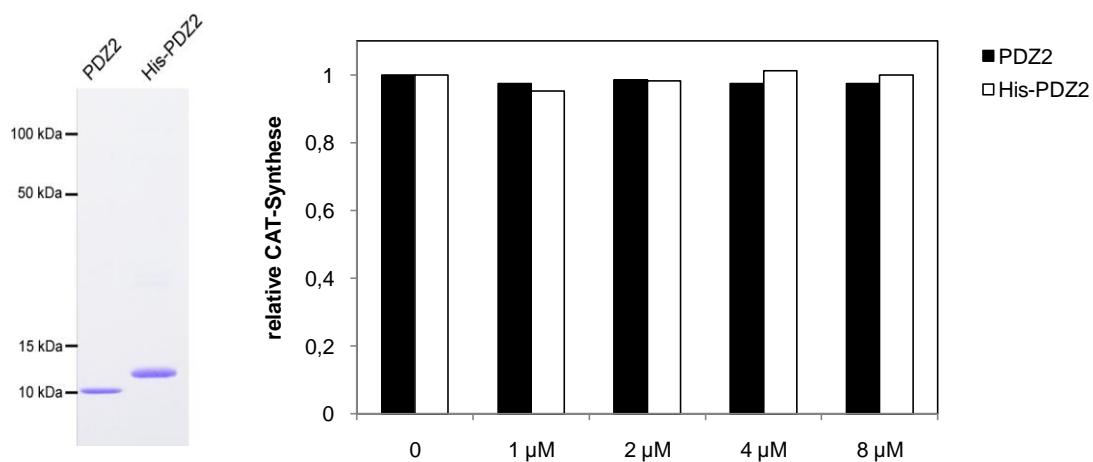


Abb. 4.14: Reinheitskontrolle und Einfluss der PDZ2-Domäne mit und ohne His₆-tag auf die CFPS

Links: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils etwa 1,5 µg der PDZ2-Domäne ohne (PDZ2; ca. 8,8 kDa) und mit His₆-tag (His-PDZ2; ca. 11 kDa). Beide Domänen lagen in einem sehr reinen Zustand vor.

Rechts: Einfluss der beiden Varianten der PDZ2-Domäne auf die CFPS mit S30 Extrakten. Es wurde die CAT, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) für 1 h bei 37° C synthetisiert und anschließend quantifiziert (siehe 3.5.10). Weder die Anwesenheit der PDZ2-Domäne, noch der PDZ2-Domäne mit His₆-tag in unterschiedlichen Konzentrationen führte zu einer Änderung der CAT-Ausbeute, so dass davon ausgegangen werden kann, dass weder zusätzliches Protein, noch die Anwesenheit der His₆-tags die CFPS beeinflussten. Die synthetisierte CAT der Kontrolle wurde hier 1 gesetzt und die anderen Werte entsprechend verrechnet.

Bei diesen Versuchen wurde so vorgegangen, dass man mit der Zugabe von sehr niedrigen Konzentrationen der Faktoren (50-200 nM) begann und die Konzentration so lange steigerte, bis ein klarer Effekt auf die Synthese der CAT erkennbar, oder sehr hohe Konzentrationen (4-6 µM) erreicht wurden.

In Abbildung 4.15 ist erkennbar, dass nur zusätzliches EF-Tu und EF-Ts die Proteinsynthese steigern konnte. EF-Tu erhöhte die Ausbeute der CAT in einer Konzentration von 2 µM um durchschnittlich 13%, EF-Ts in einer Konzentration von 1 µM um durchschnittlich 6%. Aufgrund der starken Schwankungen dieser Steigerungen konnte leider nicht ermittelt werden, ob der Effekt dieser beiden Proteine additiv ist. Die anderen getesteten Faktoren neigten alle dazu, die Synthese der CAT, vor allem in höheren Konzentrationen, zu inhibieren, wobei RF2 und RF3 am wenigsten Einfluss nahmen. Die stärksten inhibitorischen Effekte waren bei zusätzlichem IF2, RF1 und EF-G, sowie bei den zusätzlichen translationsaktiven Ribosomen zu beobachten.

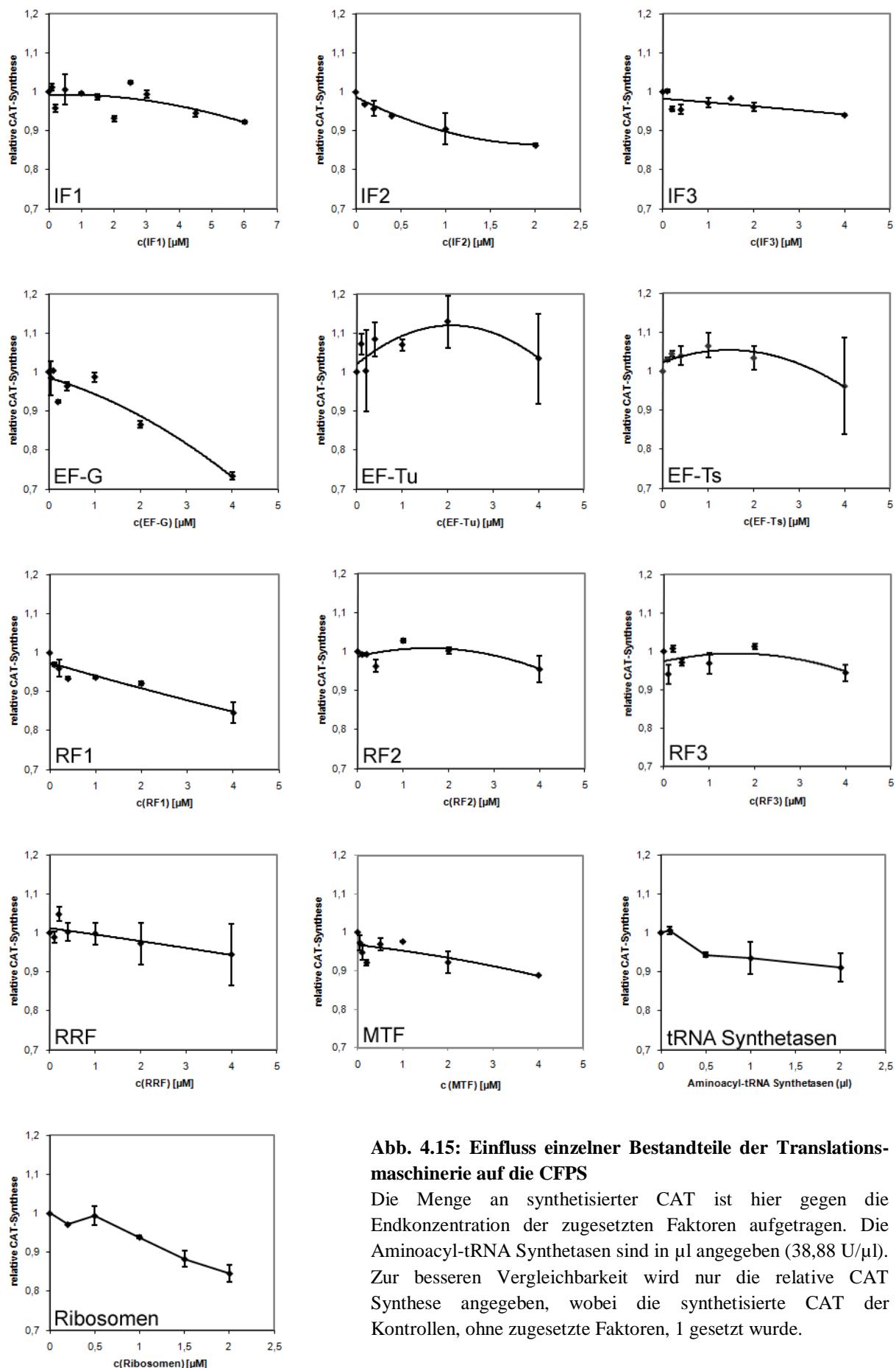


Abb. 4.15: Einfluss einzelner Bestandteile der Translationsmaschinerie auf die CFPS

Die Menge an synthetisierter CAT ist hier gegen die Endkonzentration der zugesetzten Faktoren aufgetragen. Die Aminoacyl-tRNA Synthetasen sind in μl angegeben (38,88 U/ μl). Zur besseren Vergleichbarkeit wird nur die relative CAT Synthese angegeben, wobei die synthetisierte CAT der Kontrollen, ohne zugesetzte Faktoren, 1 gesetzt wurde.

4.3.1.4 Einfluss der GTPasen bei erhöhter GTP Konzentration

Bei den Translationsfaktoren IF2, EF-G, EF-Tu und RF3 handelt es sich um GTPasen. Um auszuschließen, dass die im vorigen Abschnitt beobachteten Effekte auf einen erhöhten GTP-Verbrauch zurückzuführen sind, testete man den Einfluss dieser vier Faktoren auf die Synthese des Testproteins CAT noch einmal unter den gleichen Bedingungen wie zuvor, verwendete aber zusätzlich Batch-Ansätze mit der doppelten GTP-Konzentration (1,74 statt 0,87 mM). Dabei hatte die höhere GTP-Konzentration keinen Effekt auf den Einfluss der GTPasen, lediglich der inhibitorische Effekt von EF-G wurde weiter verstärkt (Abb. 4.16).

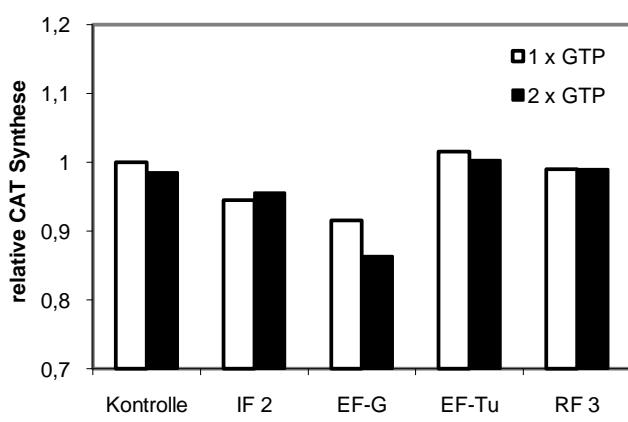


Abb. 4.16: Einfluss der GTPasen bei erhöhter GTP-Konzentration

Die GTPasen IF2, EF-G, EF-Tu und RF3 wurden erneut in einer Endkonzentration von 2 μ M auf die Synthese des Testproteins CAT getestet, sowohl bei normaler (1x GTP), als auch bei doppelter (2x GTP) GTP-Konzentration. IF2, EF-Tu und RF3 zeigten bei 2x GTP die gleichen Effekte wie bei 1x GTP. Der inhibitorische Effekt von EF-G wurde durch das zusätzliche GTP weiter verstärkt und die CAT Ausbeute war um zusätzliche ~5% geringer. Die Kontrolle mit 1x GTP wurde hier wieder 1 gesetzt.

4.3.1.5 Quantifizierung der Translationsfaktoren in S30 Extrakten

Die Konzentrationen der Translationsfaktoren in den S30 Extrakten ist bis heute nicht bekannt. Lediglich die Ribosomenkonzentrationen in den Reaktionslösungen wurden von Underwood *et al.* (2005) bestimmt und betragen etwa 1,6 μ M. Aus diesem Grund und um zu prüfen, ob in Punkt 4.3.1.3 sinnvolle Konzentrationen der Faktoren eingesetzt wurden, quantifizierte man die IFs, EFs, RFs und den RRF in den S30 Extrakten. Die Quantifizierung wurde nicht selbst, sondern von Jörg Reinders und seiner Arbeitsgruppe am Institut für funktionelle Genomik (Regensburg) durchgeführt, wobei lediglich die S30 Extrakte und die gereinigten Faktoren zur Verfügung gestellt wurden. Diese Ergebnisse werden an dieser Stelle dennoch präsentiert, da sie deutlich zeigen, dass diese Faktoren in den Versuchen in 4.3.1.3 in den richtigen Konzentrationen getestet wurden und außerdem Aufschluss über die Zusammensetzung der S30 Extrakte geben.

Die Quantifizierung erfolgte ausgehend von einer 2D-Gelelektrophorese, wobei eine Mischung aus S30 Extrakt und den gereinigten Faktoren aufgetragen wurde. Dabei waren der Extrakt und die Faktoren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt und die gereinigten Faktoren konnten somit benutzt werden, die Faktoren in den Extrakten zu identifizieren. Abbildung 4.17 zeigt ein Beispiel eines solchen Gels.

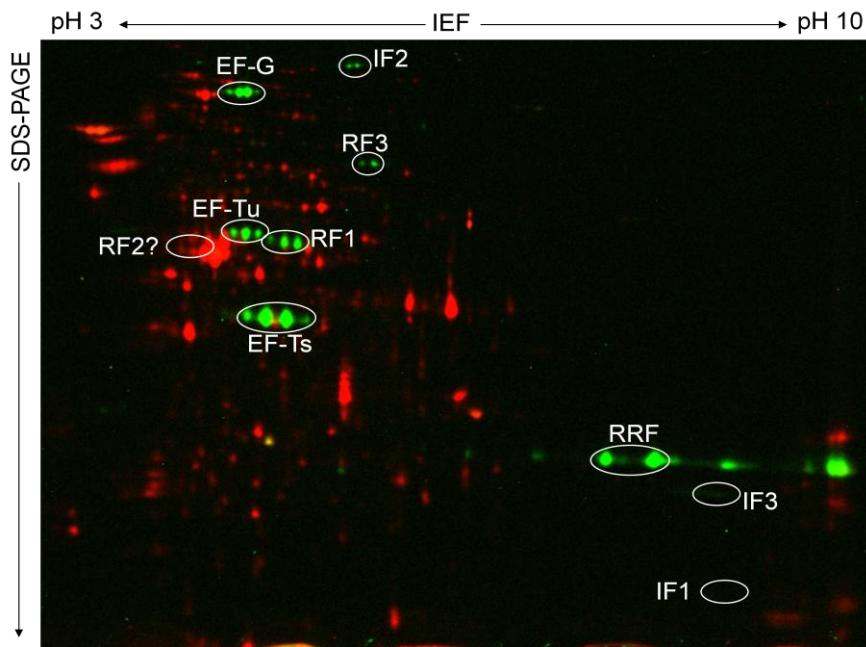


Abb. 4. 17: 2D-Gelelektrophorese eines S30 Extraktes mit zugesetzten Faktoren (Jörg Reinders, Regensburg)
Der S30 Extrakt ist mit einem roten, die gereinigten Faktoren mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Es sind hier nicht alle Faktoren (grün) zu sehen, diese konnten jedoch auf anderen Gelen identifiziert werden.

Die auf diese Weise identifizierten „Spots“ der S30 Extrakte schnitt man dann aus den Gelen aus, gewann die Proteine zurück und verdaute sie mit Trypsin, wonach sie durch nano-HPLC-MS/MS analysiert und quantifiziert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst und stammen aus der Analyse von mindestens 3, meistens aber von 6-8 Gelen. Lediglich IF1 war nur auf zwei Gelen zu finden und RF2 konnte auf den Gelen gar nicht reproduzierbar identifiziert werden.

Tab. 4.3: Quantifizierung von Translationsfaktoren in den S30 Extrakten

Faktor	µg/mg	Konzentration [µM] im	
	Protein	S30 Extrakt bei 55 mg/ml	Reaktionsansatz bei 20 mg/ml
IF1	2,4 ± 0,3	15,9 ± 1,9	5,8 ± 0,7
IF2	2,8 ± 1,1	1,5 ± 0,6	0,5 ± 0,2
IF3	7,7 ± 1,6	20,5 ± 4,2	7,5 ± 1,5
EF-G	3,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1	0,8 ± 0,04
EF-Tu	4,4 ± 1,1	5,5 ± 1,3	2,0 ± 0,5
EF-Ts	2,8 ± 0,5	5,1 ± 0,9	1,9 ± 0,3
RF1	3,9 ± 1,0	5,3 ± 1,3	1,9 ± 0,5
RF2	-	-	-
RF3	4,9 ± 0,5	4,5 ± 0,4	1,6 ± 0,1
RRF	1,3 ± 0,2	3,4 ± 0,5	1,2 ± 0,2

4.3.2 CFPS mit niedrigeren Konzentrationen der Translationsfaktoren

Viele der Bestandteile der Translationsmaschinerie, die in Punkt 4.3.1.3 auf ihren Einfluss auf die CFPS getestet wurden, inhibierten die Reaktion. Außerdem zeigen die Ergebnisse der Quantifizierung, dass die IFs, EFs, RFs und der RRF in den Reaktionen eine viel höhere Konzentration aufweisen, als beispielsweise im PURE System (vgl. z.B. Shimizu and Ueda, 2010). Aus diesen Gründen versuchte man mit zwei unterschiedlichen Methoden die CFPS mit niedrigeren Konzentrationen an Translationsfaktoren ablaufen zu lassen, um eventuell dadurch eine Steigerung der Syntheseleistung zu erzielen. Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich alle auf die Synthese der CAT, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) für 1 h bei 37° C, wonach das synthetisierte Protein quantifiziert wurde (siehe 3.5.10).

Bei der ersten Methode verwendete man die nach Kudlicki *et al.* (1992) isolierten Ribosomen und bestimmte ihre optimale Endkonzentration in CFPS Reaktionen auf 10 µM. Auch hier stellte sich heraus, dass wie schon bei den S30 Extrakten, eine Erhöhung der Endkonzentration an DTT um 2 mM einen positiven Effekt auf die Syntheseleistung hatte (siehe 4.1.2). Daher konzentrierte man diese Ribosomen standardmäßig bei der Herstellung (siehe 3.5.3) auf 40 µM auf und stellte sie, wie die S30 Extrakte, auf 6,5 mM DTT ein. Davon setzte man dann 7,5 µl in den Reaktionen ein, wobei noch 3,05 µl S30 Puffer mit 6,5 mM DTT zugegeben wurden, um die normalerweise eingesetzten 10,55 µl zu erreichen. Verglich man derartige Ribosomen in der CFPS mit einem S30 Extrakt, das ebenfalls ohne Präinkubation aus der gleichen Präparation stammte und in der optimalen

Proteinkonzentration von 40 mg/ml eingesetzt wurde (siehe 4.1.1), erreichten die Ribosomen etwa 75% der Syntheseleistung der S30 Extrakte. Als nächsten Schritt gab man den bei der Ribosomenisolierung anfallenden Überstand, den man mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa auf eine Proteinkonzentration von 50 mg/ml konzentriert (siehe 3.4.9) und auf 6,5 mM DTT eingestellt hatte, wieder schrittweise zu, wobei entsprechend weniger S30-Puffer mit 6,5 mM DTT zugegeben wurde (s.o.). Dabei stellte sich die Zugabe von 2 μ l dieses Überstandes als optimal heraus und die Ribosomen erreichten so fast exakt die Syntheseleistung der S30 Extrakte (wieder gleiche Präparation ohne Präinkubation mit 40 mg/ml). Es waren hier jedoch schon 0,5 μ l des Überstandes ausreichend, um ~93% der Syntheseleistung der S30 Extrakte zu erzielen. Die Proteinsynthese mit den Ribosomen konnte also durch die Zugabe des Überstandes wieder auf die Werte von S30 Extrakten erhöht werden, erreichte aber nie noch höhere Werte (Abb. 4.18).

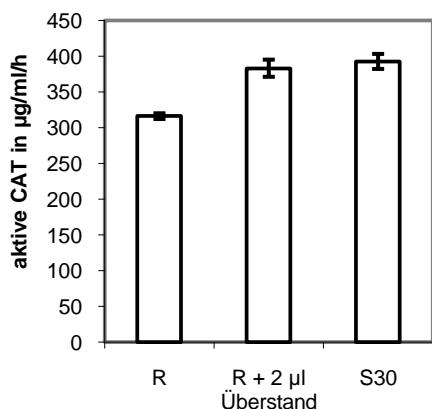


Abb. 4.18: Vergleich der Proteinsyntheseleistung von Ribosomen und S30 Extrakten

Nach Kudlicki *et al.* (1992) isolierte Ribosomen erreichten etwa 75% der Syntheseleistung von S30 Extrakten (in diesem Versuch ~80%). Die Zugabe der optimalen Menge des bei der Ribosomenisolierung anfallenden Überstandes (50 mg/ml) erhöht die Syntheseleistung wieder auf Werte, die von S30 Extrakten erreicht werden. R steht hier für Ribosomen.

Ähnliche Versuche, bei denen man statt des konzentrierten Überstandes einen S30 Extrakt (mit NaCl Präinkubation; 52 mg/ml) zu den Ribosomen gab und die Syntheseleistung mit einem S30 Extrakt verglich (gleiche Präparation wie Ribosomen; keine Präinkubation; 40 mg/ml) zeigten, dass bei Zugabe der optimalen Menge an S30 Extrakt (2,5 μ l) nur ~83% der Syntheseleistung der S30 Extrakte erreicht werden können.

Der zweite Versuchsansatz, bei dem die CFPS mit niedrigeren Konzentrationen an Translationsfaktoren durchgeführt werden sollte, beinhaltete die Verwendung von S30 Extrakten, die mit einer Ausschlussgröße von 1000 kDa, statt der normalerweise verwendeten 10 kDa, aufkonzentriert wurden (siehe 3.5.2). Auf diese Weise sollten die Ribosomen, nicht aber die anderen in den Extrakten enthaltenen Faktoren, konzentriert werden. Auch hier musste auf die NaCl Präinkubation verzichtet werden, da ansonsten der Durchlauf der Konzentrierung die gleiche Syntheseleistung aufwies, wie das Konzentrat. Ohne die

Präinkubation zeigte das Konzentrat fast die doppelte Syntheseleistung wie der Durchlauf, wenn beide in der gleichen Proteinkonzentration eingesetzt wurden. Die Konzentrate wurden ebenfalls, wie die S30 Extrakte und Ribosomen, auf 6,5 mM DTT eingestellt. Die optimale Proteinkonzentration des Konzentrats wurde auf 40 mg/ml bestimmt. Verglich man nun die Syntheseleistungen des Konzentrats mit einem S30 Extrakt aus der gleichen Präparation (beide ohne Präinkubation und 40 mg/ml), so zeigten beide exakt die gleiche Syntheseleistung. Auch die schrittweise Zugabe des bei der Konzentrierung anfallenden Durchlaufes (mit 10 kDa Ausschlussgröße auf 15 mg/ml konzentriert) zu den Konzentraten hatte keinen Einfluss auf die Syntheseleistung.

4.4 Einfluss von RNA Chaperonen auf die CFPS

In der Einleitung wurde dargelegt, dass eventuell eine Sekundärstrukturbildung der mRNA ein limitierender Faktor der CFPS sein könnte. Aus diesem Grund wurden verschiedene Vertreter von RNA Chaperonen, Annealern und Helikasen, im Folgenden einfach als RNA Chaperone bezeichnet, auf ihren Einfluss auf die CFPS getestet. Dabei benutzte man die Einteilung nach Rajkowitsch *et al.* (2007), die auch in der Einleitung verwendet wurde, und wählte aus jeder Klasse mindestens einen Vertreter zum Test in der CFPS aus. Lediglich die Klasse der Kälteschockproteine wurde hier ausgelassen, da bereits drei Vertreter auf ihren Einfluss auf die CFPS überprüft wurden, wobei alle drei die Reaktion inhibierten (Hofweber *et al.*, 2005). Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über die getesteten Proteine, inklusive Klassenzugehörigkeit nach Rajkowitsch *et al.* (2007), molekulare Massen und zugehörigen Organismus.

Die in Punkt 4.3.1.2 durchgeführten Kontrollversuche, in denen zusätzliches Protein, His₆-tags und verschiedene Puffer auf ihren Einfluss auf die CFPS getestet wurden, gelten auch hier für die RNA Chaperone. Falls weitere Puffer verwendet wurden, ist dies im nächsten Punkt erwähnt.

Tab. 4.4: In dieser Arbeit getestete RNA Chaperone

	Klasse	Gewählte(r) Vertreter	Organismus	Mw (kDa)
RNA Chaperone	hnRNPs	UP1	<i>Homo Sapiens</i>	20,8
	Ribosomale Proteine	S12	<i>E. coli</i>	13,7
		S1	<i>E. coli</i>	61,2
	Histon-artige Proteine	StpA	<i>E. coli</i>	15,3
RNA Annealer	Virale NC-Proteine	NCp7	HIV-1	8,0
	Sm-artige Proteine	Hfq	<i>E. coli</i>	11,1
RNA Helikasen		eIF-4A	<i>Homo Sapiens</i>	46,2
		Mss116p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72,3

4.4.1 Gewinnung und Aktivität

Alle in dieser Arbeit getesteten RNA Chaperone mussten zunächst kloniert, aufgereinigt und auf Aktivität getestet werden. Da sich, vor allem bei den Reinigungen, viele Besonderheiten ergaben wird hier die Prozedur für jedes Protein einzeln kurz beschrieben.

UP1

Bei UP1 handelt es sich um eine Domäne (AS 1-196) des Proteins hnRNP A1, welche RNA Chaperonaktivität besitzt (Übersicht in Russel, 2008). Ausgangsmaterial für diese Klonierung waren HeLa-Zellen, aus denen die RNA isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde. Davon ausgehend war eine Vermehrung des UP1-Inserts (Primer siehe Tab. 2.2) und seine Insertion in die EcoR I und Xho I Schnittstellen des pGEX-4T-1 (siehe 3.3; ähnlich Dallaire *et al.*, 2000) möglich. Die Expression von UP1 als Fusionsprotein mit GST erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS für 4 h bei 37° C in Anwesenheit von 1 mM IPTG. Für die anschließende Reinigung im Batch-Verfahren, ausgehend von 800 ml Kulturvolumen, wurde exakt nach Standardprotokoll vorgegangen (siehe 3.4.6). Danach lag das Protein in PBS, das im verwendeten Volumen (bis 2 µl siehe 4.3.1.2) keinen Einfluss auf die CFPS hatte, vor. Die Aktivität des Proteins wies man durch einen EMSA mit der CAT mRNA nach (siehe 3.6.1; Abb. 4.19).

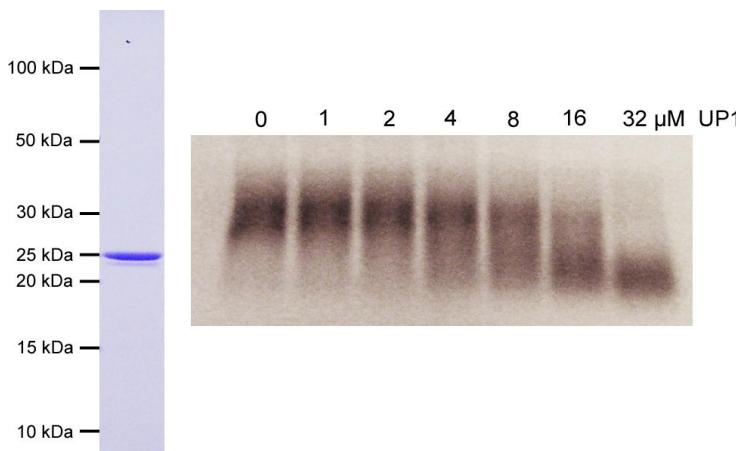
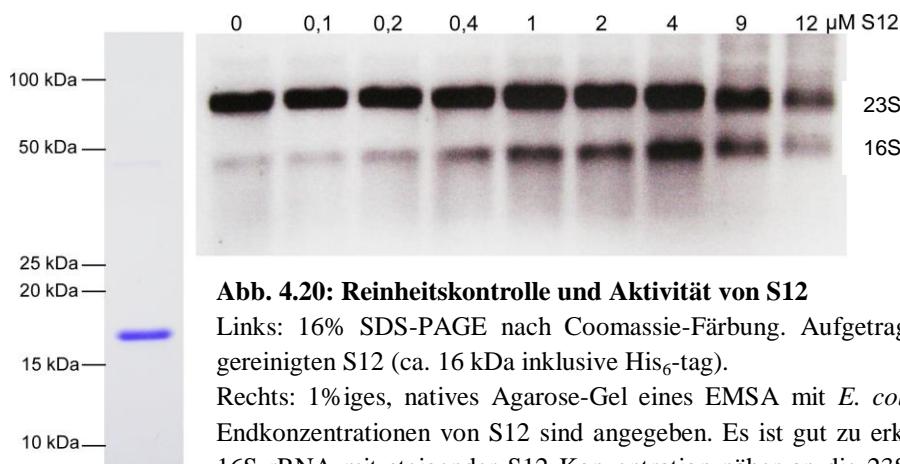


Abb. 4.19: Reinheitskontrolle und Aktivität von UP1

Links: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind etwa 1,5 µg des gereinigten UP1. Das Protein (20,8 kDa) läuft etwas zu hoch (ca. 25 kDa), was jedoch bei den stark basischen RNA Chaperonen häufiger zu beobachten war. Rechts: EMSA mit CAT mRNA. Dargestellt ist ein 1%iges, natives Agarose-Gel. Die UP1 Endkonzentrationen sind angegeben. Ab ca. 4-8 µM ist ein „Shift“ der mRNA Bande nach unten zu beobachten, der bei höheren Konzentrationen noch deutlicher wird.

S12

Die codierende Sequenz von S12 konnte ausgehend von genomischer DNA des *E. coli* Stammes BL21 per PCR vermehrt (Primer siehe Tab. 2.2) werden und wurde zuerst in den pCR®2.1-TOPO® zwischenkloniert, von wo aus sie in die Nde I und Bam HI Schnittstellen des pET-14b eingefügt werden konnte (siehe 3.3). Die Expression von S12 mit N-terminalem His₆-tag erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS für 4 h bei 37° C in Anwesenheit von 1 mM IPTG. In der Reinigung mit den Ni-NTA Spin Columns (Qiagen; siehe 3.4.5) verwendete man das Pellet einer 50 ml Kultur und wählte denaturierende Bedingungen, wobei die Standardpuffer eine hohe Reinheit des Proteins ermöglichten (Abb. 4.20). Eine Reinigung des Proteins unter nativen Bedingungen war auch durch Erhöhung der Salzkonzentration in allen Puffern bis 2 M NaCl nicht möglich, da es zu unlöslich war. Nach der Reinigung überführte man das Protein durch Dialyse (siehe 3.4.8) in 2 M Harnstoff, der in der beim eigentlichen Test eingesetzten Menge von 1 µl keinen Einfluss auf die CFPS hatte. Eine Überführung in einen von Culver und Noller (1999) für die Rekonstitution von ribosomalen 30S Untereinheiten vorgeschlagenen Puffer (80 mM HEPES-KOH, pH 7,6, 20 mM MgCl₂, 1 M KCl, 6 mM β-Mercaptoethanol) funktionierte nicht, da das S12 in höheren Konzentrationen auch hier unlöslich war. Der Nachweis der Aktivität von S12 erfolgte über einen EMSA mit *E. coli* rRNA (3.6.3; Abb. 4.20), da in einem EMSA mit der CAT mRNA (siehe 3.6.1) keine Interaktion festgestellt werden konnte, wobei das Protein in Endkonzentrationen bis 12 µM getestet wurde.

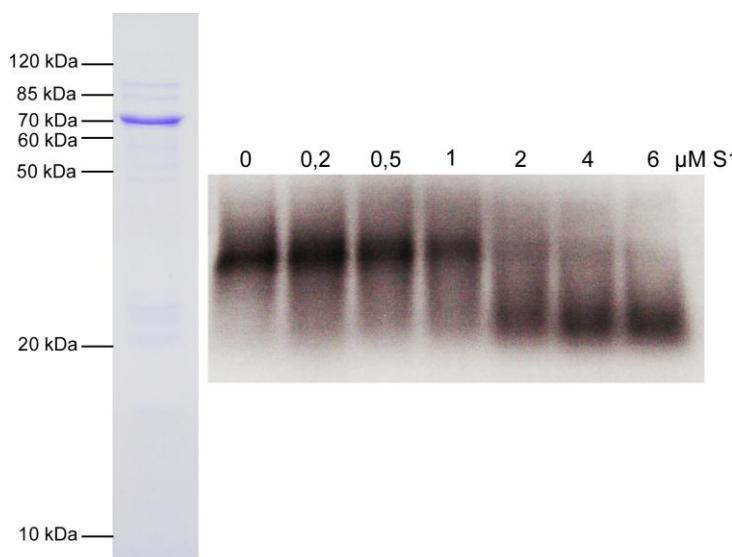
**Abb. 4.20: Reinheitskontrolle und Aktivität von S12**

Links: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind etwa 1,5 µg des gereinigten S12 (ca. 16 kDa inklusive His₆-tag).

Rechts: 1%iges, natives Agarose-Gel eines EMSA mit *E. coli* rRNA. Die verwendeten Endkonzentrationen von S12 sind angegeben. Es ist gut zu erkennen, dass die Bande der 16S rRNA mit steigender S12 Konzentration näher an die 23S rRNA Bande heranrückt. Auch ist zu erkennen, dass S12 eine einheitlichere Sekundärstruktur der 16S rRNA verursacht, was an einer Zunahme der Intensität dieser Bande erkennbar ist. In hohen Konzentrationen nimmt S12 auch Einfluss auf die 23S rRNA.

S1

Die proteincodierende Sequenz von S1 vermehrte man ausgehend von genomicscher DNA von *E. coli* BL21 (Primer siehe Tab. 2.2) und klonierte sie zunächst in den pCR®2.1-TOPO®. Von dort aus konnte sie in die Nde I und Bam HI Schnittstellen des pET-14b eingefügt werden (siehe 3.3). Die Expression von S1 mit N-terminalen His₆-tag erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS für 4 h bei 37° C und 1 mM IPTG. Aufgereinigt wurde das Protein ausgehend von 50 ml Kulturen unter nativen Bedingungen mit den Ni-NTA Spin Columns (Qiagen; Standardpuffer; siehe 3.4.5), wobei drei Ansätze parallel durchgeführt werden mussten, um genug Protein für die Versuche zu erhalten (Abb. 4.21). Es wurde bereits gezeigt, dass dieser Elutionspuffer keinen Einfluss auf die CFPS hatte. Die Aktivität von S1 wies man im EMSA mit der CAT mRNA nach (siehe 3.6.1; Abb. 4.21).

**Abb. 4.21: Reinheitskontrolle und Aktivität von S1**

Links: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind etwa 1,5 µg S1 (ca. 63 kDa inklusive His₆-tag). Auch S1 läuft auf SDS-Gelen, wie UP1, etwas zu hoch (ca. 70 kDa).

Rechts: 1%iges, natives Agarose-Gel eines EMSA mit CAT mRNA. Die verwendeten S1 Endkonzentrationen sind angegeben. Ab einer S1 Konzentration von 2 µM ist ein deutlicher „Shift“ der Bande der mRNA zu beobachten.

StpA

Klonierung, Expression und Aufreinigung von StpA erfolgten sehr ähnlich, wie von Keatch *et al.* (2005) vorgeschlagen. Auch die codierende Sequenz von StpA vermehrte man durch PCR von genomischer *E. coli* BL21 DNA (Primer siehe Tab. 2.2) und fügte sie zunächst in den pCR®2.1-TOPO® ein, von wo aus sie in die Nde I und Bam HI Schnittstellen des pET-14b umkloniert wurde (siehe 3.3). Die Expression mit N-terminalem His₆-tag erfolgte für 4 h bei 37° C und 1 mM IPTG in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS und jeweils ein Kulturvolumen von 50 ml wurde für die anschließenden Reinigungen unter nativen Bedingungen mit den Ni-NTA Spin Columns (Qiagen; siehe 3.4.5) eingesetzt. Um das Protein in reiner Form zu erhalten, waren hier einige Modifikationen des Standardprotokolls nötig. Die NaCl Konzentration musste in allen Puffern auf 1 M erhöht werden und beim Zellaufschluss gab man zusätzlich zur Lysozym/DNase I-Lösung noch 5 µl/ml des RNase A/T1 Mix (Fermentas) zu. Es musste sehr gründlich sonifiziert und das Lysat anschließend für weitere 30 min auf Eis inkubiert werden, bevor man mit dem Protokoll wie beschrieben fortfuhr (Abb. 4.22). Die Erhöhung der Salzkonzentration im Elutionspuffer hatte in dem verwendeten Volumen von 2 µl keinen Einfluss auf die CFPS. Die Aktivität des Proteins wurde über seine Fähigkeit nachgewiesen, DNA vor DNase I-Verdau zu schützen (siehe 3.7; Abb. 4.22), da im EMSA mit der CAT mRNA keine Interaktion nachgewiesen werden konnte (siehe 3.6.1; getestet bis 6 µM).

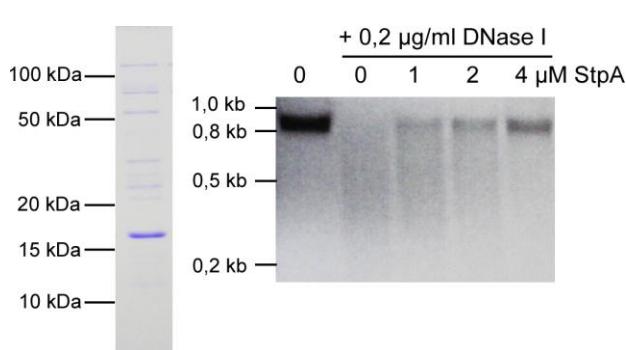


Abb. 4.22: Aktivität und Reinheit StpA

Links: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden etwa 1,5 µg StpA (17,5 kDa inklusive His₆-tag). Rechts: 1% Agarose-Gel des Aktivitätstests von StpA, in dem ein PCR Produkt (codierende Sequenz von EF-Ts; 852 bp) durch StpA vor DNase I-Verdau geschützt wurde. Mit steigender StpA Konzentration (angegeben) wurde weniger des PCR Produktes verdaut, was an der Zunahme der Bandenstärke zu erkennen ist.

NCp7

Die codierende Sequenz der 71 Aminosäure großen Variante von NCp7 amplifizierte man durch PCR mit den Primern p7-5'-Nde und p7-3'-Bam (Tab. 2.2) vom Plasmid pc-wtgag und fügte sie direkt in die entsprechenden Schnittstellen des pET-14b ein. Da jedoch Expressionen und Aufreinigungen (wie unten beschrieben) dieses Proteins immer zu Doppelbanden auf den SDS-Gelen führten, klonierte man eine 55 Aminosäure große Variante des Proteins, die noch beide RNA Bindungsdomänen (siehe z.B. Schmalzbauer *et al.*, 1996) enthielt, genau wie oben beschrieben mit den Primern p7-5'-Nde und p7(1-55)-3'-Bam (Tab. 2.2), in den pET-14b

(siehe 3.3). Die Expression von NCp7(1-55) mit N-terminalem His₆-tag erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS, wobei auffällig war, dass die Zellen sehr lange brauchten, um die für die Induktion erforderliche OD₆₀₀ von mindestens 0,5 zu erreichen (~8 h). Induziert wurde mit 1 mM IPTG und die Expression fand bei 37° C üN statt. Eine Reinigung unter nativen Bedingungen war für dieses Protein wegen seiner sehr schlechten Löslichkeit nicht möglich, so dass es unter denaturierenden Bedingungen, ausgehend von einer 800 ml Kultur, im Batch-Verfahren aufgereinigt wurde (siehe 3.4.6). Um das Protein in sauberer Form zu erhalten, musste ein anderer Lysepuffer (6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 8,0) sowie ein zweiter Waschpuffer (wie normaler Waschpuffer, aber pH 5,9) verwendet werden, mit dem ebenfalls 3x gewaschen wurde. Außerdem musste beiden Waschpuffern β-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 10 mM (vgl. z.B. Schmalzbauer *et al.*, 1996) zugesetzt werden. Nach der Reinigung (Abb. 4.23) lag das Protein in Elutionspuffer mit 10% Neutralisierungspuffer vor, in dem es auch getestet werden musste, da das Protein schon in 2 M Harnstoff komplett unlöslich war. Dieser Puffer beeinflusste die CFPS derart, dass bei Verwendung von 2 µl im Batch-Ansatz nur noch ~50% der CAT synthetisiert wurden. Die Aktivität von NCp7(1-55) wies man durch einen EMSA mit *E. coli* tRNA nach (siehe 3.6.2; Abb. 4.23), mit der es nachweislich interagiert (Khan and Giedroc, 1992). In einem EMSA mit der CAT mRNA (siehe 3.6.1), in dem es bis 12 µM getestet wurde, konnte keine Interaktion festgestellt werden.

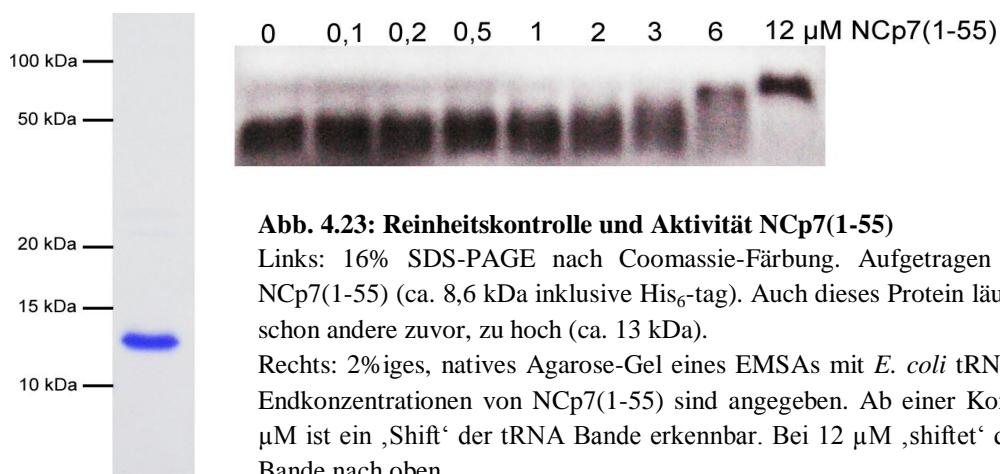


Abb. 4.23: Reinheitskontrolle und Aktivität NCp7(1-55)

Links: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind etwa 1,5 µg NCp7(1-55) (ca. 8,6 kDa inklusive His₆-tag). Auch dieses Protein läuft auf dem Gel, wie schon andere zuvor, zu hoch (ca. 13 kDa).

Rechts: 2%iges, natives Agarose-Gel eines EMASAs mit *E. coli* tRNA. Die eingesetzten Endkonzentrationen von NCp7(1-55) sind angegeben. Ab einer Konzentration von 3-6 µM ist ein „Shift“ der tRNA Bande erkennbar. Bei 12 µM „shiftet“ die komplette tRNA Bande nach oben.

Hfq

Die codierende Sequenz von Hfq gewann man durch PCR mit genomischer *E. coli* BL21 DNA, wobei die Primer Hfq-5'-Nde und Hfq-3'-Bam (Tab. 2.2) verwendet wurden. Diese fügte man zunächst in den pCR®2.1-TOPO® und anschließend in die entsprechenden

Schnittstellen des pET-14b ein. Mit einem N-terminalen His₆-tag konnte bei Hfq jedoch unter verschiedenen nativen Bedingungen keine Bindung an das Säulenmaterial erzielt werden, so dass die Reinigung auf diese Weise nicht möglich war und sowohl bei Klonierung, Expression und Reinigung nach Mikulecky *et al.* (2004) vorgegangen wurde. Man klonierte das Hfq-Insert erneut auf dem gleichen Weg wie vorher in die entsprechenden Schnittstellen des pET-20b(+), wobei diesmal die Primer Hfq-5'-Nde und HfqC-3'-Xho (Tab. 2.2) verwendet wurden (siehe 3.3). Die Expression von Hfq mit C-terminalem His₆-tag erfolgte für 4 h bei 37° C und 1 mM IPTG in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS. Für anschließende Reinigungen mit den Ni-NTA Spin Columns (Qiagen; siehe 3.4.5) unter nativen Bedingungen verwendete man ein Kulturvolumen von 50 ml. Es musste der Lysepuffer nach Mikulecky (50 mM HEPES, pH 7,5, 500 mM NH₄Cl, 20 mM Imidazol, 5% (v/v) Glycerin), sowie zusätzlich zur Lysozym/DNase I-Lösung 5 µl/ml des RNase A/T1 Mix (Fermentas) verwendet werden. Auch hier, wie schon bei StpA, inkubierte man das Lysat nach der Sonifikation zusätzliche 30 min auf Eis, bevor man nach Standardprotokoll fortfuhr (Abb. 4.24). Der Elutionspuffer beeinflusste, wie schon mehrfach erwähnt, die CFPS nicht. Der Nachweis der Aktivität erfolgte über einen EMSA mit *E. coli* tRNA (siehe 3.6.2; Abb. 4.24), wobei diese Interaktion bereits beschrieben ist (Lee and Feig, 2008). Im EMSA mit der CAT mRNA wurde keine Interaktion festgestellt (siehe 3.6.1; getestet bis 8 µM).

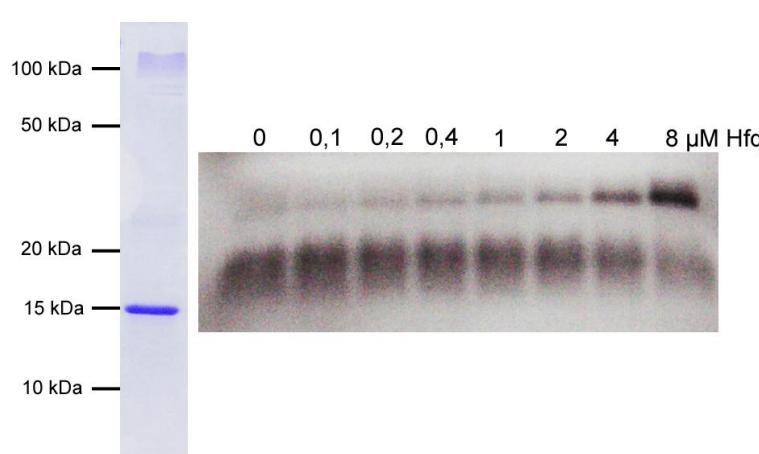


Abb. 4.24: Aktivität und Reinheit Hfq

Links: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden 1,5 µg Hfq (ca. 12 kDa mit His₆-tag), wobei auch dieses Protein etwas zu hoch läuft (ca. 15 kDa).

Rechts: 2%iges, natives Agarose-Gel eines EMAS mit *E. coli* tRNA. Die Hfq Konzentrationen sind angegeben. Mit zunehmender Konzentration des Proteins „shiftet“ immer mehr der tRNA nach oben.

eIF-4A

Die codierende Sequenz von eIF-4A klonierte man direkt, ausgehend von RNA aus HeLa-Zellen, die man zuvor in cDNA umgeschrieben hatte, in die Nde I und Bam HI Schnittstellen des pET-14b (siehe 3.3). Dabei entschied man sich für die Isoform 1 des Proteins, die auch für die Charakterisierung der Helikaseaktivität benutzt wurde (Du *et al.*, 2002). Exprimiert hat man das Protein mit N-terminalen His₆-tag für 4 h bei 30° C unter Anwesenheit von 0,5 mM

IPTG in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS. Aufgereinigt werden konnte eIF-4A mit den Ni-NTA Spin Columns (Qiagen; siehe 3.4.5) unter nativen Bedingungen mit den Standardpuffern. Lediglich das Lysat musste für eine gute Ausbeute mehrmals (2-3x) auf die Säule aufgetragen werden (Abb. 4.25). Der Elutionspuffer hatte keinen Einfluss auf die CFPS. Da eIF-4A im EMSA mit der CAT mRNA keine Interaktion zeigte (siehe 3.6.1; getestet bis 4 μ M), wies man die Aktivität über die ATP Hydrolyse des Proteins nach (siehe 3.8; Abb. 4.25).

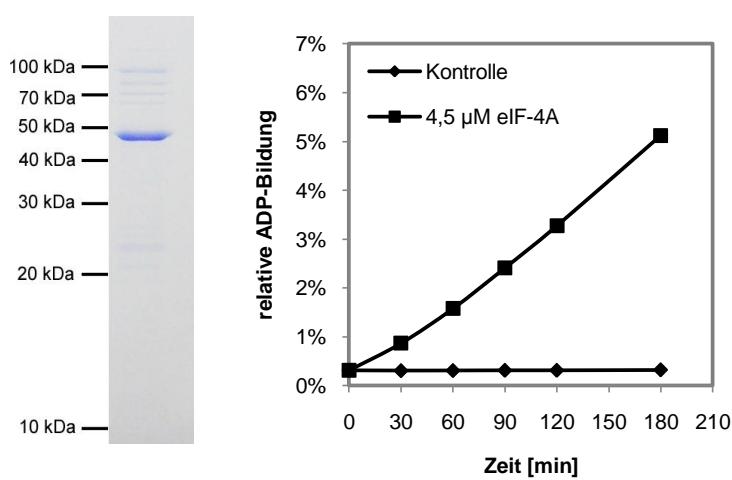


Abb. 4.25: Reinheitskontrolle und Aktivität von eIF-4A

Links: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind etwa 1,5 μ g gereinigtes eIF-4A (ca. 48,3 kDa mit His₆-tag).

Rechts: ATP Hydrolyseaktivität von eIF-4A verglichen mit einer Kontrolle. Die Entstehung von ADP in % ist hier gegen die Zeit aufgetragen. Im Gegensatz zur Kontrolle findet im Ansatz mit dem Protein eine Hydrolyse von ATP statt. Nach 3 h waren etwa 5,5% des ATPs im Ansatz (100 μ M) hydrolysiert.

Mss116p

Die Klonierung und Reinigung von Mss116p sollte zuerst nach Halls *et al.* (2007) erfolgen. Dazu vermehrte man die codierende Sequenz des Proteins (Primer siehe Tab. 2.2), ohne ein N-terminales Signalpeptid (AS 37-664) von cDNA aus Hefe, die man aus dem Stamm Y187 gewonnen hatte und fügte es zunächst in den pCR®2.1-TOPO® ein. Die Primer hängten dabei keine Schnittstellen an die Sequenz an. Zum Herausschneiden des Inserts verwendete man das Restriktionsenzym EcoR I, wobei die Schnittstellen im pCR®2.1-TOPO® codiert waren, und fügte es in die EcoR I Schnittstelle des pMAL-c4X ein. Das Protein konnte mit dem N-terminalen MBP-tag exprimiert und aufgereinigt werden, jedoch war der anschließende Proteaseverdau mit dem Faktor Xa nicht möglich. Ein zu intensiver Verdau führte zu einer kompletten Degradation von Mss116p, obwohl die Sequenz keine weiteren Schnittstellen für den Faktor Xa beinhaltet. Mildere Bedingungen beim Verdau führten immer zu einer Doppelbande von Mss116p auf SDS-Gelen. Dies erklärt, warum Halls *et al.* (2007) einen modifizierten pMAL-c4X benutzte, bei dem die Schnittstelle für den Faktor Xa durch eine Schnittstelle für die TEV-Protease ersetzt war. Aus diesem Grund wurde die codierende Sequenz von Mss116p ausgehend vom pCR®2.1-TOPO®, wieder unter Verwendung von EcoR I, in den pGEX-4T-1 umkloniert (siehe 3.3). Exprimiert werden konnte das N-terminale

Fusionsprotein mit GST in *E. coli* RosettaTM(DE3)pLysS üN bei 30° C und 1 mM IPTG. In der anschließenden Reinigung im Batch-Verfahren (siehe 3.4.6), ausgehend von 1 l Kulturvolumen, konnte das Protein unter Standardbedingungen gewonnen werden. Hier war jedoch die Entfernung von Thrombin nicht mit der Benzamidin-Säule möglich, da das MSS116p selbst an das Säulenmaterial gebunden hat. Daher entfernte man das Thrombin durch eine Gelfiltration (siehe 3.4.12) mit der HiLoadTM 16/60-Säule, wobei man PBS als Laufmittel verwendete und die Fraktionen à 1 ml gesammelt hat. Nach der Reinigung lag das Protein also in PBS vor (Abb. 4.26), das keinen Einfluss auf die CFPS hatte. Die Aktivität von MSS116p konnte durch einen EMSA mit der CAT mRNA nachgewiesen werden (siehe 3.6.1; Abb. 4.26).

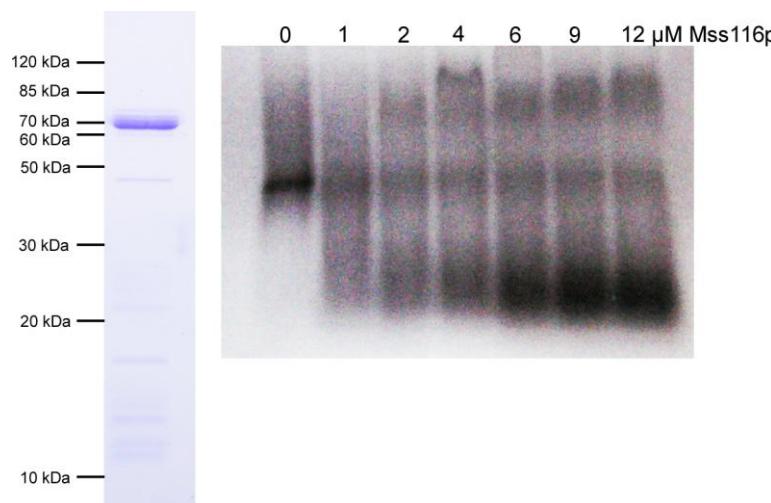


Abb. 4.26: Reinheitskontrolle und Aktivität von MSS116p

Links: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind etwa 1,5 µg MSS116p (ca. 72,3 kDa). Rechts: 1%iges, natives Agarose-Gel eines EMSAs mit CAT mRNA. Eingesetzte Endkonzentrationen von MSS116p sind angegeben. Bereits in einer Konzentration von 1 µM ist ein deutlicher Einfluss des Proteins auf die mRNA erkennbar. In höheren Konzentrationen „shiftet“ die mRNA Bande sowohl nach oben als auch nach unten.

4.4.2 Einfluss auf die Produktivität der CFPS

Den Einfluss der RNA Chaperone auf die CFPS testete man, wie schon bei den Bestandteilen der Translationsmaschinerie, anhand der Synthese des Testproteins CAT. Im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) synthetisierte man das Testprotein, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, für 1 h bei 37° C in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen (siehe 3.5.9) der RNA Chaperone, quantifizierte das synthetisierte Protein (siehe 3.5.10) anschließend und verglich die produzierte Menge mit einer Kontrolle, ohne zugesetztes Protein. Auch hier ging man so vor, dass man zuerst nur geringe Konzentrationen des entsprechenden Proteins zusetzte und die Konzentration so lange steigerte, bis ein Effekt zu sehen war oder hohe Konzentrationen erreicht waren. Die getesteten Konzentrationen entsprachen in etwa denen, die auch in den Aktivitätstests verwendet wurden. Die verwendeten S30 Extrakte wiesen alle eine

durchschnittliche Produktivität auf, lediglich beim Test von NCp7(1-55) synthetisierte die Kontrolle, aufgrund des verwendeten Puffers (s.o.), nur etwa 260 µg/ml der CAT. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 4.27 zusammengefasst.

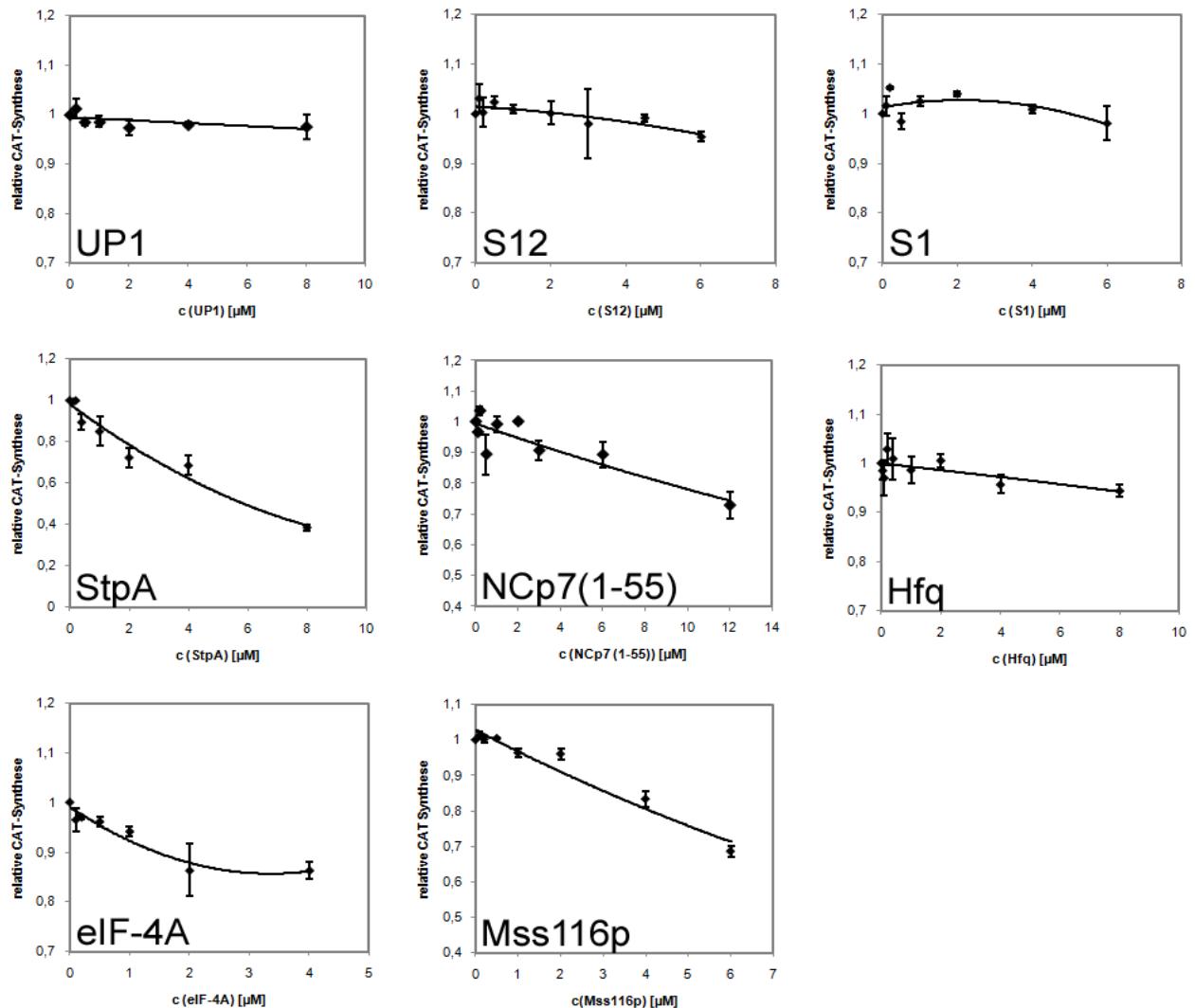


Abb. 4.27: Einfluss von RNA Chaperonen auf die CFPS

Hier ist, zur besseren Vergleichbarkeit, die relative CAT Synthese in Abhängigkeit von der Konzentration des zugesetzten RNA Chaperons dargestellt. Die synthetisierten Mengen des Testproteins der Kontrollen wurden 1 gesetzt und die anderen Werte entsprechend verrechnet.

Wie aus der Abbildung 4.27 ersichtlich ist, konnte keines der zugesetzten RNA Chaperone die Synthese des Testproteins CAT steigern. UP1, S12, S1 und Hfq zeigten kaum einen Einfluss auf die CFPS und wirkten in höheren Konzentrationen leicht inhibierend. Die Proteine StpA, NCp7, eIF-4A und MSS116p inhibierten die Reaktion dagegen alle relativ stark, wobei StpA die stärkste Inhibition zeigte.

4.5 Kopplung von Transkription und Translation in der CFPS

Ein weiterer Ansatz, die Produktivität des *E. coli* CFPS Systems zu steigern, war die Kopplung von Transkription und Translation durch die Verwendung eines *E. coli* Promotors und der in den S30 Extrakten enthaltenen *E. coli* RNA Polymerase. Obwohl heutzutage die schnelleren viralen RNA Polymerasen in CFPS Systemen standardmäßig eingesetzt werden, erzielte man in der Vergangenheit auch mit der *E. coli* RNA Polymerase vergleichbare Proteinausbeuten (vgl. z.B. Kudlicki *et al.*, 1992). Zudem konnte gezeigt werden, dass z.B. durch den Einsatz einer langsameren, mutierten T7 RNA Polymerase der aktive, also richtig gefaltete, Anteil an synthetisiertem Protein (GFP) gesteigert werden kann (Iskakova *et al.*, 2006). Aus diesen Gründen sollte in der CFPS die Expression von Proteinen, ausgehend von einem *E. coli* Promotor, durchgeführt werden. Dabei fiel die Wahl auf den starken *tac* Promotor, der beispielsweise auch in den Plasmiden pGEX-4T-1 oder dem pMAL-c4X verwendet wird und über dessen Einsatz in der CFPS keine Daten in der Literatur gefunden wurden.

4.5.1 Herstellung der DNA Konstrukte

Neben dem Testprotein CAT sollte auch ein Protein unter Einfluss des *tac* Promotors getestet werden, das sich schlecht im *E. coli* CFPS System synthetisieren lässt und bei dem Effekte der langsameren Transkription eventuell deutlicher ausfallen könnten, als bei der sehr gut zellfrei exprimierbaren CAT. Dafür wählte man die PDZ2 Domäne (siehe 4.3.1.2), bei der Vorversuche ergeben haben, dass sie im Batch-Verfahren nur in Mengen von 10-20 µg/ml synthetisiert wird.

Zunächst musste ein geeignetes Expressionsplasmid gewählt werden, wobei man sich für den pMAL-c4X entschied. Dieser besitzt jedoch ein *lacI^q*-Gen, welches für den Lac-Repressor codiert, der auch *tac* Promotoren erkennt und wahrscheinlich im zellfreien System ebenfalls synthetisiert wird. Um nun zu verhindern, dass in der CFPS Reaktion IPTG eingesetzt werden muss, um den Lac-Repressor vom *tac* Promotor zu entfernen, schnitt man unter Verwendung der Restriktionsenzyme PflM I und EcoR V große Teile des *lacI^q*-Gens, sowie seinen Promotor, aus dem pMAL-c4X heraus (869 bp; siehe 3.2.6), entfernte die von den Restriktionsenzymen verursachten Überhänge (siehe 3.2.7) und ligierte den Vektor wieder (siehe 3.2.13), bevor man ihn in *E. coli* TG1 transformierte (siehe 3.1.7). Klone mit dem korrekten pMAL-c4X ohne das *lacI^q*-Gen konnten durch Restriktionsverdau der isolierten

Plasmide identifiziert werden und dieser Vektor wird im Folgenden als pTAC-*malE* bezeichnet, da er für MBP unter dem *tac* Promotor codiert. Wird für weitere Klonierungen das Restriktionsenzym Nde I und ein weiteres aus der MCS des pMAL-c4X verwendet, hat das zur Folge, dass die für MBP codierende Sequenz (*malE*-Gen) aus dem Vektor herausgeschnitten wird und sich die neu einklonierte proteincodierende Sequenz unter dem Einfluss des *tac* Promotors befindet.

Zunächst fügte man die codierende Sequenz der CAT, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT und unter Verwendung der entsprechenden Primer (siehe Tab. 2.2) direkt in die Nde I und Bam HI Schnittstellen des pTAC-*malE* ein (siehe 3.3). Dieses Plasmid mit der codierenden Sequenz der CAT unter Einfluss des *tac* Promotors wird nachfolgend als pTAC-CAT bezeichnet und wurde für Vergleiche der Expression des Proteins mit T7 (pK7-CAT) und *tac* Promotor verwendet.

Die Expression der PDZ2-Domäne sollte, wie bei der CAT, unter Einfluss des T7 und des *tac* Promotors verglichen werden. Die PDZ2-Domäne lag bereits im pET-14b vor. Um jedoch eventuelle Effekte der Sequenz, die für das N-terminale His₆-tag codiert, auf die Expression auszuschließen, klonierte man die Domäne mit Hilfe der Primer PDZ2-5'-Nde und PDZ2-3'-Xho (siehe Tab. 2.2) in die entsprechenden Schnittstellen des mit einem T7 Promotor ausgestatteten pET-20b(+), der dann für die Experimente eingesetzt wurde und durch das C-terminale His₆-tag einen Nachweis des Proteins im Western Blot erlaubte. Ausgehend von diesem Vektor klonierte man dann die codierende Sequenz der PDZ2-Domäne, inklusive des C-terminalen His₆-tags, unter Verwendung der Primer PDZ2-5'-Nde und PDZ2His-3'-Bam (siehe Tab. 2.2) in die entsprechenden Schnittstellen des pTAC-*malE* (siehe 3.3). Das daraus resultierende Plasmid pTAC-PDZ2 wurde dann für die Versuche eingesetzt und erlaubte ebenfalls, aufgrund des C-terminalen His₆-tags, einen Nachweis des Proteins im Western Blot.

4.5.2 Verwendung des *tac* Promotors in der CFPS

Für die folgenden Versuche verwendete man S30 Extrakte, die exakt wie in Punkt 3.5.2 beschrieben hergestellt wurden. Allerdings wurde der *E. coli* Stamm BL21, statt des normalerweise verwendeten Stammes BL21 StarTM (DE3), benutzt, da dieser über kein eigenes *lacI^q*-Gen verfügt, das die Expression von *tac* Promotoren stören könnte. Auch führte

man vergleiche mit dem S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) durch, das laut Hersteller für die Expression von *E. coli* Promotoren geeignet ist und auch IPTG enthält.

Zunächst bestimmte man die optimale DNA Konzentration des pTAC-CAT im Batch-Ansatz (siehe 3.5.5) auf 6 µg/30 µl. Verglich man nun die Expression der CAT im Batch-Ansatz (siehe 3.5.5 und 3.5.10) mit T7 (1 µg/30 µl pK7-CAT) und mit *tac* Promotor (6 µg/30 µl pTAC-CAT) war feststellbar, dass bei einer Expressionsdauer von 1 h bei 37° C mit dem *tac* Promotor durchschnittlich 12% mehr der CAT synthetisiert wurde (Abb. 4.28). Betrachtete man die Expressionen von beiden Promotoren bei 37° C im Batch-Verfahren über die Zeit, wiesen beide das gleiche Reaktionsprofil auf (Abb. 4.28).

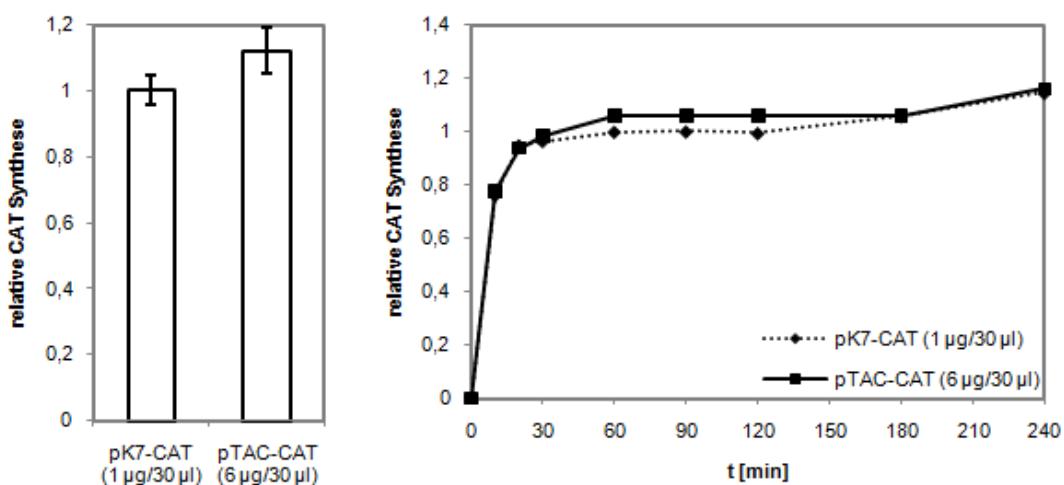


Abb. 4.28: Vergleich der Expression der CAT mit T7 und mit *tac* Promotor

Links: Bei Expression der CAT im Batch-Verfahren für 1 h bei 37° C wurde mit dem *tac* Promotor (pTAC-CAT) durchschnittlich 12% mehr des Proteins synthetisiert als mit T7 Promotor (pK7-CAT).

Rechts: Vergleicht man die Expression der CAT mit beiden Promotoren, unter den gleichen Bedingungen wie im Versuch der Abbildung links, über die Zeit, so ist der positive Effekt des *tac* Promotors (hier nur maximal eine Steigerung von 6%) nur zwischen 30 und 180 min Expressionsdauer bemerkbar. Von beiden Promotoren wurde die CAT mit der gleichen Geschwindigkeit synthetisiert. In beiden Abbildungen ist die CAT Synthese als relativer Wert angegeben, wobei die synthetisierte Menge der CAT nach 1 h unter dem T7 Promotor 1 gesetzt wurde.

Ein weiterer Vergleich der CAT Expression von beiden Promotoren, unter den gleichen Bedingungen wie zuvor, aber diesmal durchgeführt mit dem S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega; siehe 3.5.7) führte zu einem anderen Ergebnis. Hier wurden, wie zuvor (siehe Abb. 4.28), in den ersten 30 min etwa gleiche Mengen der CAT von beiden Promotoren synthetisiert. Nach 1 h und nach 4 h Expressionszeit waren dagegen größere Mengen der CAT nachweisbar, wenn die Expression vom T7 Promotor ausging (Abb. 4.29).

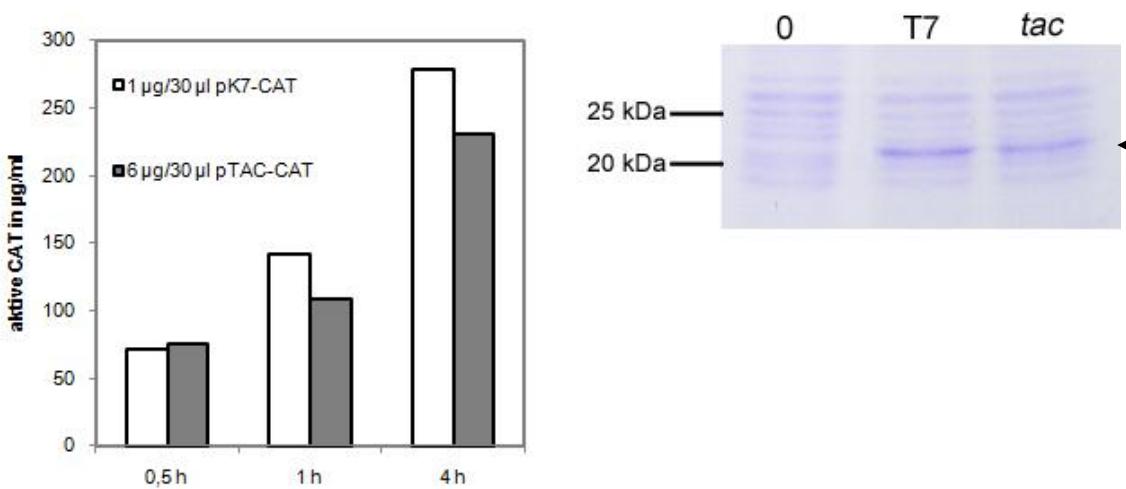


Abb. 4.29: Vergleich der CAT Synthese mit dem S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega)
Links: Verglich man hier die Expression der CAT unter dem Einfluss von T7 und *tac* Promotor über die Zeit, wurden zuerst von beiden Promotoren gleiche Mengen des Proteins synthetisiert (30 min). Zu späteren Zeitpunkten waren größere Mengen der CAT nachweisbar, wenn sie ausgehend vom T7 Promotor synthetisiert wurde (31,5% mehr nach 1 h; 20% mehr nach 4 h).

Rechts: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 1 µl der Reaktionslösungen des Versuchs der Abbildung links nach 4 h Expressionszeit. Auch auf dem SDS-Gel ist gut erkennbar, dass ausgehend vom T7 Promotor mehr der CAT (Pfeil) synthetisiert wurde als vom *tac* Promotor. 0 entspricht einer Kontrolle ohne zugesetzte template DNA.

Der Versuch, ob ein schlecht synthetisierbares Protein (PDZ2-Domäne) eventuell unter dem Einfluss des *tac* Promotors in größeren Mengen synthetisiert werden kann, wurde ebenfalls mit dem S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega; siehe 3.5.7) bei einer Expressionstemperatur von 37° C durchgeführt (Abb. 4.30). Hier führte die Verwendung des T7 Promotors (1 µg/30 µl pET-20b(+) PDZ2) bei allen getesteten Zeitpunkten zu einer deutlich größeren Ausbeute an synthetisierter PDZ2-Domäne, als bei Einsatz des *tac* Promotors (6 µg/30 µl pTAC-PDZ2).

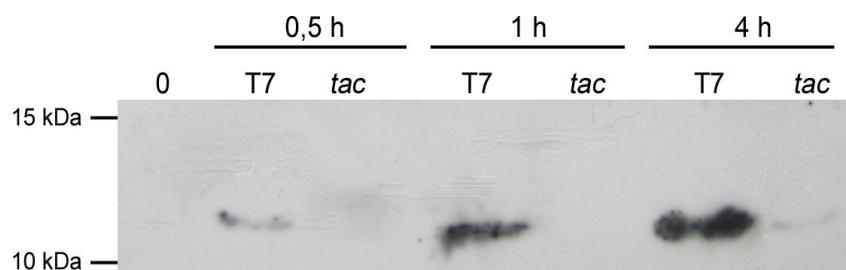


Abb. 4.30: Vergleich der Expression der PDZ2-Domäne unter dem T7 und dem *tac* Promotor

Western Blot nach 16% SDS-PAGE. Aufgetragen wurden jeweils 2 µl der Reaktionslösung nach Expression der PDZ2-Domäne (ca. 9,7 kDa inklusive His₆-tag) unter dem T7 und dem *tac* Promotor im S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) bei 37° C. Die Detektion der PDZ2-Domäne erfolgte mit dem Universal His Western Blot Kit 2.0 (Clontech; siehe 3.4.3.3). Unter dem T7 Promotor nahm die Menge an synthetisiertem Protein über die Zeit zu und war zu jedem Zeitpunkt gut nachweisbar. Unter dem *tac* Promotor wurde erheblich weniger der PDZ2-Domäne synthetisiert, die nach 0,5 h und 1 h noch gar nicht, nach 4 h nur in Spuren nachgewiesen werden konnte.

4.6 Einfluss einer miRNA auf die CFPS

Neuere Studien zeigen, dass kleine, nichtcodierende RNAs, die ncRNAs, auch sRNAs oder miRNAs genannt, die Translation post-transkriptionell regulieren können. Bei einigen mRNAs sind regulatorische Sequenzen, wie die SD-Sequenz, in Stamm-Schleife Strukturen verborgen und somit nicht für das Ribosom zugänglich. Manche miRNAs können, durch Hybridisierung mit der 5' UTR solch einer mRNA, die Sekundärstruktur so verändern, dass regulatorische Sequenzen freigelegt werden und die mRNA somit translatierbar wird (Urban and Vogel, 2008; siehe auch 1.1.5). Da Sekundärstrukturbildung der mRNA ein Problem in der CFPS sein könnte, analysierte man die Sekundärstruktur der 5' UTR des Plasmids pK7, das für die zellfreie Synthese des Testproteins CAT (pK7-CAT) eingesetzt wird, mit dem Programm RNAfold bei 37° C (Abb. 4.31). Dabei wurde festgestellt, dass auch bei dieser 5' UTR die SD-Sequenz mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 0,4 in einer Stamm-Schleife Struktur verborgen liegt. Daher designete man, nach dem Vorbild der GlmZ RNA (Urban and Vogel, 2008; siehe auch Abb. 1.8) eine miRNA, die mit der 5' UTR der pK7 mRNA, 5 Nukleotide vor der SD-Sequenz, hybridisieren (Abb. 4.31), diese Stamm-Schleife Struktur auflösen und die SD-Sequenz besser für das Ribosom zugänglich machen soll. Wie bei der GlmZ RNA wurde auch hier zur Hybridisierung mit der anti-SD Sequenz nicht die SD-Sequenz, sondern ein Linker verwendet. Als Annealingtemperatur wählte man, ähnlich der GlmZ RNA, 42° C, um eine Hybridisierung bei der Reaktionstemperatur von 37° C zu gewährleisten. Die miRNA hatte die Sequenz 5'-AAGUUAAAACAAUUUUUCUAG-3', wobei der Linker fett und kursiv gedruckt ist.

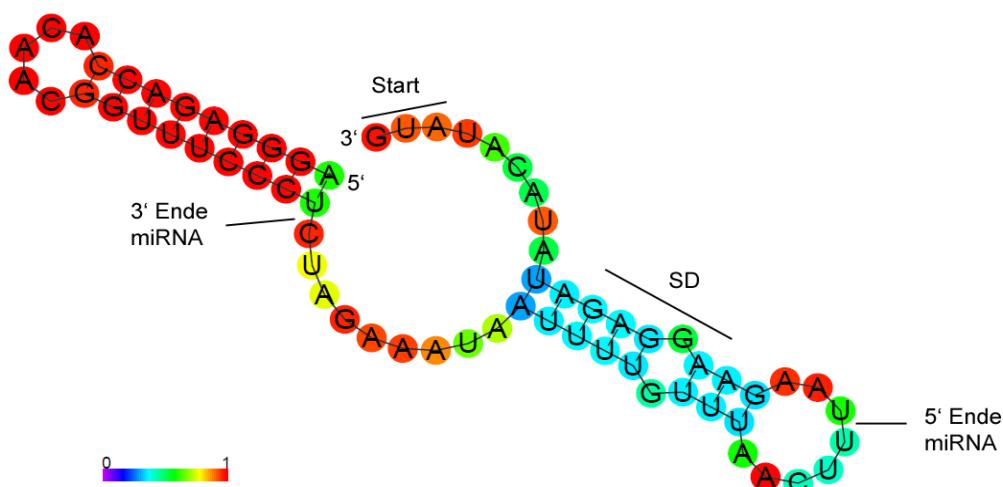


Abb. 4.31: Sekundärstruktur der 5' UTR der mRNA des Plasmids pK7 bei 37° C

5'- und 3'-Ende der 5' UTR, sowie Startcodon und SD-Sequenz sind markiert. Wahrscheinlichkeiten für diese Struktur sind farbcodiert und der Legende zu entnehmen. Die SD-Sequenz ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,4 in einer Stamm-Schleife Struktur verborgen. Der Bereich, mit dem die miRNA hybridisieren soll, ist ebenfalls markiert.

4.6.1 Eingesetzte DNA Konstrukte

Für die im nächsten Punkt beschriebenen Versuche wurde sowohl das Testplasmid pK7-CAT, als auch verschiedene Konstrukte des pET-14b und des pET-20b(+) eingesetzt, deren Herstellung nachfolgend beschrieben ist. Die mRNAs des pET-14b und des pET-20b(+) besitzen die gleiche 5' UTR wie die des pK7, so dass die oben beschriebene miRNA auch mit Konstrukten dieser Plasmide hybridisieren sollte.

Als ein weiteres Beispiel eines gut in der CFPS synthetisierbaren Proteins wählte man die *E. coli* Dihydrofolatreduktase (DHFR), die als Testprotein im PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (New England Biolabs) eingesetzt wird. Die codierende Sequenz der DHFR amplifizierte man ausgehend vom DHFR Control Plasmid (siehe 2.2.1) mit den entsprechenden Primern (siehe Tab. 2.2) und fügte sie direkt in die Nde I und Xho I Schnittstellen des pET-20b(+) ein (siehe 3.3).

Als Beispiele für schlecht in der CFPS synthetisierbare Proteine wählte man, wie im vorigen Punkt, die PDZ2-Domäne im pET-20b(+) (Herstellung siehe 4.5.1), sowie das AI-BP im pET-14b (siehe 2.6.1), das von Johannes Hiltl zur Verfügung gestellt wurde. In Vorversuchen konnte in der CFPS mit dem pET-14b AI-BP überhaupt keine Expression festgestellt werden, auch nicht bei Detektion des N-terminalen His₆-tags im Western Blot.

4.6.2 Auswirkungen einer miRNA auf die CFPS

Es wurden CFPS Reaktionen im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) unter Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der miRNA (siehe 3.5.9) durchgeführt und die Auswirkungen auf die Synthese des Testproteins CAT, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, bestimmt (siehe 3.5.10). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Synthese der CAT in Anwesenheit der miRNA in der optimalen Konzentration von 200 nM um durchschnittlich 13% gesteigert wurde (Abb. 4.32). Auch betrachtete man im Batch-Verfahren die Synthese der CAT, mit und ohne zugesetzter miRNA, über die Zeit, wobei festzustellen war, dass gerade zu Beginn der Reaktion die CAT Synthese durch die miRNA beschleunigt wird. Später im Reaktionsverlauf hat die miRNA kaum noch Einfluss auf die Proteinsynthese (Abb. 4.33).

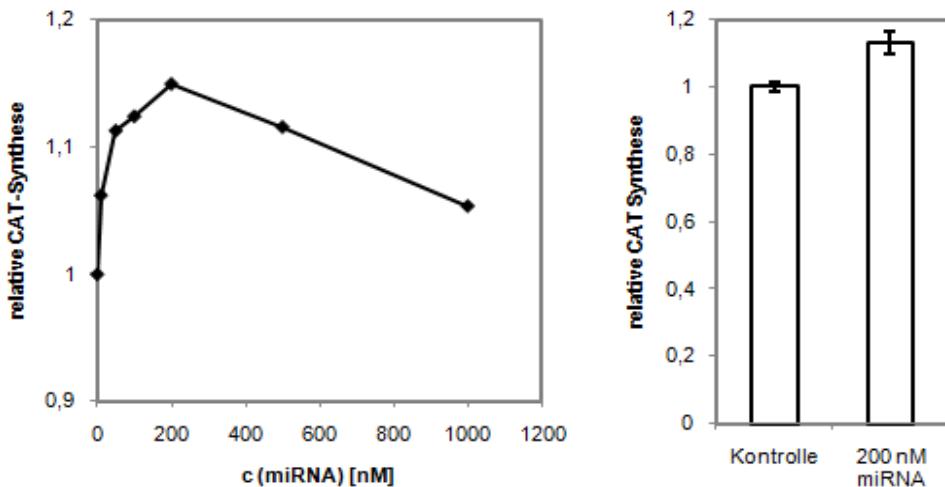


Abb. 4.32: Auswirkungen der miRNA auf die Synthese der CAT

Links: Bestimmung der optimalen Konzentration der miRNA anhand der Synthese der CAT bei 37 °C im Batch-Verfahren. Nach 1 h Reaktionszeit wurde die Menge an synthetisiertem Protein durch die miRNA in der optimalen Konzentration von 200 nM um 15% gesteigert.

Rechts: Mehrmalige Wiederholungen des Versuchs unter gleichen Bedingungen (1 h bei 37° C) ergaben eine durchschnittliche Steigerung der CAT Synthese durch die miRNA um 13%. In beiden Abbildungen ist die synthetisierte CAT als relativer Wert dargestellt, wobei die Kontrolle ohne miRNA 1 gesetzt wurde.

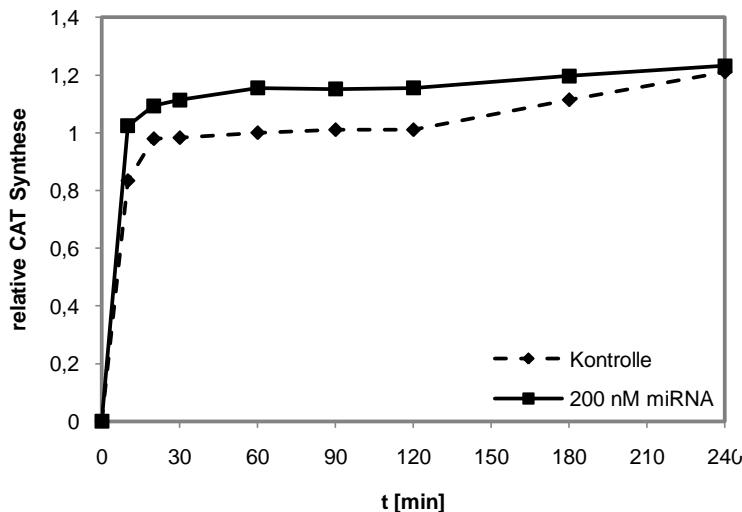


Abb. 4.33: Vergleich der CAT Synthese, mit und ohne miRNA, über die Zeit

Die Reaktionen fanden im Batch-Verfahren statt, wobei zu den angegebenen Zeitpunkten eine Probe entnommen und die synthetisierte CAT quantifiziert wurde. Auch hier ist die Menge an synthetisierter CAT als relativer Wert angegeben, wobei die CAT der Kontrolle nach 1 h 1 gesetzt wurde. Gerade zu Beginn wurde die Reaktion durch die miRNA beschleunigt.

Als nächstes testete man, ob der Effekt der miRNA auf andere *E. coli* CFPS Systeme übertragbar ist, was beispielsweise bei der Verwendung des *tac* Promotors (siehe 4.5.2) nicht der Fall war. Aus diesem Grund synthetisierte man die CAT, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, jeweils in An- und Abwesenheit der miRNA (200 nM) im S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega; siehe 3.5.7) bei 37° C. Im selben System unter den gleichen Bedingungen synthetisierte man auch die DHFR, ausgehend vom Plasmid pET20b(+) DHFR, um auszuschließen, dass der beobachtete Einfluss der miRNA spezifisch für die Synthese der

CAT ist (Abb. 4.34). Dabei wurde festgestellt, dass die miRNA auch im anderen *E. coli* System und mit anderen Proteinen funktioniert.

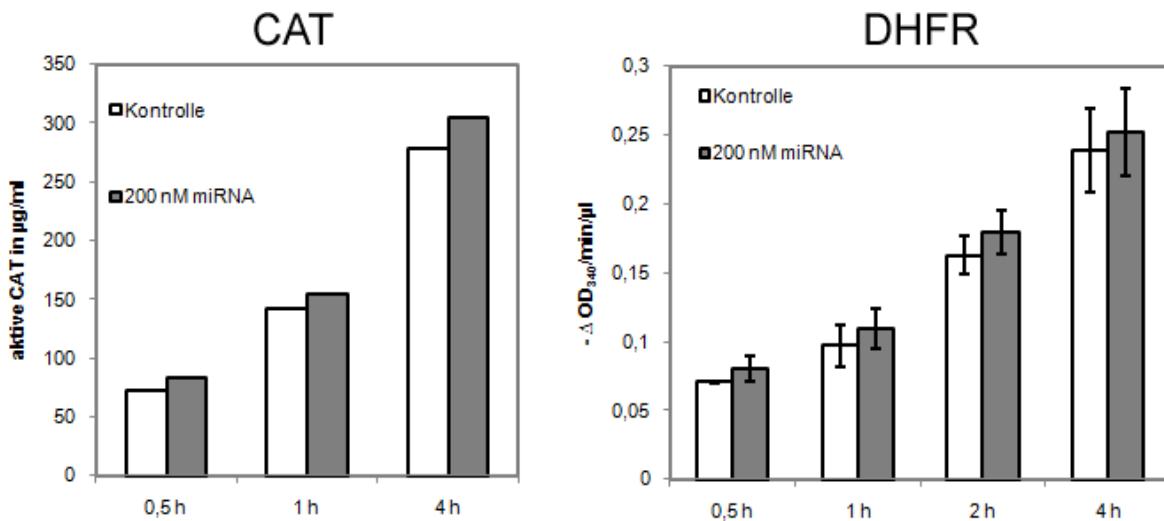


Abb. 4.34: Effekt der miRNA auf die Synthese der CAT und der DHFR im S30 T7 High-Yield Protein Expression System bei 37° C

Links: In diesem System konnten ähnliche Effekte der miRNA auf die Synthese der CAT festgestellt werden, wie in dem selbst hergestellten, das zuvor verwendet wurde. Zu den angegebene Zeitpunkten wurden Proben aus den Batch-Ansätzen entnommen und die CAT quantifiziert. Zu jedem Zeitpunkt war mehr des Testproteins detektierbar, wenn die miRNA anwesend war (15% nach 0,5 h; 8,5% nach 1 h; 9,7% nach 4 h).

Rechts: Auch wenn die DHFR in diesem System synthetisiert wurde, konnte zu jedem Zeitpunkt bei der Quantifizierung (siehe 3.5.11) mehr der DHFR nachgewiesen werden, wenn sie in Anwesenheit der miRNA synthetisiert wurde (13,2% nach 0,5 h; 13,1% nach 1 h; 10,2% nach 2 h; 5,7% nach 4 h). Hier beziehen sich die Fehlerindikatoren nicht auf die Mittelabweichung, wie in allen anderen Abbildungen, sondern spiegeln den Messfehler wieder.

Um nun zu bestimmen, ob die Effekte der miRNA eventuell größer ausfallen, wenn ein in CFPS Systemen schlecht exprimierbares Protein synthetisiert wird, testete man auch die Expression der PDZ2-Domäne (pET-20b(+) PDZ2) und des AI-BP (pET-14b AI-BP) im S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega; siehe 3.5.7) bei 37° C. Das AI-BP konnte dabei, wie schon in den Vorversuchen, nicht nachgewiesen werden, egal ob die Expression in An- oder Abwesenheit der miRNA stattfand. Selbst nach 4 h Expression und dem Auftragen großer Mengen der Reaktionsansätze war kein Nachweis im Western Blot möglich. Die Synthese des AI-BP konnte also nicht durch die miRNA induziert werden. Der Nachweis der PDZ2-Domäne war dagegen, wie in den Versuchen zuvor, im Western Blot möglich (Abb. 4.35). Dabei konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Synthese dieser Domäne durch die Anwesenheit miRNA verbessert wird. Auf jeden Fall blieb der erhoffte große Effekt auf die Expression aus.

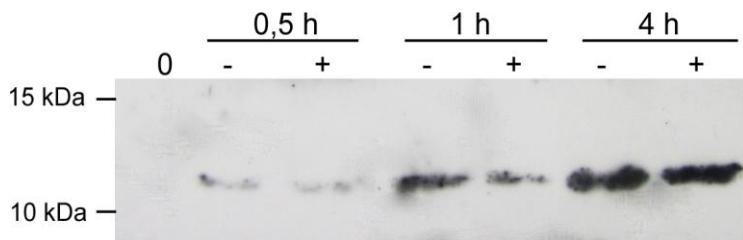


Abb. 4.35: Effekt der miRNA auf die Synthese der PDZ2-Domäne im S30 T7 High-Yield Protein Expression System bei 37° C

Western Blot nach 16% SDS-PAGE. Aufgetragen wurden jeweils 2 μ l der Reaktionsansätze zu verschiedenen Zeitpunkten der PDZ2 Expression. Die Detektion des C-terminalen His₆-tags der PDZ2-Domäne erfolgte mit dem Universal His Western Blot Kit 2.0 (Clontech; siehe 3.4.3.3). Es wurden Reaktionen in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 200 nM der miRNA durchgeführt. Die Menge an synthetisierter PDZ2-Domäne schien dabei unabhängig von der miRNA zu sein. Dabei muss jedoch festgehalten werden, dass kleine Unterschiede im Western Blot nicht detektierbar sind. Lediglich bei einer Expressionszeit von 1 h schien ohne miRNA etwas mehr Protein synthetisiert worden zu sein. Die Kontrolle (0) enthielt keine template DNA.

Der Einfluss der miRNA auf jeweils ein gut (CAT; pK7-CAT) und ein schlecht (PDZ2-Domäne; pET-20b(+) PDZ2) exprimierbares Protein wurde auch noch mit dem PURExpress[®] *In Vitro* Protein Synthesis Kit (New England Biolabs; siehe 3.5.8) bei einer Expressionstemperatur von 37° C bestimmt. In diesem System konnte weder bei der Expression der CAT, noch bei der Expression der PDZ2-Domäne ein Effekt der miRNA festgestellt werden (Abb. 4.36).

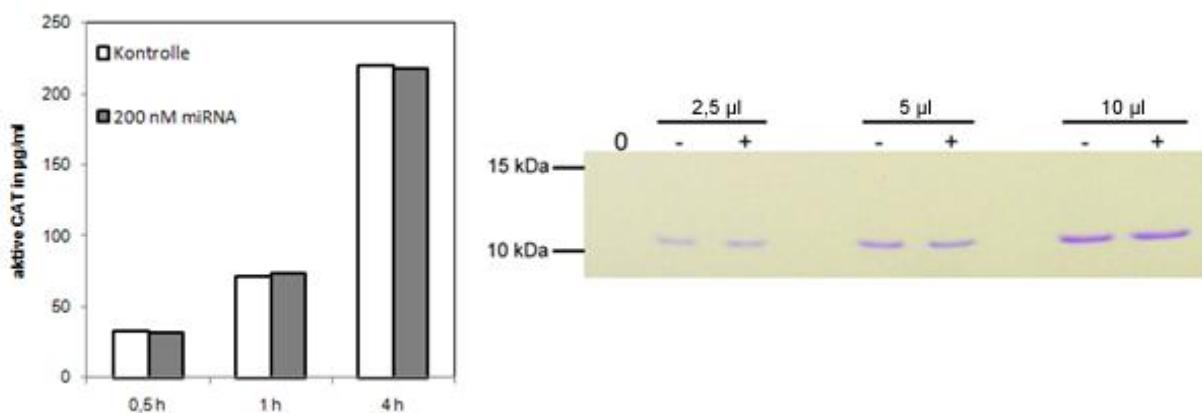


Abb. 4.36: Einfluss der miRNA auf die Expression der CAT und der PDZ2-Domäne bei Verwendung des PURExpress[®] *In Vitro* Protein Synthesis Kit bei 37° C

Links: Die in An- und Abwesenheit von 200 nM der miRNA synthetisierte CAT wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Expression quantifiziert, wobei kein Effekt der miRNA festgestellt werden konnte.

Rechts: 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind jeweils verschiedene Mengen der Reaktionsansätze einer 4 stündigen Expression der PDZ2-Domäne ohne (-) und mit (+) 200 nM der miRNA. Es sind keine Unterschiede erkennbar. Die Reaktionsansätze wurden nach der Expression von Ribosomen gereinigt (siehe 3.5.8), die Proteine mit Aceton gefällt (siehe 3.4.10) und in das Ausgangsvolumen Probenpuffer wieder aufgenommen. Mit dem PURExpress[®] *In Vitro* Protein Synthesis Kit exprimierte die PDZ2-Domäne so gut, dass kein Nachweis im Western Blot erforderlich war. Die Kontrolle (0) enthielt keine template DNA.

Eine weitere Fragestellung war, wie lange die eingesetzte miRNA in den Reaktionsansätzen stabil ist, da S30 Extrakte bekanntlich auch RNasen enthalten. Dazu wurde ein großer Ansatz ohne template DNA mit dem S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) hergestellt, der die miRNA in einer Konzentration von 200 nM enthielt, bei 37° C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen aus denen die gesamt RNA, inklusive der miRNAs, isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde. Der Nachweis erfolgte dann mit speziellen Primern durch PCR. Das genaue Vorgehen bei diesem Versuch ist in Punkt 3.5.12 beschrieben. Die optimale, für die PCR eingesetzte Menge cDNA wurde dann auf 100 ng pro Reaktion bestimmt und die PCR entsprechend mit allen entnommenen Proben durchgeführt (Abb. 4.37). Ein hier nicht gezeigter Kontrollversuch, bei dem 200 ng der miRNA in cDNA umgeschrieben und davon 1 ng in einer identischen PCR eingesetzt wurden, bestätigte, dass es sich bei der Bande auf einer Höhe von 100 bp in Abbildung 4.37 tatsächlich um das cDNA Transkript der miRNA handelte.

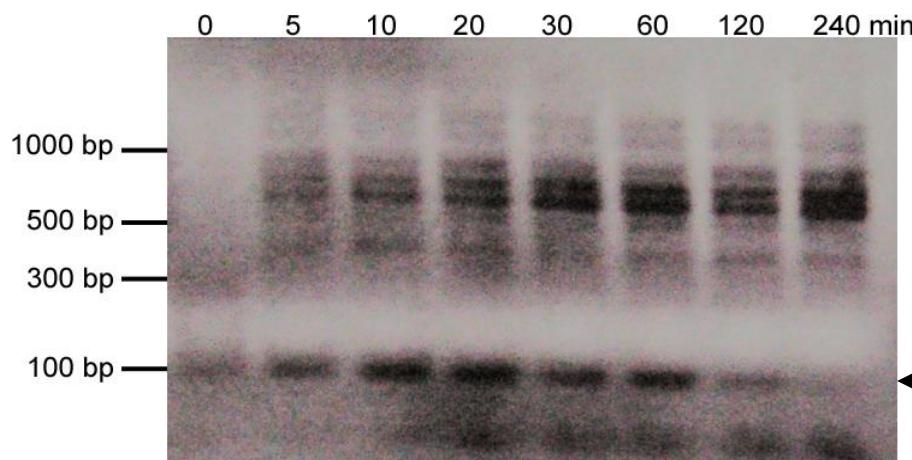


Abb. 4.37: Stabilität der miRNA in den Reaktionsansätzen

1% Agarose-Gel. Aufgetragen wurden jeweils die PCR Reaktionen zum Nachweis der in cDNA umgeschriebenen miRNA (Pfeil). Die Zeitpunkte, zu denen die Proben entnommen wurden, sind angegeben. Die miRNA konnte bis zu 2 h nach Reaktionsbeginn nachgewiesen werden. Neben der nachgewiesenen miRNA sind auf dem Gel auch viele Banden zu erkennen, die unspezifisch in der PCR amplifiziert wurden. Die Entstehung dieser unspezifischen Amplifikationsprodukte konnte nicht durch eine Erhöhung der Annealingtemperatur, oder den Einsatz von weniger cDNA template in der PCR verhindert werden. Zum Zeitpunkt 0 sind keine unspezifischen Banden erkennbar. Hier konnte jedoch auch die miRNA schlechter nachgewiesen werden als zu späteren Zeitpunkten.

4.7 CFPS unter Verwendung der 5' UTR der *cspA* mRNA

Ein weiterer Ansatz war die Verwendung der 5' UTR des Hauptkälteschockproteins von *E. coli*, CspA, in der CFPS. Diese 5' UTR wirkt als sog. Thermosensor und erlaubt die Translation der *cspA* mRNA bei tiefen Temperaturen (10°-20° C), inhibiert sie jedoch bei höheren (20°-37° C) (Giuliodori *et al.*, 2010; siehe auch 1.1.5).

Die Durchführung von CFPS Reaktionen bei tiefen Temperaturen könnte neben den bekannten Effekten, wie z.B. der besseren Proteinfaltung, auch eine Erhöhung der Ausbeute an synthetisiertem Protein zur Folge haben, da bei tiefen Temperaturen in den Reaktionen auftretende, unerwünschte Nebenreaktionen, wie z.B. die unspezifische Hydrolyse von ATP (Kim and Swartz, 2001) oder die Degradation von Proteinen (Schindler *et al.*, 1999), reduziert sein sollten. Damit stünde beispielsweise mehr ATP für die Proteinsynthese zur Verfügung, was zu höheren Proteinausbeuten führen könnte. Eine einfache Reduktion der Reaktionstemperatur konnte in einem Versuch die Ausbeute der CFPS nicht steigern (Abb. 4.38). Daher sollte überprüft werden, wie sich die Verwendung der 5' UTR der *cspA* mRNA auf die Proteinsynthese bei tiefen Temperaturen im *E. coli* CFPS System auswirkt.

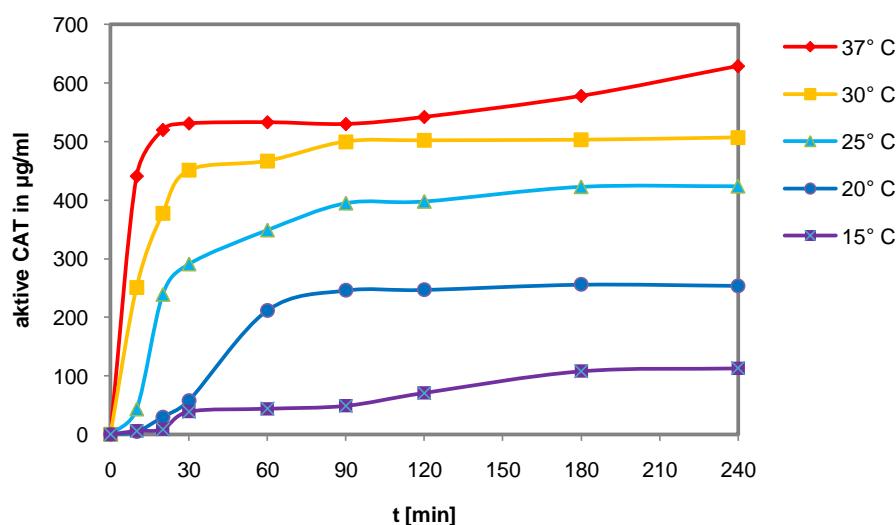


Abb. 4.38: Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Ausbeute der CFPS über die Zeit

CFPS Reaktionen, in denen die CAT, ausgehend vom Plasmid pK7-CAT, im Batch-Verfahren (siehe 3.5.5) synthetisiert wurde, führte man bei verschiedenen Reaktionstemperaturen durch. Zu den angegebenen Zeitpunkten entnahm man jeweils Proben und quantifizierte (siehe 3.5.10) die synthetisierte CAT. Auffällig war hier, dass bei tiefen Temperaturen nicht einfach nur die Reaktionsgeschwindigkeit reduziert war, sondern dass ebenfalls die synthetisierte Menge an Protein mit sinkender Temperatur abnahm.

4.7.1 Herstellung der DNA Konstrukte

Der Einfluss der 5‘ UTR von CspA auf die CFPS wurde an der Expression mehrerer Proteine bestimmt. Neben den bekannten Testproteinen CAT (pK7-CAT), DHFR (pET-20b(+) DHFR; Herstellung siehe 4.6.1) und der PDZ2-Domäne (pET-20b(+) PDZ2; Herstellung siehe 4.5.1), als Beispiel für ein schlecht exprimierendes Protein, führte man die Versuche auch noch mit zwei weiteren Proteinen durch, einer synthetischen *Renilla Luciferase* (hRluc), die als Testprotein des S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) dient, sowie mit dem CspA selbst. Die codierenden Sequenzen dieser beiden Proteine mussten erst kloniert werden.

Die codierende Sequenz des hRluc, ohne ein N-terminales HQ-tag, amplifizierte man durch PCR ausgehend von der S30 T7 Control DNA (siehe 2.2.1) mit den entsprechenden Primern (siehe Tab. 2.2) und fügte es in die Nde I und Xho I Schnittstellen des pET-20b(+) ein.

Das CspA-Insert wurde von genomischer, *E. coli* BL21 DNA aus mit den entsprechenden Primern (siehe Tab. 2.2) vermehrt und ebenfalls direkt in die Nde I und Xho I Schnittstellen des pET-20b(+) eingefügt.

Die codierenden Sequenzen aller zu testenden Proteine lagen also entweder im pK7 (CAT) oder im pET-20b(+) (DHFR, PDZ2, hRluc und CspA) vor, die eine identische 5‘ UTR besitzen und somit die gleiche Strategie erlaubten, diese 5‘ UTR durch die des *cspA*-Gens zu ersetzen. Dazu amplifizierte man die 160 bp lange 5‘ UTR des *cspA*-Gens mit den Primern Csp-T7-5‘ und Csp-3‘-Nde (siehe Tab. 2.2). Dies hatte zur Folge, dass an diese 5‘ UTR am 5‘-Ende ein T7 Promotor, am 3‘-Ende eine Nde I Schnittstelle angefügt wurde. Dieses PCR Produkt diente dann als template für eine zweite PCR mit den Primern T7-5‘-Bgl und Csp-3‘-Nde (siehe Tab. 2.2), wodurch an den T7 Promotor des 5‘-Endes noch ein kurzer Linker und eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bgl II angefügt wurde. Der kurze Linker ist derselbe, der sich auch im pK7 und im pET-20b(+) zwischen dem T7 Promotor und der weiter vorne liegenden Bgl II Schnittstelle befindet (siehe Abb. 2.2). Das auf diese Weise generierte Insert der *cspA* 5‘ UTR fügte man dann jeweils in die Bgl II und Nde I Schnittstellen des pK7-CAT und der pET-20b(+) Konstrukte ein, was zur Folge hatte, dass lediglich die normale 5‘ UTR der jeweiligen Konstrukte durch die des *cspA*-Gens ersetzt wurde.

Diese Konstrukte sowie die entsprechenden Proteine werden nachfolgend durch die Abkürzung „cs“ für „cold shock“ vor dem Namen des jeweiligen Proteins bezeichnet.

4.7.2 Einfluss der 5' UTR der *cspA* mRNA auf die CFPS

Alle nachfolgenden Versuche wurden mit dem S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega; siehe 3.5.7) durchgeführt. Die im vorigen Punkt beschriebenen Konstrukte codierten alle, bis auf die CAT und die csCAT, für ein C-terminales His₆-tag, um, falls nötig, eine Detektion im Western Blot zu ermöglichen.

Zunächst verglich man die Expression der CAT und der csCAT jeweils bei 37° C und der Kälteschocktemperatur (15° C; Abb. 4.39). Zu verschiedenen Zeitpunkten entnahm man Proben und quantifizierte das synthetisierte Protein (siehe 3.5.10), wobei bei 37° C mehr der CAT als der csCAT synthetisiert wurde. Bei 15° C war die Ausbeute beider Proteine um ein Vielfaches geringer, wobei hier mehr der csCAT, nach 4 h mehr als doppelt so viel, als von der CAT synthetisiert wurde.

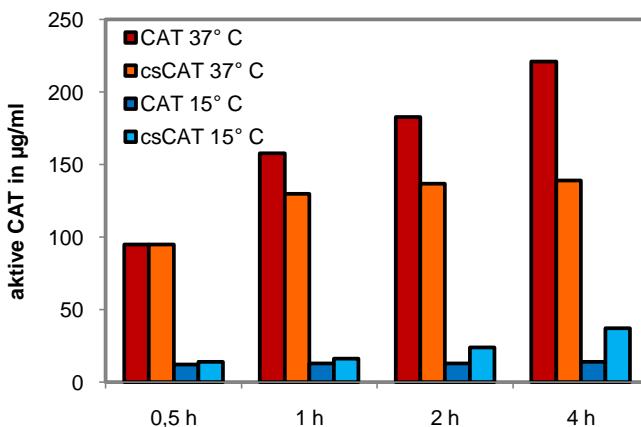


Abb. 4.39: Vergleich der Expression von CAT und csCAT bei 37° C und 15° C

Bei 37° C nahm die Menge an synthetisierter CAT über die Zeit kontinuierlich zu. Die csCAT wurde bei 37° C auch in relativ großen Mengen synthetisiert, erreichte aber nach 4 h nur etwa 63% der CAT-Ausbeute. Bei 15° C sind die Ausbeuten beider Proteine fast um ein 10faches geringer. Nach 4 h war über 2,6 Mal mehr csCAT als CAT nachweisbar.

Da dieses Ergebnis nicht den Erwartungen entsprach, wiederholte man den Vergleich der Expression der CAT und der csCAT, führte aber diesmal eine Temperaturreihe durch (Abb. 4.40).

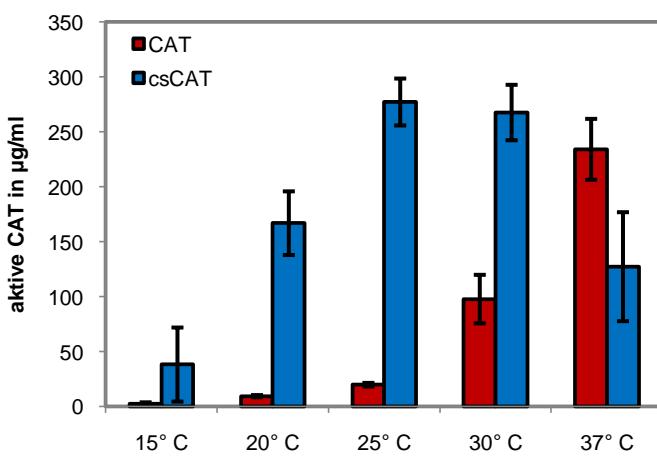


Abb. 4.40: Vergleich der Expression von CAT und csCAT bei unterschiedlichen Temperaturen

Nach einer Expressionszeit von 4 h quantifizierte man die synthetisierten Proteine. Die CAT wird nur bei Temperaturen über 30° C in nennenswerten Mengen synthetisiert. Die csCAT dagegen weist einen viel breiteren Temperaturbereich auf, in der eine Synthese stattfindet. Die Ausbeute an csCAT ist bei 25° und 30° C sogar bis zu 20% höher als die Ausbeute der CAT bei der optimalen Temperatur von 37° C.

Dieser Versuch zeigte deutlich, dass der Temperaturbereich, in dem eine Synthese der CAT stattfand, sehr begrenzt war. Bereits eine Reduktion der Temperatur von der optimalen Expressionstemperatur (37° C) der CAT (siehe auch Abb. 4.38) auf 30° C führte zu einer Reduktion der Proteinausbeute um mehr als die Hälfte. Bei noch niedrigeren Temperaturen fand kaum noch eine nennenswerte Synthese der CAT statt. Ganz anders verhielt sich die Synthese der csCAT. Hier wird das Protein in einem viel breiteren Temperaturbereich (20°-37° C) synthetisiert als die CAT. In einem Temperaturbereich von 25°-30° C ist die Ausbeute der csCAT sogar um bis zu 20% höher als die der CAT bei der optimalen Temperatur von 37° C. Dieses Ergebnis ließ sich auch gut auf einem SDS-Gel veranschaulichen (Abb. 4.41).

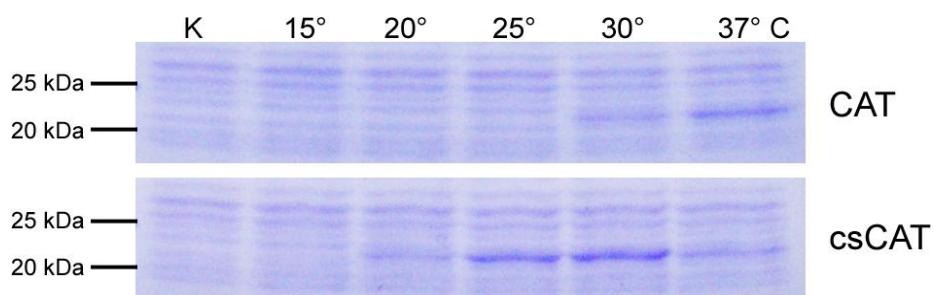
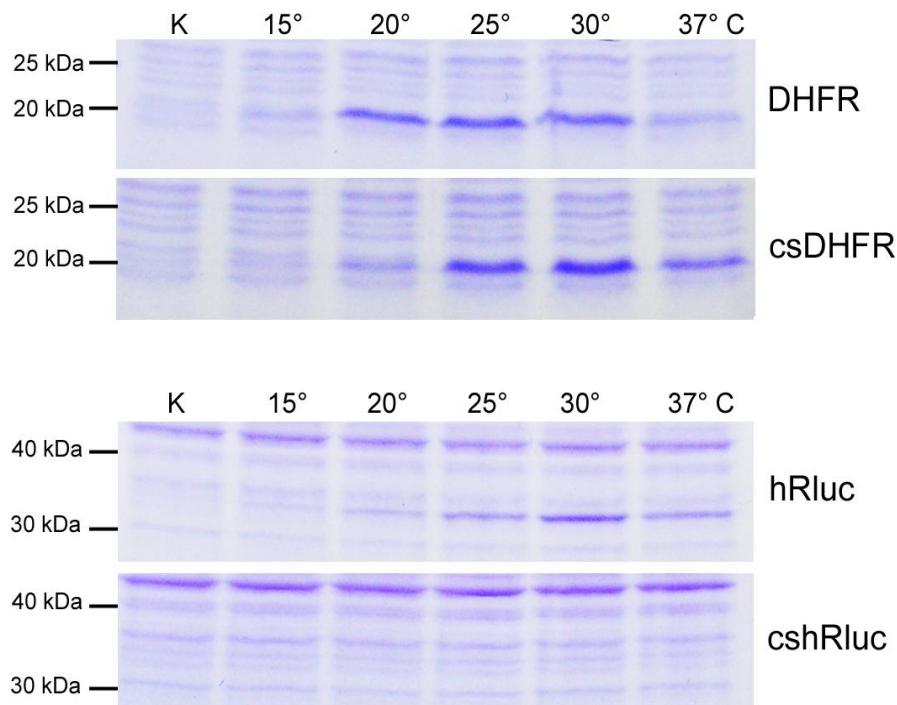


Abb. 4.41: Vergleich der Expression von CAT und csCAT bei verschiedenen Temperaturen

16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 1 µl der entsprechenden Reaktionsansätze nach einer Expressionsdauer von 4 h. Die Proben für die Gele stammten aus dem in Abb. 4.40 dargestellten Versuch und veranschaulichen das Ergebnis noch einmal. K beschreibt eine Kontrolle ohne template DNA.

Als nächstes wurde geprüft, ob der positive Effekt, der die 5' UTR des *cspA*-Genes auf die Synthese der CAT (csCAT) hatte auch bei der Expression anderer Proteine zu beobachten ist. Dazu synthetisierte man die DHFR, hRluc, PDZ2-Domäne und CspA, wieder jeweils mit der normalen 5' UTR des entsprechenden Plasmids und der 5' UTR des *cspA*-Genes, für 4 h bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Analyse dieser Versuche erfolgte durch SDS-PAGE oder im Western Blot. Die Ergebnisse für die Proteine DHFR und hRluc sind in Abbildung 4.42, die der PDZ2-Domäne und des CspA in Abbildung 4.43 dargestellt.

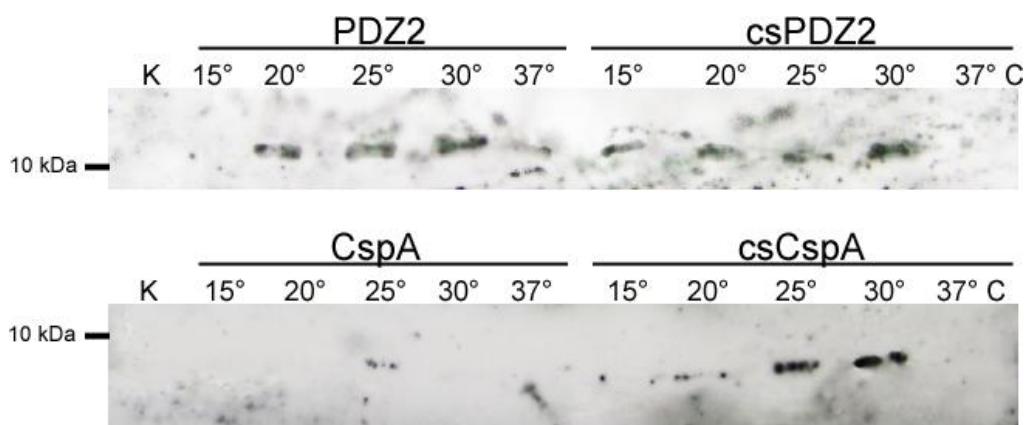
Die 5' UTR des *cspA*-Genes schien einen kleinen positiven Effekt auf die Menge an synthetisierter DHFR zu haben, wobei jedoch der Temperaturbereich, in dem die stärkste Expression stattfand, hier eingeschränkt, statt wie bei der CAT verbreitert, wurde. Die Expression der hRluc wurde durch die neue 5' UTR derart reduziert, dass auf dem SDS-Gel keine Bande mehr erkennbar war. Auf die Expression der PDZ2-Domäne scheint die 5' UTR des *cspA*-Genes so gut wie keinen Einfluss zu haben. Das CspA selbst exprimierte mit seiner natürlichen 5' UTR bei 25°-30° C am besten.

**Abb. 4.42: Synthese von DHFR, csDHFR, hRluc und cshRluc bei unterschiedlichen Temperaturen**

Jeweils 16% SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 1 μ l der Reaktionsansätze nach einer 4 stündigen Expression bei den angegebenen Temperaturen.

Oben: Die DHFR (ca. 18,9 kDa inklusive His₆-tag) zeigte in einem Temperaturbereich von 20°-30° C die stärkste Expression, die csDHFR in einem Temperaturbereich von 25°-30° C. Es scheint als ob von der csDHFR in den entsprechenden Temperaturbereichen etwas mehr synthetisiert wurde.

Unten: Die höchste Expression von der hRluc (ca. 36,9 kDa inklusive His₆-tag) fand bei 30° C statt. Die cshRluc exprimierte dagegen in so geringen Mengen, dass sie auf dem SDS-Gel nicht zu sehen war.

**Abb. 4.43: Synthese von PDZ2, csPDZ2, CspA und csCspA bei unterschiedlichen Temperaturen**

Western Blots nach 16% SDS-PAGE. Aufgetragen wurden jeweils 1 μ l der Reaktionsansätze nach einer 4 stündigen Expression bei den angegebenen Temperaturen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem Universal His Western Blot Kit 2.0 (Clontech; siehe 3.4.3.3).

Oben: PDZ2 und csPDZ2 (ca. 9,7 kDa inklusive His₆-tag) exprimierten in ähnlichen Temperaturbereichen (20-30° C) in vergleichbaren Mengen. PDZ2 zeigt zusätzlich eine schwache Expression bei 37° C, csPDZ2 bei 15° C.

Unten: CspA (ca. 8,3 kDa inklusive His₆-tag) zeigte im gesamten Temperaturbereich keine Expression, lediglich bei 25° C waren sehr kleine Mengen des Proteins detektierbar. Das csCspA zeigte bei 25°-30° C eine schwache Expression. Auch bei 20° C waren sehr kleine Mengen des Proteins nachweisbar.

5. Diskussion

5.1 Kritische Einflussfaktoren bei der Herstellung von S30 Extrakten

Die Durchführung von CFPS Reaktionen, basierend auf *E. coli* S30 Extrakten, setzt sich im Grunde aus zwei Arbeitsschritten zusammen. Zum einen wird bei der Herstellung der S30 Extrakte versucht, die komplette Translationsmaschinerie in einer möglichst aktiven, vollständigen und unbeschädigten Form zu isolieren. Zum anderen soll in der eigentlichen Reaktion eine möglichst vorteilhafte Umgebung für die Translation von mRNAs in ihre Proteinprodukte geschaffen werden. Optimierungen beider Schritte sind für ein robustes und produktives System unumgänglich und wurden daher auch in dieser Arbeit durchgeführt, wobei man sich mehr auf die Herstellung der S30 Extrakte konzentrierte. Dabei konnten einige Schritte, wie der Zellaufschluss durch Sonifikation oder die Methode der Präinkubation, als besonders kritisch für die spätere Syntheseleistung des Systems identifiziert werden. Diese und andere kritische Einflussfaktoren auf die Produktivität von *E. coli* CFPS Systemen sollen im Folgenden diskutiert werden.

Bei der Optimierung der Herstellung der S30 Extrakte war es möglich, durch einige wenige Änderungen des zuvor von Roland Hofweber weiterentwickelten Protokolls (Hofweber, 2006; Doktorarbeit) die Aktivität der Extrakte zu steigern. Dabei war es vor allem der Zellaufschluss, der großen Einfluss auf die Produktivität der S30 Extrakte nahm. Die Sonifikation als Methode für den Zellaufschluss wird von vielen Autoren als nicht geeignet angesehen (z.B. Kigawa *et al.*, 2004; Klammt *et al.*, 2007; Shirokov *et al.*, 2007), da dadurch angeblich die Ribosomen zerstört werden und sich die Extrakte zu stark erwärmen. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass mit dieser Methode durchaus sehr aktive und produktive Extrakte gewonnen werden können, wenn man sie richtig anwendet. Dies bestätigt auch andere Autoren, die die Sonifikation als echte Alternative zu anderen Methoden des Zellaufschlusses sehen (z.B. Sitaraman and Chatterjee, 2009). Ein großer Nachteil der in dieser Arbeit eingeführten, sehr kurzen Sonifikation, ist die reduzierte Ausbeute an S30 Extrakt, die auf eine ineffiziente Lyse der Zellen zurückzuführen ist. Zwar steigt die Aktivität der S30 Extrakte bei kürzeren Sonifikationszeiten bis zu einem gewissen Grad an, gleichzeitig wird dadurch jedoch auch die Proteinkonzentration der Lysate reduziert, was in einer geringeren Ausbeute an S30 Extrakt resultiert. Ein im Ergebnisteil, aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit, nicht gezeigter Kontrollversuch bestätigte die angegebenen

Sonifikationszeiten von 2x 2-3 s als optimal. Dabei lysierte man die *E. coli* Zellen mit Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) unter Rühren für 30 min auf Eis. Auf diese Weise hergestellte S30 Extrakte wiesen die gleiche Proteinsyntheseleistung auf, wie S30 Extrakte bei denen der Zellaufschluss durch die optimierte Sonifikation erfolgte, so dass negative Einflüsse durch diese Methode auf die Produktivität ausgeschlossen werden konnten. Allerdings waren bei der Verwendung von Lysozym die anschließenden 30000g Zentrifugationen nur gelegentlich erfolgreich. Durch den Einsatz von Lysozym ohne DNase I entstanden, aufgrund der noch intakten, genetischen DNA von *E. coli*, sehr viskose Lysate, die sich bei der Zentrifugation nicht immer in ein Pellet und einen Überstand trennten, auch nicht bei einer Verlängerung der Dauer der Zentrifugationen. Die DNase I, die normalerweise immer in Kombination mit Lysozym eingesetzt wird, war nicht möglich, da diese nicht mehr vollständig aus den S30 Extrakten entfernt werden kann und in CFPS Reaktionen die template DNA verdauen würde. Andere Methoden des Zellaufschlusses, wie beispielsweise das intensive Vortexen der Zellen in Anwesenheit von Glaskügelchen (\varnothing 0,17-0,18 mm), oder der Einsatz eines ‚Braun Cell Homogenizers‘, führten zu so niedrigen Proteinkonzentrationen (\leq 1 mg/ml) in den S30 Extrakten, dass mit diesen nicht weitergearbeitet werden konnte. Aus diesen Gründen wurde die Sonifikation als Methode für den Zellaufschluss beibehalten. Abschließend zum Zellaufschluss ist festzuhalten, dass sich die Sonifikation zwar negativ auf die S30 Extrakte auswirkt, jedoch bei richtiger Anwendung die Syntheseleistung der Extrakte nicht beeinflusst wird. Lediglich die Ausbeute an S30 Extrakt wird durch diese Methode stark reduziert, da die sehr kurzen Sonifikationszeiten keine effiziente Lyse der Zellen gewährleisten können. Andere Methoden des Zellaufschlusses, die häufig bei der Herstellung von S30 Extrakten eingesetzt werden sind vermutlich besser geeignet als die Sonifikation, setzen jedoch auch spezialisierte Geräte wie z.B. eine ‚French press‘ (z.B. Klammt *et al.*, 2007) oder ‚Multi Beads Shocker‘ (z.B. Kigawa *et al.*, 2004) voraus.

Ein anderer Schritt bei der Herstellung der S30 Extrakte, der in dieser Arbeit sehr intensiv untersucht wurde, ist die Präinkubation, bei der die Ribosomen von endogenen mRNAs befreit werden sollen. Die endogenen mRNAs werden anschließend durch in den Extrakten enthaltene RNasen degradiert. Dieser Schritt wird von praktisch allen Autoren durchgeführt (vgl. z.B. Kigawa *et al.*, 2004; Klammt *et al.*, 2007; Shirokov *et al.*, 2007; Sitaraman and Chatterjee, 2009; usw.). Eine Studie (Liu *et al.*, 2005) bestätigte die aktivitätssteigernde Wirkung der Präinkubation, wobei jedoch betont wird, dass dieser Effekt nicht allein durch die Freisetzung der mRNAs von den Ribosomen erklärt werden kann, sondern wahrscheinlich während dieses Schrittes auch ‚inhibitorische Substanzen‘ präzipitieren und dies zu der

Aktivitätssteigerung beiträgt. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass ein einfaches Auslassen dieses Schrittes keinen Einfluss auf die Aktivität der S30 Extrakte hatte und diese lediglich in anderen Proteinkonzentrationen eingesetzt werden müssen. Es wurde außerdem festgestellt, dass je nach Methode der Präinkubation, eine andere Proteinkonzentration der S30 Extrakte für die Synthese des Testproteins CAT optimal ist. In der erwähnten Studie von Liu *et al.* (2005) wurde während der CFPS immer mit einer Proteinendkonzentration von 9,12 mg/ml in den Batch-Ansätzen gearbeitet, was in dem hier vorgestellten System einer Proteinkonzentration der eingesetzten S30 Extrakte von etwa 30 mg/ml (Proteinendkonzentration im Batch-Ansatz: 10,55 mg/ml) entsprechen würde. Wenn die S30 Extrakte in dieser Proteinkonzentration eingesetzt wurden, synthetisierte ein S30 Extrakt, mit dem eine Präinkubation nach Shirokov *et al.* (2007) durchgeführt wurde, die der von Liu *et al.* (2005) sehr ähnlich ist, mehr des Testproteins CAT als ein S30 Extrakt, bei dessen Herstellung keine Präinkubation durchgeführt wurde (siehe Abb. 4.2). Es besteht also die Möglichkeit, dass die von Liu *et al.* (2005) festgestellte Aktivitätssteigerung der S30 Extrakte bei der Präinkubation lediglich ein Artefakt ist, das auf der Verwendung der immer gleichen Proteinkonzentration der S30 Extrakte beruht. Anders kann es auch sein, dass eine Präinkubation in dem hier vorgestellten System weniger Effekte hatte als in anderen Systemen, da durch den Zellaufschluss mittels Sonifikation bereits endogene mRNAs zerstört wurden. Daher kann die Frage, welche der verschiedenen Methoden der Präinkubation nun die beste ist, hier nicht abschließend geklärt werden. Auf jeden Fall konnte gezeigt werden, dass mit der NaCl Präinkubation nach Klammt *et al.* (2007) sehr aktive und gut handhabbare S30 Extrakte gewonnen werden können, wenigstens in dem hier vorgestellten System. Auch wurde gezeigt, dass die Methode der Präinkubation große Auswirkungen darauf hat, in welchen Konzentrationen die S30 Extrakte später in den CFPS Reaktionen eingesetzt werden müssen, um optimale Proteinausbeuten zu erzielen.

Eine andere eingeführte Änderung war der Wechsel des *E. coli* Stammes, der für die Herstellung der S30 Extrakte benutzt wurde. Mit der Verwendung des RNase E defizienten Stammes BL21 StarTM (DE3), statt des ursprünglich verwendeten BL21, konnte die Ausbeute der CFPS um weitere ~7,5% gesteigert werden. Die RNase E ist eine der wichtigsten RNAsen beim Abbau von mRNA (siehe auch 1.1.5) und ihr Fehlen in CFPS Reaktionen trägt zu einer Stabilisierung der mRNA bei, wie von Jun *et al.* (2008) gezeigt werden konnte. Der Abbau von mRNA ist besonders problematisch und ein limitierender Faktor der Proteinsynthese, wenn lineare DNA templates eingesetzt werden. Die Verwendung eines RNase E defizienten Stammes kann hier zu enormen Steigerungen der Ausbeute an synthetisiertem Protein

beitragen (Jun *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass ein Fehlen der RNase E auch positive Effekte auf die Proteinausbeute haben kann, wenn Plasmide als template DNA eingesetzt werden, wenn auch in einem viel geringeren Ausmaß. Ein positiver Nebeneffekt der Integrierung des Stammes BL21 StarTM (DE3) in das Standardprotokoll zur Herstellung der S30 Extrakte ist, dass das vorliegende *E. coli* CFPS System nun auch kompatibel zu linearen DNA templates sein sollte, falls dies einmal von einer Anwendung verlangt wird.

Die letzte Änderung bei der Optimierung des *E. coli* CFPS Systems betraf nicht die Herstellung der S30 Extrakte, sondern die Bedingungen während der eigentlichen Proteinsynthesereaktion. Die meisten Autoren benutzen DTT in einer Endkonzentration von 2 mM um das reduzierte Milieu aufrechtzuerhalten, das auch normalerweise in *E. coli* herrscht (z.B. Klammt *et al.*, 2007; Kigawa *et al.*, 2004). Diese Arbeit zeigte jedoch, dass eine Erhöhung der DTT Endkonzentration um weitere 2 mM positive Effekte auf die erzielte Proteinausbeute hatte, besonders wenn S30 Extrakte mit unterdurchschnittlicher Produktivität verwendet wurden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die hier verwendete Methode des Zellaufschlusses durch Sonifikation. Diese Methode kann zur Oxidation von Disulfidbrücken von Proteinen führen, da dabei freie Radikale entstehen (Übersicht z.B. in Hawkins and Davies, 2001). Eventuell wird die Translationsreaktion mit einem Anteil an Proteinen mit oxidierten Disulfidbrücken nicht mehr optimal durchgeführt, so dass eine Erhöhung der Konzentration des Reduktionsmittels DTT sich positiv auf die Proteinsyntheseleistung des Systems auswirkt. Für diese Theorie spricht, dass der Effekt bei unterdurchschnittlich produktiven S30 Extrakten am größten ausfiel (bis zu 40% Steigerung der Proteinsyntheseleistung), die meist zu lange sonifiziert wurden. Andererseits muss auch die Quantifizierung des Testproteins CAT mit in die Überlegungen einbezogen werden, da hier der gelbe Farbstoff (2-Nitro-5-thiobenzoat) aufgrund von freien Thiolgruppen des Coenzyms A entsteht. Es wäre also durchaus möglich, dass die Erhöhung der Proteinsynthese durch DTT, gemessen an der Synthese der CAT, nur ein Artefakt der Methode der Quantifizierung der CAT ist, da das DTT in den Batch-Ansätzen mit seinen freien Thiolgruppen eventuell auch die Entstehung des gelben Farbstoffes induzieren könnte. Diese Überlegungen können jedoch ausgeschlossen werden, da noch höhere DTT Konzentrationen keinen weiteren Effekt mehr auf die Menge an synthetisierter CAT hatte.

Neben den vorgestellten Verbesserungen, die in das *E. coli* CFPS System eingeführt wurden, verfolgte man in dieser Arbeit noch weitere Ansätze, die aber zu keinen Steigerungen der

Proteinsyntheseleistung des Systems führten. Beispielsweise sollte bei der Herstellung der S30 Extrakte durch Zusatz von 22 mM NaH₂PO₄, 40 mM Na₂HPO₄ und 100 mM Glukose zum Kulturmedium (2x YT) die Phosphataseaktivität in den Reaktionsansätzen gesenkt und dadurch die Syntheseleistung erhöht werden (Kim and Choi, 2000). Diese Modifikation führte jedoch zu einer Reduktion der Synthese des Testproteins CAT um fast die Hälfte, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die *E. coli* Zellen in dem neuen Medium ein langsameres Wachstum zeigten und fast doppelt so lange benötigten, die OD₆₀₀ von 1,2 zu erreichen (ca. 3 h statt 1,5-2 h). Erfahrungsgemäß war die Syntheseleistung der S30 Extrakte umso größer, desto schneller sie die OD₆₀₀ von 1,2 erreichten. Ebenfalls wurde in dieser Arbeit versucht, die CFPS mit zusätzlichen, in *E. coli* seltenen tRNAs durchzuführen, was vor allem für die Synthese eukaryotischer Proteine von Vorteil sein könnte (Chumpolkulwong *et al.*, 2006). Dazu isolierte man das pLysSRARE2 Plasmid aus *E. coli* RosettaTM(DE3)pLysS (siehe 2.1.1) und transformierte es in BL21 StarTM (DE3). S30 Extrakte aus diesem Stamm synthetisierten sehr große Mengen der CAT (700-800 µg/ml/h), wobei jedoch bemerkt wurde, dass diese hohen Werte auf das Chloramphenicolresistenzgen des pLysSRARE2, das ebenfalls für die CAT codiert, zurückzuführen sind, da bereits in den 0-Kontrollen, ohne zugesetztes DNA template, große Mengen der CAT enthalten waren. Es war also sehr schlecht möglich, die CAT Synthese auf SDS-Gelen darzustellen, da bereits in den 0-Kontrollen sehr starke Banden der CAT zu sehen waren, warum in der weiteren Arbeit auf die Verwendung dieses Plasmids verzichtet wurde. Auch Kigawa, der die höchste Syntheseleistung der CAT publizierte, benutzt für die Herstellung der S30 Extrakte einen *E. coli* Stamm mit einem Plasmid mit Chloramphenicolresistenzgen. Darüber hinaus werden, wenn es um die Synthese der CAT geht, auf SDS-Gelen nie 0-Kontrollen ohne template DNA gezeigt (vgl. Kigawa *et al.*, 2004; Kigawa 2010). Zwar wird in einer Veröffentlichung (Kigawa, 2010) berichtet, dass die gemessenen Werte um die bereits vorhandene CAT bereinigt werden, dennoch müssen diese Ergebnisse kritisch gesehen werden, da sie exakt den hier erreichten entsprechen (700-800 µg/ml/h).

Insgesamt betrachtet war die Optimierung des *E. coli* CFPS Systems sehr erfolgreich und die Syntheseleistung konnte mehr als verdoppelt werden. Außerdem wurde die zeitliche Einteilung des Protokolls, z.B. durch die Dialyse üN oder das Auslassen des Einfrierens der Zellen, so angepasst, dass sie gut in 1,5 Arbeitstagen durchgeführt werden kann und zu robusten S30 Extrakten führt, die reproduzierbare Proteinausbeuten liefern und sogar lyophilisierbar sind. Die erreichten Syntheseleistungen der CAT im Batch-Verfahren sind sowohl mit der anderer Autoren (vgl. z.B. Voloshin and Swartz, 2008; Calhoun and Swartz,

2007), als auch mit kommerziell erhältlichen Systemen vergleichbar. Lediglich im Dialysemodus müssen bei dem hier vorgestellten System einige Abstriche gemacht werden. In diesem Reaktionsmodus wurde nur eine Syntheseleistung von etwa 2 mg/ml der CAT erreicht, obwohl theoretisch eine 2-3fach höhere Ausbeute erzielt werden könnte. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass bei der Herstellung der S30 Extrakte nur auf die Produktivität im Batch-Verfahren hin optimiert wurde, ohne die Auswirkungen auf die Proteinsynthese im Dialysemodus mit in die Analysen einzubeziehen. Da jedoch in den Folgeversuchen lediglich das Batch-Verfahren angewandt wurde, konnte in dieser Arbeit ein solides Testsystem entwickelt werden, mit dem weitere Untersuchungen an der CFPS, basierend auf *E. coli* S30 Extrakten, durchgeführt werden konnten.

5.2 Kopplung der NASBA-Reaktion mit der CFPS

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich auch mit der Kopplung des vorgestellten *E. coli* CFPS Systems an die NASBA-Reaktion, die die Grundlage eines neuartigen *in vitro* Evolutionssystems ist, das die kontinuierlich Evolution von hochaffinen Proteinliganden ermöglichen soll. Unter Anwesenheit von *E. coli* S30 Extrakten war jedoch keine Produktbildung in der NASBA-Reaktion mehr nachweisbar. Im Ergebnisteil wurde bereits erwähnt, dass ein Ausweichen auf andere, eukaryotische CFPS Systeme aufgrund von unvereinbaren Konzentrationen der benötigten Mg²⁺-Ionen nicht möglich war. Es war lediglich eine Kopplung der Reaktion an das PURE System möglich, das ebenfalls auf *E. coli* beruht und zeigte, dass nicht die prokaryotische Translation an sich für die Inhibition der NASBA-Reaktion verantwortlich ist. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit viele Versuche unternommen, das hier verwendete *E. coli* CFPS System durch verschiedene Modifikationen kompatibel zur NASBA-Reaktion zu machen. Auch wurde versucht eine reverse Transkriptase eines Coliphagen zu exprimieren, die eventuell eine Kopplung der NASBA-Reaktion an das *E. coli* CFPS System erlaubt hätte. Leider war keiner der verfolgten Ansätze erfolgreich und im Folgenden sollen kurz Gründe dafür vorgestellt werden.

Die erste Hypothese, dass in den Extrakten enthaltene, kleine RNA Fragmente durch unspezifische Hybridisierungen mit dem RNA template der M-MLV, oder durch Konkurrenz dieser RNA Fragmente mit dem RNA template um die Bindung an die M-MLV die Produktbildung in der NASBA-Reaktion verhindern, konnte sowohl durch den im Ergebnisteil beschriebenen Versuch, als auch durch die Entdeckung der GENEART AG, dass

hitzeinaktivierte S30 Extrakte die NASBA-Reaktion nicht mehr inhibieren, ausgeschlossen werden. Ebenso konnte durch den im Ergebnisteil gezeigten GST Pulldown Assay mit der M-MLV ausgeschlossen werden, dass irgendein Protein aus den S30 Extrakten durch Bindung an die reverse Transkriptase deren Aktivität inhibiert. Die Publikation, in der beschrieben ist, dass die RNase HI die Produktbildung der M-MLV verhindert, da sie das Zwischenprodukt (RNA/DNA-Hybride) dieser reversen Transkriptase verdaut (Ma and Crouch, 1996) führte zu dem im Ergebnisteil beschriebenen Versuch, in dem S30 Extrakte eines RNase HI-defizienten Stammes eingesetzt wurden. Da jedoch auch diese die NASBA-Reaktion inhibierten, mussten noch weitere Proteine in den S30 Extrakten die Produktbildung der NASBA-Reaktion stören. Dies wurde auch durch die Fraktionierung der S30 Extrakte durch eine Gelfiltration bestätigt. Bei dieser Fraktionierung, die zu einem fast identischen Muster der Banden auf einem SDS-Gel führte, wie eine in einem anderen Zusammenhang durchgeführte Fraktionierung eines S30 Extraktes (vgl. Hillebrecht and Chong, 2008), bestätigte diese Annahme, da jede proteinhaltige Fraktion die NASBA-Reaktion inhibierte. Eine weitere Publikation (Arezi and Hogrefe, 2007), in der gezeigt wurde, dass die Anwesenheit sehr kleiner Mengen (niedriger picomolarer Bereich) der verschiedensten DNA Polymerasen die Produktbildung der M-MLV verhinderte und weitere Versuche der Kooperationspartnerin, die diese Annahme bestätigten, führten dazu, die Arbeiten mit den S30 Extrakten einzustellen. Eine Möglichkeit, das *E. coli* CFPS System doch noch kompatibel zur NASBA-Reaktion zu machen, wäre die Entfernung aller *E. coli* DNA Polymerasen, sowie der RNase HI aus den S30 Extrakten gewesen, was nur durch den Einsatz spezifischer Antikörper möglich wäre. Diese waren jedoch nicht kommerziell erhältlich und hätten erst generiert werden müssen. Auch wäre dieser sehr zeitaufwendige Versuch keine Garantie dafür, dass danach die S30 Extrakte die NASBA-Reaktion nicht mehr inhibiert hätten, da die *E. coli* S30 Extrakte noch viele weitere Proteine, wie z.B. verschiedene RNasen, enthalten, deren Auswirkungen auf die Produktbildung in der NASBA-Reaktion unbekannt sind. Aus diesem Grund wurde sich dafür entschieden, die NASBA-Reaktion an die translationsaktiven Ribosomen zu koppeln.

Im Ergebnisteil ist beschrieben, dass auch die Verwendung von translationsaktiven Ribosomen nach Kudlicki *et al.* (1992) zu keiner Produktbildung in der NASBA-Reaktion führte. Das einfache Pelletieren der Ribosomen durch Zentrifugation war anscheinend nicht ausreichend, die inhibitorisch wirkenden DNA Polymerasen und RNasen quantitativ zu entfernen. Außerdem war hier schon mit bloßem Auge, durch eine intensive Gelbfärbung der Lösung, zu erkennen, dass neben den Ribosomen noch viele weitere Proteine enthalten waren. Nach Spedding (1990) isolierte Ribosomen, die während der Präparation mehrmals mit relativ

hohen Salzkonzentrationen gewaschen wurden, führten dagegen zu einer klaren, farblosen Ribosomen-Lösung. Diese inhibierte zwar nicht die NASBA-Reaktion, zeigte jedoch auch keine Translationsaktivität mehr. Kombinationen beider Protokolle zeigten deutlich, dass es nicht möglich war, lediglich die Translationsmaschinerie zu isolieren, ohne gleichzeitig die auf die NASBA-Reaktion inhibitorisch wirkenden Proteine mit in die Präparation zu verschleppen. Eine Produktbildung in der NASBA-Reaktion bedeutete grundsätzlich auch einen Verlust der Translationsaktivität und umgekehrt. Aus diesem Grund entschied man sich, die NASBA-Reaktion selbst zu verändern und nicht das weitaus komplexere *E. coli* CFPS System.

Es sollte eine andere reverse Transkriptase in der NASBA-Reaktion verwendet werden. Die reverse Transkriptase des P2-artigen Coliphagen EC30 (P2RT) schien dafür geeignet, da nach der Expression dieses Proteins in einem *E. coli* CFPS System in den Reaktionsansätzen reverse Transkriptaseaktivität nachgewiesen werden konnte (Odegrip *et al.*, 2006). Warum die Expression dieses Proteins, ausgehend von einer Codon-optimierten Version der codierenden Sequenz, weder *in vivo*, noch *in vitro* möglich war, konnte an dieser Stelle nicht erklärt werden. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass in dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3)pLysS das Expressionsplasmid derart modifiziert wurde, dass die codierende Sequenz der P2RT gar nicht mehr oder nur noch teilweise enthalten war. Warum nun auch in *E. coli* CK600K, in dem die codierende Sequenz durch PCR nachgewiesen werden konnte, keine Expression der P2RT detektiert werden konnte, ist unbekannt. Diese Versuche bestätigen jedoch die in der Einleitung bereits erwähnte Aussage von Graslund *et al.* (2008), dass längst nicht alle proteincodierenden Sequenzen, die kloniert wurden, auch exprimiert und aufgereinigt werden können. Eine mögliche Erklärung wäre ein eventuell bei *E. coli* evolvierter Schutzmechanismus gegen die Expression einer reversen Transkriptase eines Coliphagen. Die Tatsache, dass die Expression wenigstens eines Fragmentes der P2RT im PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (New England Biolabs) möglich war, würde für diese Hypothese sprechen, ist jedoch trotzdem reine Spekulation. Odegrip *et al.* (2006) zeigt in seiner Publikation kein Gel bzw. keinen Western Blot, auf dem die Expression der P2RT nachgewiesen wird, sondern weist dieses Protein lediglich durch die reverse Transkriptaseaktivität nach. Dabei wurde das Quan-T-RT™ Assay System (GE Healthcare) verwendet. Derartige Kits sind in der Lage, reverse Transkriptasen in sehr kleinen Mengen (ca. ab 1 pg) nachzuweisen. Aus diesem Grund ist es durchaus möglich, dass die P2RT auch in dem hier verwendeten *E. coli* S30 System in sehr geringen Mengen exprimierte, die jedoch zu klein waren, um im Western Blot nachgewiesen zu werden (ca. ab 10 ng). Auf jeden Fall

war es nicht möglich, die P2RT in Mengen zu exprimieren, die in der NASBA-Reaktion hätten getestet werden können.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, deuten stark darauf hin, dass die Verwendung des PURE Systems, das weder die inhibitorisch wirkenden DNA Polymerasen, noch RNasen enthält, für das *in vitro* Evolutionsprojekt unumgänglich ist, obwohl die neueren Ergebnisse hier nicht diskutiert werden sollen, da die Zusammenarbeit mit der GENEART AG bereits vor dem Fertigstellen dieser Arbeit beendet war.

5.3 Rekonstitution der Translationsmaschinerie in *E. coli* S30 Extrakten

Ein großer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Rekonstitution der Translationsmaschinerie in den verwendeten *E. coli* S30 Extrakten. Dazu wurde zum ersten Mal ein kompletter Screen durchgeführt, in dem die Auswirkungen einzelner Teile des Translationsapparates systematisch auf die Produktivität der CFPS getestet wurde. Grundlage für diese Arbeit war die Publikation von Underwood *et al.* (2005), in der gezeigt werden konnte, dass praktisch alle Vorgänge der Translation, wie beispielsweise die Initiation oder die Elongation, in *E. coli* CFPS Systemen viel langsamer ablaufen als *in vivo* und dies ein Grund für die relativ geringen Proteinsyntheseleistungen dieser Systeme ist. Darüber hinaus zeigte diese Studie auch, dass die Produktivität durch die Zugabe der drei gereinigten Elongationsfaktoren gesteigert werden konnte. Im Folgenden sollen nun die Auswirkungen der einzelnen Teile der Translationsmaschinerie auf die Produktivität der CFPS, sowie die Versuche, in denen CFPS Reaktionen mit verringerten Konzentrationen an Translationsfaktoren durchgeführt wurden diskutiert und im Anschluss das Ergebnis dieser Versuche als Ganzes dargestellt werden.

Zuerst muss an dieser Stelle betont werden, dass die einzelnen Teile der Translationsmaschinerie in sinnvollen Konzentrationen eingesetzt wurden. Dies wurde einerseits durch die Versuche gewährleistet, bei denen mit sehr geringen Konzentrationen der entsprechenden Faktoren begonnen und die Konzentrationen so lange gesteigert wurden, bis ein Effekt auf die Produktivität des Systems bemerkbar wurde. Andererseits kann man bei den IFs, EFs, RFs und dem RRF sicher sein, diese in den richtigen Konzentrationen getestet zu haben, was die in Punkt 4.3.1.5 beschriebene Quantifizierung dieser Faktoren in den *E. coli* S30 Extrakten bestätigt, die in Zusammenarbeit mit Jörg Reinders und seinen Kollegen am Institut für funktionelle Genomik (Regensburg) durchgeführt wurde. Zusätzliche

Kontrollversuche haben bestätigt, dass weder zusätzliches Protein allgemein, noch die Einführung der häufig verwendeten His₆-tags in das System Auswirkungen auf die Produktivität hatten. Darüber hinaus konnte außerdem davon ausgegangen werden, dass alle Faktoren in aktiver Form in dem System getestet wurden, da Experimente die biologische Aktivität aller Faktoren bestätigten.

Nach Underwood *et al.* (2005) ist in *E. coli* CFPS Systemen gerade die Initiation der Translation stark verlangsamt. Die durchgeführten Versuche zeigten jedoch eindeutig, dass zusätzliche Initiationsfaktoren nicht in der Lage waren diese Limitation, die ohne Zweifel Auswirkungen auf die Produktivität dieser Systeme hat, zu überwinden. Während IF1 und IF3 kaum Einfluss auf die Syntheseleistung der CAT nahmen und erst in relativ hohen Konzentrationen, die in etwa einer Verdopplung der Menge dieser Faktoren entsprachen, begannen die Reaktion zu inhibieren, störte IF2 schon in geringeren Konzentrationen die Proteinsynthese. Hier muss jedoch beachtet werden, dass IF2 auch in den S30 Extrakten in erheblich geringeren Konzentrationen vorliegt, als IF1 und IF3. Die beobachtete relativ starke Inhibition dieses Faktors in Konzentration von 2 μ M entspricht der Zugabe der vierfachen Menge des normalerweise in den Extrakten enthaltenen IF2. Da die Zugabe der Initiationsfaktoren keinen positiven Effekt auf die Synthese des Testproteins hatte, muss die langsamere Initiation der Translation auf andere Mechanismen zurückzuführen sein, wie beispielsweise die Sekundärstrukturbildung der mRNA, die durch die Entkopplung von Transkription und Translation in *E. coli* CFPS Systemen möglich sein könnte (De Smit and van Duin, 1990; Yanofsky, 1981).

Underwood *et al.* (2005) konnte bereits zeigen, dass die Zugabe von 12 μ M EF-Tu, 6 μ M EF-Ts und 2 μ M EF-G zu CFPS Reaktionen die verlangsamten Elongationsgeschwindigkeiten und, seltsamerweise, auch die verlangsamten Initiationsgeschwindigkeiten wieder etwas erhöhen und dadurch die Syntheseleistung des Systems um durchschnittlich 20% steigern konnte. In dieser Arbeit führte die Zugabe von 2 μ M EF-Tu, was in etwa einer Verdopplung der Konzentration dieses Faktors entspricht, zu einer durchschnittlichen Steigerung der CAT Synthese um 13%, wobei die Werte jedoch stark schwankten. Die Erhöhung der Konzentration an EF-Ts um 1 μ M oder in etwa 50% steigerte sie Syntheseleistung um ~6%. Zusätzliches EF-G zeigte dagegen eine Inhibition der Reaktion, wobei auch hier beachtet werden muss, dass dieser Faktor, ähnlich wie IF2, in relativen geringen Konzentrationen enthalten ist und der starke inhibitorische Effekt in einer Konzentration von 4 μ M in etwa einer Verfünffachung der Konzentration entspricht. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse

bezüglich der EFs sind durchaus mit denen von Underwood *et al.* (2005) vereinbar, da dieser für seine Versuche keine aufkonzentrierten S30 Extrakte verwendete. In unserem stark konzentrierten System sind wahrscheinlich bereits geringere Konzentrationen an EFs ausreichend, um Effekte zu beobachten. Die positiven Effekte, die von Underwood *et al.* (2005) durch die Zugabe der EFs erreicht wurden, sind wahrscheinlich auf die positiven Effekte von EF-Tu und EF-Ts zurückzuführen, die auch in unserem System beobachtet werden konnten. Zusätzliche 2 μ M EF-G waren eventuell zu wenig, um in den nicht konzentrierten Extrakten von Underwood eine Inhibition der CAT Synthese hervorzurufen. Leider konnte in dieser Arbeit nicht bestimmt werden, ob die Effekte von EF-Tu und EF-Ts additiv sind, da die erhaltenen Werte der CAT Synthese zu stark schwankten. Auf jeden Fall ist die durch die beiden Faktoren hervorgerufene Steigerung der Syntheseleistung zu gering, um tatsächlich von limitierenden Faktoren zu sprechen, da der beobachtete Effekt kleiner ist, als die Syntheseleistung der S30 Extrakte ohnehin von Präparation zu Präparation schwankt. Einen weiteren Hinweis, dass die Produktivität von S30 Extrakten stark von dem Faktor EF-Ts abhängig ist, lieferte eine Studie, in der, hinsichtlich der Syntheseleistung, aktive, weniger aktive und inaktive S30 Extrakte durch 2D Gelelektrophorese analysiert wurden. Dabei wurde entdeckt, dass EF-Ts in aktiven und weniger aktiven S30 Extrakten in etwa drei Isoformen, die eventuell durch Phosphorylierungen und andere Modifikationen entstehen, vorlag. In den inaktiven Extrakten waren dagegen bis zu sieben Isoformen dieses Proteins detektierbar. Diese Studie zeigte auch, dass sich die unterschiedlich produktiven Extrakte weder in der Anzahl der verschiedenen enthaltenen Proteine, noch in den Ribosomenkonzentrationen unterschieden. Es wurden auch einige Spots auf den Gelen entdeckt, die in aktiven Extrakten vorhanden sind, nicht jedoch in den inaktiven und umgekehrt. Diese wurden jedoch nicht weiter charakterisiert (Schindler *et al.*, 2000).

Über die Termination und das Ribosomenrecycling in *E. coli* CFPS Systemen ist weitaus weniger bekannt, als über die Initiation und die Elongation. RF1 inhibierte die Synthese des Testproteins bereits in geringen Konzentrationen etwas, in hohen Konzentrationen von 4 μ M, was in etwa einer Verdreifachung der Menge dieses Faktors entsprach, waren nur noch etwa 85% der ursprünglichen CAT Synthese detektierbar. RF2, der bei der Quantifizierung nicht erfasst werden konnte, hatte kaum Einfluss auf die Reaktion, auch nicht in höheren Konzentrationen. Auch RF3, der in etwa in einer Konzentration von 1,6 μ M in den Reaktionen vorliegt, zeigte bei starker Konzentrationserhöhung (bis zu 4 μ M zusätzlich) kaum einen Einfluss auf die Reaktion. Zusätzlicher RRF führte in höheren Konzentrationen, die in etwa einer Verdrei- bis Vervierfachung der Menge dieses Faktors entsprachen, zu

einem starken Schwanken der Syntheseleistung, wobei jedoch ein Trend zur Inhibition erkennbar war. RF1 und RF2 sollten beide das Stopcodon UAA der CAT mRNA erkennen, dennoch zeigten beide sehr unterschiedliche Effekte auf die Synthese der CAT. Der negative Effekt von RF1 könnte vielleicht auf seine Inhibition des Ribosomenrecyclings durch RRF zurückzuführen sein, die bei hohen Konzentrationen dieses Faktors auftritt. Ebenso könnte der Einfluss von RRF hierdurch erklärt werden, da beide Faktoren eventuell überlappende Bindungsstellen am Ribosom besitzen (Pavlov *et al.*, 1997).

Ein Konkurrieren um Bindungsstellen am Ribosom könnte auch die inhibitorischen Effekte der GTPasen IF2 und EF-G erklären. Beide Faktoren, ebenso wie die anderen GTPasen EF-Tu und RF3, binden an denselben Region an das Ribosom (Helgstrand *et al.*, 2007). Eine Konzentrationserhöhung einer dieser Faktoren könnte somit dieses Gleichgewicht stören, was im Falle von IF2 und EF-G zu einer Minderung der Syntheseleistung führt.

Die Aminoacylierung der tRNAs und die Formylierung der Initiator tRNA schienen die CFPS ebenfalls nicht zu limitieren. Sowohl die zusätzlichen Aminoacyl-tRNA Synthetasen, als auch die MTF, inhibierten sie Synthese der CAT in S30 Extrakten. Zusätzliche, im Ergebnisteil nicht präsentierte Versuche, zeigten außerdem, dass die tRNA Synthetasen und die MTF die Synthese der CAT auch bei der Verwendung von translationsaktiven Ribosomen nach Kudlicki *et al.* (1992) inhibierten, was für die von ihm vorgeschlagene enge Assoziation der tRNA Synthetasen, und offensichtlich auch der MTF, mit den Ribosomen bestätigt. Ob die von den tRNA Synthetasen und der MTF verursachte Minderung der CAT Synthese an dem zusätzlichen ATP Verbrauch liegt, wurde nicht geprüft. Da jedoch sehr hohe ATP Konzentrationen und ein Energieregenerationssystem bei den CFPS Reaktionen verwendet wurden, wird auch hier ein gestörtes Gleichgewicht der Faktoren, die mit oder um die Ribosomen assoziiert sind, vermutet.

Die Studie von Underwood *et al.* (2005) konnte zeigen, dass zusätzliche Ribosomen (gereinigt, ohne assoziierte Faktoren) in den CFPS Reaktionen zwar aktiv translatieren, aber gleichzeitig die Elongationsgeschwindigkeit derart reduzieren, dass kein Unterschied in der CAT Synthese feststellbar ist. Dabei wird vermutet, dass für die zusätzlichen Ribosomen nicht genügend Translationsfaktoren zur Verfügung stehen und sich deshalb kein positiver Effekt auf die Proteinsynthese einstellt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit translationsaktive Ribosomen nach Kudlicki *et al.* (1992), inklusive der assoziierten Translationsfaktoren, auf ihren Einfluss auf die CFPS getestet. Der dabei beobachtete, inhibitorische Effekt auf die Synthese der CAT wurde dabei jedoch wahrscheinlich genau

durch die zusätzlichen Translationsfaktoren verursacht, die man mit den Ribosomen in das System einführt (s.o.).

Eine ganz andere Erklärung für die hauptsächlich negativen Effekte zusätzlicher Teile der Translationsmaschinerie auf die CFPS wäre eine Beschleunigung der Reaktion, die zu einer schnelleren Akkumulation von Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, die negative Effekte auf die Translation haben, oder zu einem schnelleren Verbrauch von Substraten führt. Diese Effekte könnten unverhältnismäßig zur Proteinsynthese auftreten und sich in einer Minderung der Synthese der CAT äußern. Diese Hypothese wird teilweise von dem Versuch gestützt, in dem gezeigt wurde, dass die Effekte der GTPasen IF2, EF-G, EF-Tu und RF3 nicht einfach durch zusätzliche GTP Hydrolyse erklärbar sind. Im Falle von EF-G führte zusätzliches GTP zu einer Verstärkung des inhibitorischen Effekts. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass zusätzliches EF-G die Translation nicht mehr weiter beschleunigen kann, jedoch durch die GTP Hydrolyse anorganisches Phosphat produziert, das wiederum die Konzentration an Mg^{2+} -Ionen reduziert und so die Synthese der CAT inhibiert (Kim *et al.*, 2006b). In diesem Fall würde EF-G die Proteinsynthese also nicht durch den Verbrauch von GTP, sondern durch die Produktion von Phosphat inhibieren. Wie hier dargestellt, sind die Vorgänge in CFPS Systemen sehr komplex und wahrscheinlich ist eine Kombination mehrerer Effekte für den Einfluss zusätzlicher Teile des Translationsapparates auf die Syntheseleistung des Systems verantwortlich.

Da die meisten der getesteten Teile des Translationsapparates negative Effekte auf die Proteinsynthese hatten, wurden die Experimente durchgeführt, in denen man versuchte, CFPS Reaktionen mit niedrigeren Konzentrationen an Translationsfaktoren ablaufen zu lassen. Dabei konnte zwar keine Steigerung der Syntheseleistung des Systems erzielt werden, dennoch erlauben diese Versuche einige interessante Aussagen über die Zusammensetzung der Translationsmaschinerie unter zellfreien Bedingungen. Bei Verwendung der translationsaktiven Ribosomen nach Kudlicki *et al.* (1992) muss an dieser Stelle zuerst angemerkt werden, dass hier nachweislich mit niedrigeren Konzentrationen an IFs, EFs, RFs und dem RRF gearbeitet wurde, da im Aktivitätstest dieser Faktoren jeder in der Lage war, in einer Konzentration von 1 μ M die Proteinsyntheseleistung dieser Ribosomen zu steigern. Mit niedrigeren Konzentrationen an Aminoacyl-tRNA Synthetasen und der MTF wurde hier eventuell nicht gearbeitet, da beide die Synthese der CAT durch diese Ribosomen inhibierten (s.o.). Gab man zu den translationsaktiven Ribosomen den bei der Isolierung anfallenden Überstand wieder zu, so konnte die Syntheseleistung wieder auf die Werte von S30 Extrakten

erhöht werden. Dabei war weniger des Überstandes erforderlich, als erwartet. Das bedeutet, dass die Proteinsynthese auch mit geringeren Konzentrationen der Translationsfaktoren ablaufen kann, ohne dass eine Minderung der Ausbeute des Testproteins eintritt. Dies könnte z.B. erklären, warum im PURE System, im Verhältnis zu den Ribosomen, sehr geringe Mengen an Translationsfaktoren eingesetzt werden (Shimizu *et al.*, 2001, 2005; Shimizu and Ueda, 2010). Diese Ergebnisse zeigen auch, dass andere energieverbrauchende Prozesse als die Translation in den CFPS Reaktionen eine eher untergeordnete Rolle spielen, da bei Verwendung der translationsaktiven Ribosomen mit dem Überstand auch diese Vorgänge reduziert sein sollten. Wäre das nicht der Fall, hätte hier eine Steigerung der Proteinsynthese stattfinden müssen. Die Syntheseleistung der translationsaktiven Ribosomen konnte auch durch die Zugabe eines S30 Extraktes gesteigert werden, erreichte jedoch nie die Produktivität der S30 Extrakte allein (~83%). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass mit den S30 Extrakten auch Ribosomen mit den assoziierten Faktoren wieder in das System eingeführt wurden, die sich negativ auf die Synthese der CAT auswirken. Bei den Experimenten, bei denen die S30 Extrakte mit 1000 kDa Ausschlussgröße konzentriert wurden, konnte man nicht sicher sein, ob tatsächlich mit niedrigeren Konzentrationen an Translationsfaktoren gearbeitet wurde. Hier war sowohl die optimale Proteinkonzentration als auch die Syntheseleistung identisch zu normalen S30 Extrakten. Auch konnten die Konzentrate nicht von den normalen S30 Extrakten unterschieden werden, wenn sie durch eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Der Durchlauf, der bei der Konzentrierung mit einer Ausschlussgröße von 1000 kDa anfiel und der nur 6,8% des gesamten Proteingehalts des Extraktes aufwies, konnte ebenso die Syntheseleistung des Konzentrates nicht mehr verbessern, störte aber auch nicht. All diese Beobachtungen bestärken die Annahme von Kudlicki *et al.* (1992), dass die Ribosomen in den zellfreien Systemen, und wahrscheinlich auch in der lebenden Zelle, mit allen Faktoren, die für die Translation benötigt werden, assoziiert sind.

Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse einen sehr starken Hinweis, wenn auch nicht den absoluten Beweis, da beispielsweise nicht jede Aminoacyl-tRNA Synthetase einzeln getestet wurde, darauf, dass die Translationsmaschinerie in den S30 Extrakten optimal rekonstituiert ist. Weder die Erhöhung, noch die Erniedrigung der Konzentration der an der Translation beteiligten Faktoren konnte die Produktivität steigern. Lediglich EF-Ts und EF-Tu scheint in den S30 Extrakten etwas zu niedrig konzentriert vorzuliegen. Darüber hinaus konnte durch die Versuche mit den translationsaktiven Ribosomen gezeigt werden, dass andere energieverbrauchende Prozesse während den CFPS Reaktionen wahrscheinlich eine

untergeordnete Rolle spielen und es konnten weitere Hinweise dafür geliefert werden, dass die Translationsmaschinerie ein zusammenhängendes System ist und nicht, wie oft in Lehrbüchern dargestellt, aus einzelnen Faktoren besteht, die gelegentlich miteinander interagieren. Da die Ribosomenkonzentration in schnell wachsenden *E. coli* Zellen etwa 42 μM beträgt (Neidhardt, 1987), sollten sich zukünftige Studien darauf konzentrieren, wie derart hohe Ribosomenkonzentrationen in CFPS Systemen eingesetzt werden können, ohne inhibitorisch zu wirken. Dies könnte der Schlüssel zu dem Problem der niedrigen Produktivität der CFPS sein. Auch sollte das Problem der Sekundärstrukturbildung der mRNA, das eventuell für die niedrige Syntheseleistung verantwortlich ist, genauer untersucht werden.

5.4 Auswirkungen der Sekundärstrukturbildung der mRNA auf die CFPS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Versuche durchgeführt, die sich mit der eventuellen Sekundärstrukturbildung der mRNA und der damit vielleicht in Zusammenhang stehenden, niedrigen Syntheseleistung von CFPS Systemen beschäftigten. Zum einen sollten durch den Zusatz von RNA Chaperonen bzw. einer miRNA eventuell vorhandene, auf die Initiation der Translation inhibitorisch wirkende Sekundärstrukturen aus den mRNAs entfernt und dadurch die Ausbeute der CFPS gesteigert werden. Zum anderen sollte durch den Einsatz der *E. coli* RNA Polymerase die Kopplung von Transkription und Translation in den CFPS Systemen wiederhergestellt werden, so dass die mRNA erst gar nicht die Zeit hat, Sekundärstrukturen auszubilden, da sie sofort mit Ribosomen besetzt wird. In der Literatur gibt es kaum Studien, die sich mit der Sekundärstrukturbildung der mRNA im zellfreien System beschäftigen. Dennoch wird sie von vielen Autoren (z.B. Spirin and Swartz, 2008; Underwood *et al.*, 2005) als Problem der CFPS gesehen, das die Ausbeute dieser Systeme limitiert. Es existieren auch einige Hinweise, die einen Einfluss der Sekundärstrukturbildung der mRNA vermuten lassen, wie beispielsweise die stark verlangsamte Initiationsgeschwindigkeit im zellfreien System (Underwood *et al.*, 2005), die nicht durch zusätzliche Initiationsfaktoren beschleunigt werden kann (diese Arbeit). Andere Studien beschäftigen sich zumeist mit der Fusion von bestimmten Nukleotidsequenzen an das 5' Ende der codierenden Region der mRNA, direkt nach dem Startcodon, wodurch eine Steigerung der Proteinausbeute erreicht wird (z.B. Ahn *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010). Ob die Verwendung von solchen Signalsequenzen die Sekundärstruktur der entsprechenden mRNA im zellfreien System derart beeinflusst, dass die Initiation der Translation erleichtert wird, oder ob der

beobachteten Steigerung der Proteinsynthese andere Mechanismen zugrundeliegen, ist unbekannt. Eine Studie, in der ebenfalls versucht wurde die Expression eines bestimmten Proteins (Aquaporin Z) durch die Verwendung solcher Signalsequenzen zu steigern, zeigte einen Zusammenhang zwischen der freien Energie der mRNA Sekundärstruktur in der Translations-Initiations-Region und der erzielten Proteinausbeute (Xu *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden andere Wege gegangen, die eventuelle Sekundärstrukturbildung der mRNA im *E. coli* CFPS System zu verhindern (s.o.). Die erhaltenen Ergebnisse der Versuche sollen nachfolgend diskutiert werden.

Der Einsatz von RNA Chaperonen zur Auflösung von mRNA Sekundärstrukturen in der auf *E. coli* S30 Extrakten basierenden CFPS wäre sehr vorteilhaft. Die codierenden Sequenzen dieser Proteine könnten direkt in dem *E. coli* Stamm, der für die Herstellung der Extrakte verwendet wird, exprimiert werden. Das entsprechende RNA Chaperon wäre dann bereits in den S30 Extrakten enthalten. Ein weiterer Vorteil der hier getesteten, sequenzunspezifischen RNA Chaperone, Annealer und Helikasen wäre auch, dass sie eventuell positive Effekte auf die Expression vieler verschiedener proteincodierender Sequenzen in unterschiedlichen Plasmiden hätten. Leider konnte durch keines der hier getesteten RNA Chaperone der verschiedensten Klassen (nach Rajkowitsch *et al.*, 2007; Russell, 2008) eine positive Wirkung auf die Syntheseleistung der CAT festgestellt werden. Auch gestaltet sich die Interpretation der erhaltenen Daten relativ schwierig, da über genaue Wirkweise dieser Proteine als RNA Chaperone bzw. über ihre Interaktionen mit mRNA, sehr wenig bekannt ist. Die meisten Daten über die Chaperonaktivität dieser Proteine stammen aus einer Handvoll spezieller *in vitro* Assays, wobei u.a. verschiedene Ribozyme, unterstützt durch RNA Chaperone, ihre korrekten Sekundärstrukturen annehmen sollen, um sich dann selbst oder eine andere Substrat RNA zu spleißen (Übersicht in Rajkowitsch *et al.*, 2007).

Die Domäne UP1 des humanen hnRNP A1 aus der RNA Chaperonklasse der hnRNPs zeigte im *E. coli* CFPS System so gut wie gar keinen Einfluss auf die Synthese der CAT, obwohl im EMSA mit der CAT mRNA eine klare Interaktion festgestellt werden konnte. Der durch UP1 verursachte ‚Shift‘ der CAT mRNA war ab einer Konzentration des Proteins von 8 µM zu beobachten. Bis zu dieser Konzentration wurde es auch im CFPS System getestet, so dass ein konzentrationsabhängiges Ausbleiben eines Effektes ausgeschlossen werden kann. Für dieses Protein ist u.a. beschrieben, dass es durch seine zwei RNA Bindungsdomänen die Fähigkeit besitzt, komplementäre Nukleinsäuren zu renaturieren, was ein Auflösen doppelsträngiger Bereiche beinhaltet (Pontius and Berg, 1990). Eine Möglichkeit, warum UP1 und eventuell

alle hier getesteten RNA Chaperone keinen positiven Effekt auf die Synthese der CAT hatten ist, dass es sich bei der aufzulösenden Struktur in der 5' UTR der CAT mRNA eventuell um eine Stamm-Schleife Struktur handelt (siehe Abb. 4.31). Die Ausbildung von Stamm-Schleife Strukturen läuft extrem schnell ab (Cantor and Schimmel, 1980). Es wäre also durchaus denkbar, dass diese Struktur von UP1 und anderen RNA Chaperonen zwar aufgeschmolzen wird, aber sich, nachdem das Protein, das ja nur eine transiente Interaktion mit der mRNA eingeht, sofort wieder ausbildet, noch bevor eine Interaktion mit der kleinen ribosomalen Untereinheit stattfinden kann. Die von Underwood *et al.* (2005) bestimmten, niedrigen Ribosomenkonzentrationen (~1,6 μ M), sowie die Tatsache, dass UP1 die Translationsreaktion auch nicht störte, würden für diese Theorie sprechen.

Die beiden ribosomalen Proteine der kleinen Untereinheit aus *E. coli*, S1 und S12, zeigten in den getesteten Konzentrationen, in denen im Aktivitätstest jedoch bereits deutliche Effekte auf die CAT mRNA bzw. die 16S rRNA zu beobachten waren, ebenfalls sehr wenig Auswirkungen auf die Synthese der CAT. Lediglich S12 inhibierte die Translationsreaktion in höheren Konzentrationen etwas. Die Daten über die RNA Chaperonaktivität des Proteins S12 stammen zumeist aus Spleiß-Experimenten mit einem bestimmten Intron des Phagen T4, wobei die RNA Chaperonaktivität *in vitro* stärker zu sein scheint, als die *in vivo* (Clodi *et al.*, 1999; Coetzee *et al.*, 1994). Zusätzlich konnte im EMSA mit der CAT mRNA keine Interaktion mit S12 festgestellt werden, was zwar nicht zwangsläufig bedeutet, dass keine Interaktion stattfindet, aber einen Hinweis darauf liefert, dass eventuell S12 in unserem CFPS System die Sekundärstruktur der CAT mRNA nicht beeinflusst. Die leichte Inhibition dieses Proteins in hohen Konzentrationen kann viele Gründe haben, wie z.B. Interaktionen mit anderen an der Translation beteiligten RNAs, wie z.B. den tRNAs, wodurch die Reaktion gestört werden könnte. Diese Vermutung wurde jedoch nicht getestet. Die beschriebenen Eigenschaften des Proteins S1 entsprechen genau denen, die, falls die Hypothese der mRNA Sekundärstrukturen als Problem in CFPS Systemen richtig ist, nötig wären, diese Limitation zu überwinden. S1 soll die mRNA binden, Sekundärstrukturen entfernen und auch an der Bildung des Initiationskomplexes beteiligt sein (Kolb *et al.*, 1977). Dieses Protein zeigte jedoch, obwohl im EMSA mit der CAT mRNA eine deutliche Interaktion bereits in niedrigen Konzentrationen (ab ca. 1-2 μ M) festgestellt werden konnte, keine Auswirkungen auf die Synthese der CAT. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass S1 in den S30 Extraktten bereits in ausreichenden Konzentrationen enthalten ist und eine weitere Erhöhung der Konzentration keinen weiteren Effekt mehr hat.

Das Histon-artige Protein StpA aus *E. coli* zeigte einen starken inhibitorischen Effekt auf die Synthese des Testproteins. Viele Daten über die RNA Chaperonaktivität dieses Proteins, das auch an der Verpackung der DNA und der Transkriptionsregulation beteiligt ist, stammen ebenfalls meist aus Spleiß-Experimenten (Übersichten in Rajkowitsch *et al.*, 2007; Russell, 2008). Ob die inhibitorische Wirkung dieses Proteins nun auf eine Minderung der Transkription durch die Bindung an die template DNA verursacht wurde, oder ob andere Mechanismen zugrunde liegen, wurde nicht geprüft. Es konnte auf jeden Fall keine Interaktion mit der CAT mRNA festgestellt werden und der Aktivitätstest bestätigte die Bindung dieses Proteins an DNA, was diese vor einem Verdau durch die DNase I schützen konnte (Keatch *et al.*, 2005). Diese Beobachtungen würden für eine Inhibition der Proteinsynthese auf der Ebene der Transkription sprechen.

Die ersten 55 Aminosäuren des viralen NC Proteins NCp7 aus HIV-1 inhibierten die CAT Synthese in unserem CFPS System ebenfalls verhältnismäßig stark. Eine Eigenschaft, warum dieses Protein zum Test in der CFPS ausgewählt wurde, ist, dass es bei der Virenreplikation die Sekundärstrukturen in den RNA templates der reversen Transkriptase auflösen soll (Wu *et al.*, 1996). Diese Fähigkeit ließ sich offenbar nicht auf die CAT mRNA übertragen, mit der im EMSA auch keine Interaktion festgestellt werden konnte. Ein Grund für den inhibitorischen Effekt dieses Proteins könnte seine Interaktion mit der tRNA sein (Khan and Giedroc, 1992), die auch für den Aktivitätstest ausgenutzt wurde. Eventuell stört diese Interaktion die Translationsreaktion.

Das bakterielle Sm-artige Protein Hfq aus *E. coli*, bei dem es sich um einen RNA Annealer und nicht um ein Chaperon im eigentlichen Sinne handelt, zeigte sehr wenig Einfluss auf die Ausbeute an synthetisiertem Testprotein und wirkte lediglich in höheren Konzentrationen leicht inhibierend. Trotz mehrerer beschriebener Fälle in denen es mit mRNA interagiert und die Sekundärstruktur der 5' UTR beeinflusst, wobei dies jedoch auch zur Inhibition der Translation führen kann (z.B. Moll *et al.*, 2003), konnte keine Interaktion mit der CAT mRNA festgestellt werden. Eventuell verfügt die CAT mRNA nicht über das für eine Interaktion erforderliche Bindungsmotiv einer A/U-reichen Regionen vor oder nach einer Stamm-Schleife Struktur (Brescia *et al.*, 2003). Auch sollte Hfq bereits in den Extrakten enthalten sein, was erklären könnte, warum eine Konzentrationserhöhung, ähnlich wie bei S1, kaum noch Effekte auf die Proteinsynthese hat. Die leichte Inhibition, die von Hfq in höheren Konzentrationen verursacht wurde, könnte, wie bei NCp7(1-55) auch, an seiner Interaktion mit der tRNA liegen (Lee and Feig, 2008), die für den Aktivitätstest ausgenutzt wurde. Es

wäre jedoch auch möglich, dass doch eine transiente Interaktion mit der CAT mRNA stattfindet, die die Ausbeute der Proteinsynthese mindert und im EMSA nicht detektiert werden konnte.

Die beiden RNA Helikasen *Mss116p* aus *Saccharomyces cerevisiae* und der humane eIF-4A störten beide die Synthese der CAT in etwa gleich stark (Minderung der Ausbeute um ca. 15% in einer Konzentration von 4 μ M). Da beide Proteine sehr unterschiedliche ATP Hydrolyseraten aufweisen, wobei bei gleicher Temperatur (30° C) der eIF-4A etwa 20-30 mal weniger ATP hydrolysiert als *Mss116p* (vgl. Halls *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2002), kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auf einen zusätzlichen ATP Verbrauch im CFPS System zurückzuführen sind. *Mss116p* ermöglicht die Translation einiger mRNAs bei tiefen Temperaturen durch das Auflösen von Sekundärstrukturen in der 5' UTR (Huang *et al.*, 2005) und zeigte auch im EMSA mit der CAT mRNA eine klare Interaktion, bereits in niedrigen Konzentrationen. Wie dieses Protein nun die Synthese der CAT stört, ist ohne weitere Experimente kaum zu bestimmen, wobei die Interaktion mit der mRNA, aber auch z.B. das Entwinden von tRNAs denkbar wären. Der eIF-4A, der RNA Sekundärstrukturen anhand der Stabilität erkennt und entwindet (Rogers *et al.*, 2001), zeigte im EMSA keine Interaktion mit der CAT mRNA, was einen Hinweis darauf geben könnte, dass eventuell vorhandene, doppelsträngige Bereiche der mRNA wahrscheinlich nicht die für die Aktivität von eIF-4A benötigte Stabilität aufweisen. Auch hier kann der inhibitorische Effekt nur durch Interaktion mit z.B. tRNAs erklärt werden, was die Reaktion stören könnte.

Über die Verwendung von RNA Chaperonen in CFPS Systemen existieren bis heute sehr wenige Daten, so dass an dieser Stelle kaum Vergleiche gemacht werden können. Hofweber *et al.* (2005) konnte zeigen, dass Kälteschockproteine, eine weitere Klasse von RNA Chaperonen, die Synthese der CAT in *E. coli* CFPS Systemen ebenfalls inhibieren. Auch Shimizu *et al.* (2005) berichtet, dass RNA Helikasen, wie z.B. SrmB aus *E. coli*, keinen positiven Effekt auf die Proteinsynthese im PURE System hatten. Diese Ergebnisse, zusammen mit den in dieser Arbeit präsentierten, zeigen deutlich, dass zusätzliche RNA Chaperone in CFPS Reaktionen die Ausbeute an synthetisiertem Protein wahrscheinlich nicht steigern können, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass einige Vertreter, die bis heute noch nicht getestet wurden, doch diese Fähigkeit besitzen.

Die Experimente mit den RNA Chaperonen könnten auch darauf hindeuten, dass die Sekundärstrukturbildung der mRNA in CFPS Systemen ein viel kleineres Problem darstellt, als bisher angenommen. Die weiteren Versuche deuten jedoch darauf hin, dass die erzielten

Proteinausbeuten, wenigstens im *E. coli* System, doch von einer Sekundärstrukturbildung der mRNA beeinflusst werden.

Die Versuche, in denen CFPS Reaktionen unter Verwendung eines starken *E. coli* (*tac*) Promotors durchgeführt wurden, sollten die Kopplung von Transkription und Translation wiederherstellen und dadurch eine Sekundärstrukturbildung der mRNA verhindern. Neuere Studien deuten darauf hin, dass durch die Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase diese Kopplung tatsächlich erreicht wird, da ein Protein, das NusG, das für die Aktivität der RNA Polymerase mitverantwortlich ist, eine Verbindung zwischen der RNA Polymerase und den Ribosomen herstellt (Burmann *et al.*, 2010). Somit könnte nur eine Transkription stattfinden, wenn gleichzeitig auch Ribosomen an die neu synthetisierte mRNA rekrutiert werden. Ob dieser Mechanismus auch im zellfreien System derart abläuft, kann hier leider nicht geklärt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Verwendung eines *E. coli* Promotors die Ausbeute der Synthese der CAT in unserem selbst hergestellten System um durchschnittlich 12% gesteigert werden konnte. Auffällig bei diesen Experimenten war, dass die Konzentration der template DNA drastisch von 1 µg auf 6 µg/30 µl erhöht werden musste, um die optimale Ausbeute an synthetisiertem Protein zu erhalten. Die normalerweise verwendete T7 RNA Polymerase ist in etwa 6-7mal schneller als die *E. coli* RNA Polymerase (McAllister, 1997), so dass eventuell mehr DNA template benötigt wurde, um das System mit mRNA zu sättigen. Ob die hier erreichte Steigerung der CAT Synthese durch Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase nun den Einfluss wiederspiegelt, den die Sekundärstrukturbildung der mRNA auf die Proteinsynthese hat, kann hier nicht beantwortet werden, da zu viele andere Einflussfaktoren in CFPS Reaktionen eine Rolle spielen. Auch wurde das hier verwendete System auf den Einsatz der T7 RNA Polymerase hin optimiert, so dass es durchaus möglich ist, dass noch größere Steigerungen bei der Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase erreicht werden können. Solch eine Optimierung ist jedoch ein langwieriger Prozess und konnte aufgrund der zeitlichen Begrenztheit dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Eine Studie, die erst nach Beendigung dieser Experimente publiziert wurde, zeigt, dass auch andere Arbeitsgruppen sehr hohe Proteinausbeuten unter Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase erreichen konnten, was die hier präsentierten Ergebnisse weiter bestätigt. Leider wurde hier kein Vergleich der Proteinexpression mit dem T7 Promotor durchgeführt, so dass nicht geklärt ist, ob hier durch die *E. coli* RNA Polymerase bessere Ergebnisse erzielt wurden (Shin and Noireaux, 2010). Die Tatsache, dass die positiven Effekte der *E. coli* RNA Polymerase nicht auf das S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) übertragbar waren, könnte an den deutlich geringeren Proteinkonzentrationen liegen, mit

denen hier im Vergleich zu unserem, stark konzentrierten System, gearbeitet wird. Dieser Unterschied war deutlich auf SDS-Gelen an der Bandenstärke der Proteine erkennbar, die aus den verschiedenen Extrakten stammten. Eventuell enthält das S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) zu wenig der *E. coli* RNA Polymerase, um eine Sättigung des Systems mit mRNA zu erreichen. In der oben erwähnten Studie (Shin and Noireaux, 2010) wird zwar mit ähnlich niedrig konzentrierten S30 Extrakten gearbeitet, jedoch wurde dieses System auf die Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase hin optimiert, so dass es nicht unbedingt mit dem für die T7 RNA Polymerase optimierten S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) vergleichbar ist. Was an dem Promega-System jedoch, anhand der Expression der PDZ2-Domäne, gezeigt werden konnte, dass die Expression eines schlecht synthetisierbaren Proteins durch die Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase nicht verbessert werden kann. Während in diesem System die CAT unter Einfluss des *tac* Promotors nur geringfügig schlechter exprimierte als unter dem T7 Promotor, war bei der PDZ2-Domäne eine sehr starke Abnahme der synthetisierten Menge an Protein zu beobachten. Falls durch die Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase tatsächlich die Kopplung zwischen Transkription und Translation wiederhergestellt wird, kann man auf jeden Fall ausschließen, dass die niedrige Expressionsrate wenigstens der PDZ2-Domäne auf eine Sekundärstrukturbildung der mRNA zurückzuführen ist. Warum nun die Expression der zellfrei schlecht synthetisierbaren PDZ2-Domäne anders auf die Verwendung des *tac* Promotors reagiert, als die CAT, kann hier nicht beantwortet werden. Vielleicht sind im Falle der PDZ2-Domäne höhere Konzentrationen der mRNA erforderlich, als bei der Expression der gut synthetisierbaren CAT, so dass sich niedrigere Konzentrationen, verursacht durch die *E. coli* RNA Polymerase, hier stärker auswirken. Eine weitere Möglichkeit, die jedoch ebenfalls in Betracht gezogen werden muss, ist, dass Unterschiede in der Expression der Proteine gar nicht mit der Kopplung bzw. Entkopplung von Transkription und Translation in Verbindung stehen, sondern daher kommen, dass der pK7 bzw. der pET-20b(+) und der pTAC unterschiedliche 5' UTRs aufweisen, die zu verschiedenen Expressionsraten der Proteine führen. Auf jeden Fall ist nun, zusammen mit der Arbeit von Shin und Noireaux (2010), bewiesen, dass unter Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase ähnliche Proteinausbeuten erzielt werden können, wie mit viralen RNA Polymerasen.

Die letzte Versuchsreihe, die zum Thema der Sekundärstrukturbildung der mRNA in *E. coli* CFPS Systemen durchgeführt wurde, war die Verwendung einer miRNA, durch die eine eventuell vorhandene Stamm-Schleife Struktur in der 5' UTR der mRNA aufgelöst, und dadurch die Ausbeute an synthetisiertem Protein erhöht werden sollte. Diese Versuche zeigten

deutlich, dass sowohl die Synthese der CAT, als auch der DHFR durch die Verwendung dieser miRNA in der richtigen Konzentration, die nach dem Vorbild der GlmZ ncRNA designt wurde (Urban and Vogel, 2008), gesteigert werden konnte. Die erreichten Erhöhungen der Proteinsyntheseleistung bewegten sich dabei in einem Rahmen von 5-15%, abhängig von der Dauer der Expression und des synthetisierten Proteins. Dabei war es egal, ob die Versuche mit dem selbst hergestellten *E. coli* CFPS System, oder mit dem S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse lassen die Annahme eines universellen Mechanismus, der eventuell doch einen Einfluss der Sekundärstrukturbildung der mRNA vermuten lässt, zu, zumindest wenn die identischen 5' UTRs des pK7 oder des pET-20b(+) verwendet werden. Die Versuche zeigten jedoch auch, dass die Verwendung der miRNA die Expression eines Proteins, das sich nicht zellfrei exprimieren lässt (AI-BP), nicht induzieren kann, so dass hier andere Mechanismen zugrundeliegen müssen. Auch stellte sich der erhoffte Effekt, dass die Expression eines schlecht synthetisierbaren Proteins (PDZ2-Domäne) durch die miRNA in einem höheren Ausmaß gesteigert wird, als bei den ohnehin schon gut synthetisierbaren Proteinen CAT und DHFR, nicht ein. Tatsächlich konnte hier nicht einmal bestimmt werden, ob überhaupt eine Expressionssteigerung stattfand, da die PDZ2-Domäne per Western Blot detektiert werden musste. Die Tatsache, dass die miRNA im PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (New England Biolabs) keinen Effekt auf die Synthese der CAT oder der PDZ2-Domäne hatte, könnte dafür sprechen, dass für die Hybridisierung der miRNA mit der 5' UTR der mRNA die Hilfe von Proteinen benötigt wird. Hier wäre das Protein Hfq ein möglicher Kandidat, der die Interaktion zwischen der mRNA und der miRNA vermitteln könnte. Hfq vermittelt auch *in vivo* derartige Interaktionen (z.B. Urban and Vogel, 2008; mehrere Beispiele zusammengefasst in Mikulecky *et al.*, 2004), was durch seine zwei Bindestellen für RNAs, wobei eine davon spezifisch für mRNAs zu sein scheint (Vecerek *et al.*, 2008), ermöglicht wird. Hfq sollte in den S30 Extrakten bereits enthalten sein, nicht aber im PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (New England Biolabs), was den beobachteten Effekt erklären könnte. Es könnte jedoch auch sein, dass die miRNA im PURE System einfach in der falschen Konzentration eingesetzt wurde, da man hier mit weniger template DNA arbeitete, was eventuell zu veränderten Konzentrationen der mRNA führt. Die Konzentration der miRNA müsste dann wahrscheinlich angepasst werden. Hier sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um eine klare Aussage treffen zu können. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die miRNA in Anwesenheit von S30 Extrakten relativ stabil ist und über 2 h bei 37° C nachgewiesen werden kann. Die miRNA sollte eigentlich beim Nachweis durch

quantitative real-time PCR exakt quantifiziert werden, um den Abbau über die Zeit genau verfolgen zu können, was jedoch aufgrund der vielen unspezifisch amplifizierten DNA Fragmente während der PCR nicht möglich war. Leider existieren keine Studien, mit denen die Ergebnisse der Verwendung einer miRNA in einem CFPS System verglichen werden könnte, so dass nur weitere Experimente zu diesem Thema Klarheit darüber schaffen können, ob eventuell eine Optimierung der Sequenz der miRNA den positiven Einfluss auf die Proteinsynthese, der hier zweifelfrei nachgewiesen wurde, noch verstärken kann. Auch wäre es sehr interessant, ob bei der Verwendung anderer Plasmide mit anderen 5' UTRs und einer entsprechend angepassten miRNA ähnliche Effekte zu beobachten wären.

Fasst man alle Experimente, die zur Bestimmung des Einflusses der Sekundärstrukturbildung der mRNA durchgeführt wurden, zusammen, so ergibt sich ein zwiespältiges Bild darüber, ob dieser Effekt nun wirklich die Ausbeute von CFPS Systemen limitiert, wie von vielen Autoren angenommen (z.B. Spirin and Swartz, 2008; Underwood *et al.*, 2005). Zum einen konnte mit keinem der bisher getesteten RNA Chaperone (diese Arbeit; Hofweber *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2005) eine Steigerung der Proteinsynthese erreicht werden. Die Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase (diese Arbeit; Shin and Noireaux, 2010) lieferte zwar gute Proteinausbeuten, jedoch sind die beobachteten Verbesserungen zu gering, als das hier wirklich von einer Limitation gesprochen werden kann. Hier stellt sich natürlich auch wieder die Frage, ob durch die *E. coli* RNA Polymerase wirklich eine Kopplung von Transkription und Translation erreicht wird, oder ob die Ribosomenkonzentrationen im CFPS System (Underwood *et al.*, 2005) zu gering sind, um die neu synthetisierten mRNAs sofort mit Ribosomen zu besetzen und eine Sekundärstrukturbildung zu verhindern. Die Experimente mit der miRNA dagegen sprechen für einen Einfluss der Sekundärstrukturbildung der mRNA, obwohl die erzielten Steigerungen ebenfalls zu gering sind, um wirklich von einer Limitation zu sprechen. Auffällig ist, dass die erzielten Steigerungen der CAT Synthese in unserem selbst hergestellten CFPS System durch die *E. coli* RNA Polymerase und durch die miRNA mit durchschnittlich 12% bzw. 13% sehr ähnlich sind. Eventuell spiegeln diese Ergebnisse den tatsächlichen Einfluss der Sekundärstrukturbildung der mRNA im *E. coli* CFPS System wieder, worüber jedoch nur weitere Versuche Klarheit schaffen können. Eine neuere Studie, in der die zellfreie Expression von über 3000 humanen Proteinen miteinander verglichen wurde, konnte 18 strukturelle und biochemische Eigenschaften des synthetisierten Proteins selbst identifizieren, die Einfluss auf die Ausbeute nehmen (Kurotani *et al.*, 2010). Aus diesem Grund bleibt

abzuwarten, inwieweit sich die Sekundärstrukturbildung der mRNA tatsächlich auf die zellfreie Expression von Proteinen auswirkt.

5.5 CFPS bei niedrigeren Temperaturen

Die Durchführung von CFPS Reaktionen bei tieferen Temperaturen kann viele Vorteile mit sich bringen. Zum einen sollten Vorgänge, die die CFPS limitieren, wie z.B. die unspezifische Hydrolyse von ATP (Kim and Swartz, 2001) oder die Proteolyse von Translationsfaktoren (Schindler *et al.*, 1999) bei tieferen Temperaturen reduziert sein, was eventuell die Ausbeute an synthetisiertem Protein erhöhen könnte. Zum anderen wirken sich tiefere Expressionstemperaturen häufig positiv auf die Faltung von Proteinen aus. Da eine einfache Erniedrigung der Temperatur in CFPS Reaktionen immer auch eine Minderung der Ausbeute an synthetisierter CAT (Temperaturoptimum bei 37° C) mit sich brachte, verwendete man die 5' UTR des *cspA*-Genes, um eine effektive Initiation der Translation bei niedrigeren Temperaturen zu erreichen. Die Verwendung dieser 5' UTR stellte sich bei Temperaturen von 25°-30° C als sehr vorteilhaft heraus. Sowohl die Synthese der CAT, als auch der DHFR und des CspA selbst konnten dadurch gesteigert werden. Auffällig war hierbei, dass sich beim Einsatz der 5' UTR des *cspA*-Genes die optimale Expressionstemperatur aller dieser Proteine, die normalerweise, trotz der identischen 5' UTRs des pK7 und des pET-20b(+), sehr unterschiedlich war (CAT: 37° C; DHFR: 20-30° C; CspA: 25° C), hin zu 25°-30° C verschoben hat. Es liegt also die Vermutung nahe, dass hier ein allgemeiner Mechanismus zugrunde liegt, der das Temperaturoptimum der Translation bei der 5' UTR des *cspA*-Genes auf diese Temperatur festsetzt. In der neuesten Studie von Giuliodori *et al.* (2010) ist beschrieben, dass die *cspA* mRNA bei 37° C eine Sekundärstruktur annimmt, die die Initiation der Translation inhibiert. Bei 10°-20° C nimmt sie dagegen eine Struktur an, die die Initiation der Translation ermöglichen soll (siehe auch 1.1.5). Auf den ersten Blick scheinen die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse nicht mit denen von Giuliodori *et al.* (2010) vereinbar. Es sind jedoch einige Dinge zu beachten, die die optimale Expressionstemperatur von 25°-30° C im zellfreien System erklären und in Einklang mit den Ergebnissen von Giuliodori bringen. Zum einen kann auch die Sekundärstruktur, die die *cspA* mRNA bei 37° C annimmt, durchaus noch translatiert werden. Findet die Translation im zellfreien System bei 15° C statt, werden ausgehend von der 37° C Struktur lediglich ~40% weniger CspA synthetisiert, als ausgehend von der 15° C Struktur. Derartige Experimente sind möglich, da die Sekundärstruktur, die die *cspA* mRNA bei 37° C annimmt, nicht in die Sekundärstruktur

umwandelbar ist, die die *cspA* mRNA bei 15° C annimmt. Auch wird gezeigt, dass die *cspA* mRNA nicht nur in den zwei verschiedenen Sekundärstrukturen bei 15° und 37° C vorkommt, sondern dass es sich dabei vielmehr um zwei Extreme handelt und bei Temperaturen dazwischen auch Mischformen dieser Sekundärstrukturen entstehen, also quasi ein fließender Übergang erfolgt (Giuliodori *et al.*, 2010). Zum anderen muss die Aktivität der T7 RNA Polymerase betrachtet werden. Setzt man die Aktivität dieses Enzyms bei 37° C 100%, so zeigt es bei 30°, 25°, 20° und 15° C nur noch etwa 87, 45, 22 bzw. 10% seiner Aktivität (Chamberlin and Ring, 1973). Betrachtet man die erhaltenen Ergebnisse von csCAT, csDHFR und csCspA vor diesem Hintergrund, werden diese erklärbar. Mit sinkender Expressionstemperatur während der CFPS Reaktion nimmt zwar die Menge an mRNA ab, jedoch die Translatierbarkeit dieser mRNAs zu. Bei 25°-30° C ist vermutlich das Optimum aus Menge und Translatierbarkeit der mRNAs erreicht. Bei höheren Temperaturen ist zwar die mRNA in ausreichenden Mengen vorhanden, jedoch ist diese aufgrund der Sekundärstruktur der 5‘ UTR der *cspA* mRNA nicht effizient translatierbar. Bei niedrigeren Temperaturen nimmt zwar die 5‘ UTR der mRNA immer besser translatierbare Sekundärstrukturen an, jedoch limitieren hier die niedrigen Konzentrationen der mRNA die Proteinsynthese. Diese Hypothese wäre leicht nachprüfbar, indem man z.B. die niedrige Aktivität der T7 RNA Polymerase bei niedrigen Temperaturen durch höhere Konzentrationen dieses Enzyms kompensiert und die Auswirkungen auf die Proteinsynthese analysiert, jedoch konnten diese Experimente aufgrund der zeitlichen Begrenztheit dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Bei diesem Experiment wäre es auch durchaus denkbar, dass noch größere Steigerungen der Proteinsynthese möglich wären, als ohnehin schon erreicht wurden (~20% im Falle der CAT).

Die Tatsache, dass der Austausch der 5‘ UTR des pET-20b(+) durch die des *cspA*-Genes bei der PDZ2-Domäne zu kaum einem Unterschied in der Synthese und beim hRluc sogar zu einer derart starken Reduktion der Expression geführt hat, dass das Protein auf einem SDS-Gel nicht mehr detektierbar war, kann hier nicht erklärt werden. Diese Beobachtung stärkt jedoch die Aussage von Voges *et al.* (2004), nämlich dass eine optimierte 5‘ UTR, aufgrund der Basenpaarungen mit der codierenden Region, niemals die Expression aller proteincodierender Sequenzen steigern kann. Im Falle der 5‘ UTR des *cspA*-Genes war es möglich, die Expression von drei der fünf getesteten Proteine zu steigern.

5.6 Ausblick

Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein *E. coli* CFPS System optimiert, um die Ausbeute an synthetisiertem Protein zu erhöhen. Bei dieser Arbeit konnte die Aussage vieler Autoren bestätigt werden, dass die Herstellung der S30 Extrakte einen großen Einfluss auf die spätere Syntheseleistung des Systems hat. Trotz der Wichtigkeit der Herstellung der Extrakte, existieren nur sehr wenige Studien darüber, welcher Schritt bei der Präparation der Extrakte wichtig und für die spätere Aktivität kritisch ist, und welcher nicht. Auch existieren sehr viele verschiedene Methoden, die einzelnen Schritte der Herstellung der Extrakte durchzuführen. Eine große Studie wäre zukünftig von Nöten, in der jede Methode bei jedem Schritt genau analysiert und die Auswirkungen auf die Proteinsynthese bestimmt wird. Dadurch wäre es möglich, bei jedem Schritt die „beste“ Methode anzuwenden, wodurch sicherlich noch Steigerungen der Syntheseleistung dieser Systeme erreicht werden könnten. Ähnlich sollte auch bei den eigentlichen Reaktionsansätzen vorgegangen werden, um z.B. die optimalen Konzentrationen aller zugesetzten Faktoren zu ermitteln oder das effizienteste Energieregenerationssystem zu identifizieren. Solche Studien sind aber bis heute kaum zu finden, da sie extrem zeitaufwendig und arbeitsintensiv sind. Dennoch würden sie zu einer Vereinheitlichung der CFPS mit *E. coli* Systemen führen, was sehr von Vorteil wäre, da oft Verbesserungen, die in einem System erzielt wurden nicht auf ein anderes übertragbar sind.

Die Kopplung des hier vorgestellten *E. coli* CFPS Systems an die NASBA-Reaktion, was essenziell für die Weiterentwicklung des neuartigen, kontinuierlichen *in vitro* Evolutionssystem ist, war leider nicht erfolgreich. Auch deuten die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass diese Kopplung nicht ohne erheblichen Aufwand zu erreichen ist, da einfach zu viele verschiedene Proteine in den S30 Extrakten die NASBA-Reaktion stören. Aus diesem Grund wird wohl ein Ausweichen auf das PURE System nicht zu vermeiden sein, auch wenn dieses, verglichen mit S30 Extrakten, deutliche Nachteile wie erhöhte Kosten und niedrigere Produktivität mit sich bringt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Translationsmaschinerie in den *E. coli* S30 Extrakten optimal rekonstituiert zu sein scheint. Weitere Versuche, in denen z.B. jede Aminoacyl-tRNA Synthetase einzeln auf ihren Einfluss auf die Proteinsynthese getestet wird, scheinen nicht sehr vielversprechend zu sein, da der Translationsapparat in *E. coli* vermutlich ein zusammenhängendes System ist, was u.a. in dieser Arbeit auch gezeigt wurde. Daher sollten alle Faktoren optimal konzentriert sein. Viel mehr Erfolgsaussichten hätten Studien, bei denen versucht wird, höhere Ribosomenkonzentrationen in den Reaktionsansätzen

einsetzen zu können, ohne dass diese inhibitorisch wirken. *In vivo* sind die Ribosomen viel höher konzentriert als im zellfreien System und die Identifikation von Faktoren, die beispielsweise die Ribosomen *in vivo* auf Abstand halten, so dass sie sich nicht gegenseitig stören, wäre vermutlich auch für die Produktivität der CFPS sehr von Vorteil. Eventuell könnte hier das prokaryotische Zytoskelett eine Rolle spielen, welches dem Zytoplasma der Bakterien Form und Struktur verleiht. Dieses wird wahrscheinlich während der Herstellung der S30 Extrakte zerstört, was den inhibitorischen Effekt hoher Ribosomenkonzentrationen in *E. coli* CFPS Systemen erklären könnte.

Die Experimente, die im Zusammenhang mit der Sekundärstrukturbildung der mRNA im *E. coli* CFPS System durchgeführt wurden, konnten zwar zeigen, dass gleichwertige Proteinausbeuten bei Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase anstatt der T7 RNA Polymerase erzielt werden können, jedoch nicht eindeutig klären, wie stark sich die mRNA Sekundärstrukturbildung tatsächlich auf die Syntheseleistung der CFPS auswirkt. Der Test von weiteren RNA Chaperonen auf ihren Einfluss auf die CFPS scheint nicht sehr vielversprechend, da nun alle verschiedenen Klassen bereits getestet wurden und keines der Proteine einen positiven Einfluss auf die Syntheseleistung hatte. Weiteres Arbeiten mit miRNAs in CFPS Systemen hätte wahrscheinlich die größten Erfolgsaussichten. Eine Optimierung der Sequenz der miRNA könnte weitere Hinweise darauf geben, wie stark sich die Sekundärstrukturbildung der mRNA tatsächlich auf die Produktivität von CFPS Systemen auswirkt. Zusätzlich müsste auch überprüft werden, ob sich die hier beobachteten Effekte der miRNA auch bei Verwendung anderer Plasmide mit unterschiedlichen 5' UTRs übertragen lassen, wenn die Sequenz der miRNA entsprechend angepasst wird. Falls diese Übertragbarkeit gegeben wäre und mit optimierten miRNAs noch größere Steigerungen der Proteinausbeute erreicht werden könnten, wäre es zukünftig durchaus denkbar, dass Plasmide für die CFPS für ihre entsprechende miRNA codieren und somit ein separates Zugeben überflüssig machen. Weiter sollte ebenfalls noch geklärt werden, ob die Hybridisierung der miRNA mit der mRNA tatsächlich proteinabhängig ist. Dies könnte den Einsatz von miRNAs sowohl im PURE System und eventuell sogar in eukaryotischen CFPS Systemen erlauben.

Die größten Steigerungen der Produktivität in *E. coli* CFPS Systemen konnten in dieser Arbeit, neben der Optimierung des Systems an sich, durch die Verwendung der 5' UTR des *cspA*-Gens erreicht werden. Wie bereits erwähnt sind hier jedoch noch weitere Versuche nötig, um bestimmen zu können, wie weit die Syntheseleistung bei Verwendung dieser 5' UTR noch gesteigert werden kann. Zuerst müssten die Versuche mit höheren Konzentrationen

der T7 RNA Polymerase wiederholt werden, um die niedrigere Aktivität dieses Enzyms bei tieferen Temperaturen zu kompensieren. Dies könnte zu einer weiteren Verschiebung der optimalen Temperatur hin zu noch niedrigeren führen. Nach der Optimierung der Konzentration der T7 RNA Polymerase, sowie der Bestimmung der optimalen Temperatur wäre das Ausmaß der möglichen Steigerungen der Syntheseleistung durch die Verwendung der 5' UTR des *cspA*-Gens bekannt. Anschließend müsste noch die Expression vieler weiterer Proteine aus unterschiedlichen Organismen mit repräsentativen Eigenschaften, sowohl mit der normalen 5' UTR des entsprechenden Plasmids, als auch mit der 5' UTR des *cspA*-Gens, verglichen werden, um bestimmen zu können, ob es sich hier tatsächlich um einen allgemeinen Mechanismus handelt. Die in dieser Arbeit bestimmten 60% der Proteine, bei denen die 5' UTR des *cspA*-Gens einen positiven Effekt auf die Expression hatte, ist nicht repräsentativ, da lediglich fünf Proteine getestet wurden.

6. Zusammenfassung

Die zellfreie Proteinsynthese hat sich in den letzten Jahren zu einer wichtigen Methode der Proteinexpression entwickelt die, durch die Offenheit des Systems und der Möglichkeit, PCR Produkte als template DNA einzusetzen, viele Vorteile gegenüber der *in vivo* Expression von Proteinen bietet. Auch viele moderne Methoden, wie beispielsweise der Einsatz von Protein Microarrays oder die *in vitro* Evolution, wurden durch die zellfreie Proteinsynthese erst möglich. Ein Grund, warum die zellfreie Proteinsynthese die *in vivo* Expression noch nicht als Standardmethode zur Herstellung rekombinanter Proteine abgelöst hat, ist in der vergleichsweise geringen Produktivität dieser Systeme zu finden. Intensive Bemühungen der letzten Jahre konnten zwar die Ausbeuten der zellfreien Proteinsynthese stark erhöhen, dennoch sind die erzielten Mengen noch weit von dem entfernt, was theoretisch möglich sein sollte. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Ansätze verfolgt, die Ausbeute der zellfreien Proteinsynthese, am Beispiel eines Systems, das auf S30 Extrakte von *Escherichia coli* basiert, zu erhöhen. Darüber hinaus sollte dieses System als Teil eines von der GENEART AG entwickelten *in vitro* Evolutionssystems eingesetzt werden.

Als erstes wurde ein am Lehrstuhl bereits existierendes Protokoll zur Herstellung der S30 Extrakte und zur Durchführung von zellfreien Proteinsynthesereaktionen optimiert, um ein solides und modernes Testsystem für weitere Versuche zur Verfügung zu haben. Dabei konnten sowohl die Methode des Zellaufschlusses durch Sonifikation, als auch die Abhängigkeit der optimalen Proteinkonzentration während der eigentlichen Synthesereaktion von der Präinkubationsmethode als kritische Einflussfaktoren der Syntheseleistung identifiziert werden. Auch zeigte sich die Verwendung eines RNase E-defizienten *E. coli* Stammes für die Herstellung der Extrakte, sowie die Erhöhung der Konzentration des Reduktionsmittels Dithiothreitol in der eigentlichen Reaktion als förderlich für die erzielten Proteinausbeuten. Zusammengenommen führten die Änderungen zu der Etablierung eines Systems, das im Batch-Verfahren in einer Stunde etwa 450 µg/ml eines Testproteins synthetisierte, wobei bei längeren Inkubationszeiten auch Mengen von über 600 µg/ml erreicht wurden. Damit konnte die Syntheseleistung des Systems, verglichen mit dem ursprünglichen, mehr als verdoppelt werden. Die Produktivität des optimierten zellfreien Proteinsynthesesystems ist nun sowohl mit den Systemen anderer Autoren, als auch mit kommerziell erhältlichen vergleichbar.

Das optimierte zellfreie Proteinsynthesesystem sollte als Teil eines *in vitro* Evolutionssystems eingesetzt werden, wobei unter Anwesenheit der S30 Extrakte die Produktbildung einer reversen Transkriptase, die essentiell für eine Amplifikationsreaktion dieses Systems war, inhibiert wurde. Intensive Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass zu viele Proteine in den S30 Extrakten, wie beispielsweise RNasen und DNA Polymerasen, dafür verantwortlich waren. Der Einsatz isolierter Ribosomen unterschiedlicher Reinheit war ebenfalls nicht möglich, da Translationsaktivität und Produktbildung der reversen Transkriptase nicht vereinbar schienen. Auch die Verwendung einer anderen reversen Transkriptase, die unter Anwesenheit von S30 Extrakten aktiv sein sollte, war nicht realisierbar, da sie nicht exprimiert werden konnte.

Im Zusammenhang der Steigerung der Syntheseleistung des zellfreien Proteinsynthesesystems konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Translationsmaschinerie in den S30 Extrakten optimal rekonstituiert zu sein scheint. Dazu testete man alle Faktoren des Translationsapparates einzeln auf ihren Einfluss auf die Produktivität von zellfreien Proteinsynthesereaktionen. Lediglich die Aminoacyl-tRNA Synthetasen waren dabei als Mischung aller 20 Enzyme kommerziell erhältlich. Translationsaktive Ribosomen mussten erst isoliert und die Initiationsfaktoren, Elongationsfaktoren, Freisetzungsfaktoren, der Ribosomenrecycling-Faktor, sowie die Methionyl-tRNA Formyltransferase mussten erst kloniert, exprimiert, aufgereinigt und auf Aktivität getestet werden. Auf die Produktivität der zellfreien Proteinsynthese wirkten sich jedoch nur die Elongationsfaktoren Tu und Ts positiv aus, wobei die Erhöhung der Syntheseleistung mit 13% bzw. 6% jedoch zu gering ausfiel, um von limitierenden Faktoren zu sprechen. Darüber hinaus wurden auch zellfreie Proteinsynthesereaktionen mit geringeren Konzentrationen an Translationsfaktoren durchgeführt, da viele der zuvor getesteten Bestandteile des Translationsapparates die Synthese des Testproteins inhibierten. Jedoch konnte auch hier keine Steigerung der Syntheseleistung erzielt werden, was, zusammen mit den vorigen Ergebnissen, die oben genannte Aussage der optimalen Rekonstitution der Translationsmaschinerie in S30 Extrakten von *Escherichia coli* zulässt. Darüber hinaus wurden durch die Experimente für eine schon länger bestehende Vermutung eindeutige Hinweise geliefert, nämlich dass der Translationsapparat als Einheit und nicht als Summe vieler einzelner Faktoren gesehen werden muss.

Desweiteren behandelte diese Arbeit das Problem der Sekundärstrukturbildung der mRNA, das viele Autoren als Grund für eine limitierte Proteinausbeute sehen. Durch den Einsatz der

verschiedensten RNA Chaperone der unterschiedlichsten Klassen wurde versucht, auf die Translation inhibitorisch wirkende Sekundärstrukturen der mRNAs aufzulösen und diese Limitation zu überwinden. Dazu klonierte, exprimierte und reinigte man acht verschiedene RNA Chaperone und bestätigte ihre biologische Aktivität. Ihr Einsatz in zellfreien Proteinsynthesereaktionen führte jedoch nicht zu einer Steigerung der Syntheseleistung und stellte den Einsatz von RNA Chaperonen in zellfreien Systemen in Frage. Durch die Verwendung der *E. coli* RNA Polymerase, statt der üblicherweise eingesetzten T7 RNA Polymerase, was die Sekundärstrukturbildung der mRNA durch die Wiederherstellung der Kopplung von Transkription und Translation verhindern sollte, konnte die Syntheseleistung des Systems um etwa 12% gesteigert werden, obwohl dieser Effekt nicht auf ähnliche, kommerziell erhältliche Systeme übertragen werden konnte. Auch die erstmalige Verwendung einer miRNA in einem zellfreien System, die durch Hybridisierung mit der 5' untranslatierten Region der mRNA regulatorische Sequenzen freilegen sollte, führte zu einer etwa 13%igen Steigerung der Syntheseleistung. Somit lieferte diese Arbeit eindeutige Hinweise auf eine Limitierung der Proteinausbeute durch Sekundärstrukturbildung der mRNA, die zuvor nur vermutet wurde.

Die größten Steigerungen der Syntheseleistung des zellfreien Systems aus *E. coli* erreichte man in dieser Arbeit durch die Erniedrigung der Reaktionstemperatur, wodurch unerwünschte Nebenreaktionen reduziert werden sollten. Dabei war der Einsatz der 5' untranslatierten Region eines Kälteschockgenes nötig, um bei niedrigeren Temperaturen eine effiziente Proteinsynthese zu gewährleisten. Die Auswirkungen dieser 5' untranslatierten Region auf die zellfreie Expression mehrerer Proteine wurde getestet, wobei bei 60% sowohl eine erhöhte Ausbeute, beispielsweise 20% im Falle der Chloramphenicol Acetyltransferase, als auch eine einheitliche optimale Expressionstemperatur von 25°-30° C festgestellt werden konnte.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit mehrere vielversprechende Ansätze identifiziert werden, die Syntheseleistung von zellfreien Proteinsynthesesystemen aus *E. coli* zu verbessern, sowie viele Hinweise zum besseren Verständnis dieser Methode geliefert werden.

7. Literaturverzeichnis

- Agrawal RK, Penczek P, Grassucci RA, Frank J. (1998)** Visualization of elongation factor G on the Escherichia coli 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6134-8.
- Agirrezabala X and Frank J. (2009)** Elongation in translation as a dynamic interaction among the ribosome, tRNA, and elongation factors EF-G and EF-Tu. *Q Rev Biophys* **42**, 159-200.
- Ahn JH, Choi CY, Kim DM. (2005)** Effect of energy source on the efficiency of translational termination during cell-free protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 325-9.
- Ahn JH, Hwang MY, Lee KH, Choi CY, Kim DM. (2007)** Use of signal sequences as an in situ removable sequence element to stimulate protein synthesis in cell-free extracts. *Nucleic Acids Res* **35**, e21.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2010)** Essential cell biology, third edition. *Garland Science, Taylor & Francis Group*, New York, USA.
- Allen G S, Zavialov A, Gursky R, Ehrenberg M, Frank J. (2005)** The cryo-EM structure of a translation initiation complex from Escherichia coli. *Cell* **121**, 703-12.
- Arezi B and Hogrefe HH. (2007)** Escherichia coli DNA polymerase III epsilon subunit increases Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase fidelity and accuracy of RT-PCR procedures. *Anal Biochem* **360**, 84-91.
- Arnold TE, Yu J, Belasco JG. (1998)** mRNA stabilization by the ompA 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation. *RNA* **4**, 319-30.
- Brescia CC, Mikulecky PJ, Feig AL, Sledjeski DD. (2003)** Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* **9**, 33-43.
- Burmann BM, Schweimer K, Luo X, Wahl MC, Stitt BL, Gottesman ME, Rösch P. (2010)** A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science* **328**, 501-4.
- Caillet J, Nogueira T, Masquida B, Winter F, Graffe M, Dock-Brégeon AC, Torres-Larios A, Sankaranarayanan R, Westhof E, Ehresmann B, Ehresmann C, Romby P, Springer M. (2003)** The modular structure of Escherichia coli threonyl-tRNA synthetase as both an enzyme and a regulator of gene expression. *Mol Microbiol* **47**, 961-74.
- Calhoun KA and Swartz JR. (2005)** Energizing cell-free protein synthesis with glucose metabolism. *Biotechnol Bioeng* **90**, 606-13.
- Calhoun KA and Swartz JR. (2006)** Total amino acid stabilization during cell-free protein synthesis reactions. *J Biotechnol* **123**, 193-203.
- Calhoun KA and Swartz JR. (2007)** Energy systems for ATP regeneration in cell-free protein synthesis reactions. *Methods Mol Biol* **375**, 3-17.
- Cantor CS and Schimmel PR (1980)** Biophysical Chemistry. *Freeman*, San Francisco, USA.

Chamberlin M and Ring J. (1973) Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. 1. General properties of the enzymatic reaction and the template specificity of the enzyme. *J Biol Chem* **248**, 2235-44.

Chumpolkulwong N, Sakamoto K, Hayashi A, Iraha F, Shinya N, Matsuda N, Kiga D, Urushibata A, Shirouzu M, Oki K, Kigawa T, Yokoyama S. (2006) Translation of 'rare' codons in a cell-free protein synthesis system from Escherichia coli. *J Struct Funct Genomics* **7**, 31-6.

Chung CT, Niemela SL, Miller RH. (1989) One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172-5.

Clodi E, Semrad K, Schroeder R. (1999) Assaying RNA chaperone activity in vivo using a novel RNA folding trap. *EMBO J* **18**, 3776-82.

Coetzee T, Herschlag D, Belfort M. (1994) Escherichia coli proteins, including ribosomal protein S12, facilitate in vitro splicing of phage T4 introns by acting as RNA chaperones. *Genes Dev* **8**, 1575-88.

Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. (2003) A vision for the future of genomics research. *Nature* **422**, 835-47.

Craig D, Howell MT, Gibbs CL, Hunt T, Jackson RJ. (1992) Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system. *Nucleic Acids Res* **20**, 4987-95.

Culver GM and Noller HF. (1999) Efficient reconstitution of functional Escherichia coli 30S ribosomal subunits from a complete set of recombinant small subunit ribosomal proteins. *RNA* **5**, 832-43.

Dallaire F, Dupuis S, Fiset S, Chabot B. (2000) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UP1 protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication in vitro. *J Biol Chem* **275**, 14509-16.

De Smit MH and van Duin J. (1990) Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7668-72.

DeVries JK and Zubay G. (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.

Dickerman HW, Steers E Jr, Redfield BG, Weissbach H. (1967) Methionyl soluble ribonucleic acid transformylase. I. Purification and partial characterization. *J Biol Chem* **242**, 1522-5.

Du MX, Johnson RB, Sun XL, Staschke KA, Colacino J, Wang QM. (2002) Comparative characterization of two DEAD-box RNA helicases in superfamily II: human translation-initiation factor 4A and hepatitis C virus non-structural protein 3 (NS3) helicase. *Biochem J* **363**, 147-55.

Dunkle JA and Cate JH. (2010) Ribosome structure and dynamics during translocation and termination. *Annu Rev Biophys* **39**, 227-44.

Endoh T, Kanai T, Sato YT, Liu DV, Yoshikawa K, Atomi H, Imanaka T. (2006) Cell-free protein synthesis at high temperatures using the lysate of a hyperthermophile. *J Biotechnol* **126**, 186-95.

Farrokhi N, Hrmova M, Burton RA, Fincher GB. (2009) Heterologous and Cell-Free Protein Expression Systems. *Methods Mol Biol* **513**, 175-98.

Feng YX, Campbell S, Harvin D, Ehresmann B, Ehresmann C, Rein A. (1999) The human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein has nucleic acid chaperone activity: possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. *J Virol* **73**, 4251-6.

Frolova LY, Tsivkovskii RY, Sivolobova GF, Oparina NY, Serpinsky OI, Blinov VM, Tatkov SI, Kisseelev LL. (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* **5**, 1014-20.

Gale EF and Folkes JP. (1954) Effect of nucleic acids on protein synthesis and amino-acid incorporation in disrupted staphylococcal cells. *Nature* **173**, 1223-7.

Gao H, Zhou Z, Rawat U, Huang C, Bouakaz L, Wang C, Cheng Z, Liu Y, Zavialov A, Gursky R, Sanyal S, Ehrenberg M, Frank J, Song H. (2007) RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for dissociation of class I release factors. *Cell* **129**, 929-41.

Geissmann T, Marzi S, Romby P. (2009) The role of mRNA structure in translational control in bacteria. *RNA Biol* **6**, 153-60.

Giuliodori AM, Di Pietro F, Marzi S, Masquida B, Wagner R, Romby P, Gualerzi CO, Pon CL. (2010) The cspA mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA. *Mol Cell* **37**, 21-33.

Grunberg-Manago M, Dessen P, Pantaloni D, Godefroy-Colburn T, Wolfe AD, Dondon J. (1975) Light-scattering studies showing the effect of initiation factors on the reversible dissociation of Escherichia coli ribosomes. *J Mol Biol* **94**, 461-78.

Graslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, dhe-Paganon S, Park HW, Savchenko A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, Wilson IA, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC, Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schutz A, Heinemann U, Yokoyama S, Bussow K, Gunsalus KC. (2008) Protein production and purification. *Nat Methods* **5**, 135-46.

Grigoriadou C, Marzi S, Kirillov S, Gualerzi CO, Cooperman BS. (2007) A quantitative kinetic scheme for 70 S translation initiation complex formation. *J Mol Biol* **373**, 562-72.

Gromadski KB and Rodnina MV. (2004) Kinetic determinants of high-fidelity tRNA discrimination on the ribosome. *Mol Cell* **13**, 191-200.

Gromadski KB, Wieden HJ, Rodnina MV. (2002) Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu. *Biochemistry* **41**, 162-9.

Grossberger R, Mayer O, Waldsch C, Semrad K, Urschitz S, Schroeder R. (2005) Influence of RNA structural stability on the RNA chaperone activity of the Escherichia coli protein StpA. *Nucleic Acids Res* **33**, 2280-9.

- Halls C, Mohr S, Del Campo M, Yang Q, Jankowsky E, Lambowitz AM. (2007)** Involvement of DEAD-box proteins in group I and group II intron splicing. Biochemical characterization of Ms116p, ATP hydrolysis-dependent and -independent mechanisms, and general RNA chaperone activity. *J Mol Biol* **365**, 835-55.
- Hanes J and Plückthun A. (1997)** In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4937-42.
- Hartz D, McPheeers DS, Gold L. (1989)** Selection of the initiator tRNA by Escherichia coli initiation factors. *Genes Dev* **3**, 1899-912.
- Hawkins CL and Davies MJ. (2001)** Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 196-219.
- He M. (2008)** Cell-free protein synthesis: applications in proteomics and biotechnology. *N Biotechnol* **25**, 126-32.
- Helgstrand M, Mandava CS, Mulder FA, Liljas A, Sanyal S, Akke M. (2007)** The ribosomal stalk binds to translation factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a conserved region of the L12 C-terminal domain. *J Mol Biol* **365**, 468-79.
- Herschlag D, Khosla M, Tsuchihashi Z, Karpel RL. (1994)** An RNA chaperone activity of non-specific RNA binding proteins in hammerhead ribozyme catalysis. *EMBO J* **13**, 2913-24.
- Hillebrecht JR and Chong S. (2008)** A comparative study of protein synthesis in in vitro systems: from the prokaryotic reconstituted to the eukaryotic extract-based. *BMC Biotechnol* **8**, 58.
- Hirokawa G, Kiel MC, Muto A, Selmer M, Raj VS, Liljas A, Igarashi K, Kaji H, Kaji A. (2002)** Post-termination complex disassembly by ribosome recycling factor, a functional tRNA mimic. *EMBO J* **21**, 2272-81.
- Hirokawa G, Nijman RM, Raj VS, Kaji H, Igarashi K, Kaji A. (2005)** The role of ribosome recycling factor in dissociation of 70S ribosomes into subunits. *RNA* **11**, 1317-28.
- Hofweber R. (2006)** Analyse kritischer Einflussfaktoren auf die Proteinexpression im zellfreien System. Doktorarbeit. Universität Regensburg.
- Hofweber R, Horn G, Langmann T, Balbach J, Kremer W, Schmitz G, Kalbitzer HR. (2005)** The influence of cold shock proteins on transcription and translation studied in cell-free model systems. *FEBS J* **272**, 4691-702.
- Huang HR, Rowe CE, Mohr S, Jiang Y, Lambowitz AM, Perlman PS. (2005)** The splicing of yeast mitochondrial group I and group II introns requires a DEAD-box protein with RNA chaperone function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 163-8.
- Hüttenhofer A and Noller HF. (1994)** Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes. *EMBO J* **13**, 3892-901.
- Iskakova MB, Szaflarski W, Dreyfus M, Remme J, Nierhaus KH. (2006)** Troubleshooting coupled in vitro transcription-translation system derived from Escherichia coli cells: synthesis of high-yield fully active proteins. *Nucleic Acids Res* **34**, e135.
- Jackson AM, Boutell J, Cooley N, He M. (2004)** Cell-free protein synthesis for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* **2**, 308-19.

Jiang W, Hou Y, Inouye M. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem* **272**, 196-202.

Jiang X, Ookubo Y, Fujii I, Nakano H, Yamane T. (2002) Expression of Fab fragment of catalytic antibody 6D9 in an *Escherichia coli* in vitro coupled transcription/translation system. *FEBS Lett* **514**, 290-4.

Jun SY, Kang SH, Lee KH. (2008) Continuous-exchange cell-free protein synthesis using PCR-generated DNA and an RNase E-deficient extract. *Biotechniques* **44**, 387-91.

Junge F, Haberstock S, Roos C, Stefer S, Proverbio D, Dötsch V, Bernhard F. (2010) Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins. *N Biotechnol* (in press).

Kaberdin VR. (2003) Probing the substrate specificity of *Escherichia coli* RNase E using a novel oligonucleotide-based assay. *Nucleic Acids Res* **31**, 4710-6.

Kaberdin VR and Bläsi U. (2006) Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 967-79.

Karimi R, Pavlov MY, Buckingham RH, Ehrenberg M. (1999) Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol Cell* **3**, 601-9.

Katunin VI, Savelbergh A, Rodnina MV, Wintermeyer W. (2002) Coupling of GTP hydrolysis by elongation factor G to translocation and factor recycling on the ribosome. *Biochemistry* **41**, 12806-12.

Katzen F, Chang G, Kudlicki W. (2005) The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol* **23**, 150-6.

Keatch SA, Leonard PG, Ladbury JE, Dryden DT. (2005) StpA protein from *Escherichia coli* condenses supercoiled DNA in preference to linear DNA and protects it from digestion by DNase I and EcoKI. *Nucleic Acids Res* **33**, 6540-6.

Keller EB and Zamecnik PC. (1956) The effect of guanosine diphosphate and triphosphate on the incorporation of labeled amino acids into proteins. *J Biol Chem* **221**, 45-59.

Khan R and Giedroc DP. (1992) Recombinant human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid (NCp7) protein unwinds tRNA. *J Biol Chem* **267**, 6689-95.

Kigawa T. (2010) Cell-free protein preparation through prokaryotic transcription-translation methods. *Methods Mol Biol* **607**, 1-10.

Kigawa T, Yabuki T, Matsuda N, Matsuda T, Nakajima R, Tanaka A, Yokoyama S. (2004) Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J Struct Funct Genomics* **5**, 63-8.

Kim DM and Choi CY. (1996) A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnol Prog* **12**, 645-9.

Kim DM and Swartz JR. (1999) Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol Bioeng* **66**, 180-8.

Kim DM and Swartz JR. (2001) Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng* **74**, 309-16.

Kim DM, Kigawa T, Choi CY, Yokoyama S. (1996) A highly efficient cell-free protein synthesis system from Escherichia coli. *Eur J Biochem* **239**, 881-6.

Kim HC and Kim DM. (2009) Methods for energizing cell-free protein synthesis. *J Biosci Bioeng* **108**, 1-4.

Kim KK, Min K, Suh SW. (2000) Crystal structure of the ribosome recycling factor from Escherichia coli. *EMBO J* **19**, 2362-70.

Kim RG and Choi CY. (2000) Expression-independent consumption of substrates in cell-free expression system from Escherichia coli. *J Biotechnol* **84**, 27-32.

Kim TW, Keum JW, Oh IS, Choi CY, Kim HC, Kim DM. (2007a) An economical and highly productive cell-free protein synthesis system utilizing fructose-1,6-bisphosphate as an energy source. *J Biotechnol* **130**, 389-93.

Kim TW, Keum JW, Oh IS, Choi CY, Park CG, Kim DM. (2006a) Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol* **126**, 554-61.

Kim TW, Kim DM, Choi CY. (2006b) Rapid production of milligram quantities of proteins in a batch cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol* **124**, 373-80.

Kim TW, Oh IS, Keum JW, Kwon YC, Byun JY, Lee KH, Choi CY, Kim DM. (2007b) Prolonged cell-free protein synthesis using dual energy sources: Combined use of creatine phosphate and glucose for the efficient supply of ATP and retarded accumulation of phosphate. *Biotechnol Bioeng* **97**, 1510-5.

Klammt C, Schwarz D, Dötsch V, Bernhard F. (2007) Cell-free production of integral membrane proteins on a preparative scale. *Methods Mol Biol* **375**, 57-78.

Kolb A, Hermoso JM, Thomas JO, Szer W. (1977) Nucleic acid helix-unwinding properties of ribosomal protein S1 and the role of S1 in mRNA binding to ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 2379-83.

Kudlicki W, Kramer G, Hardesty B. (1992) High efficiency cell-free synthesis of proteins: refinement of the coupled transcription/translation system. *Anal Biochem* **206**, 389-93.

Kumar A and Wilson SH. (1990) Studies of the strand-annealing activity of mammalian hnRNP complex protein A1. *Biochemistry* **29**, 10717-22.

Kurotani A, Takagi T, Toyama M, Shirouzu M, Yokoyama S, Fukami Y, Tokmakov AA. (2010) Comprehensive bioinformatics analysis of cell-free protein synthesis: identification of multiple protein properties that correlate with successful expression. *FASEB J* **24**, 1095-104.

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

La Teana A, Gualerzi CO, Brimacombe R. (1995) From stand-by to decoding site. Adjustment of the mRNA on the 30S ribosomal subunit under the influence of the initiation factors. *RNA* **1**, 772-82.

Laursen BS, Kjaergaard AC, Mortensen KK, Hoffman DW, Sperling-Petersen HU. (2004) The N-terminal domain (IF2N) of bacterial translation initiation factor IF2 is connected to the conserved C-terminal domains by a flexible linker. *Protein Sci* **13**, 230-9.

- Lee KH, Kwon YC, Yoo SJ, Kim DM. (2010)** Ribosomal synthesis and in situ isolation of peptide molecules in a cell-free translation system. *Protein Expr Purif* **71**, 16-20.
- Lee T and Feig AL. (2008)** The RNA binding protein Hfq interacts specifically with tRNAs. *RNA* **14**, 514-23.
- Linder P. (2000)** Quick guide: DEAD-box proteins. *Curr Biol* **10**, R887.
- Liu DV, Zawada JF, Swartz JR. (2005)** Streamlining Escherichia coli S30 extract preparation for economical cell-free protein synthesis. *Biotechnol Prog* **21**, 460-5.
- Ma WP and Crouch RJ. (1996)** Escherichia coli RNase HI inhibits murine leukaemia virus reverse transcription in vitro and yeast retrotransposon Ty1 transposition in vivo. *Genes Cells* **1**, 581-93.
- Madono M, Sawasaki T, Morishita R, Endo Y. (2010)** Wheat germ cell-free protein production system for post-genomic research. *N Biotechnol* (in press).
- Mandal M and Breaker RR. (2004)** Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 29-35.
- Mankin AS and Polacek N. (2008)** SPARK: a new peptidyl transferase activity assay. *Methods Mol Med* **142**, 107-16.
- Marcus A, Luginbill B, Feeley J. (1968)** Polysome formation with tobacco mosaic virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**, 1243-50.
- Marzi S, Myasnikov AG, Serganov A, Ehresmann C, Romby P, Yusupov M, Klaholz BP. (2007)** Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome. *Cell* **130**, 1019-31.
- Mathy N, Pellegrini O, Serganov A, Patel DJ, Ehresmann C, Portier C. (2004)** Specific recognition of rpsO mRNA and 16S rRNA by Escherichia coli ribosomal protein S15 relies on both mimicry and site differentiation. *Mol Microbiol* **52**, 661-75.
- McAllister WT. (1997)** Transcription by T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Mol Biol* **11**, 15–25.
- McDowall KJ, Lin-Chao S, Cohen SN. (1994)** A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *J Biol Chem* **269**, 10790-6.
- Mechulam Y, Schmitt E, Maveyraud L, Zelwer C, Nureki O, Yokoyama S, Konno M, Blanquet S. (1999)** Crystal structure of Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase highlights species-specific features. *J Mol Biol* **294**, 1287-97.
- Mei Q, Khnouf R, Simon A, Fan ZH. (2010)** Protein synthesis in a device with nanoporous membranes and microchannels. *Lab Chip* **10**, 2541-5.
- Meysing M. (2010)** Entwicklung eines Verfahrens zur kontinuierlichen, gerichteten Evolution hochaffiner Protein-Liganden in vitro. Doktorarbeit. GENEART AG, Regensburg.
- Michel-Reydellet N, Calhoun K, Swartz J. (2004)** Amino acid stabilization for cell-free protein synthesis by modification of the Escherichia coli genome. *Metab Eng* **6**, 197-203.

Michel-Reydellet N, Woodrow K, Swartz J. (2005) Increasing PCR fragment stability and protein yields in a cell-free system with genetically modified *Escherichia coli* extracts. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**, 26-34.

Mikami S, Kobayashi T, Imataka H. (2010) Cell-free protein synthesis systems with extracts from cultured human cells. *Methods Mol Biol* **607**, 43-52.

Mikulecky PJ, Kaw MK, Brescia CC, Takach JC, Sledjeski DD, Feig AL. (2004) *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1206-14.

Milon P, Konevega AL, Gualerzi CO, Rodnina, MV. (2008) Kinetic checkpoint at a late step in translation initiation. *Mol Cell* **30**, 712-20.

Miranda-Ríos J, Navarro M, Soberón M. (2001) A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9736-41.

Moazed D and Noller HF. (1989) Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* **57**, 585-97.

Moine H, Romby P, Springer M, Grunberg-Manago M, Ebel JP, Ehresmann B, Ehresmann C. (1990) *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase and tRNA(Thr) modulate the binding of the ribosome to the translational initiation site of the thrS mRNA. *J Mol Biol* **216**, 299-310.

Moll I, Leitsch D, Steinhauser T, Bläsi U. (2003) RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein. *EMBO Rep* **4**, 284-9.

Monro RE. (1967) Catalysis of peptide bond formation by 50 S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **26**, 147-51.

Morita M, Kanemori M, Yanagi H, Yura T. (1999a) Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure. *J Bacteriol* **181**, 401-10.

Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Yura T. (1999b) Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* **13**, 655-65.

Myasnikov AG, Simonetti A, Marzi S, Klaholz BP. (2009) Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 300-9.

Neidhardt FC. (1987) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1654 p.

Nevin DE and Pratt JM. (1991) A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter. *FEBS Lett* **291**, 259-63.

Nierhaus KH and Wilson DN. (2004) Protein synthesis and ribosome structure: translating the genome. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany.

Nirenberg MW and Matthaei JH. (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**, 1588-602.

Odegrip R, Nilsson AS, Haggård-Ljungquist E. (2006) Identification of a gene encoding a functional reverse transcriptase within a highly variable locus in the P2-like coliphages. *J Bacteriol* **188**, 1643-7.

Orth JH, Schorch B, Boundy S, Ffrench-Constant R, Kubick S, Aktories K. (2010) Cell-free synthesis and characterization of a novel cytotoxic pierisin-like protein from the cabbage butterfly *Pieris rapae*. *Toxicon* (in press).

Pavlov MY, Freistroffer DV, Heurgué-Hamard V, Buckingham RH, Ehrenberg M. (1997) Release factor RF3 abolishes competition between release factor RF1 and ribosome recycling factor (RRF) for a ribosome binding site. *J Mol Biol* **273**, 389-401.

Pedersen A, Hellberg K, Enberg J, Karlsson BG. (2010) Rational improvement of cell-free protein synthesis. *N Biotechnol* (in press).

Pelham HR and Jackson RJ. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* **67**, 247-56.

Peske F, Rodnina MV, Wintermeyer W. (2005) Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. *Mol Cell* **18**, 403-12.

Petry S, Brodersen DE, Murphy FV 4th, Dunham CM, Selmer M, Tarry MJ, Kelley AC, Ramakrishnan V. (2005) Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. *Cell* **123**, 1255-66.

Petry S, Weixlbaumer A, Ramakrishnan V. (2008) The termination of translation. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 70-7.

Philippe C, Eyermann F, Bénard L, Portier C, Ehresmann B, Ehresmann C. (1993) Ribosomal protein S15 from *Escherichia coli* modulates its own translation by trapping the ribosome on the mRNA initiation loading site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4394-8.

Pon CL and Gualerzi CO. (1984) Mechanism of protein biosynthesis in prokaryotic cells. Effect of initiation factor IF1 on the initial rate of 30 S initiation complex formation. *FEBS Lett* **175**, 203-7.

Pontius BW and Berg P. (1990) Renaturation of complementary DNA strands mediated by purified mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein: implications for a mechanism for rapid molecular assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8403-7.

Poole E and Tate W. (2000) Release factors and their role as decoding proteins: specificity and fidelity for termination of protein synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1493**, 1-11.

Pratt CA and Mowry KL. (2010) Preparation of a highly active cell-free translation system from immature *Xenopus laevis* oocytes. *Methods* **51**, 101-5.

Pratt, J.M. (1984) Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems. In *Transcription and Translation: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, UK.

RajBhandary UL. (1997) Once there were twenty. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 11761-3.

Rajkowitsch L, Chen D, Stampfl S, Semrad K, Waldsch C, Mayer O, Jantsch MF, Konrat R, Bläsi U, Schroeder R. (2007) RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biol* **4**, 118-30.

Rajkowitsch L and Schroeder R. (2007) Dissecting RNA chaperone activity. *RNA* **13**, 2053-60.

Ramachandran N, Raphael JV, Hainsworth E, Demirkhan G, Fuentes MG, Rolfs A, Hu Y, LaBaer J. (2008) Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nat Methods* **5**, 535-8.

Ramesh V, Gite S, Li Y, RajBhandary UL. (1997) Suppressor mutations in Escherichia coli methionyl-tRNA formyltransferase: role of a 16-amino acid insertion module in initiator tRNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13524-9.

Repoila F and Darfeuille F. (2009) Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biol Cell* **101**, 117-31.

Romby P and Springer M. (2003) Bacterial translational control at atomic resolution. *Trends Genet* **19**, 155-61.

Roberts EB. (1958) Microsomal Particles and Protein Synthesis. *Pergamon Press*, London, UK.

Roberts RW and Szostak JW. (1997) RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12297-302.

Rogers GW Jr, Lima WF, Merrick WC. (2001) Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *J Biol Chem* **276**, 12598-608.

Rostom AA, Fucini P, Benjamin DR, Juenemann R, Nierhaus KH, Hartl FU, Dobson CM, Robinson CV. (2000) Detection and selective dissociation of intact ribosomes in a mass spectrometer. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5185-90.

Russell R. (2008) RNA misfolding and the action of chaperones. *Front Biosci* **13**, 1-20.

Sawasaki T, Hasegawa Y, Tsuchimochi M, Kamura N, Ogasawara T, Kuroita T, Endo Y. (2002a) A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products. *FEBS Lett* **514**, 102-5.

Sawasaki T, Ogasawara T, Morishita R, Endo Y. (2002b) A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14652-7.

Schindler PT, Baumann S, Reuss M, Siemann M. (2000) In vitro coupled transcription translation: effects of modification in lysate preparation on protein composition and biosynthesis activity. *Electrophoresis* **21**, 2606-9.

Schindler PT, Macherhammer F, Arnold S, Reuss M, Siemann M. (1999) Investigation of translation dynamics under cell-free protein biosynthesis conditions using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 806-12.

Schmalzbauer E, Strack B, Dannull J, Guehmann S, Moelling K. (1996) Mutations of basic amino acids of NCp7 of human immunodeficiency virus type 1 affect RNA binding in vitro. *J Virol* **70**, 771-7.

Schmeing TM, Seila AC, Hansen JL, Freeborn B, Soukup JK, Scaringe SA, Strobel SA, Moore PB, Steitz TA. (2002) A pre-translocational intermediate in protein synthesis observed in crystals of enzymatically active 50S subunits. *Nat Struct Biol* **9**, 225-30.

Schneider B, Junge F, Shirokov VA, Durst F, Schwarz D, Dötsch V, Bernhard F. (2010) Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods Mol Biol* **601**, 165-86.

Schwarz D, Daley D, Beckhaus T, Dötsch V, Bernhard F. (2010) Cell-free expression profiling of *E. coli* inner membrane proteins. *Proteomics* **10**, 1762-79.

Scolnick E, Tompkins R, Caskey T, Nirenberg M. (1968) Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**, 768-74.

Seki E, Matsuda N, Yokoyama S, Kigawa T. (2008) Cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli* cells cultured at decreased temperatures improves productivity by decreasing DNA template degradation. *Anal Biochem* **377**, 156-61.

Semrad K, Green R, Schroeder R. (2004) RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from *Escherichia coli*. *RNA* **10**, 1855-60.

Seshadri A and Varshney U. (2006) Mechanism of recycling of post-termination ribosomal complexes in eubacteria: a new role of initiation factor 3. *J Biosci* **31**, 281-9.

Shaw WV. (1975) Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol* **43**, 737-55.

Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* **19**, 751-5.

Shimizu Y, Kanamori T, Ueda T. (2005) Protein synthesis by pure translation systems. *Methods* **36**, 299-304.

Shimizu Y and Ueda T. (2010) PURE technology. *Methods Mol Biol* **607**, 11-21.

Shin J and Noireaux V. (2010) Efficient cell-free expression with the endogenous *E. Coli* RNA polymerase and sigma factor 70. *J Biol Eng* **4**, 8.

Shine J and Dalgarno L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 1342-6.

Shirokov VA, Kommer A, Kolb VA, Spirin AS. (2007) Continuous-exchange protein-synthesizing systems. *Methods Mol Biol* **375**, 19-55.

Shoji S, Walker SE, Fredrick K. (2009) Ribosomal translocation: one step closer to the molecular mechanism. *ACS Chem Biol* **4**, 93-107.

Siekevitz P. (1952) Uptake of radioactive alanine in vitro into the proteins of rat liver fractions. *J Biol Chem* **195**, 549-65.

Simonetti A, Marzi S, Jenner L, Myasnikov A, Romby P, Yusupova G, Klaholz BP, Yusupov M. (2009) A structural view of translation initiation in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **66**, 423-36.

Sitaraman K and Chatterjee DK. (2009) High-throughput protein expression using cell-free system. *Methods Mol Biol* **498**, 229-44.

Sonnemann J, Drugeon G, Haenni AL, Mutzel R. (1993) Elongation in a *Dictyostelium* in vitro translation system is affected by calmodulin antagonists. *FEBS Lett* **329**, 183-8.

Spedding G. (1990) Isolation and analysis of ribosomes from prokaryotes, eukaryotes, and organelles. In *Ribosomes and protein synthesis: a practical approach*. *IRL Press at Oxford University Press*, New York, USA.

Spirin AS. (2004) High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol* **22**, 538-45.

Spirin AS, Baranov VI, Ryabova LA, Ovodov SY, Alakhov YB. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* **242**, 1162-4.

Spirin AS and Swartz JR. (2008) Cell-Free Protein Synthesis Systems: Historical Landmarks, Classification, and General Methods, in *Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols*. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.*, Weinheim, Germany.

Stigers DJ, Watts ZI, Hennessy JE, Kim HK, Martini R, Taylor MC, Ozawa K, Keillor JW, Dixon NE, Easton CJ. (2010) Incorporation of chlorinated analogues of aliphatic amino acids during cell-free protein synthesis. *Chem Commun (Camb)* (in press).

Studer SM and Joseph S. (2006) Unfolding of mRNA secondary structure by the bacterial translation initiation complex. *Mol Cell* **22**, 105-15.

Tawfik DS and Griffiths AD. (1998) Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol* **16**, 652-6.

Tissieres A, Schlessinger D, Gros F. (1960) Amino acid incorporation into proteins by *Escherichia coli* ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**, 1450-63.

Ueda T. (2008) The Constructive Approach for Cell-Free Translation, in *Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols*. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.*, Weinheim, Germany.

Underwood KA, Swartz JR, Puglisi JD. (2005) Quantitative polysome analysis identifies limitations in bacterial cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng* **91**, 425-35.

Urban JH and Vogel J. (2008) Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate *glmS* mRNA translation. *PLoS Biol* **6**, e64.

Vecerek B, Rajkowitsch L, Sonnleitner E, Schroeder R, Bläsi U. (2008) The C-terminal domain of *Escherichia coli* Hfq is required for regulation. *Nucleic Acids Res* **36**, 133-43.

Voges D, Watzele M, Nemetz C, Wizemann S, Buchberger B. (2004). Analyzing and enhancing mRNA translational efficiency in an *Escherichia coli* in vitro expression system. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 601-14.

Voloshin AM and Swartz JR. (2008) Large-Scale Batch Reactions for Cell-Free Protein Synthesis, in *Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols*. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.*, Weinheim, Germany.

Wilson DN and Nierhaus KH. (2007) The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**, 187-219.

Winnick T. (1950) Studies on the mechanism of protein synthesis in embryonic and tumor tissues. I. Evidence relating to the incorporation of labeled amino acids into protein structure in homogenates. *Arch Biochem* **27**, 65-74.

Wu W, Henderson LE, Copeland TD, Gorelick RJ, Bosche WJ, Rein A, Levin JG. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein reduces reverse transcriptase pausing at a secondary structure near the murine leukemia virus polyuridine tract. *J Virol* **70**, 7132-42.

Wulczyn FG and Kahmann R. (1991) Translational stimulation: RNA sequence and structure requirements for binding of Com protein. *Cell* **65**, 259-69.

Xu Z, Lian J, Cai J. (2010) Efficient expression of aquaporin Z in Escherichia coli cell-free system using different fusion vectors. *Protein Pept Lett* **17**, 181-5.

Yanofsky C. (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* **289**, 751-8.

Yin G and Swartz JR. (2004) Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnol Bioeng* **86**, 188-95.

Yokoyama J, Matsuda T, Koshiba S, Kigawa T. (2010) An economical method for producing stable-isotope labeled proteins by the E. coli cell-free system. *J Biomol NMR* **48**, 193-201.

Youngman EM, McDonald ME, Green R. (2008) Peptide release on the ribosome: mechanism and implications for translational control. *Annu Rev Microbiol* **62**, 353-73.

Zárate X, Henderson DC, Phillips KC, Lake AD, Galbraith DW. (2010) Development of high-yield autofluorescent protein microarrays using hybrid cell-free expression with combined Escherichia coli S30 and wheat germ extracts. *Proteome Sci* **8**, 32.

Zavialov AV, Buckingham RH, Ehrenberg M. (2001) A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3. *Cell* **107**, 115-24.

Zavialov AV, Hauryliuk VV, Ehrenberg M. (2005) Guanine-nucleotide exchange on ribosome-bound elongation factor G initiates the translocation of tRNAs. *J Biol* **4**, 9.

Zawadzki V and Gross HJ. (1991) Rapid and simple purification of T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **19**, 1948.

Zhang A, Rimsky S, Reaban ME, Buc H, Belfort M. (1996) Escherichia coli protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *EMBO J* **15**, 1340-9.

8. Abkürzungsverzeichnis

5' UTR	5' untranslatierte Region	CspA	'cold shock protein' A
A	Adenosin	CTP	Cytidintriphosphat
AI-BP	ApoA-I Bindeprotein	DHFR	Dihydrofolatreduktase
Abb.	Abbildung	DMSO	Dimethylsulfoxid
ADP	Adenosindiphosphat	DNA	Desoxyribonukleinsäure
APS	Ammoniumpersulfat	dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphate
AS	Aminosäure	DTNB	5,5'-Dithio-Bis (2-Nitrobenzoic Acid)
A-Stelle	Aminoacyl-Stelle	DTT	Dithiothreitol
ATP	Adenosintriphosphat	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
bp	Basenpaare	EF	Elongationsfaktor
bzw.	beziehungsweise	eIF-4A	eukaryotischer Initiationsfaktor 4A
C	Cytidin	ECL	'enhanced chemiluminescence'
ca.	circa	EMSA	'Electrophoretic Mobility Shift Assay'
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase	E-Stelle	Exit-Stelle
cDNA	'complementary' DNA	FPLC	'fast protein liquid chromatography'
CFPS	'cell-free protein synthesis'	g	Gramm
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	g	Erdbeschleunigung $1g = 9,81 \text{ ms}^{-2}$
CMV	Cytomegalovirus	G	Guanosin
CoA	Coenzym A	GDP	Guanosindiphosphat
CECF	,continous exchange cell-free'	GFP	'green fluorescent protein'
CFCF	,continous flow cell-free'	GST	Glutathion-S-Transferase
cfu	,colony forming units'	GTP	Guanosintriphosphat
cs	,cold shock'		
Csp	Kälteschockprotein ('cold shock protein')		

GTPase	GTP hydrolysierendes Protein	mM	Stoffmengenkonzentration (= mmol/l)
H	Histidin	M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
h	Stunde	mRNA	'messenger' RNA
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure	MTF	Methionyl-tRNA Formyltransferase
His	Histidin	Mw	Molekulargewicht
His ₆	6 Histidine in Folge	µg	Mikrogramm
HIV-1	humanes Immundefizient-Virus-1	µl	Mikroliter
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein	µM	Stoffmengenkonzentration (= µmol/l)
HPLC	'high-performance liquid chromatography'	NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
hRluc	synthetische <i>Renilla</i> Luciferase	NASBA	'nucleic acid sequence based amplification'
IF	Initiationsfaktor	NC	Nukleokapsid
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid	NCp7	Nukleokapsid-Protein 7
kb	Kilobasen	ng	Nanogramm
kDa	kilo Dalton	nM	Stoffmengenkonzentration (= nmol/l)
l	Liter	nm	Nanometer
LB	Luria Bertani	NMR	'nuclear magnetic resonance'
LMW	'low molecular weight'		
M	Stoffmengenkonzentration (= mol/l)	OD	Optische Dichte
mA	Milliamper	PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese
MBP	Maltose Bindeprotein	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
MDa	Mega Dalton	PEG	Polyethylenglycol
mg	Milligramm	pg	Pikogramm
min	Minute	pI	isoelektrischer Punkt
miRNA	'micro' RNA	P-Stelle	Peptidyl-Stelle
ml	Milliliter		

PURE	‘protein synthesis using recombinant elements’	U	Uridin bzw. Unit
Q	Glutamin	u.a.	unter anderem
RBS	Ribosomenbindungsstelle	UTP	Uridintriphosphat
RF	Freisetzungs-(‘Release’)-Faktor	UV	ultraviolet
RNA	Ribonukleinsäure	V	Volt
RNase	Ribonuklease	vgl.	vergleiche
rpm	’rounds per minute‘	v/v	Volumenanteil
RRF	Ribosomenrecycling-Faktor	w/v	’weight per volume‘
rRNA	ribosomale RNA	z.B.	zum Beispiel
RT-PCR	Reverse Transkripase-PCR		
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)		
s	Sekunde		
SD	Shine Dalgarno		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
s.o.	siehe oben		
sog.	sogenannte/r/s		
sRNA	’small‘ RNA		
s.u.	siehe unten		
T	Thymin		
Tab.	Tabelle		
T _{Ann}	Annealingtemperatur		
TBA	Tribromoanisole		
TEMED	Tetramethylethylendiamin		
TF	Translationsfaktor		
TIR	Translations-Initiations-Region		
tRNA	’transfer‘ RNA		
TSS	’transformation and storage solution‘		

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, März 2011

Axel Freischmidt

10. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, herzlichst bedanken. In erster Linie gilt mein Dank Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer und Prof. Dr. Ralf Wagner für die interessante Themenstellung, ihr Interesse am Erfolg und die Begutachtung dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Gudrun Horn für die Betreuung, die Hilfe bei Problemen jeglicher Art und das sehr gute Arbeitsklima bedanken. Emmi Fuchs und Sabine Ruppel danke ich für ihre Unterstützung, die vielen Bestellungen und ebenfalls für das sehr nette Arbeitsklima. Bei Dr. Michael Spörner bedanke ich mich zudem noch bei der Hilfe mit der HPLC. Meinen Laborkollegen Malte Andrasch und Johannes Hiltl danke ich für Plasmide, Proteine und den Spaß den wir nicht nur im Labor hatten. Genauso danke ich auch dem ganzen Rest des Lehrstuhls für Biophysik und physikalische Biochemie für eine tolle Atmosphäre und viel Spaß, auch wenn nicht immer jeder sein Getränkegeld pünktlich bezahlt hat;) Auch sollen an dieser Stelle nicht die ganzen Praktikanten vergessen werden, deren Betreuung immer Abwechslung und Überraschungen in den Laboralltag gebracht hat.

Bei Maren Meysing möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit mit der GENEART AG und die Bereitstellung der Plasmide bedanken. Für die Quantifizierung der Translationsfaktoren bedanke ich mich bei Dr. Jörg Reinders und seinen Kollegen vom Lehrstuhl für funktionelle Genomik. Auch bei Dr. Joachim Griesenbeck möchte ich mich für den ‚Schnellkurs‘ in qRT-PCR bedanken.

Natürlich möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meinen Eltern für den Rückhalt und die finanzielle Unterstützung bedanken, ohne die ich gar nicht so weit gekommen wäre. Auch bedanke ich mich bei meiner Schwester, Anne Freischmidt, vom Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie für die HeLa-Zellen und die gelegentlichen Kaffeepausen.

Bei meinen Freunden und Bekannten bedanke ich mich für die Ablenkung von der Arbeit und ruhige, ernsthafte und beschauliche Abende und Nächte;)

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Sabine hier ganz besonders bedanken, die mich bereits das ganze Studium und nun auch die Doktorarbeit begleitet und unterstützt hat. Du bist etwas ganz Besonderes und ich will auch in Zukunft nicht mehr auf dich verzichten.