

INAUGURAL- DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Marcus Kleber

aus Speyer

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Eigenschaften der Translationsinitiationsregion in
E.coli: Effizienz verschiedener Signale aus dem Genom
des Bakteriophagen T7

Gutachter: Prof. Dr. Eckart Fuchs
Prof. Dr. Hans Ulrich Schairer

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eckart Fuchs für die Überlassung des Themas, für seine wertvollen Anregungen und für seine Hilfe bei der Durchführung der *in vitro* Versuche.

Ich möchte mich ebenfalls bedanken bei Herrn M. Behr, Frau Dr. U. Sahillioglu und Frau B. Schell für ihre Unterstützung und Ratschläge.

Mein Dank gilt auch Herrn T. Hotz, Herrn C. Peter und Frau Dr. U. Sahillioglu für die zur Verfügung gestellten Konstrukte.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre ständige Unterstützung.

Zusammenfassung

Die prokaryontische Translationsinitiationsregion (TIR) setzt sich aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Signalelementen zusammen. Stets vorhanden ist das Initiationstriplett (IT), meist AUG. Weitere häufig vorhandenen Elemente sind die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) und die Downstream Box (DB), die beide komplementär zu bestimmten Bereichen der 16S rRNA sind. Des Weiteren ist es in der Regel günstig, wenn sich im Bereich der Ribosomenbindestelle (RBS) keine Sekundärstrukturen ausbilden. Man spricht dann von einer unstrukturierten Region (USR).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene dieser Signalelemente, welche die Effizienz der Translationsinitiation bei Prokaryonten regulieren, untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, ob eine verlängerte SD in richtigem Abstand zum IT ausreichend ist für eine optimale Translationsinitiationsrate. Für diese Experimente wurden Fragmente der TIR von drei stark exprimierenden Genen aus dem Genom von T7 verwendet (Gene 1; 1,3 und 0,3). Fragmente dieser drei TIR mit unterschiedlichen Downstreamlängen wurden im selben Leseraster vor geeignete Reportergene (Maus-Dihydrofolatreduktase bzw. Chloramphenicolacetyltransferase) kloniert. Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt, dass kleine TIR-Fragmente dieser Gene eine um Größenordnungen geringere Effizienz zeigen als der Wildtyp, sowie dass mittels Verlängerung des Downstreambereichs eine deutliche Steigerung der Translationsrate erzielt werden kann. Alle drei Gene verfügen nur über eine kurze SD (4 bzw. 5 Nt). Durch Verlängerung dieser SD sollte untersucht werden, ob dadurch bei den kurzen TIR-Fragmenten die stimulierende Wirkung der fehlenden Downstreambereiche, speziell der DB, kompensiert werden kann. Konstrukte dieser drei Gene mit unterschiedlichen Downstream- und SD-Längen wurden *in vitro* und *in vivo* auf die Expression der Fusionsproteine aus T7-TIR und Reporterprotein getestet.

Bei zwei der verwendeten T7-Gene (0,3 und 1) führte eine Verlängerung der SD von 4 Nt auf bis zu 11 bzw. 12 Nt *in vitro* stets zu einer Steigerung der Expression, während sich *in vivo* in der Regel eine SD mittlerer Länge (7 bzw. 9 Nt) als optimal erwies. Nur bei den kleinsten Insert-Längen (28 bp bzw. 29 bp), die aufgrund des völligen oder teilweise Fehlens der stimulierenden Downstreambereiche (speziell der Downstream Box) nur schwach exprimieren, brachte auch *in vivo* die längste SD die besten Resultate. Diese schwach exprimierenden Konstrukte profitieren von der stärkeren Bindung der längeren SD an die rRNA, während diese starke Bindung bei den höher exprimierenden, längeren Inserts *in vivo* vermutlich das Clearing der Startstelle und den Übergang in die Elongation behindert. Warum dieser Effekt nur *in vivo* auftritt und nicht *in vitro* kann nicht konkret beantwortet werden, es mag an der höheren Konzentration an Ribosomen *in vivo* oder an nur in lebenden Zellen stattfindenden Vorgängen, wie z.B. dem Channeling, liegen. Für die T7-Gen 1,3-Konstrukte erwiesen sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* kürzere SD (5 oder 7 Nt) als optimal. Auch wenn *in vitro* die Expression bei Verlängerung der SD meist ansteigt, konnte dadurch die stimulierende Wirkung fehlender Downstreambereiche nicht vollständig kompensiert werden. Bei gleichen SD-Längen sind in der Regeln die Konstrukte mit den längsten Downstreambereichen am stärksten. Lange SD führen *in vivo*, sehr schwache TIR-Fragmente ausgenommen, stets zu einer Abnahme der Expressionsrate.

Wie bereits angesprochen ist es günstig, wenn im Bereich der RBS keine stabilen Sekundärstrukturen ausgebildet werden, die den Zugang für die Ribosomen behindern könnten. Die RBS von allen stark exprimierenden Gene des Bakteriophagen T7 verfügt über eine USR mit einem davor liegenden, stabilen 5'-hairpin. Die Funktion des 5'-hairpins ist es entweder, die dahinter liegende USR vor Einfaltungen upstream gelegener Sequenzbereiche zu schützen, oder aber Kontakte zu den Ribosomen herzustellen und diesen das Erkennen der Startstelle zu erleichtern. Das T7-Gen 11 verfügt über eine USR und einen sehr stabilen 5'-hairpin. Unterschiedliche Fragmente der TIR dieses Gens wurden in Expressionsvektoren kloniert. Die TIR befand sich hierbei entweder am 5'-Ende der mRNA oder vor dem zweiten Gen einer bicistronischen mRNA. Ein größerer Abschirmeffekt des hairpins in der innercistronischen Position konnte nicht beobachtet werden. Zusätzlich wurden in Konstrukte mit und ohne hairpin Sequenzen inkloniert, die direkt komplementär zur RBS waren (Anti-RBS). Sollte der hairpin einen Abschirmeffekt für die RBS haben, so sollten die Konstrukte mit hairpin besser vor den Anti-RBS geschützt sein als die Konstrukte ohne ihn. Ein solcher Effekt konnte nicht beobachtet werden. Fast alle Konstrukte, ob mit oder ohne hairpin, wurden in gleichem Maße gehemmt. Der Austausch der RBS des Gens 11 gegen die stärkere RBS des T7-Gens 1,3 bestätigte diese Ergebnisse. Daraus lässt sich schließen, dass der positive Effekt, den diese hairpin-Struktur nachweislich auf die Translation hat, nicht auf einer Abschirmung der RBS, sondern vermutlich auf Wechselwirkungen mit den initiiierenden Ribosomen beruht.

Abkürzungsverzeichnis

Anti-DB	Anti-Downstream Box
Anti-RBS	Sequenz komplementär zur RBS
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASD	Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz
Bp	Basenpaar
Cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
DB	Downstream Box
EF	Elongationsfaktor
EthBr	Ethidiumbromid
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
H ₂ O _{VE}	vollentsalztes Wasser
IF	Initiationsfaktor
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IT	Initiationstriplett
Nt	Nukleotid(e)
PAA	Polyacrylamid
RBS	Ribosomenbindestelle
SD	Shine-Dalgarno-Sequenz
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIR	Translationsinitiationsregion
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
ÜNK	Übernachtskultur
USR	unstrukturierte Region

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung Abkürzungsverzeichnis

I	Einleitung	1
II	Material und Methoden	9
II.1	Material	9
II.1.1	Laboraausstattung	9
II.1.2	Verbrauchsmaterial	10
II.1.3	Chemikalien	10
II.1.4	Medien, Puffer, Stocklösungen	10
II.1.5	Enzyme	11
II.1.5.1	Restriktionsenzyme	11
II.1.5.2	Weitere Enzyme	11
II.1.6	Radioisotope	11
II.1.7	Bakterienstämme	11
II.1.8	Vektoren	12
II.2	Methoden	13
II.2.1	Restriktionsverdau	13
II.2.1.1	Analytischer Restriktionsverdau	13
II.2.1.2	Präparativer Restriktionsverdau	14
II.2.2	Gelelektrophoretische Methoden	14
II.2.2.1	Gele zum Auftrennen von DNA	14
II.2.2.1.1	Agarosegele	14
II.2.2.1.2	8% Polyacrylamidgele	15
II.2.2.1.3	Anfärben von dsDNA	15
II.2.2.2	Gele zum Auftrennen von Proteinen	15
II.2.3	Elution von DNA aus Agarose- und PAA-Gelen	17
II.2.3.1	Elektroelution	17
II.2.3.2	Elution mit dem NucleoSpin Extract Kit	18
II.2.4	Fällung von Nukleinsäuren	18
II.2.4.1	Fällung von DNA mit Hilfe von Ethanol, Isopropanol, n-Butanol	18
II.2.4.2	Fällung von radioaktiv markierter RNA mit Hilfe von Perchlorsäure	18
II.2.5	Herstellung synthetischer Oligonukleotide	18
II.2.6	Polymerase Chain Reaction (PCR)	19
II.2.7	Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Vektor	19
II.2.7.1	Präparation des Vektors	19
II.2.7.1.1	Verdau des Vektors	19
II.2.7.1.2	Dephosphorylierung eines linearisierten Vektors	19
II.2.7.2	Präparation des Inserts	20
II.2.7.2.1	Hybridisieren von Oligonukleotiden	20
II.2.7.2.2	Phosphorylierung von Oligonukleotiden	20
II.2.8	Vektor-Insert-Ligation	21
II.2.9	Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA	21
II.2.9.1	Herstellung elektrokompenter E.coli-JM101-Zellen	21

II.2.9.2	Elektroporation	22
II.2.10	Plasmidpräparation	22
II.2.10.1	Minipräp nach Birnboim und Doly	22
II.2.10.2	Minipräp nach dem SeqLab-Laccone-Protokoll	23
II.2.10.3	Maxipräp	23
II.2.11	Reinigung von Plasmid-DNA über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	24
II.2.12	Konzentrationsbestimmung von DNA am Spektrophotometer	25
II.2.13	DNA-Sequenzierung	25
II.2.14	<i>In vitro</i> Proteinbiosynthesystem	26
II.2.15	<i>In vivo</i> Proteinbiosynthese	27
II.2.16	<i>In vitro</i> mRNA-Synthese	28
II.2.17	Computergestützte RNA-Sekundärstrukturanalyse	28
III.	Ergebnisse	29
III.1	Vorgehensweise	29
III.2	Nomenklatur	31
III.3	Übersicht über die verwendeten Expressionsvektoren	32
III.4	Übersicht über alle verwendeten Konstrukte	33
III.4.1	Konstrukte mit veränderter SD	34
III.4.2	Konstrukte mit unterschiedlichen Sekundärstrukturen	34
III.5	Reinigung fd-kontaminierter Konstrukte	35
III.6	Verlängerung der SD bei der TIR des T7-Gens 1	37
III.6.1	<i>In vitro</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor	38
III.6.2	<i>In vivo</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor	40
III.6.3	<i>In vitro</i> RNA-Synthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor	43
III.6.4	Umklonierung der T7-Gen 1 Konstrukte in den pDS5-NC-Vektor	43
III.6.5	<i>In vitro</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor	44
III.6.6	<i>In vivo</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor	46
III.6.7	<i>In vitro</i> RNA-Synthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor	49
III.7	Verlängerung der SD bei der TIR des Gens 1,3	50
III.7.1	<i>In vitro</i> Proteinsynthese der Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor	51
III.7.2	<i>In vivo</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor	53
III.7.3	<i>In vitro</i> RNA-Synthese der Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor	56
III.7.4	<i>In vitro</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor	56
III.7.5	<i>In vivo</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor	59
III.7.6	<i>In vitro</i> RNA-Synthese der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor	62
III.8	Verlängerung der SD bei der TIR des T7-Gens 0,3	63
III.8.1	<i>In vitro</i> Proteinsynthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor	64
III.8.2	<i>In vivo</i> Proteinsynthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im ND-Vektor	66
III.8.3	<i>In vitro</i> RNA-Synthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor	68
III.8.4	Umklonierung einiger T7-Gen 0,3 Konstrukte in den pDS5-NC-Vektor	69
III.8.4.1	<i>In vitro</i> Proteinsynthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor	69
III.8.5	<i>In vivo</i> Proteinsynthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor	71
III.8.6	<i>In vitro</i> RNA-Synthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor	73
III.9	Untersuchungen zur Funktion des 5'-hairpins der USR des T7-Gens 11	74
III.9.1	Herstellung des Expressionsvektors pDS5-NcD	74
III.9.2	Umsetzung von T7-Gen 11-Konstrukten in den neuen Expressionsvektor	76
III.9.3	Vergleich der <i>in vitro</i> Proteinsynthese der T7-Gen 11 Konstrukte im pDS5-ND- und pDS5-NcD-Vektor	77
III.9.4	<i>In vitro</i> RNA-Synthese der T7-Gen 11 Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor	79

III.9.5	Einklonierung zur RBS der T7-Gens 11 komplementärer Sequenzen	80
III.9.6	<i>In vitro</i> Proteinsynthese der T7-Gen 11 Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor	81
III.9.7	<i>In vivo</i> Proteinsynthese der T7-Gen 11 Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor	84
III.9.8	<i>In vitro</i> RNA-Synthese der T7-Gen 11 Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor	85
III.9.9	Ersetzen der T7-Gen 11 RBS durch die RBS des T7-Gens 1,3	86
III.9.10	<i>In vitro</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor	88
III.9.11	<i>In vivo</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor	91
III.9.12	<i>In vitro</i> RNA-Synthese-Kinetik der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor	92
III.9.13	Umsetzung der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte in den Vektor pDS5-ND	93
III.9.14	<i>In vitro</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im Vektor pDS5-ND	94
III.9.15	<i>In vivo</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-ND-Vektor	95
III.10.16	<i>In vitro</i> RNA-Synthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-ND-Vektor	97
III.9.17	Substitution des Promotors für die E.coli-RNA-Polymerase durch einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase	97
III.9.18	<i>In vitro</i> Proteinsynthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-TcD-Vektor	98
IV	Diskussion	100
V.	Literaturverzeichnis	111
VI.	Anhang	116
VI.1	Nukleotidsequenz des Expressionsvektors pDS5-ND	116
VI.2	Nukleotidsequenz des Expressionsvektors pDS5-NC	117
VI.3	Nukleotidsequenz des Expressionsvektors pDS5-NcD	118
VI.4	Nukleotidsequenz des Expressionsvektors pDS5-TcD	120
VI.5	Nukleotidsequenz der T7-Gen 1 TIR-Fragmente	122
VI.6	Nukleotidsequenz der T7-Gen 1,3 TIR-Fragmente	122
VI.7	Nukleotidsequenz der T7-Gen 0,3 TIR-Fragmente	123
VI.8	Nukleotidsequenz der T7-Gen 11 Fragmente	123

I. Einleitung

Die Realisierung der in den Genen abgelegten Information erfolgt in mehreren Schritten. Während des Vorgangs der Transkription wird die Information der DNA in mRNA umgeschrieben. Über die Signale, die diesen Prozess kontrollieren, ist bei Prokaryonten bereits sehr viel bekannt. Der nächste Schritt in der Realisierung der genetischen Information ist der Vorgang der Translation. Hierbei wird die in der mRNA enthaltene Information in Proteine übersetzt. Dies ist einer der kompliziertesten und kostspieligsten Prozesse in der Zelle. Eine große Anzahl von Faktoren ist daran beteiligt, die vielseitige Wechselwirkungen mit den flexiblen Strukturen der einzelsträngigen mRNA eingehen können. Man kann die Translation in die Phasen der Initiation, Elongation und Termination unterteilen. Alle diese Schritte sind kinetisch sowohl miteinander, als auch mit der bei Prokaryonten zeitgleich stattfindenden Transkription, dem mRNA-Processing und dem nachfolgenden Protein-Processing verknüpft und gegenseitig voneinander abhängig. Es existieren auf allen Ebenen vielfältige Möglichkeiten zur Regulation der Genexpression.

Der entscheidende Schritt bei der Bestimmung der Translationseffizienz ist in der Regel die Initiation (Ray und Pearson, 1975). Man kann sie in mehrere Einzelschritte unterteilen. Als erstes erfolgt die Bindung der 30S ribosomalen Untereinheit (UE) und des ternären Komplexes aus der beladenen Initiator-tRNA (fMet-tRNA_i), dem Initiationsfaktor 2 (IF 2) und GTP an die mRNA unter Mithilfe der Initiationsfaktoren IF1, IF3 und des ribosomalen Proteins S1. Im nächsten Schritt bindet die 50S UE. Dabei wird GTP hydrolysiert und die Initiationsfaktoren werden freigesetzt. Nun bindet die nächste beladene tRNA unter Mithilfe des Elongationsfaktors EF-Tu und GTP und es kommt zur Bildung der ersten Peptidbindung. Schließlich erfolgt mit dem Clearing der Ribosomenbindestelle (RBS) der Übergang in die Elongation. An der freigegebenen RBS kann dann ein weiteres Ribosom starten.

Als RBS definiert man diejenigen mRNA-Fragmente, die bei einem RNase Verdau durch Ribosomen geschützt werden (Steitz et al., 1969). Diese Fragmente besitzen eine Größe von 30-40 Nt und enthalten u.a. das Initiationstriplett (IT) sowie die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD). Neben der RBS definiert man noch die Translationsinitiationsregion (TIR). Die TIR umfasst neben der RBS alle weiteren Sequenzen, die für die Regulation und Steuerung der Translationsinitiation von Bedeutung sind.

Als Initiationstriplett wird meist AUG verwendet (> 90%), man findet aber auch GUG, UUG, in seltenen Fällen auch CUG, AUA oder AUU (Sacerdot et al., 1982; Gold et al., 1984; Singer et al., 1981; Childs et al., 1985; Shinedling 1985). Sogar das Terminationscodon UAG kann als IT dienen (Varshney et al., 1990). Welches IT verwendet wird hat Auswirkungen auf die Effizienz der Translationsinitiation. Die besten Ergebnisse erhält man für gewöhnlich mit einem AUG als Startcodon (Looman und van Knippenberg, 1986, Manson et al., 1984, Farwell et al., 1992). Es wurde mehrfach demonstriert, dass eine Ersetzung eines seltenen IT durch AUG eine Steigerung der Translationsinitiation mit sich bringt. Beispiele wären das infC-Gen (Brombach und Pon, 1987) und das rnd-Gen von E.coli (Zhang u Deutscher, 1989). Es gibt aber auch Fälle, bei denen der Austausch eines seltenen IT gegen AUG keine Erhöhung der Translationsinitiation bewirkt (Singer und Gold, 1976; Hui und de Boer 1987) oder es sogar zu einem Rückgang kommt (Shinedling et al., 1987). Gerade bei gram-positiven Bakterien wie z.B. *B. subtilis* erhält man bei Vorhandensein einer starken SD für AUG und GUG als IT die selben Translationsraten (Farwell et al., 1992).

Die Shine-Dalgarno-Sequenz wurde 1974 von Shine und Dalgarno entdeckt (Shine und Dalgarno 1974; Shine und Dalgarno 1975). Es handelt sich um eine purinreiche Sequenz variabler Länge, die einige Nukleotide upstream des IT liegt und komplementär zum 3' Ende der 16S rRNA, der Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz (ASD) ist (Gold, 1988). Steitz und Jakes konnten 1975

Basenpaarungen zwischen der RBS verschiedener Gene und einem Fragment der 16S rRNA nachweisen.

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der SD war die Konstruktion von Ribosomen, in deren ASD Basen ausgetauscht wurden. Ribosomen mit den so veränderten ASD waren nur zu einer effizienten Translation befähigt, wenn die RBS der verwendeten mRNAs komplementäre Austauschere in der SD aufwiesen (Jakob et al., 1987, Hui und de Boer, 1987). Es wurde nachgewiesen, dass eine künstliche Verlängerung der SD, und somit Verstärkung der SD-ASD-Wechselwirkung, bei schwach translatierten Genen zu einer erhöhten Expression der entsprechenden Proteine führt (Ringquist et al., 1992). Eine Verkürzung der SD führt meist zu einer Verschlechterung der Expression, eine zu lange SD kann sich wiederum hemmend auf die Translationsrate auswirken (Singer et al., 1981; Schwartz et al., 1981; Manson et al., 1984). Die starke Wechselwirkung zwischen SD und ASD könnte die Ribosomen beim Clearing der RBS und Eintritt in die Elongation behindern. Eine Rolle spielt auch der Abstand (Spacing) zwischen IT und SD. Von Dunn und Studier (1981) wurde zum erstmal beschrieben, dass der Abstand eines bestimmten Uracils der SD, welches komplementär zu Nt 1534 der 16S rRNA ist, zum IT einen Einfluss auf die Translationsinitiationseffizienz hat. Chen et al. (1994) führten den Begriff des *aligned spacing* ein. Ein Abstand von 5 Nt dieses Uracils zum IT gilt als optimal (Chen et al., 1994). Neben dem *aligned spacing* wurde auch der Begriff des *corrected spacings* eingeführt (Ringquist et al., 1992). Dieses bezieht sich auf ein anderes Nukleotid der SD, nämlich ein G, welches komplementär zu Nt 1535 der 16S rRNA ist.

Die Aufgabe der SD bei der Initiation der Translation ist wohl, die 30S UE der Ribosomen an die richtige Startstelle auf der mRNA zu dirigieren. Auch bei der Elongation kann die SD eine Rolle spielen. Es wurde gezeigt, dass Wechselwirkungen zwischen SD und ASD von entscheidender Bedeutung sind beim Leserasterwechsel des RF2-Gens von *E.coli* (Weiss et al., 1987).

Die Ansicht, dass die RBS gleichzusetzen ist mit der TIR und damit SD, spacing und IT die einzigen wichtigen Elemente sind, ist noch immer weit verbreitet. Träfe dies zu, dann wäre es sehr einfach möglich, eine portable TIR, die vor beliebige Gene kloniert deren Translationsrate optimiert, zu konstruieren. Das ist jedoch nicht gelungen. Es gibt also noch weitere wichtige Elemente, die eine starke TIR ausmachen. Belegt wird dieser Sachverhalt auch durch die Tatsache, dass es in prokaryontischen Genomen deutlich mehr Kombinationen aus IT und im richtigen Abstand dazu gelegenen SD existieren als echte Translationsstartstellen (Stormo et al., 1982). Die Basenzusammensetzung echter RBS unterscheidet sich von der der Pseudo-RBS (Scherer et al., 1980; Stormo, 1986; Dreyfus, 1988). Der Bereich zwischen -20 und -1 enthält, abgesehen von der SD, signifikant weniger Gs als bei Pseudo-RBS. Es kommen bevorzugt A und U vor. Diese Zusammensetzung könnte darauf hindeuten, dass weniger stabile Sekundärstrukturen innerhalb der RBS ausgebildet werden können.

Auch dem ersten Codon nach dem IT kommt eine große Bedeutung für die Translationsinitiation zu. Die Translationsrate kann abhängig vom zweiten Codon um das 15-20fache schwanken (Looman et al., 1987; Stenström et al., 2001). Codons an der zweiten Position, welche die Translationsinitiation begünstigen, finden sich bei den Genen von *E.coli* weitaus häufiger als Codons, die mit schlechterer Effizienz der Translationsinitiation in Verbindung gebracht werden. Im allgemeinen zeigen die günstigen Codons einen hohen Adenin-Gehalt.

Ein weiterer Beweis dafür, dass SD, spacing und IT eine TIR nicht alleine ausmachen, ist die Tatsache, dass eine Reihe von Gene ganz ohne SD auskommt. Ein Beispiel ist das Gen des cI-Repressors des Bakteriophagen λ , dessen mRNA keinen untranslatierten Leader vor dem IT besitzt (Ptashne et al., 1976). Bei einigen Genen ist es auch möglich, den im Wildtyp vorhandenen, untranslatierten Leader samt SD zu entfernen, und trotzdem noch eine zwar leicht verminderte, aber effiziente Translationsrate zu erhalten (Van Etten und Janssen, 1998). In

solchen Fällen spielt das IT eine besonders große Bedeutung. Man vermutet allerdings, dass der Mechanismus der Translationsinitiation bei leaderlosen mRNAs ein anderer ist als bei „normalen“ mRNAs mit untranslatiertem Leader. Solcher leaderlosen mRNAs können möglicherweise direkt an 70S Ribosomen binden. Es wurde bereits gezeigt, dass leaderlose mRNAs mit einem AUG-Startcodon am 5' Ende in vitro einen ternären Komplex mit 70S Ribosomen bilden können (Balakin et al., 1992). Ein anderes Modell für die Initiation an leaderlosen mRNAs sieht die Erkennung des Startcodons einer solchen mRNA durch einen Komplex aus 30S UE, IF-2 und der beladenen Initiator-tRNA vor (Moll et al., 2002).

Es gibt auch Gene, die über einen untranslatierten Leader verfügen, dieser weist aber keinerlei erkennbare SD auf (Beck et al., 1978; Singleton et al., 1980). Weiterhin wurden auch Ribosomen hergestellt, deren 16S rRNA die letzten 30 Nt am 3' Ende, und damit die ASD, fehlten (Melancon et al., 1990). Trotz der fehlenden ASD konnte die Translationsinitiation weiterhin stattfinden.

Ein weiteres Regulationselement der Translationsinitiation wurde von Deutscher et al. 1989 für das *rnd*-Gen von *E. coli* beschrieben. Es handelt sich um eine PolyU-Sequenz upstream der SD, die eine aktivierende Wirkung auf die Translationsinitiation hat. Diese PolyU-Sequenz befindet sich direkt hinter einem hairpin. Diese Anordnung ähnelt einem rho-unabhängigen Terminationssignal für die Transkription. Veränderungen an der PolyU-Sequenz erhöhen tatsächlich die Transkription um den Faktor 2, haben aber gleichzeitig den Rückgang der Translationseffizienz um 95% zur Folge (Zhang und Deutscher, 1989 und 1992). Es wurde zudem festgestellt, dass die mutierten Konstrukte im in vitro Testsystem deutlich schlechter an 30S UE binden als die Transkripte des Wildtyp-Gens. Die Erklärung hierfür könnten Wechselwirkungen des ribosomalen Proteins S1 mit pyrimidinreichen Sequenzen der mRNA sein (Subramanian, 1984). PolyU-Sequenzen finden sich nur bei einigen mRNAs. Sie könnten wichtig sein bei Genen, die ansonsten nur über schwache Initiationssignale verfügen. Bei Gram-positiven Bakterien, deren Ribosomen kein S1-Protein besitzen, findet man in der Regel längere SD als bei den mRNAs gram-negativer Bakterien (Roberts und Rabinovitz, 1989; Farwell et al., 1992). Auch kann *E. coli* die mRNAs einiger Pflanzenviren erfolgreich translatieren, z.B. die RNA4 des Alfalfa Mosaik Virus oder die RNA des Tabak Mosaik Virus. Diese mRNAs besitzen in ihrer 68 Nt langen Leadersequenz (Ω -Sequenz) keine SD. Kloniert man sie in *E. coli* vor geeignete Reportergene können sie dennoch deren Translation aktivieren (Gallie et al., 1987; Gallie und Kado, 1989; Wilson et al., 1990).

Sequenzelemente, welche die Translationsinitiation regulieren, findet man nicht nur in den untranslatierten Leadersequenzen der mRNA, sondern auch downstream des IT. Sprengart et al. identifizierten 1990 eine Downstream Box (DB) genannte Sequenz, die im codierenden Bereich vieler Gene von Bakterien und Bakteriophagen zu finden ist. Die DB ist komplementär zu den Nt 1469-1483 (Anti-Downstream box, ADB) der 16S rRNA. Man findet sie in den ersten 40 Nt des codierenden Bereichs der mRNA, ihre exakte Position ist nicht so genau festgelegt wie bei der SD. Da sie sich in der codierenden Sequenz befindet muss Rücksicht auf die Aminosäurezusammensetzung des entsprechenden Proteins genommen werden. Aus diesem Grund ist die DB auch häufiger durch mismatches unterbrochen. Um einen die Translation stimulierenden Effekt zu erzielen, muss aber mindestens eine Sequenz von 4 komplementären Basen in Folge vorhanden sein.

Die DB scheint ein sehr wichtiges Signalelement zu sein. Deletion der DB des bereits erwähnten leaderlosen Gens *ci* von λ verhindert die Translation dessen mRNA (Shean und Gottesman, 1992). Auch die Translation der ebenfalls leaderlosen *dnaX*-mRNA von *Caulobacter* hängt vom Vorhandensein einer DB ab (Winzeler und Shapiro, 1997). Durch eine Erhöhung der Komplementarität der DB des Gens *galE* von *E. coli* zur ADB um ein Nukleotid konnte die Translationsinitiation um ein Vierfaches gesteigert werden. Erhöht man die Komplementarität

weiter, so ließen sich Steigerungen bis zum Fünfzehnfachen erzielen (Plumbrigde und Söll, 1989; Faxen et al., 1991). Eine elffache Zunahme der Translationseffizienz konnte durch den Austausch nur eines Nukleotids in der DB des E.coli Gens rpoH erreicht werden (Nagai et al., 1991; Yura, 1996). Auch für die cold-shock-Gene von E.coli wurde das Vorhandensein und die Wichtigkeit der DB nachgewiesen (Mitta et al., 1997, Etchegaray und Inouye, 1999).

Es ist ebenfalls möglich, die Translationseffizienz eukaryontischer Gene in E.coli durch die Erzeugung oder Verbesserung einer potentiell vorhanden DB zu steigern. Bei der menschlichen Gluthathionreduktase konnte eine Steigerung um das Siebzigfache erreicht werden (Bücheler et al., 1990).

Es ist noch unklar, auf welche Art und Weise DB und ADB interagieren. Die ADB liegt in der 16S rRNA nicht einzelsträngig vor, sondern ist in den stem einer hairpin-Struktur eingebunden. Eine direkte Basenpaarung wie bei der SD-ASD-Wechselwirkung ist daher nicht möglich (Mc Carthy und Brimacombe, 1994; O'Connor et al., 1999). Es könnte sich eine Art Tripelhelix ausbilden. Dies wurde allerdings noch nicht experimentell belegt.

Neben den bereits besprochenen Signalelementen in der Sequenz der mRNA sind auch Sekundär- und übergeordnete Strukturen von großer Bedeutung für die Translationsinitiation. Es gibt vier grundsätzliche Sekundärstrukturelemente: Helices, loops, bulges und junctions. Die Helices sind A-Form Watson-Crick-Doppelstränge. Loops, bulges und junctions enthalten keine Basenpaarungen und werden von Helices begrenzt. Im Verlauf der mRNA-Faltung werden vermutlich zunächst kleine und stabile Strukturelemente, wie die weit verbreiteten Tetraloops gebildet (Woese et al., 1990; Tinoco und Bustamante, 1999). Aus diesen Grundelementen können kompliziertere Strukturen wie Pseudoknoten, kissing-hairpins oder andere loop-loop, loop-Helix oder Helix-Helix Interaktionen entstehen. Es bilden sich ebenso Basen-mismatches, Basentripel in der großen Furche der RNA oder Basen-Nukleosid-Tripel, die in der kleinen Furche der RNA durch Wasserstoffbrückenbindung an die 2'-Hydroxylgruppen von Ribose-Ribose-Zippern entstehen. Die ungeheuere Vielzahl an möglichen Strukturen wird mehr und mehr deutlich. Durch diese Flexibilität ist es der RNA möglich, als Ribozym katalytisch aktiv zu sein (Doherty und Doudna, 2001) oder als RNA-Aptamer (Ellington und Szostak, 1990; Patel et al., 1997) beliebige Liganden zu binden. Es werden auch mehr und mehr RNAs entdeckt, die als Sensoren dienen und auf Umweltreize wie Temperaturschwankung oder das Vorhandensein bestimmter Moleküle (z.B. Vitamine) reagieren können (Narberhaus, 2002). Dies geschieht dadurch, dass es durch Umweltveränderungen wie Erwärmung, Abkühlung oder Vitaminzugabe zu einer Veränderung der Sekundärstrukturen im Bereich der RBS der mRNA kommt, wodurch diese von den Ribosomen besser oder schlechter erkannt wird.

Bei kleinen RNA-Molekülen, wie beispielsweise RNA-Aptameren, ist eine Strukturaufklärung mittels Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse sowie NMR möglich. Für größere RNA-Moleküle ist dies in der Regel nicht machbar. Grundbedingung ist, dass die RNA in einer festen Struktur vorliegt. Aber die wenigsten prokaryontischen mRNAs verfügen über feste Strukturen. Es handelt sich bei der mRNA-Faltung um einen dynamischen und kinetischen Prozess. Da bei Prokaryonten Transkription und Translation gekoppelt sind, wird die mRNA bereits kurz nachdem ihre Synthese begonnen hat in statu nascendi von Ribosomen translatiert. Sie kann sich also niemals in eine feste Struktur falten.

Das macht die genaue Vorhersage von räumlichen Strukturen äußerst schwierig. Zur Aufklärung werden Computerprogramme benutzt, die meist auf dem Algorithmus von Zuker und Stiegler (Zuker und Stiegler, 1981; Zuker, 1989 und 1994) beruhen. Diese Programme wurden im Laufe der Zeit stark verbessert, ihre Resultate stellen dennoch nur eine Annäherung an die tatsächlichen Verhältnisse dar. Zudem werden der kinetische Aspekt sowie übergeordnete Strukturen und Wechselwirkungen mit anderen Molekülen nicht berücksichtigt. Zur Ermittlung einzelsträngiger Bereiche kann man sich einzelstrangspezifischer Nukleasen bedienen, oder Chemikalien

zugeben, die nur Einzelstränge brechen. Allerdings setzen diese Methoden feste Strukturen der RNA voraus und liefern für den kinetischen Prozess der mRNA-Faltung keine verwertbaren Ergebnisse. Zur Untersuchung der Faltungskinetik einiger großer RNAs mit stabilen Strukturen, wie beispielsweise des Tetrahymena Gruppe I Ribozyms, wurden verschiedene Ansätze verwendet (Woodson, 2000). Zarrinkar und Williamson entwickelten 1994 eine Methode, die auf der kompetitiven Hybridisierung komplementärer Desoxyoligonukleotide beruht. Diese DNA-Proben können an einzelsträngige DNA-Bereiche binden wodurch diese durch RNase H verdaut werden können. Die Faltungsrate lässt sich durch den Anteil geschnittener RNA-Moleküle nach bestimmten Inkubationszeiten ermitteln. Eine weitere Methode ist das „X-ray footprinting“ der RNA (Sclavi et al., 1998). Hierbei werden in einer wässrigen Lösung durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen in kurzer Zeit eine hohe Anzahl an Hydroxyl-Radikalen erzeugt, die die RNA spalten. Alle diese Methoden wurden aber zur Untersuchung der Faltung stabiler RNAs verwendet. Für die Analyse der dynamischen Faltung der mRNA sind sie nur begrenzt einsetzbar.

Prokaryontische RBS zeigen meist ein relativ geringes Potential zur Ausbildung von Sekundärstrukturen (Ganoza et al., 1987). Es ist leicht vorstellbar, dass Sekundärstrukturen im Bereich der RBS die Bindung der SD an die ASD auf der 16S rRNA des Ribosoms behindern und somit die Translationsinitiation stören. Bei einigen Genen ist die RBS in stabile Sekundärstrukturen eingebunden. Ein Beispiel ist das coat Gen des Bakteriophagen MS2. Hier bildet sich in der RBS ein hairpin aus. Das IT befindet sich im loop, die SD aber im Stamm des hairpins. Eine starke SD kann den hemmenden Einfluss dieser Sekundärstruktur zum Teil kompensieren (de Smit und van Duin, 1994).

Auch bei einigen stark exprimierenden Genen des Bakteriophagen T7 scheint ein Zusammenhang zwischen dem Grad der mRNA-Faltung im Bereich der RBS und der Stärke der Translationsstartstelle zu bestehen. Bei den Genen 0,3; 1; 1,3; 2,5; 10; 11 und 17 fanden Helke et al. 1993 eine unstrukturierte Region (USR) auf der mRNA, die SD und IT enthält und 30-40 Nt lang ist. Währenddessen waren die RBS schwächerer Gene, wie beispielsweise die der Gene 0,4 und 0,5, laut Computerprogrammen in Sekundärstrukturen eingebunden.

Den USR der stark exprimierenden Gene geht meist ein hairpin voraus, der wichtig ist für die Effizienz der Translation. Einige dieser hairpins dienen als Schnittstelle für die RNaseIII, d.h. die dahinterliegende USR befindet sich dann am 5'-Ende der mRNA. Dies ist z.B. der Fall bei den T7-Genen 0,3; 1; 1,3 und 13. Diese USR ist für eine gewisse Zeit frei von Sekundärstrukturen und damit auch zugänglich für die initiiierenden Ribosomen.

Im Falle von polycistronischen mRNAs ist häufig ein stabiler 5'-hairpin vorhanden, der entweder dazu dienen könnte, die Faltungen zwischen upstream gelegenen Sequenzen und der dahinter liegende USR zu verhindern, wofür Energie verwendet werden könnte, die bei der Ausbildung des stabilen hairpins frei wird, oder der Wechselwirkungen mit den Ribosomen eingeht, und so die Erkennung der richtigen Startstelle erleichtert. Die T7-Gene 3,8; 10; 11 und 17 besitzen solch einen innercistronischen 5'-hairpin.

Zusätzlich zu den besprochenen Faktoren kann die Translationsinitiation auch durch die Bindung verschiedener Proteine im Bereich der Translationsstartstelle reguliert werden. Ein Beispiel wäre die Regulation der Synthese der ribosomalen Proteine. Einige dieser Proteine binden an Strukturen und Sequenzen der TIR ihrer eigenen mRNA, wenn nicht ausreichend rRNA als primärer Bindungspartner zur Verfügung steht. Dadurch wird nicht nur die Bindung der Ribosomen an die RBS blockiert, es kommt gleichzeitig zu einer Verkürzung der Lebensdauer der mRNA (Nomura et al., 1980; Nomura et al., 1984; Petersen, 1989; Philippe et al., 1995; Benard et al., 1996). In anderen Fällen bindet ein Protein an einen inhibitorischen hairpin im Bereich der TIR und stabilisiert diesen dadurch (van Duin, 1988). Als Repressor kann nicht nur

ein Protein fungieren, sondern auch eine antisense RNA. Beispielsweise wird die Translationsinitiation des Transposasegens des Insertionselementes IS10 durch die Bindung einer komplementären RNA an die RBS inhibiert (Case et al., 1990; Ma und Simons, 1990). Im hok/sok-System des Plasmids R1 wird die Translation der hok mRNA durch die sok antisense RNA inhibiert (Thisted et al., 1995).

Beim „silencing“ von Genen mittels der RNA_i-Methode macht man ebenfalls Gebrauch von antisense RNA. Bei dieser Methode kommt es nach dem Binden einer antisense RNA an die mRNA des Gens, welches man ausschalten will, zum Abbau des RNA-Doppelstranges (Hannon, 2002).

Liegt eine polycistronische mRNA vor, so kann die Translation des downstream gelegenen Gens über das Phänomen der translationellen Kopplung reguliert werden. In einigen Fällen ist die Translation des downstream gelegenen Gens vollständig von den Ribosomen abhängig, die seine TIR vom upstream gelegenen Gen her erreichen. So ist beispielsweise die Translation der T7-Gens 1,2 von der Translation des Gens 1,1 abhängig (Saito und Richardson, 1981). Eine solch starke Abhängigkeit wurde auch für die Operons der ribosomalen Proteine gefunden (Nomura et al., 1990). Bei anderen Operons ergibt sich eine geringere Abhängigkeit (Oppenheimer und Yanofsky, 1980; Schümperli et al., 1982; Little et al., 1989). Es wird häufig beobachtet, dass die Synthese von Genprodukten vom 5'-Ende zum 3'-Ende einer mRNA eines Operons abnimmt. Es gibt aber auch Beispiele, wo das nicht der Fall ist. In der frühen Region des Bakteriophagen T7 werden downstream befindliche Gene zum Teil stärker translatiert als Gene, die weiter upstream auf der mRNA liegen (Studier und Dunn, 1983).

Zur Untersuchung verschiedener Signalelemente, die für eine starke TIR wichtig sind, ist es vorteilhaft, sich der Gene lytischer Phagen zu bedienen. Viele Phagengene werden sehr stark exprimiert, da sie sich nicht an die ausgeklügelten Gleichgewichte innerhalb der Wirtszelle zu halten brauchen. Diese Gene verfügen meist über sehr starke TIR, damit sie die für den lytischen Infektionszyklus benötigten großen Proteinmengen herstellen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die TIR verschiedener Gene des Bakteriophagen T7 verwendet. Mit seinem linearen, doppelsträngigen Genom von 39937 bp gehört er zu den kleineren Vertretern der T-Phagen. Sein Genom ist bereits seit langem vollständig sequenziert und charakterisiert (Dunn und Studier, 1983; Studier und Dunn, 1983; Moffatt und Studier, 1988). T7 besitzt ca. 50 Gene, die sich anhand des Zeitpunkts ihrer Expression in drei Klassen einteilen lassen (Studier, 1972):

Klasse I

Die erste Klasse umfasst 10 Gene, die von der wirtseigenen RNA-Polymerase transkribiert werden. Diese Gene bereiten die Übernahme des Transkriptionsapparats der Wirtszelle durch den Phagen vor. Aufgrund der Konkurrenz durch die bakteriellen Gene müssen diese Gene besonders effizient exprimiert werden. Zu dieser Klasse gehören die in dieser Arbeit verwendeten Gene 0,3; 1 und 1,3.

Klasse II

Zu dieser Klasse gehören 24 Gene. Sie werden von der phageneigenen RNA-Polymerase abgelesen. Ihre Funktion ist die DNA-Replikation sowie die endgültige Stilllegung der

Proteinsynthese des Wirts mittels Inaktivierung der Wirtspolymerase und der Zerstörung der Wirts-DNA.

Klasse III

Diese Gruppe umfasst Gene, die für Strukturproteine des Virions kodieren oder an der Reifung des Phagenpartikels beteiligt sind. Auch diese Gene werden von der T7-RNA-Polymerase transkribiert. Zu dieser Klasse gehört auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene 10 und 11.

Die Gene der Klasse I, auch frühe Gene genannt, werden von der E.coli RNA-Polymerase transkribiert. Zwischen den Genen 1,3 und 1,4, am Ende der frühen Region, befindet sich ein Transkriptionsterminator, der nur von der E.coli RNA-Polymerase, nicht aber von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird (Dunn und Studier, 1980). Ein zweiter Transkriptionsterminator befindet sich zwischen den Genen 10 und 11 (Niles und Condit, 1975; McAllister und McCarron, 1977). Dieser Terminator wird von beiden Enzymen erkannt.

Die T7-mRNAs sind in der Regel polycistronisch und werden durch die RNaseIII prozessiert. Die RNaseIII ist ein Wirtsenzym, das bestimmte Sekundärstrukturen der mRNA erkennt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der SD, DB sowie von mRNA-Sekundärstrukturen als Faktoren, die eine wichtige Rolle bei der Translationsinitiation spielen. Durch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse soll gezeigt werden, dass entgegen der noch immer weit verbreiteten Ansicht (siehe z.B. Lehrbücher wie R. Knippers: „Molekulare Genetik“, 8. Auflage, Kapitel 4, Thieme Verlag; T.A. Brown: „Moderne Genetik“, Kapitel 9, 2. deutsche Auflage, Spektrum Verlag), dass SD und IT im richtigen Abstand zueinander hinreichend sind für eine starke TIR, auch andere Elemente unentbehrlich für eine effiziente Translationsinitiation sind. Diesen Sachverhalt klarzustellen ist wichtig für die Herstellung stark exprimierender Genkonstrukte. Eine Untersuchung bezüglich des Zusammenspiels unterschiedlich langer SD mit anderen, downstream gelegenen Signalelementen wurde bislang noch nicht durchgeführt.

Es existieren bislang auch keine Studien über die mögliche Funktion von hairpin-Strukturen zur Stabilisierung von USR abhängig von der Position der entsprechenden TIR innerhalb einer mRNA. Es ist ein großer Unterschied, ob sich eine TIR am Anfang einer mRNA steht (als erstes Gen einer Transkriptionseinheit oder durch Prozessierung der mRNA), oder ob es sich um eine interne Startstelle einer polycistronischen mRNA handelt.

Daher sind die in dieser Doktorarbeit dargelegten Daten von besonderem Interesse für ein tieferes Verständnis des Vorganges der Translationsinitiation.

Zur Analyse der Funktionen der SD und DB wurden unterschiedlich große Fragmente der TIR der T7-Gene 0,3; 1 und 1,3 vor geeignete Reportergene kloniert. Alle diese Gene gehören zu den frühen Genen der Klasse I. Gen 0,3 kodiert für ein Protein, welches an der Ausschaltung des wirtseigenen Restriktionssystems beteiligt ist, Gen 1 kodiert für die T7-RNA-Polymerase und Gen 1,3 für eine Ligase.

Die im Wildtyp nur sehr kurzen SD dieser Gene (4 und 5 Nt) wurde durch Basenaustausch und Baseninsertion künstlich verlängert, wobei das aligned spacing nicht verändert wurde. Es wurde nun untersucht, ob eine starke SD für eine optimale Expression der Reportergene ausreicht und den Einfluss downstream gelegener stimulierender Elemente ersetzen kann. Hierzu wurden die verschiedenen SD-Längen in Konstrukten unterschiedlicher Downstreamlängen getestet.

Zur Untersuchung der Bedeutung von stabilen 5'-Hairpin-Strukturen für die Translationsinitiation gab es bereits Studien über die TIR der T7-Gene 11; 1,1 und 1 (Sahillioglu, 1999; Jungbluth (1992; Helke et al., 1993). Alle drei Gene verfügen über USB mit davor liegenden 5'-hairpins. Durch Deletion des hairpins sank die Translationsrate aller drei Gene jeweils mindestens um den Faktor 2. Dies spricht für eine wichtige Rolle dieser hairpin-Strukturen für die effiziente Translationsinitiation. Für meine eigenen Untersuchungen benutzte ich die TIR des T7-Gens 11. Das Gen 11 gehört zu den Klasse III Genen und kodiert für ein Schwanzprotein. Es besitzt im T7-Genom keinen eigenen Promotor, seine TIR liegt also innerhalb einer polycistronischen mRNA. Zwischen den Genen 10 und 11 befindet sich der bereits angesprochene Transkriptionsterminator T ϕ . Dieser Terminator besteht aus einer stabilen hairpin-Struktur mit einer anschließenden Sequenz von 6 Uridinen. Die T7-Polymerase terminiert in 90% der Fälle die Transkription an dieser Stelle. In 10% der Fälle findet jedoch ein Überlesen des Terminators statt und die Transkription wird fortgesetzt, so dass auch das Gen 11 transkribiert werden kann. Diese Konstellation stellt sicher, dass vom Gen 10, welches für das Haupthüllprotein des Phagen kodiert, große Mengen mRNA synthetisiert werden, während vom Gen 11, dessen Genprodukt (Schwanzprotein) in weit geringeren Mengen benötigt wird, eine relativ geringe Menge an mRNA hergestellt wird.

Der Terminator T ϕ wird nicht nur von der T7-RNA-Polymerase erkannt, sondern auch von der RNA-Polymerase von E.coli. Das spielt eine Rolle, denn alle Konstrukte wurden in E.coli exprimiert. Wie bereits beschrieben verfügen viele der stark exprimierten Gene von T7 über eine USB mit davor liegendem 5'-hairpin. Im Falle des Gens 11 ist dies ebenfalls der Fall, allerdings wird der hairpin vom Terminator T ϕ gebildet. Nach der Eliminierung der Sequenz aus 6 Uridinen funktionierte T ϕ nicht mehr als Transkriptionsterminator, damit konnte die Bedeutung des weiterhin ausgebildeten hairpins für die Translationsinitiation getestet werden. Verschiedene Fragmente der TIR dieses Gens wurden bereits von Dr. Sahillioglu in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert (Sahillioglu, 1999). Bei den von ihr hergestellten Konstrukten befand sich die T7-TIR immer am Anfang der mRNA. Im Rahmen ihrer Dissertation erhielt sie Daten, die auf eine wichtige Rolle des hairpins des Gens 11 für die Translationsinitiation schließen lassen. Es wurde, wie bereits oben angesprochen, angenommen, dass die Aufgabe des hairpins entweder darin besteht, die USB im Bereich der RBS von Wechselwirkungen mit upstream gelegenen Sequenzen zu schützen, oder aber in der Ausbildung von Wechselwirkungen mit den Ribosomen, welche das Finden der Startstelle erleichtern. Da sich die TIR bei ihren Untersuchungen aber sehr weit am 5'-Ende der mRNA befand, gab es keine großen Sequenzbereiche upstream. Wenn der hairpin jedoch bereits in dieser Position eine signifikante Rolle bei der Translationsinitiation spielt, dann könnte, sofern der Abschirmeffekt von Bedeutung ist, seine Wichtigkeit im Inneren einer polycistronischen mRNA, analog zur Wildtyp-Situation im Phagen, noch größer sein. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es sich so verhält. Sollte sich kein Abschirmeffekt des hairpins nachweisen lassen, so ist anzunehmen, dass es zu direkten Kontakten mit den Ribosomen kommt.

II.1 Material

II.1.1 Laborausstattung

Brutschränke:	Desaga, Heidelberg; Ehret
Elektrophoreseapparaturen:	institutseigene Werkstatt
Eppendorfschüttler Typ 5432:	Migge, Heidelberg
Entwicklermaschine:	Agfa Curix 60
Feinwaage:	Sartorius Typ 2492, Göttingen
Geltrockner:	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Gradientenzapfgerät:	Isco D
Grobwaage:	Sartorius Typ 2254, Göttingen
Kassetten für Autoradiographie:	GOOS, Heidelberg und Amersham, England
Kleinbildkamera:	Nikon F-2 (mit 55 mm Objektiv)
Kühlfalle für Vakuumpumpe:	Bachofer, Reutlingen
Kühlschränke:	Bosch, Liebherr
Kühlzentrifugen:	Sorvall RC2-8 Sorvall RC5-B Sorvall RC5-C
Mikrowellenherd:	Philips cooktronic 8910, Schweden
Netzgeräte:	LKB Typen 2103 und 2197 Bromma, Schweden Vokam Typ SAE 2761, Shandon, London
pH-Meter:	Digital pH-Meter Typ 646, Knick, Berlin
Photometer:	Carl Zeiss Typ PM QIII, Oberkochen LKB Ultraspec II, Bromma, Schweden Hitachi U-1100
Pipetman:	Gilson
Rundgelapparatur:	Hölzel, Laborgeräte, Dorfen
Schüttelinkubatoren:	HT Infors Typen KF4 und RS1T, Basel
Szintillationszähler:	Wallac 1409, Turku, Finnland
Speed-Vac:	Savant Speed-Vac Concentrator
Sequenziermaschine:	ABI310, Applied Biosystems
Thermocycler:	Biomed Thermocycler 60
Tiefkühlschränke (-20°C):	Bosch, Linde
Tiefkühltruhen (-70°C):	Colora UK 85-300 T und Colora UF 80-450 S
Tischzentrifugen:	Eppendorf Typ 5412 und 5414
Ultrazentrifugen:	Beckman Typen L8-55 und L8-70, Sorvall OTD-75B
UV-Platten:	Typ C62, Ultraviolet Prod. inc., San Gabriel USA N90 (254 nm), K. Benda
Vakuumpumpe:	A. Pfeiffer GmbH, Wetzlar
Vortex:	Heidolph Typ REAX 1
Wasserbäder:	Julabo U3/6A, Juchenheim Labortechnik KG, Seelbach Gesellschaft für Labortechnik (GFL) mbH, Hannover

II.1.2 Verbrauchsmaterial

DEAE-Zellulose-Papier:	Typ DE-81, Whatman
Dialysierschläuche:	Visking Typ 20/32, Wandstärke 0,02 mm, Durchmesser 16 mm, Breite 25 mm, Roth, Karlsruhe
Einmalkanülen:	diverse Größen, Terumo, Belgien B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalküvetten:	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Eppendorf-Reaktionsgefäße:	0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml, Eppendorf Gerätebau, Hamburg und Sarstedt, Nümbrecht (nur 1,5 ml)
Filme:	Kodak XAR-5 (Röntgenfilme)
Filmentwickler:	Roentoroll HC, Tetenal (Röntgenfilm)
Filmfixierer:	Superfix MRP, Tetenal (Röntgenfilm)
GF/A-Filter (2,5 cm):	Whatman
Mikroschlauch:	0,5 mm Innendurchmesser, Portex, England
Pipettenspitzen (für Pipetman):	Tipac C20/TJ, Gilson, France Gilson C10 Crystal Tips
Vials für Scintillationszähler:	Zinsser Analytic, Frankfurt
Whatman-Papier:	Typ 3MM, Whatman
Zentrifugenröhrchen (UZ):	Quick-Seal, Beckmann

II.1.3 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien waren von der Qualität p. a. und wurden von den Firmen Merck, Darmstadt, Serva, Heidelberg und Roth KG, Karlsruhe bezogen.

Agarose:	Seakem ME- und LE-Agarose, A. Johnson & Co. GmbH
Bovine Serum Albumin (BSA):	Sigma, St. Louis, USA
Bromphenolblau:	Serva, Heidelberg
Orange G:	Fluka, Neu Ulm
Xylencyanol/FF:	Fluka, Neu Ulm

II.1.4 Medien, Puffer, Stocklösungen

Alle verwendeten Medien, Puffer und Stocklösungen sind im Methodenteil aufgeführt.

II.1.5 Enzyme

II.1.5.1 Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz	isoliert aus	bezogen von
BamHI	5' G↓GATCC 3'	Bacillus amyloliquefaciens H	NEB
Bpu1102I	5' GC↓TNAGC 3'	Bacillus pumefaciens	Fermentas
BsmI	5' GAATGCN↓ 3'	Bacillus stearothermophilus	NEB
EcoRI	5' G↓AATTC 3'	Escherichia coli RY 13	NEB
HindIII	5' A↓AGCTT 3'	<u>Haemophilus influenzae</u>	NEB
MfeI	5' C↓AATTG 3'	Mycoplasma fermentans	NEB
NcoI	5' C↓CATGG 3'	Nocardia corallina	NEB
XhoI	5' C↓TCGAG 3'	Xanthomonas holcicola	NEB

II.1.5.2 weitere Enzyme

Calf Intestinal Phosphatase (CIP):

RNase A (aus Rinderpankreas):

T4-DNA-Ligase:

T4-DNA-Polymerase:

T4-Polynukleotidkinase (PNK):

T7-RNA-Polymerase:

Boehringer Mannheim

Serva, Heidelberg

Biolabs, Beverly, Mas., USA

Biolabs, Beverly, Mas., USA

Boehringer Mannheim

Biolabs, Beverly, Mas., USA

II.1.6 Radioisotope

[α -³⁵S]dATP, ³⁵S-Methionin und ¹⁴C-UTP wurden von Amersham und Buchler (Braunschweig) bezogen.

II.1.7 Bakterienstämme

Escherichia coli **JM101**: : *supE*, *thi*, Δ (*lac-proAB*), [*F'*, *traD36*, *proAB*+, *lacIqZ* Δ *M15*], λ^-

Escherichia coli **DH5alpha**: *F*-, ϕ 80*dlacZ* Δ *M15*, *endA1*, *recA1*, *hsdR17* (*r_k⁻*, *m_k⁺*), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)*U169*, λ^-

Escherichia coli **MC1061**: *F* *araD139* Δ (*ara-leu*)7696 *galE15 galK16* Δ (*lac*)*X74 rpsL* (*Str^r*)*hsdR2*(*r_k⁻*, *m_k⁺*)*mcrA*, *mcrB1*

II.1.8 Vektoren

pDS5-ND: Bujard et al., 1987;

pDS5-Derivat mit dem T5-Promotor N25 und dem lac-Operator O3O4, Δ cat.

pDS5-NC: pDS5-Derivat mit dem T5-Promotor N25 und dem lac-Operator O3O4, cat als alleiniges Reportergen.

pDS5-NcD: pDS5-Derivat mit dem T5-Promotor N25 und dem lac-Operator O3O4, verkürztes cat vor dhfr

pDS5-TcD: pDS5-Derivat mit einem T7-Promotor und dem lac-Operator O3O4, verkürztes cat vor dhfr

II.2 Methoden

II.2.1 Restriktionsverdau

Um aus einem DNA-Molekül ein bestimmtes Fragment zu gewinnen, wurden Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Mit Typ II-Restriktionsenzymen können DNA-Moleküle an spezifischen Stellen geschnitten werden. Kurze Sequenzen auf der DNA (meist 4-6 bp) dienen als Erkennungsstellen. An den Schnittstellen können glatte Enden (blunt ends) oder überhängende Enden (sticky ends) entstehen.

II.2.1.1 Analytischer Restriktionsverdau

Für den analytischen Restriktionsverdau werden geringe Mengen an DNA eingesetzt (ca 0,1-0,2 µg). Das Volumen eines solchen Verdau betrug in der Regel 10 µl. Durch spezielle Enzympuffer wurde für ein optimales Milieu für die Restriktionsenzyme gesorgt.

Wurde für den Verdau Miniprep-DNA eingesetzt, die nach der Birnboim-Doly-Methode (II.2.10.1) isoliert wurde, musste RNase A (2µg) hinzugegeben, um die verunreinigende RNA zu entfernen. Diese wird in ihren doppelsträngigen Bereichen ebenfalls von Ethidiumbromid gefärbt und kann DNA-Banden überdecken.

Die Inkubation wurde, sofern keines der beteiligten Enzyme ein anderes Temperaturoptimum hatte, bei 37°C durchgeführt. Zur Festlegung der Inkubationsdauer wurden die Aktivität des Enzyms, die Menge an DNA sowie die Anzahl vorhandener Schnittstellen berücksichtigt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1/10 Volumen 10x DNA-Probenpuffer zum Verdau hinzugegeben.

RNaseA-Stocklösung:

Konzentration: 2 mg/ml

10x DNA-Probenpuffer für Agarosegelproben:

60% Saccharose in 10x Loening-Puffer
1 Spatelspitze Orange G / 50 ml
1 Spatelspitze Xylencyanol / 50 ml
1 Spatelspitze Bromphenolblau / 50 ml

10x DNA-Probenpuffer für Polyacrylamidgelproben:

60% Saccharose in 10x TBE-Puffer
1 Spatelspitze Orange G / 50 ml
1 Spatelspitze Xylencyanol / 50 ml
1 Spatelspitze Bromphenolblau / 50 ml

II.2.1.2 Präparativer Restriktionsverdau

Für einen präparativen Restriktionsverdau wurden größere DNA-Mengen eingesetzt als für den analytischen Verdau (0,5-1 µg). Das Volumen war daher ebenfalls größer (20-50 µl). Verdaut wurde meist über Nacht, um eine vollständige Umsetzung der DNA zu gewährleisten.

II.2.2 Gelelektrophoretische Methoden

II.2.2.1 Gele zum Auftrennen von DNA

Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrats besitzen alle DNA-Moleküle eine einheitliche Ladungsdichte. Daher ist es möglich, unterschiedlich lange DNA-Moleküle anhand ihrer unterschiedlichen Formfaktoren voneinander zu trennen. Es wurden zu diesem Zweck Agarosegele und 8% PAA-Gele verwendet.

Die Standard-Taschengröße für analytische Gele betrug 4 mm x 2 mm x 2 mm = 16 mm³ bei Agarosegelen und 4 mm x 1 mm x 5 mm = 20 mm³ bei 8% PAA-Gelen. Für die analytischen Verdau reicht dies aus. Bei den präparativen Verdau wurden entsprechend des Probenvolumen mehrere Stege des Kammes mit Tesafilm zusammengeklebt.

II.2.2.1.1 Agarosegele

Es wurden meist 1%ige oder 3%ige Agarosegele verwendet, in wenigen Fällen auch 2%ige. 1% Agarosegele wurden für die Auftrennung hochmolekularer DNA-Moleküle (700 bp bis einige 1000 bp) verwendet. 3% Agarosegele dienten aufgrund ihrer geringeren Porengröße zur Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente bis zu 700 bp. 2% Agarosegele stellen ein Mittelding zwischen den beiden anderen Varianten dar.

Die Agarosegele wurden auf eine Glasplatte mit der Grundfläche 10 cm x 8 cm gegossen. Ein Auslaufen des Gels wurde durch die Oberflächenspannung der Agaroselösung verhindert. In die noch flüssige Agaroselösung wurde der Kamm eingesetzt.

Als Laufpuffer für die Agarosegelelektrophorese wurde 1x Loening-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wurde bei konstant 200 mA (1% Agarosegele) bzw konstant 250 mA (3% Agarosegele) durchgeführt.

10x Loening-Puffer pH 7,6:

0,36 M Tris HCl

0,3 M NaH₂PO₄ x H₂O

0,01 M EDTA*Na₂ x H₂O

II.2.2.1.2 8% Polyacrylamidgele

Aus Acrylamid- und Bisacrylamidmonomeren wird mit Hilfe freier Ammoniumpersulfatradikale (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Mediator ein Polymer hergestellt. Diese Matrix dient zur Auftrennung von kurzen DNA-Molekülen (vergl. 3% Agarosegele). Der wässrige Acrylamidansatz wurde zwischen 2 Glasplatten mit der Fläche von 17 cm x 20 cm gegossen, die durch 0,1 mm dicke Spacer voneinander getrennt waren. Zum Abdichten der Glasplatten wurde eine 1% wässrige Agarlösung verwendet. Der Kamm wurde in die unpolymersierte Lösung eingesteckt und nach der Polymerisation wieder entfernt. Die Elektrophorese erfolgte für ca 1 h bei konstant 200 V.

Gelansatz:

3,5 ml 10x TBE
9,3 ml Acrylamid (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
22 ml H₂O
400 µl APS
40 µl TEMED

10x TBE-Puffer:

Tris: 0,89 mM
Borsäure: 0,89 mM
Na₂EDTAH₂O: 20 mM

II.2.2.1.3 Anfärben von dsDNA

Ethidiumbromid ist ein fluoreszierendes Agens, das sowohl an DNA als auch an RNA bindet, indem es zwischen zwei Basenpaare interkaliert. Allerdings ist die Affinität des Farbstoffs zu RNA geringer. Im UV-Licht fluoreszieren die Nukleinsäure-EthBr-Komplexe stärker als das EthBr alleine. Die Nukleinsäure überträgt das absorbierte UV-Licht dabei auf den Farbstoff, der ein orangerotes Licht emittiert.

Für die Färbung der DNA-Gele wurde eine wässrige EthBr-Lösung mit der Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Die Gele wurden für ca 8 min unter Schütteln in der Färbelösung inkubiert und nach kurzem Entfärben in H₂O_{VE} fotografiert.

II.2.2.2 Gele zum Auftrennen von Proteinen

Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Proteine werden, bevor man sie auf das Gel aufträgt, mittels Hitze und SDS-Zugabe denaturiert. SDS bindet oberhalb einer Konzentration von 0,3% in einer Stöchiometrie von etwa einem SDS-Molekül pro Aminosäurerest an die Proteine. Diese werden dadurch negativ durchgeladen, die Ladungsdichten sind nun für die meisten Proteine fast gleich. Disulfidbrücken werden durch Zugabe eines Reduktionsmittels wie β-Mercaptoethanol gelöst. Nun können die Proteine auf dem SDS-PAA-Gel gemäß ihrer Länge aufgetrennt werden.

Für die SDS-PAGE wird neben dem Trenngel, in dem die Proteine aufgetrennt werden, noch ein Sammelgel gegossen. Dieses dient zum Fokussieren der Proben. Es hat einen pH-Wert von 6,8. Bei diesem pH besitzen die im Elektrophoresepuffer enthaltenen Glycinat-Ionen nur eine geringe Mobilität, da sie nur zu einem geringen Teil geladen sind. Die Chloridionen, die ebenfalls im Puffer enthalten sind, wandern durch ihre hohe Ladungsdichte sehr schnell. Zwischen den Cl^- Ionen und den Glycinat-Ionen entsteht daher eine Zone mit geringer Feldstärke, in der die Proteinfront fokussiert wird. Beim Übergang in das Trenngel findet ein pH-Sprung statt, von 6,8 auf 8,8. Die Glycinat-Ionen sind nun zum Großteil geladen und überholen die Proteinfront. Die Proteine werden nun aufgrund ihrer Größe im dichteren Trenngel aufgetrennt.

Das SDS-PAA-Gel wurde folgendermaßen gegossen: Das Trenngel wurde zwischen zwei durch 0,1 mm dicke Spacer getrennte Glasplatten von 17 cm x 20 cm gegossen. Zur Glättung der Oberfläche wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{VE}}$ überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Taschen zum Auftragen der Proben wurden auf zwei verschiedene Weisen erzeugt. Entweder wurde ein Kamm verwendet, der nach dem Polymerisieren wieder entfernt wurde, und dessen Zähne die Taschen bilden, oder es wurde ein Kamm verwendet, der nach dem Polymerisieren im Gel verblieb. In letzterem Fall wurde das Sammelgel nicht ganz bis zum oberen Rand der Ohrenplatte gegossen (nur bis ca 5 mm unter dem Rand) und die Zwischenräume zwischen den Zähnen des Kamms bildeten die Wände der Proben tasche.

Für die Elektrophorese wurde 1x TAGL verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für 2,5-3 h bei 40 mA, bzw. über Nacht bei 6°C und 80 V konstant.

Ansatz für das Trenngel:

10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{VE}}$
 7,5 ml Lower Tris pH 8,8
 12,5 ml Acrylamid (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
 100 µl 10 % APS
 50 µl TEMED

Ansatz für das Sammelgel:

6,2 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{VE}}$
 2,5 ml Upper Tris pH 6,8
 1,4 ml Acrylamid (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
 50 µl 10 % APS
 100 µl TEMED

4x Lower Tris:

1,5M Tris/HCl pH 8,8
 0,4% SDS

4x Upper Tris:

0,5M Tris/HCl pH 6,8
 0,4% SDS

10x TAGL:

250 mM Tris
 2 M Glycin
 1% SDS

Vorbereitung der Probe:

Aus einer E.coli-ÜNK wurden 0,5 ml entnommen und die Zellen abzentrifugiert. Zum Pellet wurde 40 µl Proteinprobenpuffer gegeben. Die Proben wurden für 15-20 min geschüttelt und danach für 10 min aufgekocht.

Proteinprobenpuffer (PROTRI):

25% 4x Upper Tris
20% Glycerin
3% SDS
3% β -Mercaptoethanol
1 Spatelspitze Bromphenolblau

Färben der SDS-Proteingele:

Zum Sichtbarmachen der einzelnen Proteinbanden wurden die Gele zunächst kurz in der Färbelösung in der Mikrowelle gekocht und 15 min bei RT stehen gelassen. Danach wurde die Färbelösung entfernt und das Gel in Entfärber aufgeköcht und mindestens 15 min bei RT stehen gelassen. Der verwendete Farbstoff, Coomassie-blue, bleibt an die Proteine gebunden, während sich der Gelhintergrund wieder entfärbt.

Färbelösung:

0,1% Coomassie Brilliant Blue R250
in Entfärbelösung

Entfärbelösung:

10% Essigsäure

Dokumentation:

Nach kurzem Wässern wurden die Gele auf Whatmann 3MM-Papier überführt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Anschließend wurden sie 30-40 min bei 65°C auf einem Gelrockner unter Vakuum getrocknet.

II.2.3 Elution von DNA aus Agarose- und PAA-Gelen

II.2.3.1 Elektroelution

Nach einem präparativen Restriktionsverdau und der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente mussten die interessierenden DNA-Fragmente aus dem Gel zur weiteren Verarbeitung zurückgewonnen werden. Bei der Elektroelution wurde die DNA zunächst an DEAE-Cellulose gebunden und anschließend mit einer hochkonzentrierten Salzlösung unter Hitze heruntergewaschen. Zu diesem Zweck wurden die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Glasröhrchen (abgesägte Pasteurpipette) überführt. Das Röhrchen wurde auf einer Seite mit DEAE-Cellulose verschlossen. Mit 1/2x TBE aufgefüllt und in einer Rundgelapparatur fixiert. Die Elektrophorese der DNA aus dem Gel-Stück auf die DEAE-Cellulose wurde für 2 h bei 200V konstant durchgeführt. Danach erfolgten drei Waschschrte (10 s in Ethanol, 10 s in 1x TBE, 10 s in Ethanol). Zwischen den Waschschrten wurden die DEAE-Cellulose-Filter kurz luftgetrocknet. Der so behandelte Filter wurde in ein 0,5 ml Eppendorftube überführt, welches ein Loch am Boden aufwies. Es wurden 30 μ l 1,5 M NaCl in 1x TE dazu gegeben. Dieses Gefäß wurde in ein 1,5 ml Eppendorftube gestellt und 2x für je 10 min bei 65°C inkubiert, um die DNA mit Hilfe der Salzlösung vollständig von der DEAE-Cellulose zu lösen. Die DNA wird hierbei von den negativen Chloridionen verdrängt. Nach jeder Inkubationszeit wurde die DNA-haltige Salzlösung durch das Loch in das größere Eppendorfgefäß zentrifugiert. Die so erhaltene DNA-Lösung wurde mit H₂O verdünnt und mit Ethanol gefällt (siehe II.2.4.1).

10x TBE:
siehe Punkt II.2.2.1.2

10x TE:
0,1 M Tris/HCl pH 7,5
0,01 M EDTA

II.2.3.2 Elution mit dem NucleoSpin Extract Kit

Durchführung:

- 1) Ausschneiden der DNA-Bande aus dem Agarosegel
- 2) 300 µl Puffer NT1 für je 100 mg Agarose zugeben
- 3) Inkubation für 10 min bei 50°C, alle 2-3 Minuten vortexen
- 4) Überführung der Probe in ein NucleoSpin-tube, dieses in 2 ml Eppendorfgefäß stellen
- 5) Zentrifugation für 60 s bei 6000 g
- 6) 2x Zugabe von 700 µl NT3-Puffer, Zentrifugation jeweils für 60 s mit maximaler Geschwindigkeit
- 7) Zentrifugation für 60 s mit max. Geschwindigkeit um letzte Pufferreste zu entfernen
- 8) NucleoSpin-tube in frisches Eppendorfgefäß setzen, 50 µl Elutionspuffer zugeben und für 60 s mit max. Geschwindigkeit zentrifugieren

II.2.4 Fällung von Nukleinsäuren

II.2.4.1 Fällung von DNA mit Hilfe von Ethanol, Isopropanol, n-Butanol

Die DNA-Lösung wird auf eine Salzkonzentration von 0,2 M mit NaCl oder KAc gebracht. Danach wird der Alkohol zugegeben. Wird Ethanol verwendet, so wird eine Endkonzentration von 70% benötigt. Im Falle von Isopropanol genügt eine Endkonzentration von 40%. Bei Verwendung von n-Butanol wurde das 10fache Volumen hinzugegeben. Während der Zentrifugation fällt die DNA als Salz aus. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde das Präzipitat in der Regel mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und im gewünschten Volumen eines Puffers oder Wasser aufgenommen.

II.2.4.2 Fällung von radioaktiv markierter RNA mit Hilfe von Perchlorsäure

Zur Quantifizierung der mRNA-Synthese meiner Konstrukte wurde ein zellfreies in vitro Transkriptions-/Translationssystem (II.2.14) verwendet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,3 M HClO₄ gestoppt. Dies führt zu einer Präzipitation der synthetisierten RNA.

II.2.5 Herstellung synthetischer Oligonukleotide

Die verwendeten Primer und andere Oligonukleotide wurden im ZMBH hergestellt oder von den Firmen MWG und Thermo Hybaid bezogen. Sie waren einzelsträngig und besaßen kein 5'-Phosphat.

II.2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mit Hilfe der PCR wurden gezielt Veränderungen in DNA-Sequenzen eingeführt. Es wurden synthetisierte Primer verwendet, die mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase verlängert wurden. Verwendet wurde die HotStarTaq von Qiagen.

Ein PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

82,5 µl H₂O_{dd}
10 µl PCR-Puffer
2 µl NTP (10 mM)
2 µl Primer 1 (0,1-0,5 µM)
2 µl Primer 2 (0,1-0,5 µM)
0,5 µl HotStarTaq
1 µl DNA-Template (< 1 µg)

PCR-Programm:

15 min 95°C
30 x: - 1 min 94°C
 - 1 min 58°C
 - 1 min 72°C
10 min 72°C

II.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Vektor

II.2.7.1 Präparation des Vektors

II.2.7.1.1 Verdau des Vektors

Der verwendete Expressionsvektor musste vor der Einklonierung des DNA-Fragments mit Hilfe von Restriktionsenzymen aufgeschnitten werden. Wurde nur ein Enzym mit nur einer Schnittstelle verwendet, so wurde der Vektor linearisiert. Bei der Verwendung von zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen wurde ein Vektorstück herausgeschnitten. Für den Verdau wurde ca 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Inkubiert wurde über Nacht bei der für die verwendeten Enzyme optimalen Temperatur (in der Regel 37°C).

II.2.7.1.2 Dephosphorylierung eines linearisierten Vektors

Bei der Ligation eines Inserts in einen linearisierten Vektor ist es wahrscheinlich, dass dieser religiert, ohne ein Insert aufgenommen zu haben. Um die Anzahl religierter Vektoren möglichst klein zu halten, wurde am linearisierten Vektor die 5'-Phosphatgruppe mit Hilfe des Enzyms Calf Intestinal Phosphatase (CIP) entfernt. Ohne die 5'-Phosphatgruppe ist es der T4-Ligase nicht mehr möglich, die beiden Vektorenden zu religieren.

Dephosphorylierungsansatz:

15 µl linearisierter Vektor (ca. 30 pmol)
5 µl 10x CIP-Puffer
1 U CIP
H₂O_{dd} ad 50 µl

10x CIP-Puffer:

500 mM Tris/HCl pH 9
10 mM MgCl₂
1 mM ZnCl₂
10mM Spermidin

Es wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Enzym durch Zugabe von EDTA (1 mM Endkonzentration), SDS (0,5% Endkonzentration) und 15 minütiges Erhitzen auf 68°C inaktiviert. Durch eine anschließende Ethanolfällung (II.2.4.1) wurde das Volumen verringert. Das Endvolumen wurde so gewählt, dass eine Konzentration von ca. 2 pmol/µl erreicht wurde.

II.2.7.2 Präparation des Inserts

Wurden synthetisierte Oligonukleotide für die Klonierung verwendet, so mussten diese zuerst hybridisiert und anschließend phosphoryliert werden.

II.2.7.2.1 Hybridisieren von Oligonukleotiden

Hybridisierungsansatz:

Je 1 µl Oligonukleotide (10 µg/µl)
98 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,5

Die Hybridisierung erfolgte durch Inkubation bei 65°C für 10 min und anschließender Inkubation von 10 min bei RT

II.2.7.2.2 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Phosphorylierungsansatz:

12 µl 10x PNK-Puffer
2 µl hybridisierte Oligonukleotide
2 µl 100 mM ATP
2 µl PNK
H₂O_{dd} ad 20 µl

Die künstlich synthetisierten Oligonukleotide besitzen keine 5'-Phosphatgruppe. Für eine Ligation war eine 5'-Phosphatgruppe an mindestens einem der Enden der zu ligierenden DNA-Moleküle notwendig. Die Phosphorylierung erfolgte mit Hilfe des Enzyms Polynukleotidkinase aus T4.

Nach einer Inkubationszeit von 50 min bei 37°C wurde das Enzym durch 15 minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 69°C inaktiviert.

II.2.8 Vektor-Insert-Ligation

Bei den von mir durchgeführten Vektor-Insert-Ligationen handelte es sich um sticky-end-Ligationen. Die Reaktion wurde vom ATP-abhängigen Enzym T4-Ligase katalysiert. Das Verhältnis von Vektormolekülen zu Insertmolekülen entsprach etwa 2:1. Eine zu hohe Konzentration von Insertmolekülen würde die Bildung von Insert-Dimeren begünstigen. Es wurde entweder für 30-60 min bei RT oder über Nacht bei 16°C ligiert.

Ligationsansatz:

5 µl Insertfragment (ca. 1 pmol)
1 µl aufgeschnittener Vektor (ca. 2 pmol)
4 µl 5x Ligationspuffer
1 µl T4-Ligase
H₂O ad 20 µl

Nach der Inkubation wurde der Ansatz auf 50 µl aufgefüllt mit H₂O_{dd}. Danach erfolgte eine Fällung mit dem 10fachen Volumen n-Butanol (II.2.4.1). Das Präzipitat wurde in 10 µl H₂O_{dd} aufgenommen. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um Salze zu entfernen, die bei der folgenden Elektroporation stören könnten.

II.2.9 Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA

Es gibt verschiedene Methoden Plasmid-DNA in Bakterienzellen einzuschleußen. Verwendet wurde die Methode der Elektroporation. Ca. 10 ng Plasmid-DNA wurden zu entsprechend präparierten Zellen (II.2.9.1) gegeben. Die Zellen wurden dann einem elektrischen Puls ausgesetzt, der die Zellen durchlässiger für die DNA macht. Nach einer Erholungszeit von 30-60 min in einem LB-Medium mit 1% Glukose konnte der Transformationsansatz auf Ampicillin-haltigen (100µg/ml) Agar-Platten ausplattiert werden. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB-Medium:

10g Bactotrypton
10g NaCl
5 g Hefeextrakt
H₂O_{VE} ad 1 l

II.2.9.1 Herstellung elektrokompetenter E.coli-JM101-Zellen

400ml LB-Medium wurden mit einer 4 ml ÜNK des E.coli-Stamms JM101 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 im Schüttler inkubiert. Im folgenden wurde bei einer Temperatur von 0°C-4°C weitergearbeitet. Die Zellen wurden abzentrifugiert, 2x mit 400 ml H₂O_{VE} gewaschen, jeweils zentrifugiert, danach in 40 ml einer wässrigen 10% Glycerinlösung aufgenommen, nochmals zentrifugiert, in 400 µl der 10%igen Glycerinlösung aufgenommen und in Aliquots von je 40 µl aufgeteilt und bei -70°C gelagert.

II.2.9.2 Elektroporation

Zu einem 40 µl Aliquot der elektrokompenten Zellen (II.2.9.1) wurde ca. 10 ng Plasmid-DNA zugegeben. Das Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und im Elektroporator einem elektrischen Puls ausgesetzt (2,5 kV; 25 µF; 200 Ohm). Die Bakteriensuspension wurde danach sofort in LB-Medium mit 1% Glukose überführt. Nach einer Regenerationszeit von 30-60 min wurden 100-200 µl des Transformationsansatzes auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (100 µg Ampicillin/ml LB-Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

II.2.10 Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmiden aus ÜNK transformierter Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Hierbei werden die Zellen durch Zugabe von NaOH und SDS zerstört, Proteine und DNA werden denaturiert. Die große chromosomale DNA von E.coli zerfällt auf Grund von mechanischen Scherkräften in kleine Fragmente und liegt dann nicht mehr ringförmig vor. Im Gegensatz zur geschlossenen Plasmid-DNA, deren Einzelstränge sich auf Grund ihrer räumlichen Nähe sehr schnell wieder finden und renaturieren, finden sich die Einzelstränge der chromosomalen DNA-Fragmente nur sehr langsam. Bei der folgenden Fällung präzipitiert vornehmlich die Plasmid-DNA.

II.2.10.1 Minipräp nach Birnboim und Doly

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

- 1) Zentrifugation von 1,5 ml einer E.coli ÜNK für 2 min bei 9000 Upm
- 2) Resuspendieren des Bakterienpellets in 100 µl Lösung I
- 3) Inkubation bei 0°C für 5 min
- 4) Zugabe von 200 µl frisch zubereiteter Lösung II, mischen durch 2x drehen um 180°
- 5) Inkubation bei RT für 2 min
- 6) Zugabe von 150 µl Lösung III, 10 s auf dem Kopf gestellt vortexen
- 7) Inkubation bei 0°C für 5 min
- 8) Zentrifugation bei 4°C und 13000 Upm für 5 min
- 9) Überführen des Überstandes in neues Eppendorfgefäß
- 10) Zugabe von doppeltem Volumen absoluten Ethanol, gut mischen
- 11) Inkubation für 2 min bei RT
- 12) Zentrifugation bei 4°C und 13000 Upm für 5 min
- 13) Waschen des DNA-Präzipitats mit 1 ml 70% Ethanol
- 14) Zentrifugation bei 4°C und 13000 Upm für 5 min
- 15) Trocknen des Pellets, Aufnahme in 30 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,5

Lösung I:
50 mM Glukose
25 mM Tris/HCl pH 8
10 mM EDTA

Lösung II:
0,2 M NaOH
1% SDS

Lösung III:
3 M NaAc pH 4,8

II.2.10.2 Minipräp nach dem SeqLab-Laccone-Protokoll

- 1) Zentrifugation von 2-5 ml ÜNK für 10 min bei 4000 Upm
- 2) Resuspendierung des Bakterienpellets in 100 µl Resuspendierungspuffer RE
- 3) Zugabe von 200 µl Lysepuffer LY, sanftes Über-Kopf-Schwenken
- 4) Inkubation für maximal 5 min bei RT
- 5) Zugabe von 150 µl Neutralisierungspuffer NE, sanftes Über-Kopf-Schwenken
- 6) Inkubation für 5 min bei RT
- 7) Zentrifugation bei 14000 Upm für 30 min, Überführung des Überstandes in neues Eppendorfgefäß
- 8) Zugabe von 1 ml absoluten Ethanol, gut mischen
- 9) Zentrifugation für 20 min bei 14000 Upm
- 10) Waschen des DNA-Präzipitats mit 1 ml 70% Ethanol
- 11) Zentrifugation für 5 min bei 14000 Upm, Trocknen des Pellets, Aufnahme in 30 µl H₂O_{dd}

II.2.10.3 Maxi präp

- 1) Zentrifugation von 400 ml einer E.coli-ÜNK für 15 min bei 8000 Upm
- 2) Resuspendieren des Bakterienpellets in 15 ml Lösung I
- 3) Inkubation bei 0°C für 45 min
- 4) Zugabe von 30 ml frisch angesetzter Lösung II
- 5) Inkubation bei 0°C für 5 min
- 6) Zugabe von 22,5 ml Lösung III
- 7) Inkubation bei 0°C für 60-90 min
- 8) Zentrifugation bei 4°C und 9000 Upm für 45-60 min
- 9) Überstand mit dem 2,5fachen Volumen absoluten Ethanol versetzen
- 10) Inkubation bei -20°C für 60 min
- 11) Zentrifugation bei 4°C und 9000 Upm für 20 min
- 12) Pellet in 4 ml Lösung IV aufnehmen
- 13) Zugabe von 10 ml absoluten Ethanol
- 14) Fällung für 30-45 min bei -20°C
- 15) Zentrifugation für 15-20 min bei 10000 Upm
- 16) Pellet in 1 ml Lösung IV resuspendieren
- 17) Zugabe von 2,5 ml absoluten Ethanol
- 18) Fällung für 30 min bei -20°C
- 19) Zentrifugation für 20 min bei 10000 Upm
- 20) DNA-Pellet trocknen und in 2 ml 10mM Tris/HCl lösen

Lösung I, II, III:

Siehe II.2.10.1

Lösung IV:

0,1 M NaAc

50 mM Tris/HCl pH 8

II.2.11 Reinigung von Plasmid-DNA über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Zum Einsatz in einem *in vitro* Proteinbiosynthesystem muss Plasmid-DNA sehr rein sein. Daher wurde Plasmid-DNA, die mittels Maxipräp gewonnen wurde, durch isopycnische CsCl-Dichtegradientenzentrifugation von den verbliebenen Kontaminationen gereinigt. Diese Methode basiert auf der unterschiedlichen Bindungskapazität der DNA-Formen für Ethidiumbromid. Lineare DNA, d.h. Bruchstücke der chromosomalen DNA, entwinden sich bei der Interkalation von EthBr, es entsteht keine Spannung. In zirkulär geschlossener Plasmid-DNA wird durch die Interkalation von EthBr eine Spannung erzeugt, die einer weiteren Einlagerung von EthBr entgegenwirkt. Plamid-DNA kann dadurch nicht so viel EthBr aufnehmen wie lineare DNA. Sie besitzt daher eine etwas höhere Dichte und läuft im CsCl-Dichtegradient weiter als die lineare DNA. RNA sedimentiert auf den Grund des Zentrifugenröhrchens, Proteine schwimmen am oberen Rand.

Maxipräp siehe II.2.10.3, Schritte 1-8. Danach wie folgt:

- 1) Überstand mit 0,7 Volumina Isopropanol versetzen
- 2) Inkubation für 30 min bei 0°C
- 3) Zentrifugation bei 4°C und 9000 Upm für 30 min
- 4) DNA-Pellet aufnehmen in 4 ml 10 mM Tris/HCl
- 5) Zugabe von CsCl zu DNA-Lösung im Verhältnis 1:1, d.h. 4 g CsCl zu 4 ml DNA-Lösung
- 6) Zugabe von 800 µl Ethidiumbromid (10mg/ml), Proteine fallen aus
- 7) Zentrifugation bei 20°C und 10000 Upm für 15 min
- 8) Überführen des Überstandes in Quickseal-Zentrifugenröhrchen
- 9) Auffüllen des Quickseal-Röhrchens mit einer Lösung aus CsCl/10 mM Tris/HCl pH 7,5 (1:1)
- 10) Verschweißen des Quickseal-Röhrchens
- 11) Zentrifugation bei 20°C und 55000 Upm für mindestens 18 h
- 12) Zapfen der Plasmid-DNA-Bande aus dem Quickseal unter Verwendung eines Isco-Gradienten-Zapfgeräts
- 13) Zugabe von 200 µl EthBr zu der gezapften DNA-Lösung
- 14) Überführung der DNA-Lösung in neues Quickseal-Röhrchen
- 15) Verschweißen des Quickseal
- 16) Zentrifugation bei 20°C und 55000 Upm für mindestens 18 h
- 17) Zapfen der Plasmid-DNA-Bande

EthBr stellt bereits in geringsten Konzentrationen einen effektiven Inhibitor des gekoppelten *in vitro* Proteinbiosynthesystems dar. Es wurde daher mit Hilfe von wassergesättigtem n-Butanol aus der Plasmid-Lösung ausgeschüttelt. Die Plasmid-Lösung wird mit dem gleichen Volumen wassergesättigtem n-Butanol versetzt und gut durchmischt. Das EthBr sammelt sich in der obenliegenden n-Butanol-Phase an. Diese wird abgenommen und verworfen. Mit der wässrigen Phase werden die soeben beschriebenen Schritte wiederholt, bis die Butanol-Phase farblos wird (2-4 mal).

Um das CsCl zu entfernen und das Volumen der Lösung zu verringern wurde nach dem Ausschütteln des EthBr eine Ethanol-Fällung (II.2.4.1) durchgeführt. Da bei zu hohen Salzkonzentrationen während der Fällung das Salz ebenfalls präzipitiert, wurde die Plasmid-Lösung zuvor mit 2 Volumina H₂O_{dd} verdünnt. Nach der Zugabe von 2 Volumina absoluten Ethanols wurde bei -20°C über Nacht gefällt. Die gefällte DNA wurde bei 4°C und 10000 Upm für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl Lösung IV resuspendiert, mit 1 ml absolutem Ethanol versetzt und 2x 1 min in flüssigem Stickstoff gefällt. Anschließend wurde

für 15 min bei 4°C und 13000 Upm zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das getrocknete Pellet in 20 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,5 aufgenommen.

II.2.12 Konzentrationsbestimmung von DNA am Spektrophotometer

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Handelt es sich bei der zu messenden DNA um Oligonukleotide, so entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 20 µg/ml.

Zusätzlich wurde noch die optische Dichte bei 280 nm gemessen. Hier liegt das Absorptionsmaximum für Proteine. Durch den Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ lässt sich eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA-Lösung machen. Für eine reine DNA-Lösung sollte der Quotient bei 1,8-2,0 liegen. Für CsCl-gereinigte DNA wurde zusätzlich noch die OD bei 230 nm gemessen. Hier liegt das Absorptionsmaximum des CsCl. Die OD₂₃₀ sollte kleiner sein als die OD₂₈₀.

II.2.13 DNA-Sequenzierung

Zur endgültigen Verifizierung positiver Klone wurde deren Plasmid-DNA isoliert und die Sequenz im Bereich des Reportergens bestimmt. Verwendet wurde die Didesoxy-Methode nach Sanger. Hierbei werden Primer mit Hilfe einer DNA-Polymerase verlängert. Sobald ein Didesoxy-Nukleotid eingebaut wird endet die Kette. Die Konzentration an Didesoxy-Nukleotiden ist so gewählt, dass statistisch an allen Positionen die Reaktion abbricht und Fragmente aller Längen entstehen.

Die Sequenzierung wurde mit einem ABI 310 Kapillarsequencer durchgeführt. Verwendet wurden BigDye-Terminatoren, d.h. die Didesoxy-Nukleotide waren mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Da jedes der vier Didesoxy-Nukleotide mit einem anderen Farbstoff markiert ist, kann die Thermo-Cycling-Reaktion in einem einzigen Eppendorfgefäß vorgenommen werden.

Sequenzierungsansatz:

2 µl Premix (dNTPs, Fluoreszenz-ddNTPs, Puffer, AmpliTaqFS)

1-2 µl DNA-Template (0,03-0,12 pmol)

1-2 µl Primer (5 pmol)

H₂O_{dd} ad 10 µl

Cycling-Protokoll:

25 Zyklen:

Denaturierung	96°C	10 s
Annealing	58°C	5 s
Extension	60°C	4 min

Um nicht eingebaute, fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide aus dem Ansatz zu entfernen wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Hierfür wurden zum Sequenzieransatz 2 µl 3M NaAc sowie 55 µl absoluter Ethanol hinzugegeben. Es wurde für 20 min bei 13000 Upm zentrifugiert,

das so erhaltene Pellet wurde mit 250 μ l 70% Ethanol gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert und getrocknet. Aufgenommen wurde es in 20-25 μ l H₂O_{dd}.

Während des Sequenzierungslaufs wird ein Teil der Probe mittels Elektrophorese in eine mit einem Flüssigpolymer gefüllte Kapillare gesaugt. Die DNA-Moleküle wandern durch die Kapillare und werden nach ihrer Größe aufgetrennt. Sie laufen dabei an einem Fenster in der Kapillare vorbei, durch das ein Laserstrahl einfällt. Der Laser regt die Fluoreszenzfarbstoffe am Ende der DNA-Fragmente an, die daraufhin Licht bestimmter Wellenlänge abstrahlen, welches von einer CCD-Kamera detektiert wird. Eine spezielle Software berechnet aus den aufgezeichneten Rohdaten die Basensequenz des DNA-Moleküls.

II.2.14 In vitro Proteinbiosynthesesystem

Um die Menge an hergestelltem Fusionsprotein der einzelnen Konstrukte zu messen, wurden alle Konstrukte im gekoppelten, DNA-abhängigen *in vitro* Proteinbiosynthesesystem (Fuchs et al., 1980) auf ihre Expressionsstärke hin untersucht. Durch Kontrollen wurde sichergestellt, dass sich durch das Einklonieren der T7-TIR-Fragmente vor die Reportergene keine Veränderungen bezüglich der Promotorstärke des Konstrukts und der Stabilität von mRNA bzw des Fusionsproteins ergeben hatten. Unterschiedlich starke Expression des Fusionsproteins konnte somit auf die unterschiedlich effizienten TIR zurückgeführt werden. Die synthetisierten Proteine wurden mittels ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Nach SD-PAGE (II.2.2.2) und anschließender Fluorografie des Gels konnten die Fusionsproteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und im Szintillationszähler vermessen werden.

Standardansatz für die *in vitro* Proteinsynthese:

36,5 mM	Hepes/KOH, pH 8,1
3,5 mM	Tris/Acetat
8,5 mM	MgAc
3 mM	Spermidin
96 mM	KCl
12 mM	NH ₄ Cl
je 0,2 mM	der 20 Aminosäuren
je 0,2 mM	NTPs
0,032 mM	NADP
0,023 mM	Folinsäure
10 mM	Phosphoenolpyruvat
20 g/ml	Pyruvatkinase
1,4 mM	Dithiothreitol
0,5 mg/ml	tRNAs
~ 3 mg/ml	Proteinfraktion (enthält u.a. E.coli-RNA-Polymerase)
~ 8 mg/ml	Ribosomen
5-7 μ Ci	α - ³⁵ S-Methionin
0,02 bis 4 μ g	Plasmid-DNA

Fluorografie:

Die radioaktiv markierten Proteinbanden könnten durch Autoradiografie sichtbar gemacht werden, durch die Durchführung einer Fluorografie (Bonner und Laskey, 1974; Laskey und Mills, 1975) konnte jedoch die Intensität um ca. das 10fache erhöht werden. Hierzu wurde das Trenngel zunächst für 1 h in Dimethylsulfoxid (DMSO) entwässert. Anschließend wurde das Gel mit 2,5-Diphenyloxazol (PPO) gesättigt, indem es für mindestens 3 h in einer Lösung von 20% PPO in DMSO geschwenkt wurde. Danach wurde das DMSO durch Wässern des Gels für 1 h entfernt und das Gel getrocknet. Die Funktion des PPO ist es, die schwache β -Strahlung des ^{35}S -Methionins in sichtbares Licht umzuwandeln. Damit es auf einem Röntgenfilm zu einer Schwärzung kommt, muss ein und dasselbe Silberkorn von zwei Photonen getroffen werden. Nach dem ersten Treffer ist es in einem aktivierten Zustand. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein zweiter Treffer stattfindet, kann erhöht werden, indem der aktivierte Zustand verlängert wird. Dies geschieht bei niedrigen Temperaturen. Aus diesem Grund erfolgt die Exponierung des Röntgenfilms unter Lagerung bei -70°C .

II.2.15 In vivo Proteinbiosynthese

Für die Quantifizierung der in vivo synthetisierten Fusionsproteine wurden definierte Mengen einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen E.coli-JM101-Kultur induziert. Die mRNA-Synthese der Fusionsproteine wird in den Vektoren pDS5-ND, pDS5-NC und pDS5-NcD mit Hilfe der O3O4-Operatorregion des lac-Operons reguliert. Da der E.coli-Stamm JM101 konstitutiv lac-Repressor synthetisiert, liegen die Promotoren dieser Vektoren im Normalzustand reprimiert vor. Durch Zugabe von IPTG ins Medium (0,2 mM) können diese allerdings induziert werden.

Durchführung der in vivo Proteinbiosynthese:

- 1) Transformation elektrokompenter E.coli-JM101-Zellen mit ca. 10 ng Plasmid-DNA
- 2) Überimpfen von 150-180 μl des Transformationsansatzes in 5 ml LB/Ampicillin-Medium (100 μg Ampicillin/ml LB)
- 3) Inkubation bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5
- 4) 0,5 ml dieser Kultur wurden für 2 min bei 10000 Upm abzentrifugiert
- 5) Resuspendieren des Bakterienpellets in 0,2 ml Induktionsmedium
- 6) Inkubation bei 37°C für 50 min
- 7) Abzentrifugieren der Zellen für 2 min bei 10000 Upm
- 8) Zugabe von 25 μl PROTRI
- 9) 15 min Schütteln im Eppendorf-Schüttler
- 10) Denaturierung für 2 min bei 100°C

Induktionsmedium:

LB/Ampicillin-Medium (100 μg Ampicillin/ml LB)

0,2 mM IPTG

$\alpha^{35}\text{S}$ -Methionin (40 bis 50 $\mu\text{Ci/ml}$ LB)

II.2.16 In vitro mRNA-Synthese

Um sicherzustellen, dass die in die Vektoren inklonierten TIR-Fragmente keine Auswirkungen auf die Effizienz des Promotors haben, wurde die mRNA-Syntheserate in einem in vitro Versuch bestimmt.

Standardansatz für die in vitro Proteinsynthese:

36,5 mM	Hepes/KOH, pH 8,1
3,5 mM	Tris/Acetat
8,5 mM	MgAc
3 mM	Spermidin
96 mM	KCl
12 mM	NH ₄ Cl
je 0,2 mM	der 20 Aminosäuren
je 0,2 mM	NTPs
0,032 mM	NADP
0,023 mM	Folinsäure
10 mM	Phosphoenolpyruvat
20 g/ml	Pyruvatkinase
1,4 mM	Dithiothreitol
0,5 mg/ml	tRNAs
~ 3 mg/ml	Proteinfraktion (enthält u.a. E.coli-RNA-Polymerase)
~ 6 mg/ml	Ribosomen
0,2 µCi	¹⁴ C-UTP
0,02 bis 1 µg	Plasmid-DNA

Nach Inkubation für 20 min bei 37°C wurden die Ansätze mit 200 µl HClO₄ gefällt und auf GF/A-Filter gebunden. Nach Waschen mit HClO₄ und Ethanol wurden die Filter getrocknet und die darin enthaltene Menge an Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

II.2.17 Computergestützte RNA-Sekundärstrukturanalyse

Zur Berechnung von Sekundärstruktur-Faltungsmodellen bestimmter mRNA-Bereiche wurden die Programme RNADRAW (Matzura und Wennborg, 1996) und RNAstructure (Mathews et al., 1999) verwendet.

III. Ergebnisse

III.1 Vorgehensweise

Bei Prokaryonten hängt die Effizienz einer Translationsinitiationsregion (TIR) auf der mRNA von unterschiedlichen Faktoren, wie beispielsweise Shine-Dalgarno-Sequenz (SD), Initiationstriplet (IT), Downstream Box (DB) oder der räumlichen Struktur der RNA im Bereich der Ribosomenbindestelle (RBS) ab. Der Bakteriophage T7 verfügt über einige sehr starke TIR. Diese TIR zeichnen sich durch einige gemeinsame Merkmale aus. Sie verfügen meist über eine nur kleine SD, ihre RBS liegen in unstrukturierten Regionen (USR) und sind damit gut erreichbar für die ankommenden Ribosomen. Diesen USR geht ein stabiler hairpin voraus. Ziel meiner Doktorarbeit war es, die Bedeutung dieser Elemente für eine effiziente Translationsinitiation zu untersuchen. Es ging speziell darum die Frage zu beantworten, ob eine lange SD und IT alleine ausreichend sind für eine hocheffiziente Translationsinitiation.

Verwendet wurden die TIR der T7-Gene 0,3, 1, 1,3 und 11. Gene von Bakteriophagen eignen sich gut für solche Untersuchungen, denn sie verfügen über besonders starke Promotoren und TIR. Das Ziel der Phagen ist es schließlich, den gesamten Expressionsapparat der Wirtszelle auf die Produktion von neuen Phagen umzustellen. Die Signale können deshalb so stark sein, weil die Phagengene nicht an die ausgewogenen Gleichgewichte in der Wirtszelle gebunden sind.

Für die durchgeführten Experimente wurden unterschiedliche Fragmente der TIR der oben aufgelisteten T7-Gene in Expressionsvektoren vor geeignete Reportergene kloniert. Diese Reportergene verfügen über keine eigenen TIR und können nur mittels der davor eingesetzten T7-TIR-Fragmente als Fusionsproteine exprimiert werden.

Die verwendeten Vektoren enthielten das dhfr-Gen der Maus bzw. das bakterielle cat-Gen als Reportergene. Das dhfr-Gen der Maus verfügt als eukaryontisches Gen in E.coli über keine eigene Startstelle und sein Produkt, die Dihydrofolat-Reduktase, wird in großen Mengen von den Bakterienzellen toleriert, da eine bakterielle Form dieses Enzyms, welches eine zentrale Rolle bei der Thymidylat-Synthase-Reaktion spielt, existiert. Das cat-Gen ist ein bakterielles Gen, welches für die Chloramphenicolacetyl-Transferase codiert, die eine Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol verleiht. Es verfügt nur über eine extrem schwache eigene TIR.

Zur Untersuchung der Funktion der SD wurde die jeweils kleine SD der T7-Gene 0,3, 1 und 1,3 künstlich verlängert und die Expressionsrate der Reportergene abhängig sowohl von den unterschiedlich langen SD als auch von unterschiedlich langen Downstreambereichen bestimmt. Bei den TIR der Gene 0,3, 1 und 1,3 spielen Downstreamsequenzen wie die DB eine wichtige Rolle für die Effizienz der Translationsinitiation. Durch die Verlängerung der kurzen SD sollte untersucht werden, ob eine ausreichend lange SD für eine optimale Initiation genügt und die verstärkenden Signale der downstream gelegenen Sequenzabschnitte ersetzen kann. Diese Arbeiten wurden für einen Expressionsvektor bereits in den Diplomarbeiten von C. Peter, T. Hotz und mir durchgeführt. Da nachträglich jedoch eine Verunreinigung einzelner Konstrukte mit dem Phagen fd festgestellt wurde mussten die entsprechenden Konstrukte neu aufgereinigt und getestet werden. Des Weiteren musste ein Großteil der Konstrukte zur Kontrolle noch in den zweiten Expressionsvektor umgesetzt werden.

Wie oben bereits erwähnt, besitzen die alle stark exprimierten Gene von T7 eine USR, der ein stabiler 5'-hairpin vorausgeht. Die Funktion dieses hairpins ist es vermutlich entweder, die hinter ihm liegenden Bereiche der mRNA von Sekundärstrukturen frei zuhalten, oder Kontakte zu den initiierten Ribosomen auszubilden, um diesen das Erkennen der Startstelle zu erleichtern.

Das T7-Gen 11 wird zusammen mit dem vorangehenden Gen 10 transkribiert. Es verfügt sowohl über eine USR als auch über einen davor liegenden 5'-hairpin. Dieser hairpin dient zudem als Transkriptionsterminator für die T7-RNA-Polymerase. In einem kleinen Prozentsatz der Fälle

überliest die Polymerase allerdings den Terminator und transkribiert so das Gen 11. Auf diese Weise steuert der Phage die Menge an hergestelltem Protein, denn das Produkt des Gens 10 (Haupthüllprotein) wird in wesentlich größeren Mengen benötigt als das Produkt des Gens 11. Eine Entfernung oder Veränderung des hairpins würde sich also direkt auf die Menge an Gen 11-mRNA auswirken. Aus diesem Grund wurde die Funktion als Transkriptionsterminator zerstört, indem die dem hairpin folgende, und für die Termination essentielle Sequenz von sechs Uridinen durch die Sequenz 5' AAGAGA 3' ersetzt wurde. Durch diesen Austausch blieb die Struktur des hairpins erhalten. Da sich aus einem Entfernen und Verändern des hairpins nun keine Konsequenzen für die Transkription ergeben, konnte die Funktion des hairpins für die Translationsinitiation untersucht werden.

Die TIR des Gens 11 wurde bereits von Frau Dr. U.Sahillioglu vor geeignete Reportergene in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Auch die Zerstörung der Terminationsfunktion wurde von ihr durchgeführt. Sie untersuchte die Bedeutung des 5'-hairpins für die Effizienz der Translation, wobei sind die TIR des Gens 11 in den von ihr durchgeführten Experimenten vor dem ersten Gen der mRNA befand. Ich wollte hingegen die Bedeutung dieses hairpins für eine Startstelle innerhalb einer polycistronischen mRNA, entsprechend der Wildtyp-Situation, untersuchen. Sollte die Wirkungsweise des hairpins in der Abschirmung der folgenden RBS bestehen, so sollte er in der innercistronischen Position noch wichtiger sein. Sollte hingegen sein stimulierender Effekt auf Kontakten zu den Ribosomen basieren, so wäre es vermutlich nicht von großer Bedeutung wie groß der Bereich upstream des hairpins ist. Für diese Untersuchungen musste ein geeigneter Expressionsvektor konstruiert und die entsprechenden TIR-Fragmente des Gens 11 in diesen einkloniert und getestet werden. Hierzu wurde ein verkürztes cat-Gen vor das dhfr-Reportergen des Expressionsvektors pDS1-ND kloniert. Es wurde ein verkürztes cat-Gen benutzt, denn das Wildtyp-Cat hat ungefähr die gleiche Größe wie die Fusionproteine aus Dhfr und T7-TIR. Um zu vermeiden, dass beide Proteine bei der Trennung durch SDS-PAGE auf der selben Höhe laufen, wurde ein Teil des Gens am 3'-Ende durch Restriktionsverdau abgeschnitten.

Die zu untersuchenden TIR-Fragmente des Gens 11 konnten dann hinter das verkürzte cat-Gen und, wie schon in der Diplomarbeit, vor das dhfr-Reportergen einkloniert werden. Nachdem eine Reihe von Gen 11-Konstrukten in den neuen Expressionsvektor einkloniert und getestet waren, wurde beschlossen, zusätzlich noch Sequenzen einzuführen, die direkt komplementär zur RBS der einklonierten Konstrukte waren. Dies geschah in der Erwartung, dass der hairpin nun noch größere Bedeutung als Mittel zur Abschirmung der RBS vor der Ausbildung von Sekundärstrukturen haben sollte. Zur RBS komplementäre Sequenzen verschiedener Länge wurden an einer Stelle upstream des hairpins eingesetzt und die Expression der entstandenen Konstrukte gemessen. Die Expressionsraten dieser Konstrukte waren sehr niedrig und es wurde beschlossen, hinter dem hairpin die RBS des Gens 11 durch die des Gens 1,3, die von sich aus wesentlich stärker ist, zu ersetzen. Auch für diese RBS wurden komplementäre Sequenzen in die entsprechenden Konstrukte eingefügt.

Des Weiteren wurde durch Ersetzen des Promotors für die E.coli RNA-Polymerase vor dem zu testenden Genen durch einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase getestet, ob sich an den beobachteten Effekten etwas ändert, wenn die RNA-Polymerase den bereits mit der Translation beginnenden Ribosomen weiter vorausseilt als es bei der E.coli-Polymerase der Fall ist. Die T7-RNA-Polymerase arbeitet deutlich schneller als das bakterielle Enzym, so dass die RNA dann mehr Zeit zur Ausbildung von Sekundärstrukturen hätte, da sie nicht so schnell von den translatierenden Ribosomen geglättet wird.

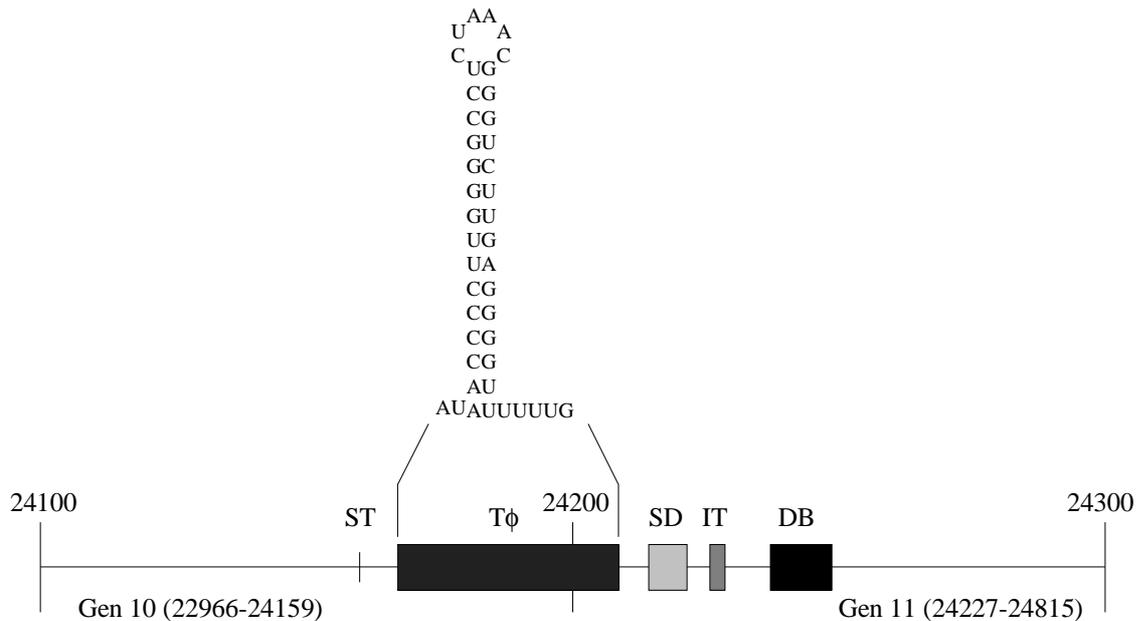


Abb. III.1.1: Schematischer Ausschnitt aus der T7-Sequenz, die Zahlen bezeichnen die Position im T7-Genom. ST: Stopptriplett des Gens 10; T ϕ : Transkriptionsterminator, die Sequenz des Terminators ist als mRNA-Sekundärstruktur dargestellt; SD: Shine-Dalgarno-Sequenz; IT: Initiationstriplet; DB: downstream box

III.2 Nomenklatur

Die Bezeichnung der Konstrukte soll an zwei Beispielen erläutert werden:

p1-29-SD7 ND
p1,3-217h+ SDk NcD

Das „p“ gibt an, dass sich das Konstrukt in einem Plasmid befindet. DNA-Fragmente werden mit einem „f“ bezeichnet.

Die „1“ bzw. „1,3“ gibt die Nummer des T7-Gens an, aus dem das Fragment ursprünglich entnommen wurde.

Die nächste Zahl gibt die Länge des DNA-Fragments in Basenpaaren an.

Der Ausdruck „SD7“ zeigt, dass das Konstrukt eine 7 Basenpaar große Shine-Dalgarno-Region enthält.

Der Ausdruck „h+ SDk“ zeigt an, dass dem 217er Fragment der 5'-hairpin des Gens 11 vorgeschaltet ist und zusätzlich eine Sequenz eingeführt wurde, die komplementär zur RBS des 217er Fragments im Bereich der SD ist.

Das „ND“ bzw. „NcD“ zeigt den verwendeten Expressionsvektor an. Im Falle des „ND“ ist dies pDS5-ND, wobei das „N“ für den T5N₂₅O3O4-Promotor steht, das „D“ für das dhfr-Reportergen. Im Falle des „NcD“ steht das „N“ für den T5N₂₅O3O4-Promotor und das „c“ für das verkürzte cat-Gen, welches dem folgenden dhfr-Reportergen vorgeschaltet ist.

III.3 Übersicht über die verwendeten Expressionsvektoren

Die Vektorkarten von allen verwendeten Expressionsvektoren werden im folgenden dargestellt. Alle diese Plasmide leiten sich ab von pDS5 ab (Stueber und Bujard, 1982). Ihnen allen ist die β -Lactamase als Resistenzgen gemeinsam. Als Reportergen wird entweder das dhfr-Gen der Maus oder das bakterielle cat-Gen verwendet.

1. pDS5-ND

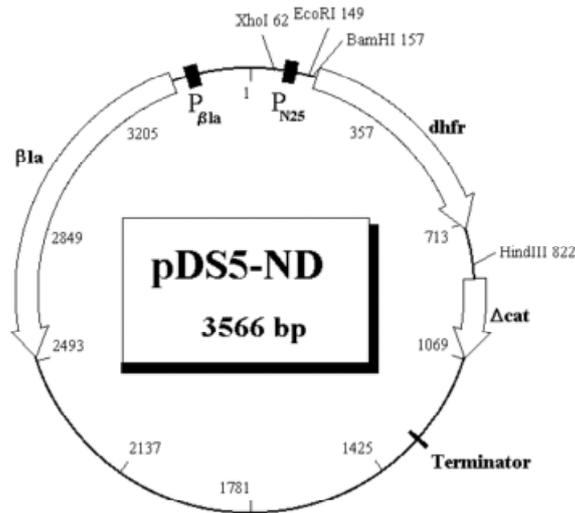


Abb.III.3.1: pDS5-ND Vektor. dhfr: Gen für die Dihydrofolatreduktase; Δ cat: verkürztes Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase; β la: Gen für die β -Lactamase; $P_{\beta la}$: β la-Promotor; P_{N25} : Promotor N25O3O4 für die E.coli-RNA-Polymerase ans dem Genom des Phagen T5 mit dem lac-Operator in Position 3 und 4; Terminator: Transkriptionsterminator aus dem rrnB-Operon; XhoI, EcoRI, BamHI, HindIII: Restriktionsschnittstellen

2. pDS5-NC

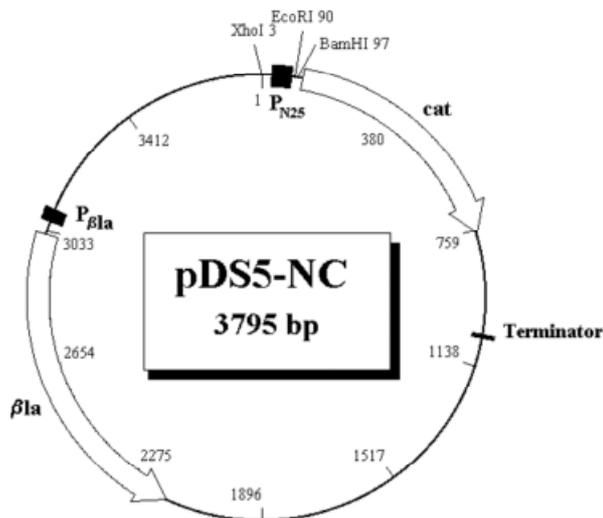


Abb. III.3.2: pDS5-NC Vektor. cat: Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase; β la: Gen für die β -Lactamase; $P_{\beta la}$: β la-Promotor; P_{N25} : Promotor N25O3O4 für die E.coli-RNA-Polymerase ans dem Genom des Phagen T5 mit dem lac-Operator in Position 3 und 4; Terminator: Transkriptionsterminator aus dem rrnB-Operon; XhoI, EcoRI, BamHI: Restriktionsschnittstellen

3. pDS5-NcD

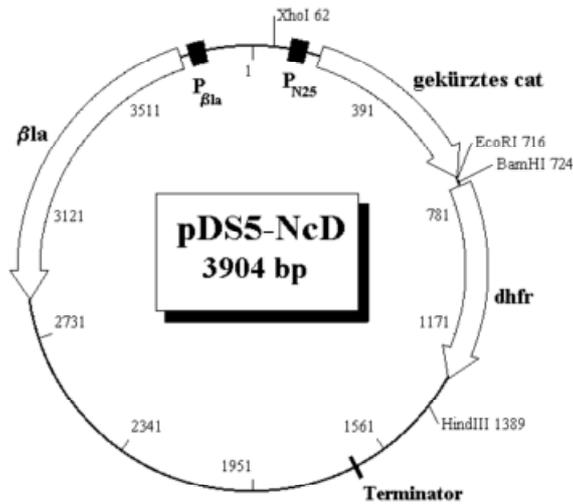


Abb.III.3.3: pDS5-NcD Vektor (siehe III.9.1). dhfr: Gen für die Dihydrofolatreduktase; gekürztes cat: verkürztes Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase; β la: Gen für die β -Lactamase; $P_{\beta la}$: β la-Promotor; P_{N25} : Promotor N25O3O4; für die E.coli-RNA-Polymerase ans dem Genom des Phagen T5 mit dem lac-Operator in Position 3 und 4 Terminator: Transkriptionsterminator aus dem rrnB-Operon; XhoI, EcoRI, BamHI, HindIII: Restriktionsschnittstellen

4. pDS5-TcD

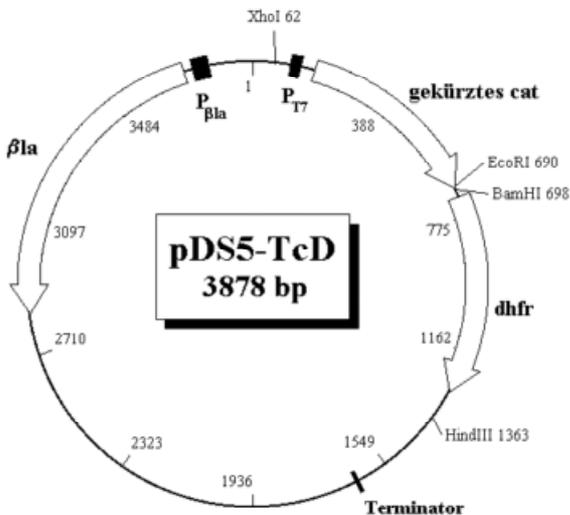


Abb.III.3.4: pDS5-TcD Vektor. dhfr: Gen für die Dihydrofolatreduktase; gekürztes cat: verkürztes Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase; β la: Gen für die β -Lactamase; $P_{\beta la}$: β la-Promotor; P_{T7} : T7-Promotor mit dem lac Operator in Position 3 und 4; Terminator: Transkriptionsterminator aus dem rrnB-Operon; XhoI, EcoRI, BamHI, HindIII: Restriktionsschnittstellen

III.4 Übersicht über alle verwendeten Konstrukte

Im Folgenden soll eine Auflistung aller verwendeten Konstrukte gegeben werden.

III.4.1 Konstrukte mit veränderter SD

Bei den in den Tabellen (III.4.1.1-3) dargestellten Konstrukten wurden unterschiedlich lange SD auf ihren Einfluss auf die Translationsinitiation hin untersucht. Fast alle wurden in zwei unterschiedliche Expressionsvektoren (pDS5-ND und pDS5-NC) kloniert.

Konstrukte mit der TIR des T7-Gens 1,3:

Tab. III.4.1.1: Auflistung der Konstrukte mit der RBS des Gens 1,3 von T7 mit veränderter SD und variabler Downstreamsequenz.

31er Serie	49er Serie	175er Serie
p1,3-31-SD5 ND/NC	p1,3-49-SD5 ND/NC	p1,3-175-SD5 ND/NC
p1,3-31-SD7U ND/NC	P1,3-49-SD7U ND/NC	p1,3-175-SD7U ND/NC
p1,3-31-SD7D ND/NC	P1,3-49-SD7D ND/NC	p1,3-175-SD7D ND/NC
p1,3-31-SD9 ND/NC	p1,3-49-SD9 ND/NC	p1,3-175-SD9 ND/NC
p1,3-31-SD11 ND/NC	P1,3-49-SD11 ND/NC	p1,3-175-SD11 ND/NC

Konstrukte mit der TIR des T7-Gens 1:

Tab. III.4.1.2: Auflistung der Konstrukte mit der RBS des Gens 1 von T7 mit veränderter SD und variabler Downstreamsequenz.

29er Serie	43er Serie	63er Serie	192er Serie
p1-29-SD4 ND/NC	p1-43-SD4 ND/NC	p1-63-SD4 ND/NC	p1-192-SD4 ND/NC
p1-29-SD7 ND/NC	p1-43-SD7 ND/NC	p1-63-SD7 ND/NC	p1-192-SD7 ND/NC
p1-29-SD12 ND/NC	p1-43-SD12 ND/NC	p1-63-SD12 ND/NC	p1-192-SD12 ND/NC

Konstrukte mit der TIR des T7-Gens 0,3:

Tab. III.4.1.3: Auflistung der Konstrukte mit der RBS des Gens 0,3 von T7 mit veränderter SD und variabler Downstreamsequenz.

28er Serie	40er Serie	56er Serie
p0,3-28-SD5 ND	p0,3-40-SD5 ND	p0,3-56-SD5 ND
p0,3-28-SD7 ND	p0,3-40-SD7 ND	p0,3-56-SD7 ND
p0,3-28-SD9 ND	p0,3-40-SD9 ND	p0,3-56-SD9 ND
p0,3-28-SD12 ND	p0,3-40-SD12 ND	p0,3-56-SD12 ND

III.4.2 Konstrukte mit unterschiedlichen Sekundärstrukturen

Im Folgenden wird eine Übersicht über alle hergestellten Konstrukte zur Erforschung der Bedeutung des 5'-hairpins des T7-Gens 11 gegeben. Viele Konstrukte wurden in zwei verschiedene Expressionsvektoren inkloniert (NcD und ND), einige auch noch in einen dritten (TcD).

Ergebnisse

Konstrukte mit der TIR des T7-Gens 11:

Tab. III.4.2.1: Auflistung der Konstrukte mit der TIR des Gens 11 zur Untersuchung des 5'-hairpins

364l-Serie	364Δ-Serie	Sonstige
p11-364l NcD/ND	p11-364Δ NcD/ND	p11-175 NcD/ND
p11-364l SDk NcD/ND	p11-364Δ SDk NcD/ND	p11-213 NcD/ND
p11-364l upSDk NcD/ND	P11-364Δ upSDk NcD/ND	p11-364linv NcD/ND
p11-364l 17k NcD/ND	p11-364Δ 17k NcD/ND	
p11-364l 30k NcD/ND	p11-364Δ 30k NcD/ND	

Konstrukte mit der TIR des T7-Gens 1,3 mit Upstreamsequenzen von Gen 11:

Tab. III.4.2.2: Auflistung der Konstrukte mit der TIR des Gens 1,3 mit und ohne den 5'-hairpin der UTR des Gens 11

217h+ Serie	217h- Serie
p1,3-217h+ NcD/ND/TcD	p1,3-217h- NcD/ND/TcD
p1,3-217h+ upSDk NcD	p1,3-217h- upSDk NcD
p1,3-217h+ 12SDk NcD/ND/TcD	p1,3-217h- 12SDk NcD/ND/TcD
P1,3-217h+ 20SDk NcD/ND	P1,3-217h- 20SDk NcD/ND

III.5 Reinigung fd-kontaminierter Konstrukte

Genauere Überprüfungen ergaben, dass einige früher hergestellte und isolierte Konstrukte mit fd-Phagen verunreinigt waren. Der Grund für dieses Problem ist unser Großraumlabor, das sich über die gesamte Etage hinzieht und damit extrem schwierig keimfrei zu halten ist in Verbindung mit der Tatsache, dass eine andere Arbeitsgruppe unseres Instituts mit diesen Phagen zu arbeiten begann. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden alle kontaminierten Präparationen neu aufgereinigt und von den Phagen befreit. Im Nachhinein stellte sich heraus, dass die Menge an kontaminierender Phagen-DNA in allen Fällen so gering war, dass sich nur unwesentliche Abweichungen von den später erzielten Ergebnissen ergaben. Es handelte sich um folgende Konstrukte:

Tab. III.5.1: Auflistung aller mit fd-Phagen kontaminierter Konstrukte

Gen 0,3	Gen 1	Gen 1,3
p0,3-28-SD12 ND	P1-29-SD12 ND	p1,3-31-SD9 ND
p0,3-40-SD7 ND	P1-63-SD12 ND	p1,3-49-SD7U ND
p0,3-40-SD9 ND	P1-192-SD4 ND	p1,3-49-SD11 ND
p0,3-40-SD12 ND	P1-192-SD7 ND	p1,3-175-SD7U ND
p0,3-56-SD7 ND	p1-192-SD12 ND	p1,3-175-SD7D ND
p0,3-56-SD9 ND		

Die Konstrukte der Gene 0,3 und 1 konnten mittels Transformation in F⁻ Zellen von dem Phagenbefall gereinigt werden. Der fd-Phage kann nur F⁺ Zellen, wie die von uns verwendeten E.coli JM101 Zellen, infizieren. Verwendet wurde zunächst der F⁻-Stamm MC1061. Leider ließen sich die kontaminierten Konstrukte von Gen 1,3 so nicht aufreinigen. Diese Konstrukte wiesen fast keine Expression des Reporterproteins mehr auf. Der Grund hierfür liegt in der deutlich höheren Expressionsrate dieser Konstrukte im Vergleich mit den Konstrukten der Gene 0,3 und 1. Die große Menge an hergestelltem Fusionsprotein ist für die Zellen eine so große

Belastung, dass „Down-Mutationen“, welche die Expression herabsetzen, sehr schnell die korrekten Konstrukte überwachsen. Die Sequenzierung ergab, dass bei allen untersuchten Mutanten Deletionen im Promotor-Bereich vorlagen.

Die von mir zunächst verwendeten JM101-Zellen exprimieren erhöhte Mengen des lac-Repressors, wodurch der Promotor unserer Reportergene, der zwei Lac-Operatoren O3 und O4 (Stueber und Bujard, 1982) beinhaltet, nur wenig transkribiert wird. Aus diesem Grunde konnten die JM101-Zellen die starken RBS des Gens 1,3 tolerieren. Die MC1061-Zellen produzieren nicht so viel Lac-Repressor, wodurch das Reportergen stärker transkribiert wird, was in Verbindung mit einer sehr starken RBS und der daraus resultierenden starken Translation zu großen Mengen Protein führt.

Ich ersetzte daher den MC1061-Stamm durch E.coli DH5 α Z1, der ebenfalls eine erhöhte Menge des Lac-Repressors synthetisiert. Leider überwuchsen Mutationen auch in diesen Zellen die korrekten Konstrukte. Aus diesem Grund kehrte ich zu den JM101-Zellen zurück. Nach erfolgter Elektroporation wurden die Bakterien sofort auf LB-Amp Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden gepickt und auf Phagenbefall untersucht. DNA nichtbefallener Kolonien wurde dann für eine weitere Transformation und anschließender CsCl-Reinigung eingesetzt. Leider konnte es auch hierbei wieder zu neuen Phagenkontaminationen kommen.

Nachdem alle Verunreinigungen beseitigt waren wurden alle Konstrukte *in vitro* und *in vivo* getestet.

III.6 Verlängerung der SD bei der TIR des T7-Gens 1

Das Gen 1 des Bakteriophagen T7 kodiert für die phageneigene RNA-Polymerase. Es ist unter Laborbedingungen bei der Infektion von E.coli das einzige essentielle Gen und eines der am stärksten exprimierten Gene der frühen Region von T7. Die im vorangegangenen Teil geschilderte Abhängigkeit der TIR-Signalstärke von der Länge der SD und den downstream liegenden Bereichen wurde zunächst an diesem Gen überprüft.

Vier unterschiedlich große Fragmente der TIR des T7-Gens 1, welches die T7-RNA-Polymerase kodiert, wurden untersucht. Sie hatten eine Länge von 29, 43, 63 und 192 Nukleotiden (Abb. III.6.1). Da sie alle das gleiche upstream-Ende hatten, unterschieden sie sich nur durch die Länge ihres Downstreambereichs (9, 23, 43 und 172 Nt). Bei diesen Fragmenten wurde die ursprünglich 4 Nt lange SD durch Basenaustausch und eine Insertion, bei der das *aligned spacing* der SD zum IT nicht verändert wurde, auf 7 bzw. 12 Nt verlängert. Die unterschiedlichen SD sind in Abbildung III.6.2 wiedergegeben. Bereits in früheren Experimenten konnte ein Einfluss downstream gelegener Sequenzen auf die Effizienz dieser TIR nachgewiesen werden (Geisen et al., 1987). Die RBS alleine ist kaum aktiv. Es sollte untersucht werden, ob eine lange SD alleine ausreichend für eine optimale Translationsinitiation durch die TIR des Gens 1 ist. Durch den Vergleich der unterschiedlich langen SD in Konstrukten mit unterschiedlich langen Downstreambereichen soll die Wichtigkeit der jeweiligen Elemente analysiert werden.

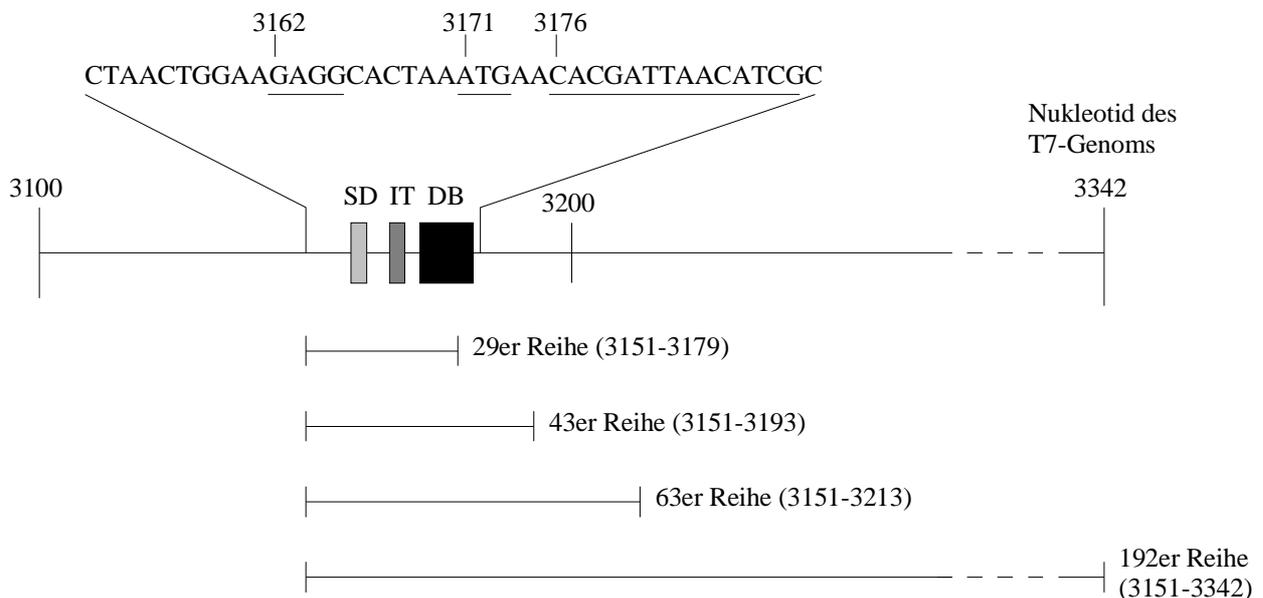


Abb. III.6.1: Schematische Darstellung der verwendeten Fragmente der TIR des T7-Gens 1. Die erste horizontale Linie zeigt den relevanten Teil der T7-Sequenz. Die Zahlenangaben geben die Position innerhalb des T7-Genoms wieder. Ein Teil der Sequenz im untersuchten Bereich ist oberhalb angegeben, SD, IT und DB sind unterstrichen. Darunter sind die einzelnen Fragmente dargestellt. Der exakte Bereich aus der T7-Sequenz, den sie umfassen, ist in Klammern angegeben. Fragmente dieser Längen mit unterschiedlichen SD wurden in Expressionsvektoren vor geeignete Reportergene inkloniert. Es wurde untersucht, wie stark sie die Translationsrate der Reportergene anheben können.

Shine-Dalgarno-Konsensussequenz:	5' TAAGGAGGTGATC 3'
4er Shine-Dalgarno-Sequenz (WT):	GGAAGAGG CACTA
7er Shine-Dalgarno-Sequenz:	GAAGGAGG CACTA
12er Shine-Dalgarno-Sequenz:	TAAGGAGGTGATA

Abb. III.6.2: Aufstellung der Shine-Dalgarno-Veränderungen an der TIR des T7-Gens 1. Wiedergegeben ist die SD-Konsensussequenz auf der mRNA sowie Ausschnitte aus der RBS von Konstrukten mit unterschiedlich langen SD. Nukleotide identisch zur Konsensussequenz (komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA) sind dick gedruckt.

Die Inserts mit 29 Nt Länge wurden chemisch synthetisiert und in den Expressionsvektor pDS5-ND inkliniert. Plasmide, in welche die 43, 63 bzw. 192 Nt langen Fragmente der TIR des Gens 1 von T7 bereits eingefügt waren, wurden freundlicherweise von R. Geisen und A. Helke zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um Wildtyp-Sequenzen, die mittels BamHI in den Vektor pDS5-ND inkliniert worden waren. Mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BsaBI, welches in der Insertsequenz hinter dem AUG schneidet, wurde ein Teil des Inserts, welcher auch die SD enthielt, ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden durch chemisch synthetisierte Oligonukleotide, welche die veränderten SD beinhalteten, ersetzt.

III.6.1 In vitro Proteinsynthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor

Die Gen 1 ND-Konstrukte wurden in einem gekoppelten *in vitro* Proteinbiosynthesesystem (II.2.14) auf ihre Expression hin untersucht. Der Vorteil eines *in vitro* Testsystems liegt darin, dass man eine genau Kontrolle über die Konzentrationen der meisten Bestandteile hat. Die Versuche sind dadurch leicht reproduzierbar. Damit kann man *in vitro* ganz gezielt einzelne Parameter ändern. Arbeitet man *in vivo* mit lebenden Zellen, so kann man die einzelnen Parameter niemals so gut kontrollieren wie *in vitro*. Beispielsweise weiß man *in vivo* nicht genau, in welchem Umfang Proteasen exprimiert werden, die das Reporterprotein verdauen. In den *in vitro* Versuchen gibt man als Template nur die gewünschte Plasmid-DNA zu und kann so sicher sein, dass nur die Gene auf diesem Plasmid exprimiert werden.

Die *in vitro* synthetisierten Proteine wurden mittels Einbau von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Nach dem Fällern und Waschen der Proben wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt (II.2.2.2). Mit den SDS-Gelen wurde eine Fluorografie (II.2.14) durchgeführt.

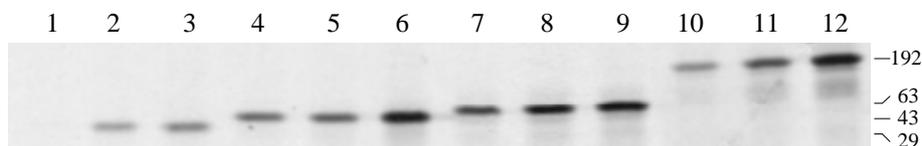


Abb. III.6.1.1: Fluorografie, die die T7/DHFR-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der Konstrukte des T7-Gens 1 im pDS5-ND-Vektor mit unterschiedlichen langen SD zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Seitlich angegeben ist die Länge des verwendeten T7-Inserts. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1-29-SD4 ND; 2) p1-29-SD7 ND; 3) p1-29-SD12 ND; 4) p1-43-SD4 ND; 5) p1-43-SD7 ND; 6) p1-43-SD12ND; 7) p1-63-SD4 ND; 8) p1-63-SD7 ND; 9) p1-63-SD12ND; 10) p1-192-SD4 ND; 11) p1-192-SD7 ND; 12) p1-192-SD12 ND

Die auf dem Röntgenfilm sichtbar gewordenen Banden (Abb. III.6.1.1) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und ihre Radioaktivität quantitativ in einem Szintillationszähler bestimmt.

Ergebnisse

Tabelle III.6.1.1 gibt das Ergebnis eines solchen Versuchs wieder. In Abbildung III.6.1.2 sind die Resultate grafisch dargestellt.

Tab. III.6.1.1: Relative Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor im *in vitro* Test. Dieser Test wurde fünffach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (2492 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1-29-SD4 ND	8	0%
p1-29-SD7 ND	206	8%
p1-29-SD12 ND	463	19%
p1-43-SD4 ND	459	18%
p1-43-SD7 ND	680	27%
p1-43-SD12 ND	1855	74%
p1-63-SD4 ND	900	36%
p1-63-SD7 ND	1332	53%
p1-63-SD12 ND	1968	79%
p1-192-SD4 ND	435	17%
p1-192-SD7 ND	901	36%
p1-192-SD12 ND	2492	100%

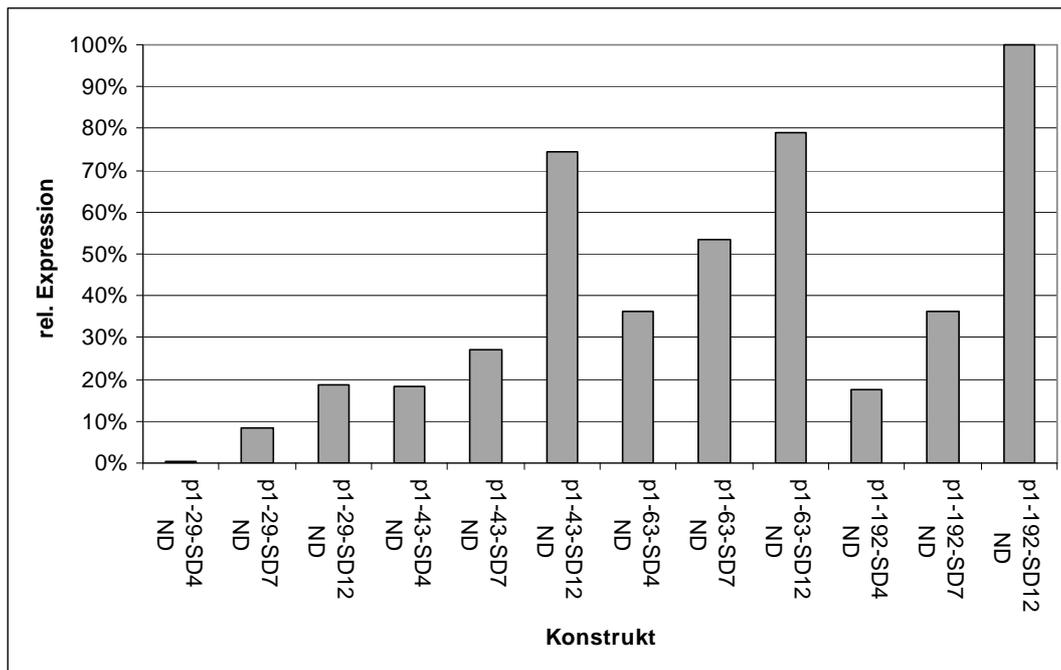


Abb. III.6.1.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor aus Tabelle III.6.1.1 im *in vitro* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD.

Eine Verlängerung der im WT 4 Nt langen SD führt bei allen Konstruktreihen zu einer stetigen Erhöhung der Expressionsrate des Reporterproteins (Abb. III.6.1.3B). Besonders groß sind die relativen Anstiege beim 29er Konstrukt. Hier steigt die Expression um den Faktor 26 bzw. 2,3 bei einer Verlängerung der SD von 4 auf 7 bzw. 7 auf 12 Nt. Allerdings erreicht man fast die selbe Erhöhung der Expression, die sich für p1-29-SD12 ND ergibt, wenn man die Downstreamsequenz um 14 Nt verlängert (Abb. III.6.1.3A). p1-43-SD4 ND, mit der Wildtyp-SD, exprimiert fast genauso stark wie p1-29-SD12 ND. p1-43-SD12 ND ist um das Vierfache

stärker als p1-29-SD12 ND. Verlängert man den Downstreambereich weiter, so ergibt sich für die 63 Nt langen Konstrukte wiederum eine Steigerung der Expression. Es ist klar zu sehen, dass auch eine Verlängerung der SD auf 12 Nt den Einfluss von downstream gelegenen Sequenzelementen nicht ausgleichen kann, denn bei gleicher SD-Länge steigt die Expression bei zunehmender Downstreamlänge zunächst an. Dies gilt nicht mehr bei den 192er Konstrukten. Dieser lange Downstreambereich wirkt sich wieder etwas negativ auf die Expressionsrate aus. Dieses Phänomen wurde bereits bei den früheren Untersuchungen zur TIR des Gens 1 festgestellt (Geisen et al., 1987). Bei einer SD von 12 Nt Länge sind allerdings keine negativen Einflüsse der langen Downstreamregion zu beobachten. p1-192-SD12 ND ist das stärkste Konstrukt des ganzen Tests. Eine 12 Nt lange SD sorgt auch für eine stärkere Angleichung der Expressionsraten von anderen Konstrukten, wie im Falle des 43 Nt und 63 Nt langen Fragments zu sehen ist. Bei einer SD von 4 oder 7 Nt ist das 63er Konstrukt noch fast doppelt so stark, bei einer SD von 12 sind beide fast gleich. Die Länge der SD spielt also eine große Rolle, ist aber längst nicht das einzige wichtige Signalelement auf der mRNA.

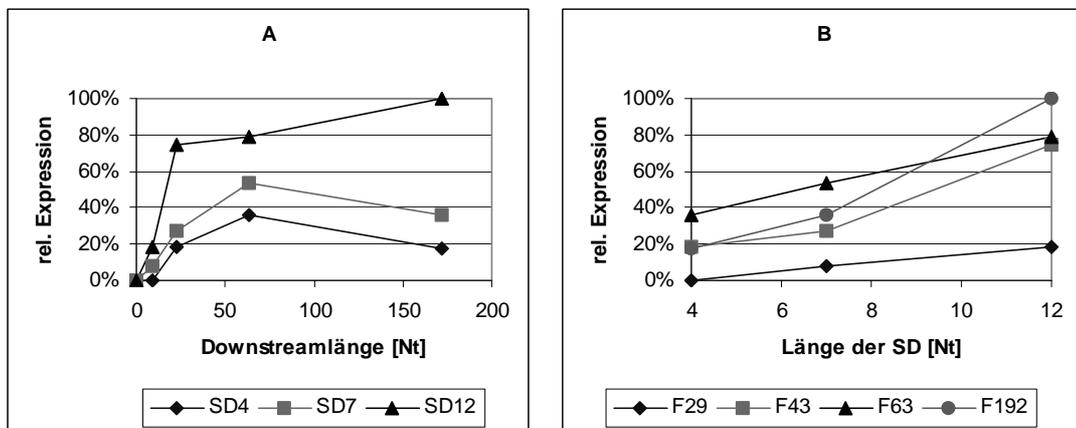


Abb. III.6.1.3: Grafische Darstellung der relativen *in vitro* Expression der T7-Gen 1 Konstrukte im Vektor pDS5-ND. A) Relative Expression bei unterschiedlichen SD aufgetragen gegen die Downstreamlänge der einklonierten Fragmente (9, 23, 43 und 172 Nt). B) Relative Expression bei unterschiedlichen Fragmentgrößen (29, 43, 63 und 192 Nt) aufgetragen gegen die Länge der SD (4, 7 und 12 Nt).

III.6.2 In vivo Proteinsynthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor

Neben den *in vitro* Tests wurden die Konstrukte mit den Fragmenten der TIR des Gens 1 auch *in vivo* getestet. Bei *in vivo* Experimenten hat man keine so genaue Kontrolle über die einzelnen Faktoren wie *in vitro*. Es herrschen auch andere Konzentrationsverhältnisse. Die Konzentrationen der Makromoleküle, wie z.B. der DNA ist *in vivo* höher, die Substratkonzentrationen sind dagegen niedriger. *In vivo* können auch zusätzliche Effekte, wie das vermutete Channeling (Negrutskii und Deutscher, 1991), bei dem die beladenen tRNAs in den Zellen aktiv zum Ribosom geleitet werden, wirksam sein. Das endgültige Ziel ist jedoch stets, die Vorgänge in den Zellen kennen zu lernen.

Unser Reporterprotein bringt der Bakterienzelle auch keinen Vorteil. Die großen Mengen an zusätzlich zu synthetisierendem Protein ist für die Zelle eine Belastung. Aus diesem Grund ist der Promotor unserer Expressionsvektoren durch die Lac-Operatoren O3O4 inhibiert. Der verwendete Bakterienstamm, E.coli JM101, produziert große Mengen des Lac-Repressors. Für den *in vivo* Versuch wird der Promotor nur für die Zeit des Experiments durch Zugabe von IPTG induziert. Abbildung III.6.2.1 zeigt einen Ausschnitt aus einem Röntgenfilm, auf dem die radioaktiv markierten Proteinbanden zu sehen sind. Diese Banden wurden aus dem PAA-Gel

Ergebnisse

ausgeschnitten und ihre Radioaktivität wurde im Szintillationszähler gemessen. Das Resultat ist in Tabelle III.6.2.1 und Abbildung III.6.2.2 wiedergegeben.

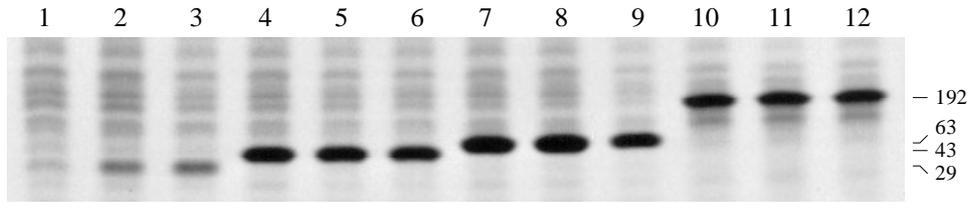


Abb. III.6.2.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vivo* Proteinsynthese der Konstrukte des T7-Gens im pDS5-ND-Vektor zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Seitlich angegeben ist die Länge des verwendeten T7-Inserts. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1-29-SD4 ND; 2) p1-29-SD7 ND; 3) p1-29-SD12 ND; 4) p1-43-SD4 ND; 5) p1-43-SD7 ND; 6) p1-43-SD12ND; 7) p1-63-SD4 ND; 8) p1-63-SD7 ND; 9) p1-63-SD12ND; 10) p1-192-SD4 ND; 11) p1-192-SD7 ND; 12) p1-192-SD12 ND

Tab. III.6.2.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 1 ND-Konstrukte im *in vivo* Test. Dieser Test wurde fünffach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (3361 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1-29-SD4 ND	20	1%
p1-29-SD7 ND	140	4%
p1-29-SD12 ND	227	7%
p1-43-SD4 ND	1309	39%
p1-43-SD7 ND	1613	48%
p1-43-SD12 ND	1500	45%
p1-63-SD4 ND	2082	62%
p1-63-SD7 ND	3253	97%
p1-63-SD12 ND	2350	70%
p1-192-SD4 ND	2311	69%
p1-192-SD7 ND	3361	100%
p1-192-SD12 ND	2366	70%

Der *in vivo* Proteinsynthesetest zeigt, dass im Gegensatz zu den *in vitro* Tests nicht die 12 Nt lange SD für die höchste Expression sorgt, sondern in der Regel die 7 Nt lange SD (vgl. Abb. III.6.2.3B mit Abb. III.6.1.3B). Nur die 29er Konstruktreihe bildet hier eine Ausnahme. Längere SD scheinen die Zellen vor Probleme zu stellen. Ein zweiter großer Unterschied zu den *in vitro* Ergebnissen besteht darin, dass ein inhibitorischer Einfluss der längsten Downstreamsequenzen nicht mehr beobachtet werden kann (vgl. Abb. III.6.2.3A mit Abb. III.6.1.3A). Die Steigerungen sind zwar nur gering (10% von p1-63-SD4 ND zu p1-192-SD4 ND, 3% von p1-63-SD7 ND zu p1-192-SD7 ND, 1% von p1-63-SD12 ND zu p1-192-SD12 ND), aber *in vitro* gab es ja zum Teil deutliche Abnahmen der Expression (-52% von p1-63-SD4 ND zu p1-192-SD4 ND, -32% von p1-63-SD7 ND zu p1-192-SD7 ND). Die Steigerungsraten zwischen den Konstrukten mit 43er Insert und 63er Insert sind *in vitro* und *in vivo* ähnlich, abgesehen von den Konstrukten mit einer 12 Nt langen SD. Die Expressionszunahme von p1-43-SD12 ND zu p1-63-SD12 ND ist *in vivo* deutlich höher (36%) als *in vitro* (6%). Hätte das Konstrukt p1-63-SD12 ND *in vitro* die selbe Steigerungsrate vorzuweisen wie *in vivo*, dann wäre es auch *in vitro* das insgesamt stärkste Konstrukt. Dann hätte p1-192-SD12 ND auch *in vitro* einen inhibitorischen Effekt, so wie die anderen 192er Konstrukte. Wiederum deutlich am schwächsten exprimieren die 29 bp großen Konstrukte.

Ergebnisse

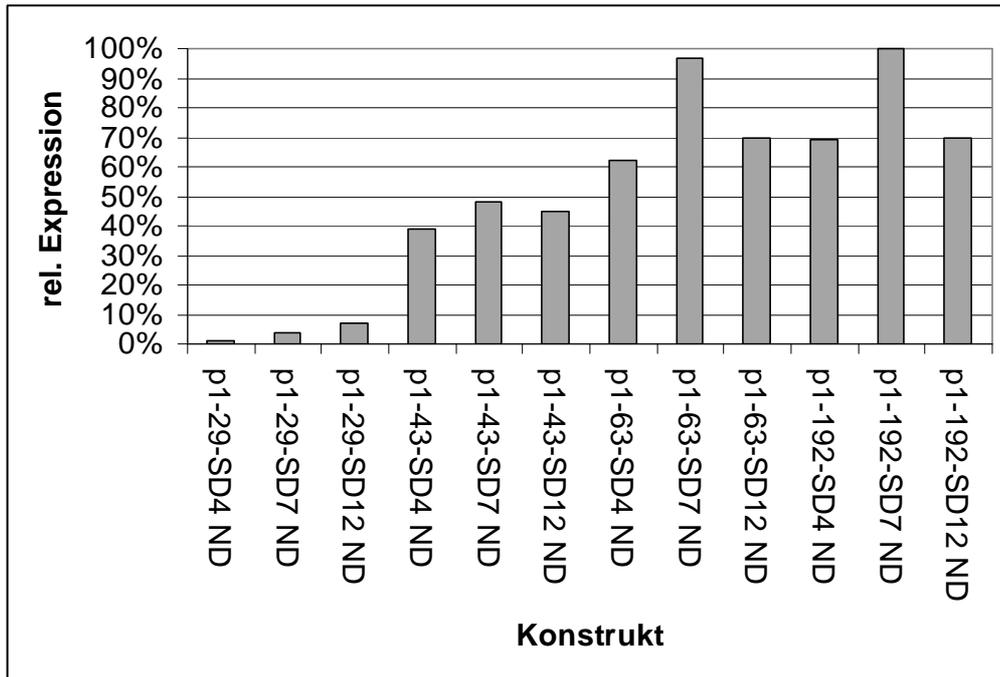


Abb. III.6.2.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor aus Tabelle III.6.2.1 im *in vivo* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD.

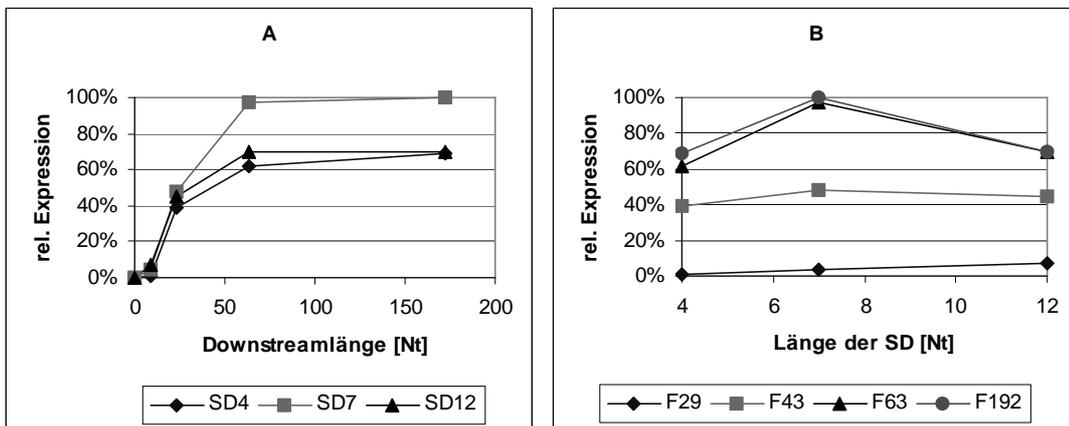


Abb. III.6.2.3: Grafische Darstellung der relativen *in vivo* Expression der T7-Gen 1 Konstrukte im Vektor pDS5-ND. A) Relative Expression bei unterschiedlichen SD aufgetragen gegen die Downstreamlänge der inklonierten Fragmente (9, 23, 43 und 172 Nt). B) Relative Expression bei unterschiedlichen Fragmentgrößen (29, 43, 63 und 192 Nt) aufgetragen gegen die Länge der SD

III.6.3 *In vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor

Um von den in den *in vitro* und *in vivo* Proteinsyntheseexperimenten erhaltenen Daten auf die Translationsrate, und damit auf die Effizienz der TIR rückschließen zu können, sind Kontrollversuche notwendig, die sicherstellen, dass sich durch die inklonierten TIR-Fragmente keine Veränderungen der Promotorstärke oder der Stabilität von mRNA oder Protein ergeben. Die *in vitro* RNA-Synthese dient dazu zu kontrollieren, ob alle Konstrukte die selben Mengen an mRNA synthetisieren. Im *in vitro* Testsystem wurde die hergestellte mRNA mittels Einbau von ^{14}C -UTP radioaktiv markiert. Nach der Inkubationszeit wurde die mRNA präzipitiert, über Glasfilter filtriert und gewaschen. Die Radioaktivität wurde anschließend im Szintillationszähler bestimmt. Was in diesem Test gemessen wird, ist die Gesamtheit der produzierten mRNA, was auch die mRNA für die β -Lactamase einschließt. Deren Promotor besitzt jedoch nur ein Zehntel der Stärke des Promotors unseres Reportergens. Seine Stärke sollte sich nicht durch die eingefügten Fragmente ändern.

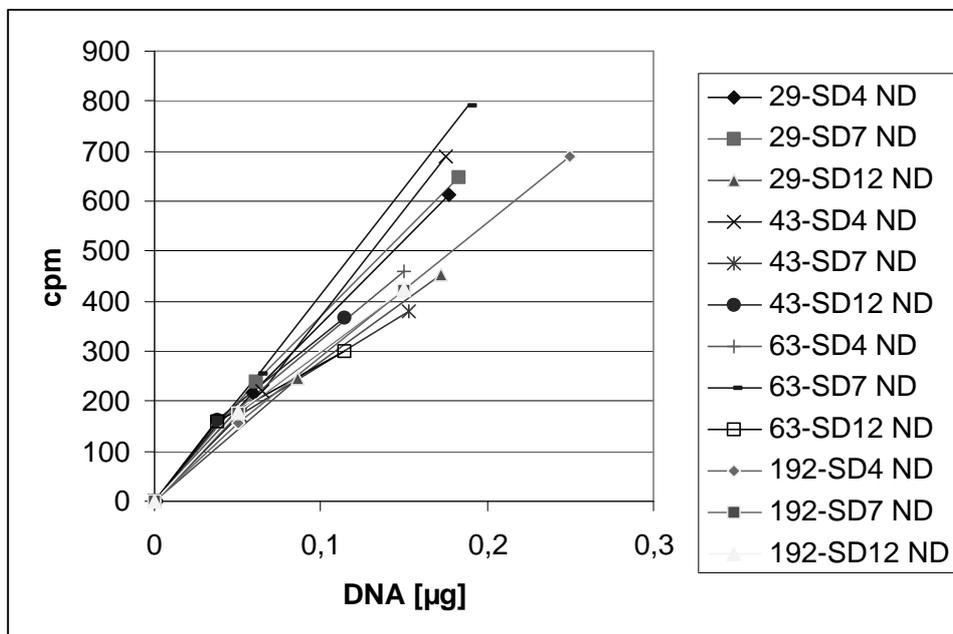


Abb. III.6.3.1: Darstellung der *in vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor. Unterschiedliche DNA-Mengen der einzelnen Konstrukte wurden im gekoppelten *in vitro* Proteinbiosynthesystem in Gegenwart von ^{14}C -UTP auf ihre mRNA-Synthese untersucht. Die radioaktiv markierte mRNA wurde im Szintillationszähler gemessen. Die erhaltenen cpm Werte sind gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen.

Alle Konstrukte zeigen eine ähnlich hohe mRNA-Syntheserate (Abb. III.6.3.1). Die Schwankungen liegen in einem akzeptablen Rahmen und korrelieren nicht mit den Ergebnissen der Proteinsyntheseexperimente. Es wird davon ausgegangen, dass keinerlei Beeinflussung des Promotors durch die inklonierten Fragmente vorliegt. Ein solcher Einfluss wurde bislang auch in früheren Arbeiten noch nie beobachtet.

III.6.4 Umklonierung der T7-Gen 1 Konstrukte in den pDS5-NC-Vektor

Bereits während meiner Diplomarbeit wurden einige Gen 1 Konstrukte in einen zweiten Expressionsvektor, pDS5-NC, umgesetzt. Dies geschah, um zu überprüfen, ob die Art des

verwendeten Reportergens eine Auswirkung auf die Stärke der untersuchten TIR ausübt. Es wäre denkbar, dass Sequenzen des Reportergens, die in der Nähe des T7-Inserts liegen, durch Ausbildung von Sekundärstrukturen einen Einfluss auf die Translationsinitiation haben. Im Vektor pDS5-NC wird statt des dhfr das cat-Gen als Reportergen verwendet.

Bereits umgesetzt waren alle Konstrukte mit einer 7 Nt langen SD. Die verbliebenen Konstrukte wurden von mir im Rahmen der Doktorarbeit ebenfalls in den zweiten Vektor kloniert. Dies geschah dadurch, dass mit Hilfe der Restriktionsenzyme XhoI und BamHI die jeweiligen Inserts aus den Plasmiden der ND-Serie ausgeschnitten, und in den ebenfalls mit den Enzymen XhoI und BamHI geschnittenen Vektor pDS5-NC inkloniert wurden.

III.6.5 In vitro Proteinsynthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor

Analog zur Vorgehensweise bei den Konstrukten im ND-Vektor wurden auch diese wieder im gekoppelten Proteinbiosynthesesystem eingesetzt und auf die Expression des Reportergens, das in diesem Fall ein Fusionsprotein aus cat und T7-TIR ist, untersucht. Die Quantifizierung der Proteinsynthese erfolgt wie bereits in III.6.1 beschrieben. Abbildung III.6.5.1 zeigt den Ausschnitt eines Röntgenfilms, der die radioaktiven Proteinbanden der in einem solchen Versuch hergestellten Proteine zeigt.

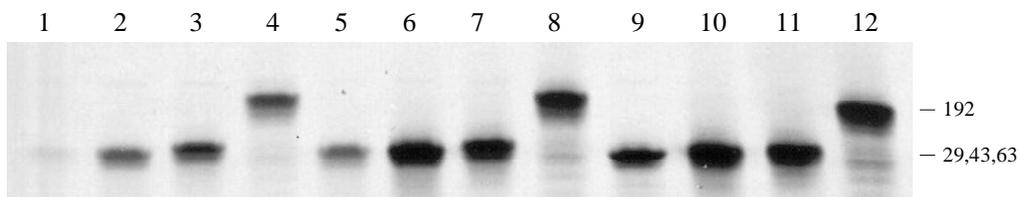


Abb. III.6.5.1: Fluorografie, die die T7-TIR/CAT-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der Konstrukte des T7-Gens 1 im pDS5-NC-Vektor zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Seitlich angegeben ist die Länge des verwendeten T7-Inserts. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1-29-SD4 NC; 2) p1-29-SD7 NC; 3) p1-29-SD12 NC; 4) p1-43-SD4 NC; 5) p1-43-SD7 NC; 6) p1-43-SD12 NC; 7) p1-63-SD4 NC; 8) p1-63-SD7 NC; 9) p1-63-SD12NC; 10) p1-192-SD4 NC; 11) p1-192-SD7 NC; 12) p1-192-SD12 NC

Nach Positionierung des Röntgenfilms wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und ihre Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die Ergebnisse der Auszählung sind in Tabelle III.6.5.1 wiedergegeben. In Abbildung III.6.5.2 zeigt das Balkendiagramm eine nach der Fragmentlänge geordnete grafische Darstellung der Resultate dieser Tabelle.

Ergebnisse

Tab. III.6.5.1: Relative Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1 NC-Konstrukte im *in vitro* Test. Dieser Test wurde dreifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (4252 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1-29-SD4NC	31	1%
p1-29-SD7NC	354	8%
p1-29-SD12NC	1427	34%
p1-43-SD4NC	270	6%
p1-43-SD7NC	2233	53%
p1-43-SD12NC	4252	100%
p1-63-SD4NC	562	13%
p1-63-SD7NC	2033	48%
p1-63-SD12NC	2742	64%
p1-192-SD4NC	571	13%
p1-192-SD7NC	2147	50%
p1-192-SD12NC	3951	93%

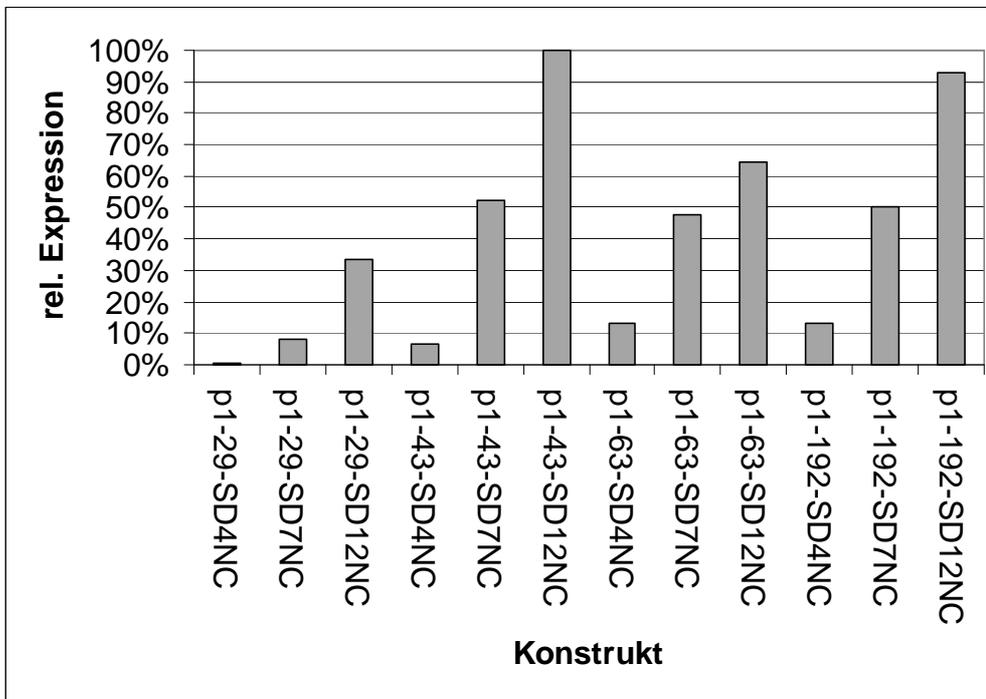


Abb. III.6.5.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor aus Tabelle III.6.5.1 im *in vitro* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD.

Wie bereits bei den ND-Konstrukte zu sehen war, ergibt sich auch im NC-Vektor für alle Insert-Längen bei Verlängerung der SD eine Steigerung der Expression (vgl. Abb. III.6.5.3B. mit Abb. III.6.1.3B). Jedoch kann diese Steigerung auch in diesem Vektor den Einfluss downstream gelegener Signale nicht vollständig kompensieren. Die kleinsten Konstrukte mit dem 29er Insert haben für alle SD-Längen wiederum die geringste Expression (Abb. III.6.5.3B). Es fällt auf, dass im NC-Vektor die 43er Konstruktreihe bei den längeren SD die höchsten Werte zeigt. p1-43-SD12 NC ist das stärkste Konstrukt im ganzen Test. Die 63er und 192er Konstruktreihen zeigen eine sehr ähnliche Expressionsstärke. Im Vergleich mit dem ND-Vektor ist die 63er Serie im NC-Vektor etwas schwächer, denn alle 63er Konstrukte waren dort stärker als die jeweiligen 43er Konstrukte.

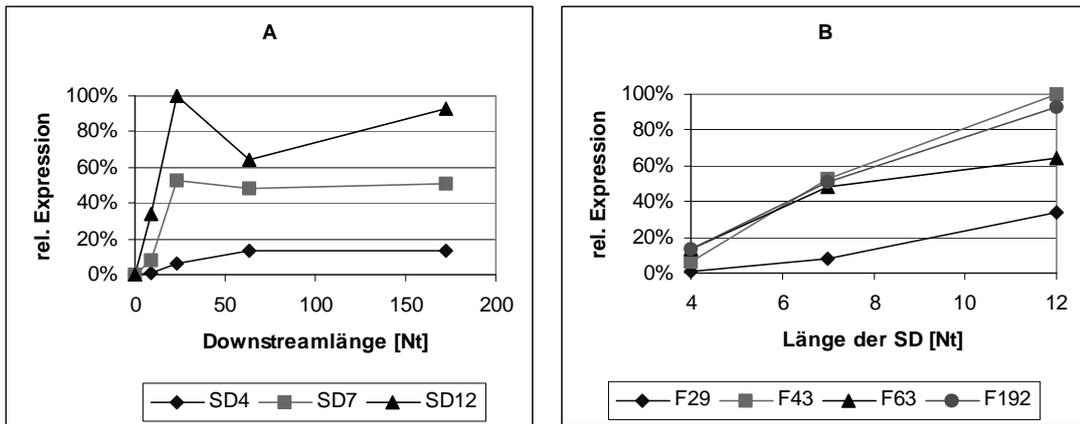


Abb. III.6.5.3: Grafische Darstellung der relativen *in vitro* Expression der T7-Gen 1 Konstrukte im Vektor pDS5-NC. A) Relative Expression bei unterschiedlichen SD aufgetragen gegen die Downstreamlänge der inklonierten Fragmente (9, 23, 43 und 172 Nt). B) Relative Expression bei unterschiedlichen Fragmentgrößen (29, 43, 63 und 192 Nt) aufgetragen gegen die Länge der SD

Alle Konstrukte mit der Wildtyp-SD zeigen in diesem Vektor eine sehr geringe Expression. Im ND-Vektor betrug der Unterschied zwischen den Konstrukten mit einer WT-SD und der 12 Nt langen SD für die unterschiedlichen Fragmentlängen von 29, 43, 63 und 192 Nt 99%, 75%, 54% und 82%, für den NC-Vektor ergeben sich 98%, 94%, 80% und 85%. Im ND-Vektor hatten p1-29-SD12 ND und p1-43-SD4 ND beinahe die selbe Expression. p1-29-SD12 NC ist jedoch um ca. das Fünffache stärker als p1-43-SD4 NC.

III.6.6 *In vivo* Proteinsynthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor

Es wurden Tests durchgeführt, um die Proteinbiosynthese der Gen 1 NC-Konstrukte *in vivo* zu untersuchen. Ein Ausschnitt aus einem Röntgenfilm, auf dem die radioaktiv markierten Proteinbanden eines solchen Versuchs zu sehen sind, ist in Abbildung III.6.6.1 wiedergegeben.

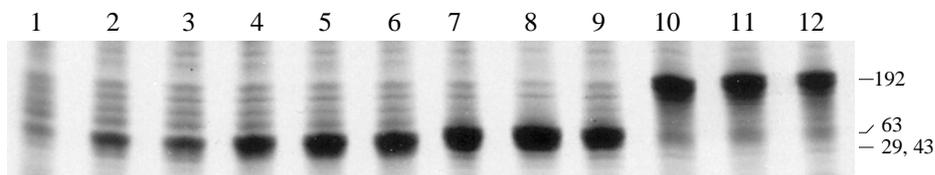


Abb. III.6.6.1: Fluorografie, die die T7-TIR/CAT-Fusionsproteine der *in vivo* Proteinsynthese der Konstrukte des T7-Gens 1 im pDS5-NC-Vektor zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Seitlich angegeben ist die Länge des verwendeten T7-Inserts. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1-29-SD4 NC; 2) p1-29-SD7 NC; 3) p1-29-SD12 NC; 4) p1-43-SD4 NC; 5) p1-43-SD7 NC; 6) p1-43-SD12NC; 7) p1-63-SD4 NC; 8) p1-63-SD7 NC; 9) p1-63-SD12NC; 10) p1-192-SD4 NC; 11) p1-192-SD7 NC; 12) p1-192-SD12 NC

Die Banden für die Reporterfusionsproteine wurden aus dem Gel ausgeschnitten. In einem Szintillationszähler wurde ihre Radioaktivität quantitativ erfasst. Das Ergebnis einer solchen Messung zeigt Tabelle III.6.6.1. Eine grafische Veranschaulichung dieser Daten zeigt Abbildung III.6.6.2. Das Balkendiagramm zeigt die relative Expression der Konstrukte, die nach der Länge des verwendeten T7-Inserts geordnet sind.

Tab. III.6.6.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 1 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor im *in vivo* Test. Dieser Test wurde zweifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (11533 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1-29-SD4 NC	61	1%
p1-29-SD7 NC	608	5%
p1-29-SD12 NC	663	6%
p1-43-SD4 NC	1818	16%
p1-43-SD7 NC	3824	33%
p1-43-SD12 NC	3522	31%
p1-63-SD4 NC	6107	53%
p1-63-SD7 NC	11533	100%
p1-63-SD12 NC	4904	43%
p1-192-SD4 NC	6296	55%
p1-192-SD7 NC	10668	92%
p1-192-SD12 NC	4977	43%

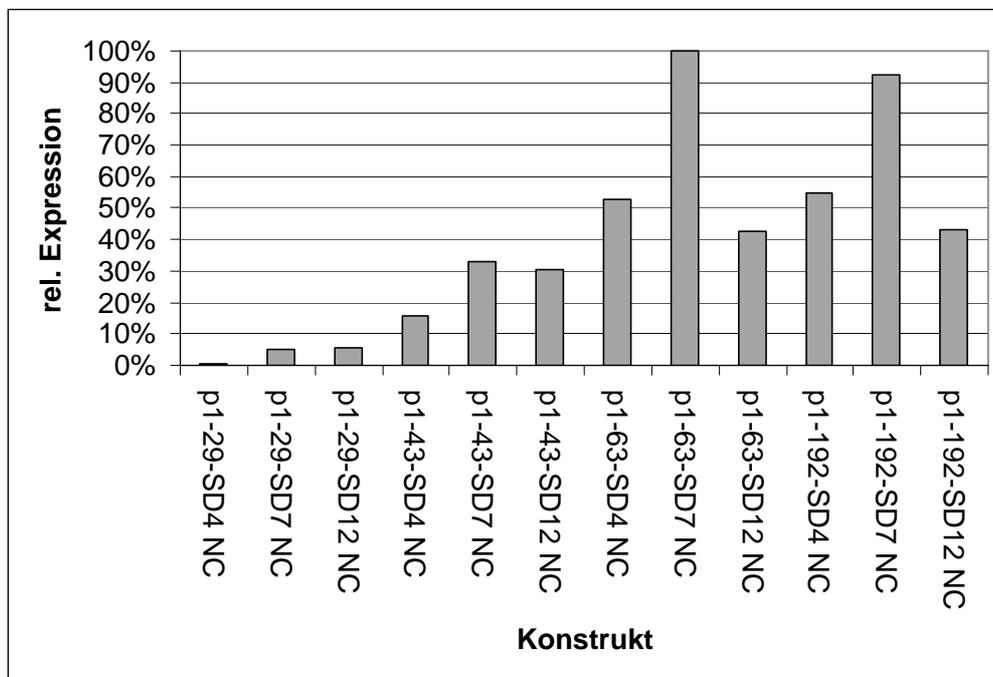


Abb. III.6.6.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor aus Tabelle III.6.6.1 im *in vivo* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD.

Die Ergebnisse der *in vivo* Proteinsynthese der Gen 1 NC-Konstrukte entsprechen den Ergebnissen für die ND-Konstrukte sehr gut (vgl. Abb. III.6.6.3 mit Abb. III.6.2.3). Während bei den 29er Konstrukten noch dasjenige mit der 12 Nt langen SD die höchste Expression zeigt, so ist für die anderen Reihen jeweils die mittlere SD von 7 Nt Länge am besten. Wie schon bei den ND-Konstrukten wirkt sich die 12 Nt lange SD *in vivo* negativ auf die Expressionsrate aus.

Es fällt auch auf, dass p1-63-SD7 NC und p1-192-SD7 NC deutlicher hervorstechen als es bei den ND-Konstrukten der Fall war, wobei p1-63-SD7 NC sogar noch etwas stärker ist als p1-192-SD7 NC. Des Weiteren ist zu beobachten, dass, während bei den ND-Konstrukten diejenigen mit einer 12 Nt langen SD ein wenig stärker waren als die entsprechenden Konstrukte mit einer 4 Nt langen SD, so ist dies bei den NC-Konstrukten nur noch bei den 29er und 43er zu sehen. Bei den längeren Inserts ist jeweils das Konstrukt mit der kleinsten SD etwas stärker als das mit der längsten SD.

In diesem Test unterscheiden sich die 63er und die 192er Konstruktserien nur sehr geringfügig, wie schon bei den ND-Konstrukten zu beobachten war.

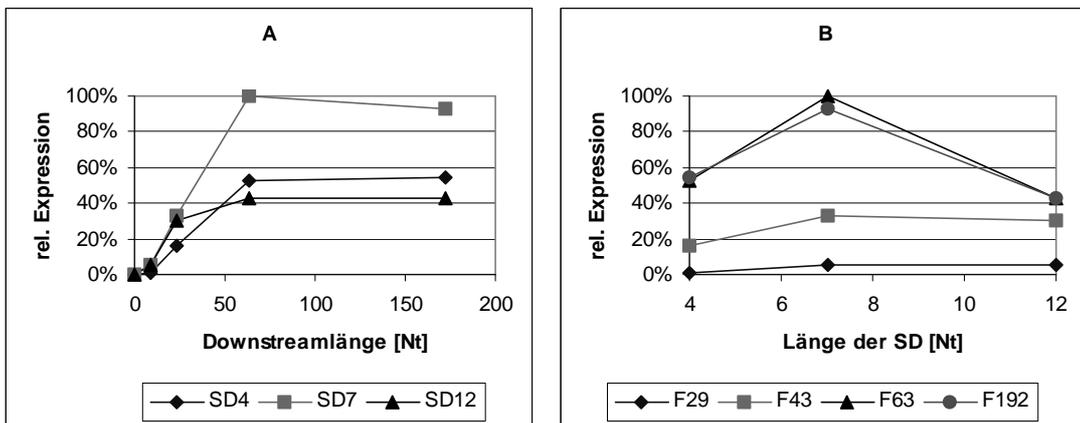


Abb. III.6.6.3: Grafische Darstellung der relativen *in vivo* Expression der T7-Gen 1 Konstrukte im Vektor pDS5-NC. A) Relative Expression bei unterschiedlichen SD aufgetragen gegen die Downstreamlänge der inklonierten Fragmente (9, 23, 43 und 172 Nt). B) Relative Expression bei unterschiedlichen Fragmentgrößen (29, 43, 63 und 192 Nt) aufgetragen gegen die Länge der SD.

III.6.7 *In vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor

Wie bereits für den ND-Vektor beschrieben, wurde eine *in vitro* RNA-Synthese durchgeführt um sicherzustellen, dass die inklonierten Fragmente der TIR des Gens 1 keinen Einfluss auf die Stärke des Promotors unseres Reportergens haben. Wie aus Abbildung III.6.7.1 zu ersehen ist, produzieren alle Konstrukte vergleichbare Mengen an mRNA. Die festgestellten Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen Konstrukte beruht also nicht auf Veränderungen auf der transkriptionellen Ebene, sondern wie gewünscht auf der Variation der Translationseffizienz.

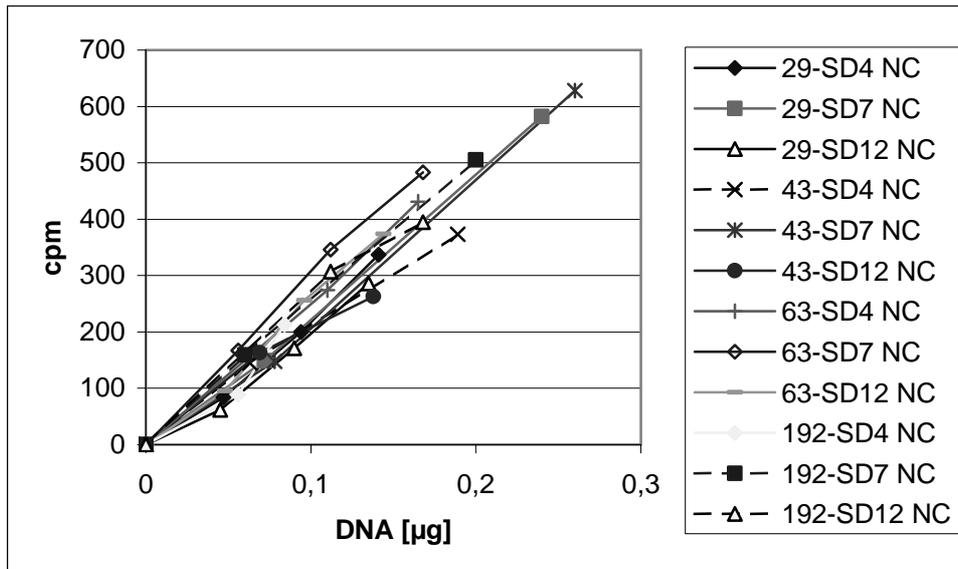


Abb. III.6.7.1: Darstellung der *in vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 1 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor. Unterschiedliche DNA-Mengen der einzelnen Konstrukte wurden im gekoppelten *in vitro* Biosynthesystem in Gegenwart von ^{14}C -UTP auf ihre mRNA-Synthese untersucht. Die radioaktiv markierte mRNA wurde im Szintillationszähler gemessen. Die erhaltenen cpm Werte sind gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen.

III.7 Verlängerung der SD bei der TIR des Gens 1,3

Im Gegensatz zur TIR des T7-Gens 1 zeigte die TIR des T7-Gens 1,3 in einer früheren Untersuchung (Fatscher et al, 1988) schon in dem kurzen Fragment von 31 Nt eine recht hohe Aktivität. Es stellte sich daher die Frage, ob auch bei der Verlängerung der SD im Vergleich zu unterschiedlich langen Downstreamsequenzen andere Ergebnisse als bei den T7-Gen 1-Konstrukten zu sehen sind.

Drei unterschiedlich lange Fragmente der TIR des Gens 1,3, welches eine DNA-Ligase kodiert, wurden untersucht. Diese Fragmente wiesen eine Länge von 31, 49 bzw 175 Nt auf. Da sie alle ein gemeinsames upstream-Ende haben unterscheiden sie sich nur durch die Länge ihres Downstreambereichs (9, 27 bzw 153 Nt). Abbildung III.7.1 gibt eine schematische Übersicht über die unterschiedlichen T7-Gen 1,3 Fragmente. Die im Wildtyp 5 Nt lange SD wurde durch Basenaustausch auf 7, 9 und 11 Nt verlängert. Wobei die Verlängerung auf 7 Nt auf zwei verschiedene Weisen (einmal upstream, einmal downstream) erfolgte. Die eingeführten Mutationen sind samt Konsensussequenz in Abbildung III.7.2 wiedergegeben.

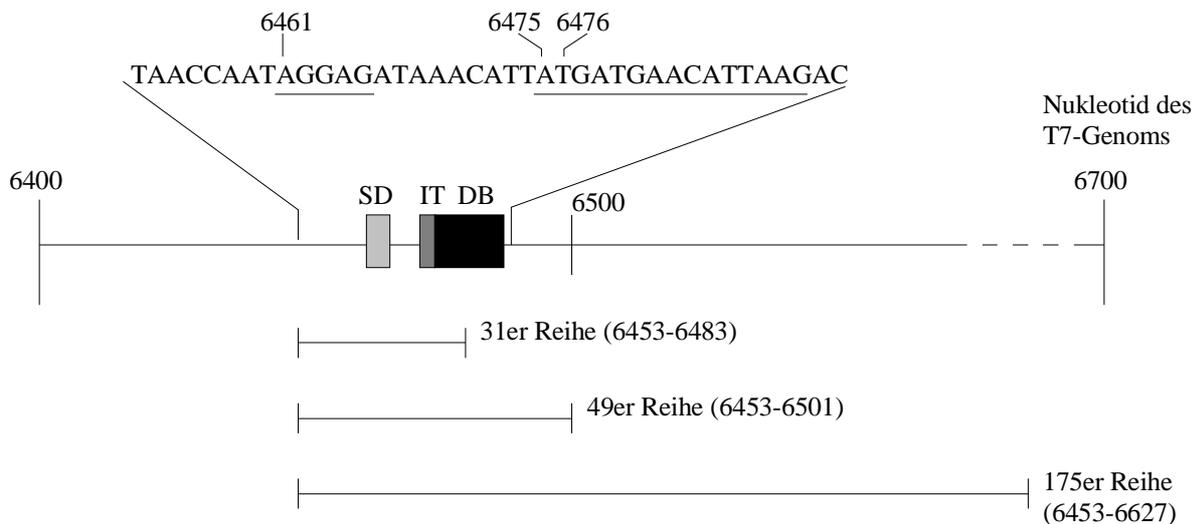


Abb. III.7.1: Schematische Darstellung der verwendeten Fragmente der TIR des T7-Gens 1,3. Die erste horizontale Linie zeigt den relevanten Teil der T7-Sequenz. Die Zahlenangaben geben die Position innerhalb des T7-Genoms wieder. Ein Teil der untersuchten Sequenz ist oberhalb angegeben, SD, IT und DB sind unterstrichen. Die DB dieses Gens beginnt bereits mit dem ‚T‘ des ‚ATG‘-IT. Darunter sind die einzelnen Fragmente dargestellt. Der exakte Bereich aus der T7-Sequenz, den sie umfassen, ist in Klammern angegeben. Fragmente dieser Längen mit unterschiedlichen SD wurden in Expressionsvektoren vor geeignete Reportergene einkloniert. Es wurde untersucht, ob und wie stark sie die Translationseffizienz der Reportergene verbessern können.

Shine-Dalgarno-Konsensussequenz:	5' TAAGGAGGTGATC 3'
5er Shine-Dalgarno-Sequenz (WT):	ATAGGAGATAAAC
7U Shine-Dalgarno-Sequenz:	TAAGGAGATAAAC
7D Shine-Dalgarno-Sequenz:	ATAGGAGGTAAAC
9er Shine-Dalgarno-Sequenz:	TAAGGAGGTAAAC
11er Shine-Dalgarno-Sequenz:	ATAGGAGGTGATC

Abb. III.7.2: Aufstellung der Shine-Dalgarno-Veränderungen an der TIR des T7-Gens 1,3. Wiedergegeben ist die SD-Konsensussequenz auf der mRNA sowie Ausschnitte aus der RBS von Konstrukten mit den verlängerten SD. Nukleotide identisch zur Konsensussequenz (komplementär zur 16S rRNA) sind dick gedruckt. Im Falle der SD-Verlängerung auf 7 Nt wurden zwei verschiedene Konstrukte hergestellt. Bei einem wurde die SD an ihrem upstream-Ende verlängert (7U), bei dem anderen erfolgte die Verlängerung am downstream-Ende (7D).

Das Konstrukt p1,3-31-SD5 ND wurde von Herrn Dr. Vollmer zur Verfügung gestellt. p1,3-31-SD7U ND sowie alle Konstrukte der 49er und 175er Reihen wurden über gerichtete Mutation mittels PCR hergestellt. In bereits vorhandene, und von Herrn Dr. Vollmer zur Verfügung gestellten T7-Gen 1,3 Konstrukten wurde über spezielle PCR-Primer die SD-Veränderungen sowie geeignete Restriktionsschnittstellen eingeführt. Die Konstrukte p1,3-31-SD7D ND, p1,3-31-SD9 ND sowie p1,3-31-SD11 ND wurden durch Einklonierung synthetisierter Oligonukleotide in den Vektor ND erzeugt.

III.7.1 *In vitro* Proteinsynthese der Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor

In einem gekoppelten *in vitro* Proteinbiosynthesesystem wurden die Konstrukte mit den einklonierten TIR-Fragmenten des T7-Gens 1,3 auf die Expression des Fusionsproteins aus T7-TIR und DHFR hin untersucht. Nach Auftrennung der hergestellten, radioaktiv markierten Proteine mittels PAA-Gelelektrophorese wurde mit den Gelen eine Fluorografie durchgeführt. Einen Ausschnitt eines Röntgenfilms, auf dem die Fusionsproteine zu sehen sind, gibt Abbildung III.7.1.1 wieder.

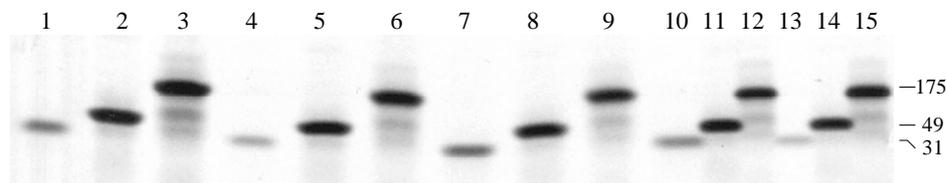


Abb. III.7.1.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der Konstrukte des Gens 1,3 im pDS5-ND-Vektor zeigt. Zur Quantifizierung wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Seitlich angegeben ist die Länge des verwendeten T7-Inserts. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1,3-31-SD5 ND; 2) p1,3-49-SD5 ND; 3) p1,3-175-SD5 ND; 4) p1,3-31-SD7U ND; 5) p1,3-49-SD7U ND; 6) p1,3-175-SD7U ND; 7) p1,3-31-SD7D ND; 8) p1,3-49-SD7D ND; 9) p1,3-175-SD7D ND; 10) p1,3-31-SD9 ND; 11) p1,3-49-SD9 ND; 12) p1,3-175-SD9 ND; 13) p1,3-31-SD11ND; 14) p1,3-49-SD11 ND; 15) p1,3-175-SD11 ND

Ergebnisse

Nach dem Ausschneiden der Fusionsproteinbanden aus dem PAA-Gel wurden deren Radioaktivität quantitativ im Szintillationszähler gemessen. Dieser Test wurde mehrfach durchgeführt. Das Ergebnis eines solchen Tests ist in Tabelle III.7.1.1 und Abbildung III.7.1.2 dargestellt.

Tab. III.7.1.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor im *in vitro* Test. Dieser Test wurde dreifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (2307 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1,3-31-SD5 ND	387	17%
p1,3-31-SD7U ND	274	12%
p1,3-31-SD7D ND	527	23%
p1,3-31-SD9 ND	517	22%
p1,3-31-SD11 ND	110	5%
p1,3-49-SD5 ND	2095	91%
p1,3-49-SD7U ND	2059	89%
p1,3-49-SD7D ND	1298	56%
p1,3-49-SD9 ND	1575	68%
p1,3-49-SD11 ND	1098	48%
p1,3-175-SD5 ND	2307	100%
p1,3-175-SD7U ND	2017	87%
P1,3-175-SD7D ND	1526	66%
p1,3-175-SD9 ND	1265	55%
p1,3-175-SD11 ND	1576	36%

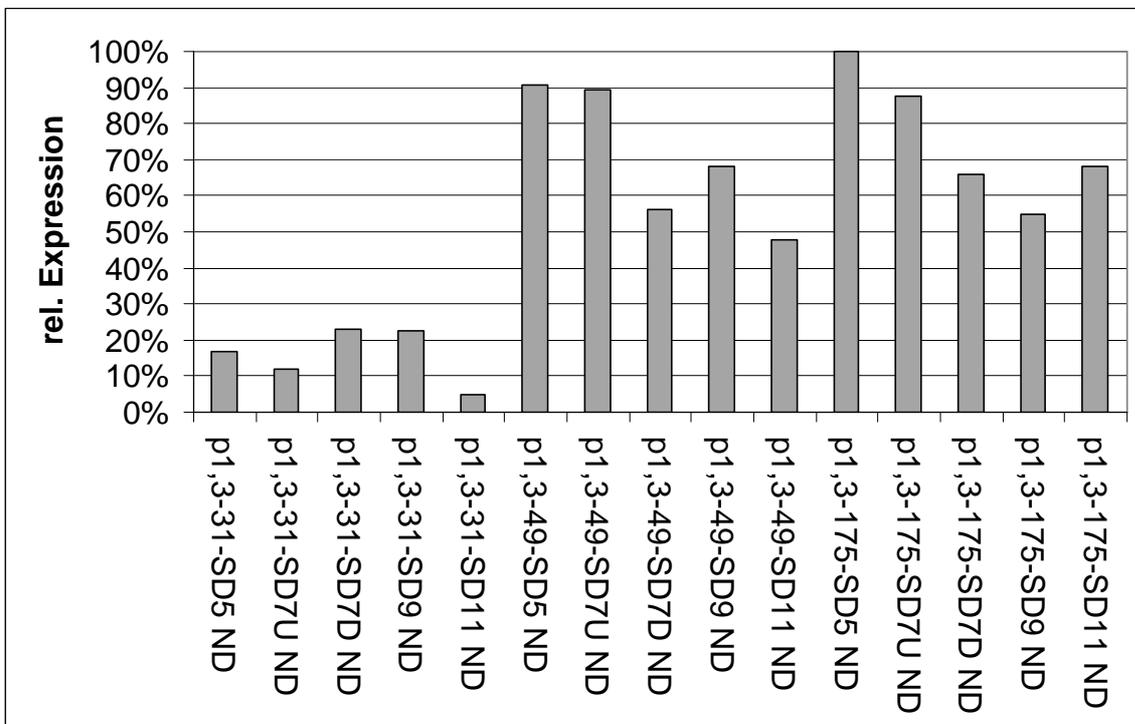


Abb. III.7.1.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor aus Tabelle III.7.1.1 im *in vitro* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD..

Sehr stark sind jeweils die SD5-Konstrukte. Bei den 49er und 175er Serien sind sie sogar die Stärksten. Die Konstrukte mit der längsten SD sind relativ schwach (Abb. III.7.1.3B). Die längste SD von 11 Nt Länge ist bei den kurzen Fragmentlängen die schlechteste, bei den 175er Konstrukten ist sie ebenfalls sehr schwach. Dies ist ein Unterschied zu den *in vitro* Ergebnissen der TIR des Gens 1. Die TIR des Gens 1,3 ist im WT schon wesentlich stärker als die des Gens 1 (Fatscher et al., 1988). Darin mag der Grund liegen, warum bereits im *in vitro* Test die längste SD hier keine hohe Expression ergibt. Es ist zu vermuten, dass die Ribosomen an diese Startstellen zu gut binden, da die Wechselwirkung zwischen SD und ASD zu stabil ist, und dadurch der Übergang in die Elongation erschwert wird. Daher sind kurze SD günstiger, nur bei den 31er Konstrukten, denen ein Teil der DB fehlt, ist eine verlängerte SD (SD7D und SD9) vorteilhafter.

Betrachtet man die SD7U und SD7D Konstruktserien so fällt auf, dass es eine Rolle zu spielen scheint, in welche Richtung man die SD verlängert. Bei einer Verlängerung downstream auf 7 Nt ist die Expression bei den 31ern um 48% stärker als bei einer Verlängerung upstream auf 7 Nt. Bei den 49er Konstrukten und der 175er Serie ist das 7U-Konstrukt jedoch um 37% bzw 24% stärker als das 7D-Konstrukt.

Durch eine Verlängerung des Downstreambereichs von 9 auf 27 Nt ergibt sich eine deutliche Steigerung der Expression des T7/DHFR-Fusionsproteins (60-90%; Abb. III.7.1.3B). Der Grund hierfür könnte die bereits angesprochene, unvollständige DB der 31 bp langen Konstrukte sein. Durch weitere Verlängerung der Downstreamregion auf 153 bp kommt es nur noch zu einem sehr geringen Zuwachs der Expression, bei den Konstrukten mit der 9 Nt langen SD kommt es sogar zu einem leichten Absinken.

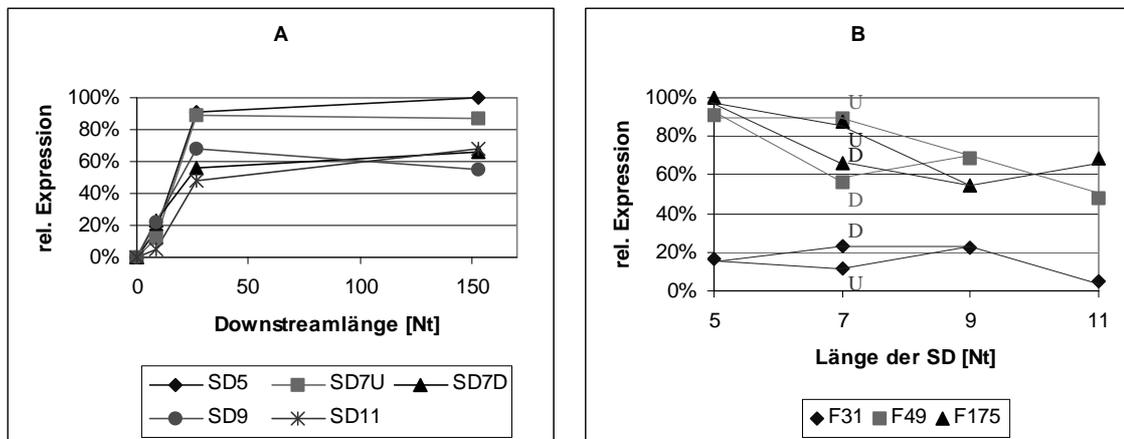


Abb. III.7.1.3: Grafische Darstellung der relativen *in vitro* Expression der T7-Gen 1,3 Konstrukte im Vektor pDS5-ND. A) Relative Expression bei unterschiedlichen SD aufgetragen gegen die Downstreamlänge der inklonierten Fragmente (9, 27 und 153 Nt). B) Relative Expression bei unterschiedlichen Fragmentgrößen (31, 49 und 175 Nt) aufgetragen gegen die Länge der SD (5, 7, 9 und 11 Nt). Da die 7 Nt lange SD sowohl durch Verlängerung upstream (U) als auch downstream (D) erzeugt wurde sind hier zwei Punkte angegeben.

III.7.2 *In vivo* Proteinsynthese der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor

Neben den *in vitro* Proteinbiosynthesetests wurden auch Versuche *in vivo* durchgeführt. Zwar kann man hier die verschiedenen Parameter der Testbedingungen nicht mehr so genau kontrollieren, dafür könnten aber Mechanismen eine Rolle spielen, die nur in der lebenden Zelle zur Anwendung kommen und sich im Reagenzglas nicht simulieren lassen. *In vitro* und *in vivo* Tests ergänzen sich in ihren Aussagen. Abbildung III.7.2.1 zeigt einen Ausschnitt aus einem Röntgenfilm, auf dem die Fusionsproteinbanden der einzelnen Konstrukte zu sehen sind. Diese

Ergebnisse

Banden wurden, wie bereits beschrieben, aus den PAA-Gelen ausgeschnitten und ihre Radioaktivität quantitativ im Szintillationszähler bestimmt. Das Ergebnis dieses Tests ist in Tabelle III.7.2.1 und Abbildung III.7.1.2 dargestellt.

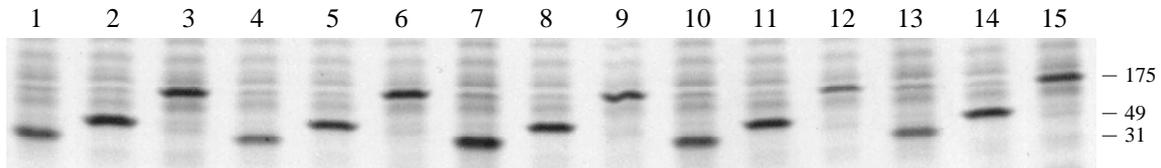


Abb. III.7.2.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vivo* Proteinsynthese der Konstrukte des Gens 1,3 im pDS5-ND-Vektor zeigt. Zur Quantifizierung wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Seitlich angegeben ist die Länge des verwendeten T7-Inserts. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1,3-31-SD5 ND; 2) p1,3-49-SD5 ND; 3) p1,3-175-SD5 ND; 4) p1,3-31-SD7U ND; 5) p1,3-49-SD7U ND; 6) p1,3-175-SD7U ND; 7) p1,3-31-SD7D ND; 8) p1,3-49-SD7D ND; 9) p1,3-175-SD7D ND; 10) p1,3-31-SD9 ND; 11) p1,3-49-SD9 ND; 12) p1,3-175-SD9 ND; 13) p1,3-31-SD11ND; 14) p1,3-49-SD11 ND; 15) p1,3-175-SD11 ND

Tab. III.7.2.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor im *in vivo* Test. Dieser Test wurde dreifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (2531 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1,3-31-SD5 ND	1560	62%
p1,3-31-SD7U ND	1159	46%
p1,3-31-SD7D ND	1736	69%
p1,3-31-SD9 ND	1245	49%
p1,3-31-SD11 ND	1140	45%
p1,3-49-SD5 ND	2492	98%
p1,3-49-SD7U ND	2531	100%
p1,3-49-SD7D ND	2343	93%
p1,3-49-SD9 ND	1582	63%
p1,3-49-SD11 ND	1864	74%
p1,3-175-SD5 ND	2090	83%
p1,3-175-SD7U ND	1312	52%
p1,3-175-SD7D ND	1514	60%
p1,3-175-SD9 ND	1321	52%
p1,3-175-SD11 ND	1181	47%

In vivo ergibt sich bei einer Verlängerung des Downstreambereichs von 9 auf 27 Nt eine Steigerung der Expressionsrate des Fusionsproteins, die jedoch verglichen mit den *in vitro* Resultaten geringer ausfällt (*in vivo* Steigerung um 22-50%, *in vitro* um 60-90%; vgl. Abb. III.7.2.3A mit Abb. III.7.1.1A). Verlängert man weiter auf 153 Nt, so sinkt die Expression bei allen SD-Längen, teilweise deutlich (16-49%). Dieses Absinken konnte schon im *in vivo* Versuch der Gen 1 Konstrukte beobachtet werden.

Die Konstrukte mit der WT-SD sind, wie schon *in vitro*, auch *in vivo* sehr stark (vgl. Abb. III.7.2.3B mit Abb. III.7.1.3B). In der 175er Konstruktsreihe zeigt das Konstrukt mit der WT-SD die höchste Expressionsrate. Stärkstes Konstrukt der 31er Reihe bleibt aber p1,3-31-SD7D, welches auch hier wieder stärker ist (um 33%) als das Konstrukt mit der upstream verlängerten SD.

p1,3-49-SD5 ND und p1,3-49-SD7U ND sind auch hier fast gleichstark, wobei allerdings *in vivo* das 7U-Konstrukt etwas stärker exprimiert. Das Konstrukt p1,3-49-SD7D ND, welches *in vitro*

Ergebnisse

deutlich schwächer war als p1,3-49-SD7U ND, ist *in vivo* fast genauso stark. Bei den 175er Konstrukten zeigen sich ebenfalls Unterschiede zu den *in vitro* Experimenten. p1,3-175-SD7U ND ist ein wenig schwächer als p1,3-175-SD7D ND und p1,3-175-SD11 ND ist das Schwächste der Reihe.

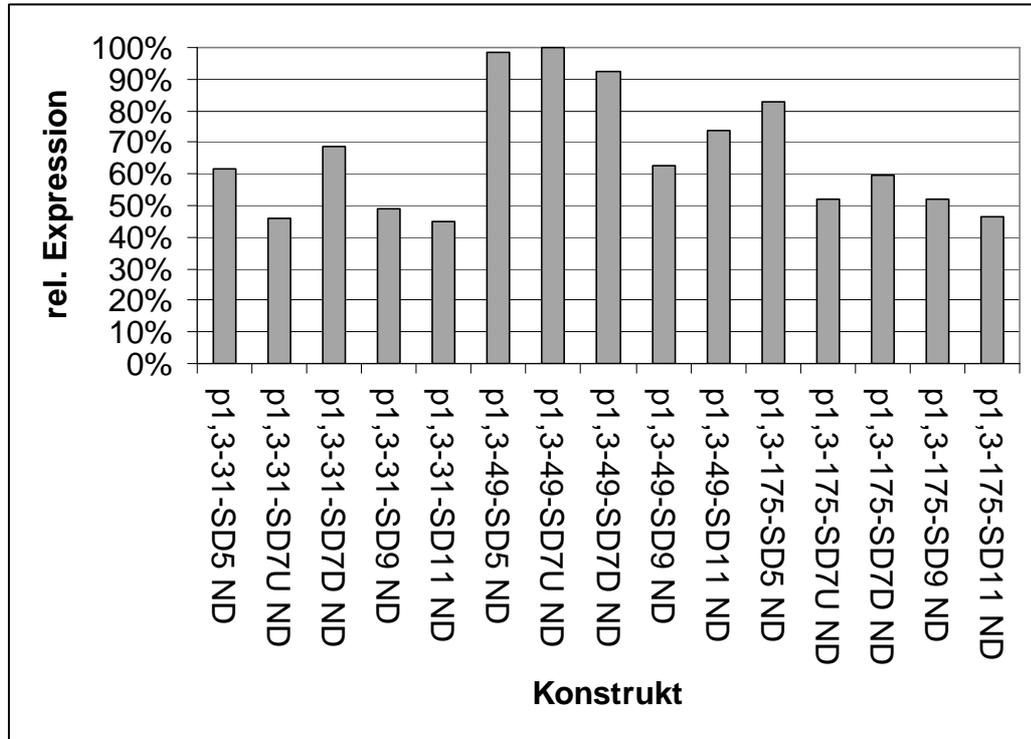


Abb. III.7.2.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor aus Tabelle III.7.2.1 im *in vivo* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD.

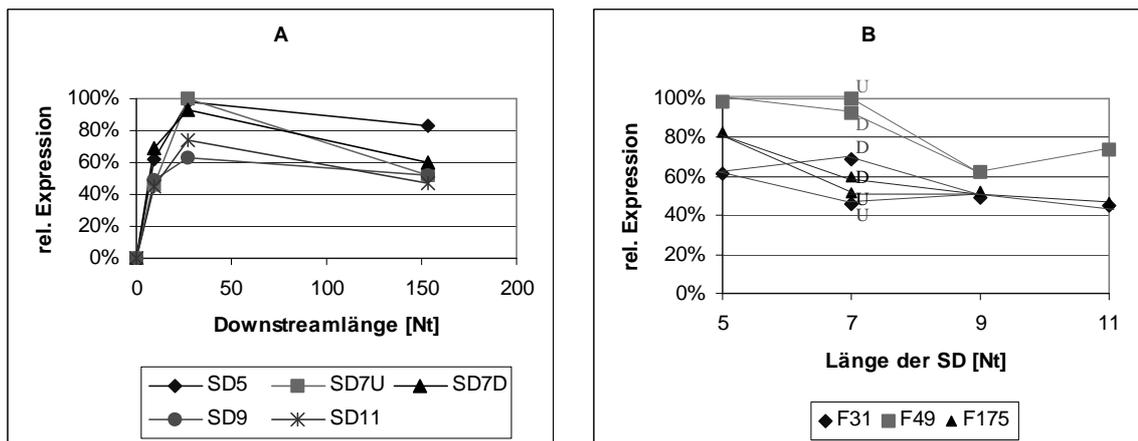


Abb. III.7.2.3: Grafische Darstellung der relativen *in vivo* Expression der T7-Gen 1,3 Konstrukte im Vektor pDS5-ND. A) Relative Expression bei unterschiedlichen SD aufgetragen gegen die Downstreamlänge der inklonierten Fragmente (9, 27 und 153 Nt). B) Relative Expression bei unterschiedlichen Fragmentgrößen (31, 49 und 175 Nt) aufgetragen gegen die Länge der SD (5, 7, 9 und 11 Nt). Da die 7 Nt lange SD sowohl durch Verlängerung upstream (U) als auch downstream (D) erzeugt wurde sind hier zwei Punkte angegeben.

III.7.3 *In vitro* RNA-Synthese der Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor

Die Kontrolle der Transkriptionsrate wurden wie für die Konstrukte des Gens 1 bereits besprochen durchgeführt (III.6.3). Unterschiedliche DNA-Konzentrationen der einzelnen Konstrukte wurden *in vitro* auf ihre mRNA-Synthese getestet. Abbildung III.7.3.1 gibt das Ergebnis eines solchen Tests wieder.

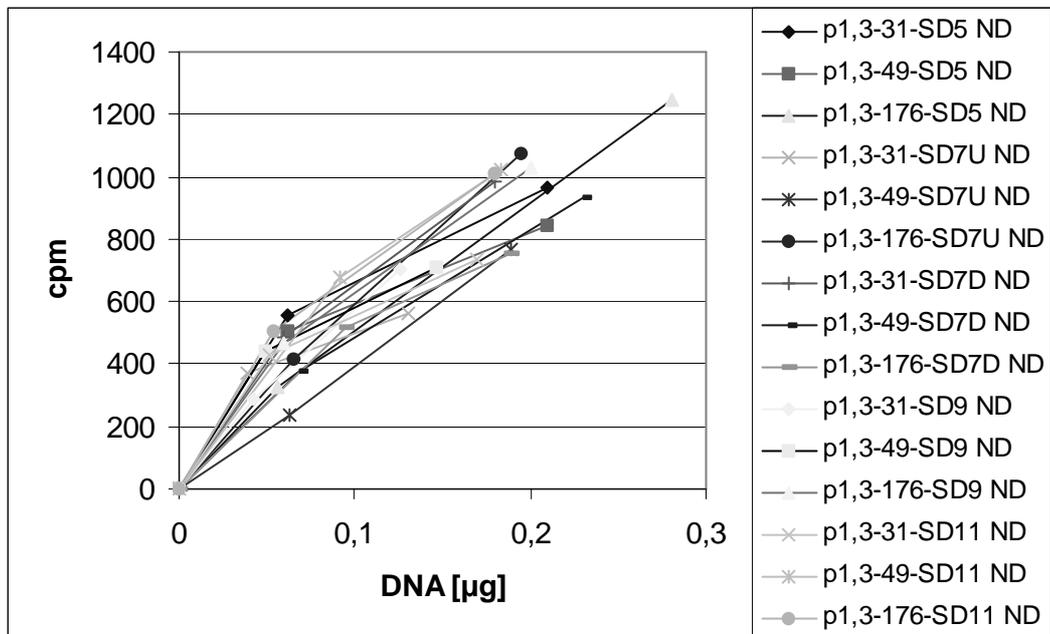


Abb. III.7.3.1: Darstellung der *in vitro* mRNA-Synthese der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor. Unterschiedliche DNA-Mengen der einzelnen Konstrukte wurden im gekoppelten *in vitro* Biosynthesesystem in Gegenwart von ^{14}C -UTP auf ihre mRNA-Synthese untersucht. Die radioaktiv markierte mRNA wurde im Szintillationszähler gemessen. Die erhaltenen cpm Werte sind gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen.

Die Abweichungen in der mRNA-Synthese der einzelnen Konstrukte halten sich in einem vertretbaren Rahmen. Sie korrelieren nicht mit Schwankungen in der Expression des Reportergens. Daher kann man davon ausgehen, dass die inklonierten Fragmente keinen Einfluss auf die Transkriptionsrate der Konstrukte haben.

III.7.4 *In vitro* Proteinsynthese der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor

Alle T7-Gen 1,3 Konstrukte wurden auch im NC-Vektor *in vitro* auf die Expression des T7-TIR/CAT-Fusionsproteins hin untersucht. Die Tests wurden in gleicher Art und Weise durchgeführt, wie für das Gen 1 oder die Gen 1,3 ND-Konstrukte. Abbildung III.7.4.1 gibt die Fusionsproteinbanden wieder, die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurden.

Ergebnisse

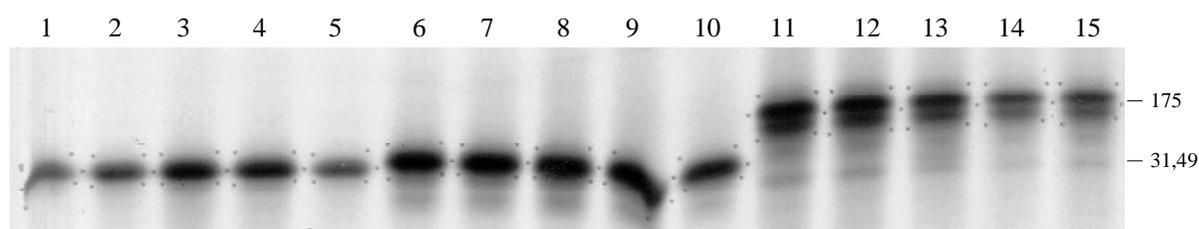


Abb. III.7.4.1: Fluorografie, die die T7-TIR/CAT-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der Konstrukte des Gens 1,3 im pDS5-NC-Vektor zeigt. Zur Quantifizierung wurden die Banden ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Seitlich angegeben ist die Länge des verwendeten T7-Inserts. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1,3-31-SD5 ND; 2) p1,3-31-SD7U ND; 3) p1,3-31-SD7D ND; 4) p1,3-31-SD9 ND; 5) p1,3-31-SD11 ND; 6) p1,3-49-SD5 ND; 7) p1,3-49-SD7U ND; 8) p1,3-49-SD7D ND; 9) p1,3-49-SD9 ND; 10) p1,3-49-SD11 ND; 11) p1,3-175-SD5 ND; 12) p1,3-175-SD7U ND; 13) p1,3-175-SD7D ND; 14) p1,3-175-SD9 ND; 15) p1,3-175-SD11 ND

Nach dem Ausschneiden der Banden aus dem PAA-Gel wurden die entsprechenden Gel-Stücke in Vials für den Szintillationszähler überführt und ihre Radioaktivität wurde quantitativ bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle III.7.4.1 und grafisch in Abbildung III.7.4.2 wiedergegeben.

Tab III.7.4.1: Relative Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor im *in vitro* Test. Dieser Test wurde vierfach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1,3-31-SD5 NC	652	18%
p1,3-31-SD7U NC	1043	28%
p1,3-31-SD7D NC	2177	59%
p1,3-31-SD9 NC	1889	52%
p1,3-31-SD11 NC	772	21%
p1,3-49-SD5 NC	2915	80%
p1,3-49-SD7U NC	2966	81%
p1,3-49-SD7D NC	3226	88%
p1,3-49-SD9 NC	3663	100%
p1,3-49-SD11 NC	1804	49%
p1,3-175-SD5 NC	3510	96%
p1,3-175-SD7U NC	3376	92%
p1,3-175-SD7D NC	2361	64%
p1,3-175-SD9 NC	1292	35%
p1,3-175-SD11 NC	1597	44%

Die *in vitro* Ergebnisse für den NC-Vektor zeigen ebenfalls, dass bei den Konstrukten des Gens 1,3 eine lange SD nicht von Vorteil ist (Abb. III.7.4.3B). Bei allen Konstruktängen ergibt sich für eine 11 Nt lange SD eine relative schlechte Expression. In der 31er Reihe exprimiert, wie schon im ND-Vektor, p1,3-31-SD7D am stärksten. Eine Verlängerung der SD auf 7 oder 9 Nt bewirkt hier eine Steigerung der Expression. Auch bei den 49er Konstrukten steigert sich die Expressionsrate bei einer Verlängerung der SD auf 7 oder 9 Nt. Dies war im ND-Vektor nicht der Fall, hier war p1,3-49-SD5 ND am stärksten. Es fällt auf, dass auch p1,3-49-SD7U, schon im ND-Vektor praktisch gleichstark wie p1,3-49-SD5, ebenso absinkt im NC-Vektor. Bei den 175er Konstrukten ist tendenziell alles so wie bereits im ND-Vektor gesehen. p1,3-175-SD5 NC zeigt

die höchste Expression, bei einer Verlängerung der SD sinkt die Translationsrate zunächst nur leicht (p1,3-175-SD7U), dann stärker (Konstrukte mit SD7D, SD9 und SD11), auch etwas stärker als es im ND-Vektor zu beobachten war.

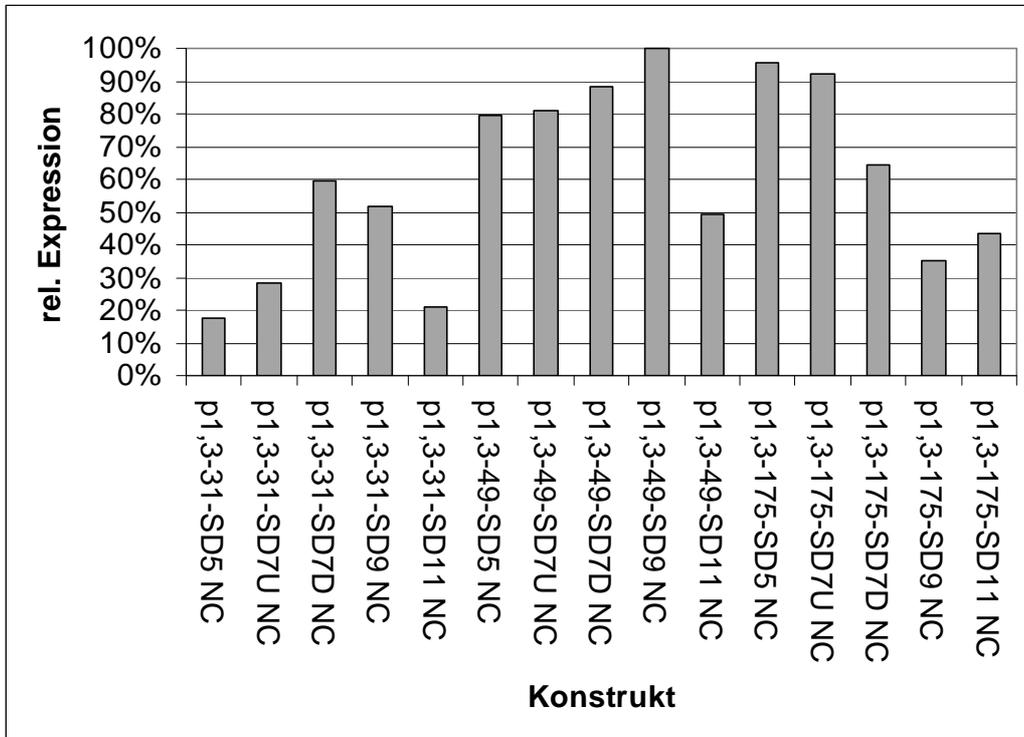


Abb. III.7.4.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor aus Tabelle III.7.4.1 im *in vitro* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD.

Die 31er Konstrukte zeigen untereinander größere Unterschiede als im ND-Vektor. Zum Beispiel beträgt der Unterschied zwischen p1,3-31-SD5 und p1,3-31-SD7D im ND Vektor nur 27%, im NC-Vektor 70%. Hierdurch verringert sich auch der Abstand zu den 49er Konstrukten. Vergleicht man die Konstrukte mit unterschiedlichen Downstreamlängen miteinander (Abb. III.7.4.3A), so fällt auf, dass das Absinken der Expression zwischen p1,3-49-SD9 und p1,3-175-SD9 im NC-Vektor deutlicher ausfällt als im ND-Vektor (75% zu 20%). Im NC-Vektor ist p1,3-49-SD9 NC allerdings auch das stärkste Konstrukt im ganzen Test. Im ND-Vektor war dieses Konstrukt merklich schwächer.

Für die Konstrukte mit den anderen SD-Längen ergeben sich nur geringere Veränderungen bei der Verlängerung des Downstreambereichs von 27 auf 153 Nt. Dies gleicht dem Bild für den ND-Vektor.

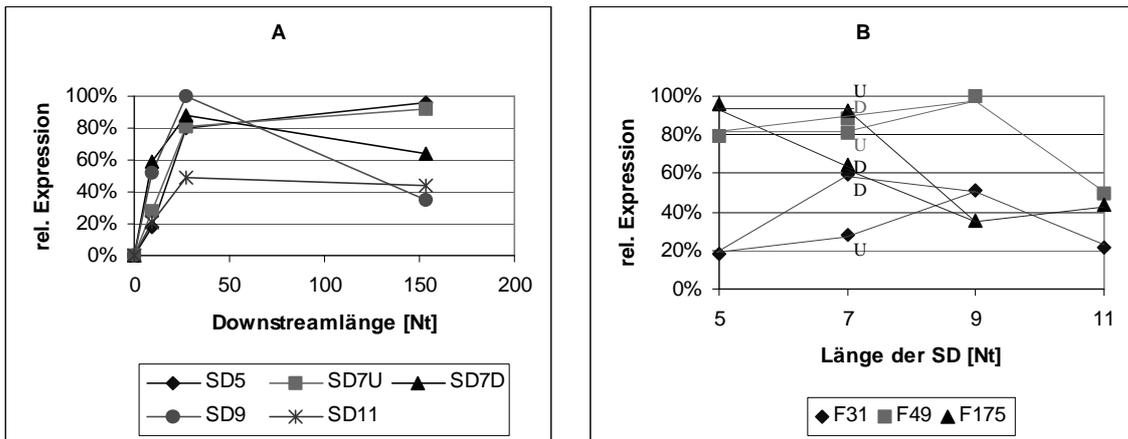


Abb. III.7.4.3: Grafische Darstellung der relativen *in vitro* Expression der T7-Gen 1,3 Konstrukte im Vektor pDS5-NC. A) Relative Expression bei unterschiedlichen SD aufgetragen gegen die Downstreamlänge der einklonierten Fragmente (9, 27 und 153 Nt). B) Relative Expression bei unterschiedlichen Fragmentgrößen (31, 49 und 175 Nt) aufgetragen gegen die Länge der SD (5, 7, 9 und 11 Nt). Da die 7 Nt lange SD sowohl durch Verlängerung upstream (U) als auch downstream (D) erzeugt wurde sind hier zwei Punkte angegeben.

III.7.5 *In vivo* Proteinsynthese der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor

Wie bereits für die ND-Konstrukte beschrieben, wurden auch die T7-Gen 1,3 NC-Konstrukte in den lebenden Bakterienzellen, also *in vivo*, getestet. Die bei diesem Test synthetisierten Reporterfusionsproteine sind in Abbildung III.5.1 zu sehen. Nach Quantifizierung der in den Banden enthaltenen Radioaktivität ergeben sich die in Tabelle III.7.5.1 wiedergegebenen relativen Expressionsraten. Grafisch dargestellt werden diese in Abbildung III.7.5.2.

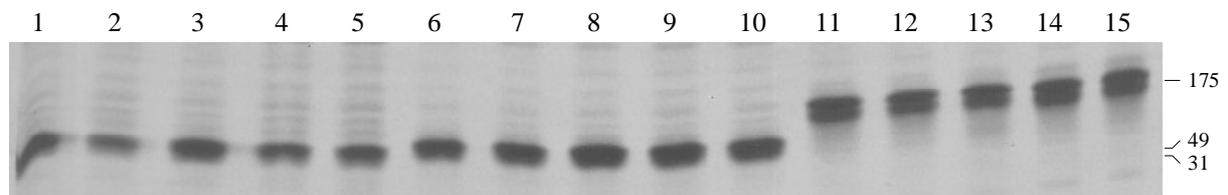


Abb. III.7.5.1: Fluorografie, die die T7-TIR/CAT-Fusionsproteine der *in vivo* Proteinsynthese der Konstrukte im pDS5-NC-Vektor des Gens 1,3 zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Seitlich angegeben ist die Länge des verwendeten T7-Inserts. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1,3-31-SD5 NC; 2) p1,3-49-SD5 NC; 3) p1,3-175-SD5 NC; 4) p1,3-31-SD7U NC; 5) p1,3-49-SD7U NC; 6) p1,3-175-SD7U NC; 7) p1,3-31-SD7D NC; 8) p1,3-49-SD7D NC; 9) p1,3-175-SD7D NC; 10) p1,3-31-SD9 NC; 11) p1,3-49-SD9 NC; 12) p1,3-175-SD9 NC; 13) p1,3-31-SD11 NC; 14) p1,3-49-SD11 NC; 15) p1,3-175-SD11 NC

Ergebnisse

Tab. III.7.5.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor im *in vivo* Test. Dieser Test wurde fünffach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (6222 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1,3-31-SD5 NC	1882	30%
p1,3-31-SD7U NC	774	12%
p1,3-31-SD7D NC	2493	40%
p1,3-31-SD9 NC	1026	16%
p1,3-31-SD11 NC	1147	18%
p1,3-49-SD5 NC	5827	94%
p1,3-49-SD7U NC	4668	75%
p1,3-49-SD7D NC	6222	100%
p1,3-49-SD9 NC	4218	68%
p1,3-49-SD11 NC	3910	63%
p1,3-175-SD5 NC	5515	89%
p1,3-175-SD7U NC	3792	61%
p1,3-175-SD7D NC	6117	98%
p1,3-175-SD9 NC	5765	93%
p1,3-175-SD11 NC	5307	85%

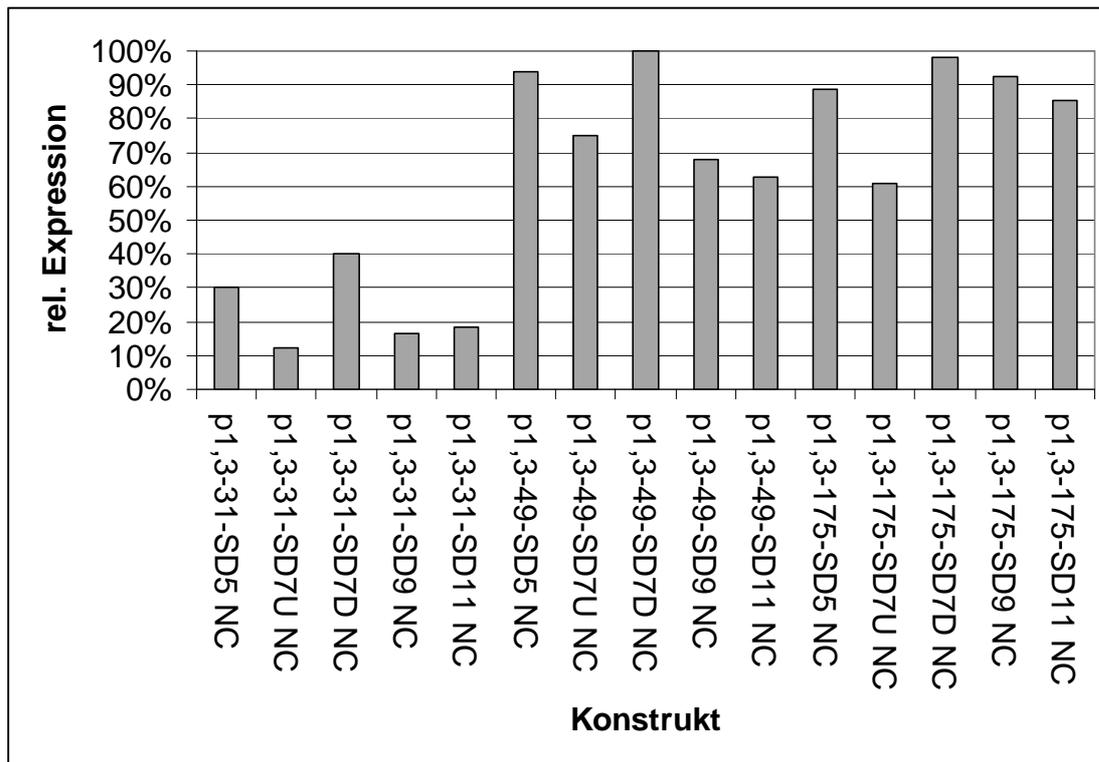


Abb. III.7.5.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor aus Tabelle III.7.5.1 im *in vivo* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD.

In diesem *in vivo* Test ist bei allen Insertlängen jeweils das Konstrukt mit der SD7D am stärksten (Abb. III.7.5.3B). Im *in vitro* Test war das nur bei den 31er Konstrukten der Fall. Weitere Gemeinsamkeiten bei allen drei Insertlängen sind die Stärke der kurzen SD von 5 Nt Länge sowie ein Absinken der Expression bei den längeren SD von 9 bzw. 11 Nt Länge. Bei den 175er Konstrukten nimmt die Expression bei den langen SD allerdings nur wenig ab. Ebenfalls bei allen Insertlängen zu beobachten ist, dass das SD7U Konstrukt sehr schwach ist, gerade im Vergleich mit dem starken SD7D Konstrukt. Bei den 31er Konstrukten ist das SD7D Konstrukt um 69% stärker, bei der 49er Reihe um 25% und bei der 175er Serie um 38%.

Wie erwartet bewirkt eine Verlängerung des Downstreambereichs von 9 auf 27 Nt eine deutliche Steigerung der Expressionsrate (Abb. III.7.5.3A). Eine weitere Verlängerung auf 153 Nt führt nur bei den Konstrukten mit der 9 und 11 Nt langen SD zu einer weiteren, leichten Erhöhung. Im ND-Vektor verlieren alle Konstrukte *in vivo* bei der größten Downstreamlänge an Expression.

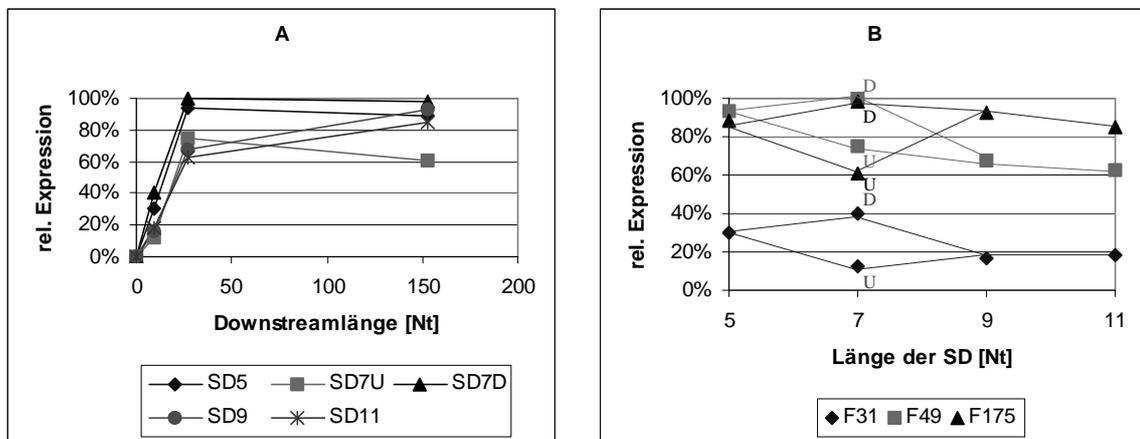


Abb. III.7.5.3: Grafische Darstellung der relativen *in vivo* Expression der T7-Gen 1,3 Konstrukte im Vektor pDS5-NC. A) Relative Expression bei unterschiedlichen SD aufgetragen gegen die Downstreamlänge der inklonierten Fragmente (9, 27 und 153 Nt). B) Relative Expression bei unterschiedlichen Fragmentgrößen (31, 49 und 175 Nt) aufgetragen gegen die Länge der SD (5, 7, 9 und 11 Nt). Da die 7 Nt lange SD sowohl durch Verlängerung upstream (U) als auch downstream (D) erzeugt wurde sind hier zwei Punkte angegeben.

III.7.6 *In vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor

Um sicherzustellen, dass sich durch das Einklonieren der TIR-Fragmente des T7-Gens 1,3 die Stärke des Promotors des CAT-Reportergens nicht geändert hat, wurden alle Konstrukte in einem *in vitro* Testsystem auf ihre mRNA-Syntheseraten hin untersucht. Hierzu wurden die verschiedenen Konstrukte in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Die synthetisierte mRNA wurde durch Einbau von ^{14}C -UTP radioaktiv markiert und im Szintillationszähler gemessen.

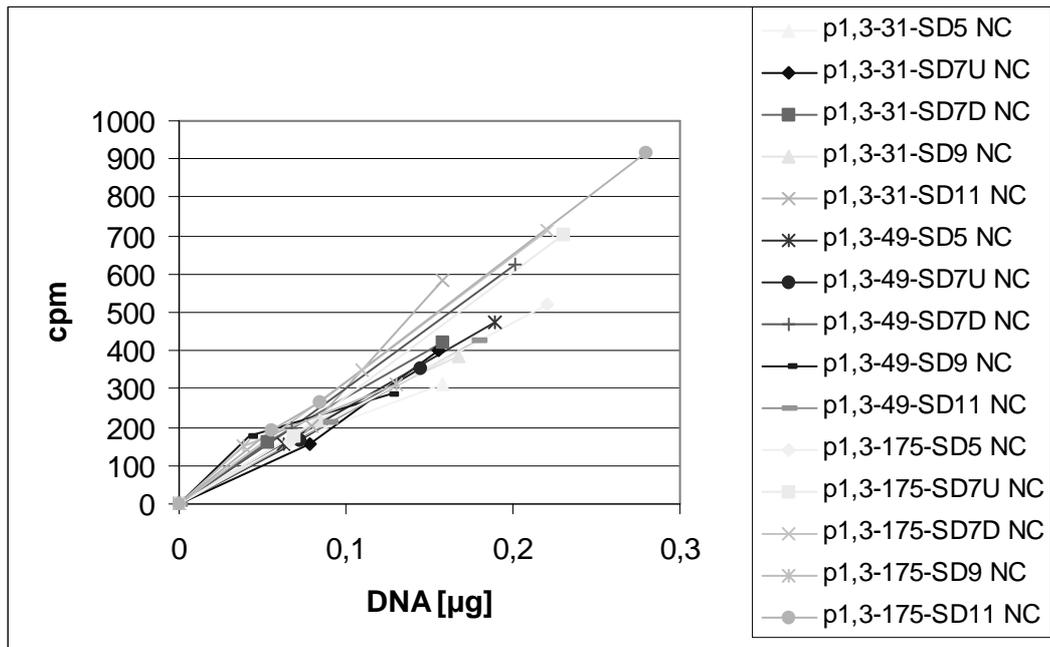


Abb. III.7.6.1: Darstellung der *in vitro* mRNA-Synthese der T7-Gen 1,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor. Unterschiedliche DNA-Mengen der einzelnen Konstrukte wurden im gekoppelten *in vitro* Biosynthesesystem in Gegenwart von ^{14}C -UTP auf ihre mRNA-Synthese untersucht. Die radioaktiv markierte mRNA wurde im Szintillationszähler gemessen. Die erhaltenen cpm Werte sind gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen.

Abbildung III.7.6.1 zeigt, dass alle Konstrukte vergleichbare Mengen an mRNA synthetisieren. Die auftretenden Unterschiede korrelieren nicht mit Unterschieden in der Expression des Reportergens. Durch die einklonierten Fragmente der T7-TIR ergeben sich keine Veränderungen für die Transkriptionsrate. Unterschiede in der Expression des Fusionsproteins können somit auf Änderungen der Translationsrate und/oder der Stabilität von mRNA oder Fusionsprotein zurückgeführt werden.

III.8 Verlängerung der SD bei der TIR des T7-Gens 0,3

Das erste Gen der frühen Region von T7, das Gen 0,3, welches für ein Antirestriktionsprotein kodiert, zeigte bezüglich der Abhängigkeit der TIR-Aktivität von der Fragmentlänge in den Versuchen von Fatscher et al 1988 ein ähnliches Verhalten wie das Gen 1. Es soll hier als Ergänzung überprüft werden, ob dies auch für die Variation der SD-Größe zutrifft.

Drei unterschiedlich große Fragmente der TIR des Gens 0,3 wurden untersucht. Sie hatten eine Länge von 28, 40 und 56 Nukleotiden. Alle Fragmente hatten das gleiche upstream-Ende (Position 906 im T7-Genom). Sie unterschieden sich durch die Länge ihres downstream-Bereichs (entsprechend 9, 21 und 37 Nt). Abbildung III.8.1 gibt einen schematischen Überblick über die verschieden langen Fragmente. Die ursprünglich 5 Nt lange SD des Gens 0,3 wurde durch Basenaustausch auf 7, 9 bzw. 12 Nt verlängert. Die verschiedenen SD sind, zusammen mit der SD-Konsensussequenz in Abbildung III.8.2 dargestellt.

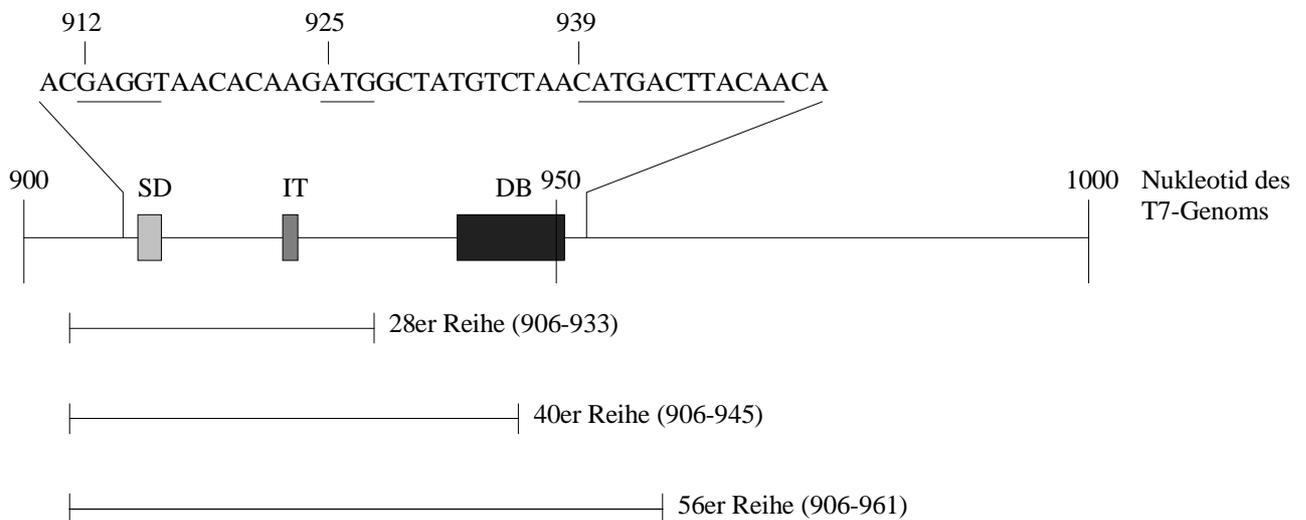


Abb. III.8.1: Schematische Darstellung der verwendeten Fragmente der TIR des T7-Gens 0,3. Die erste horizontale Linie zeigt den relevanten Teil der T7-Sequenz. Die Zahlenangaben geben die Position innerhalb des T7-Genoms wieder. Ein Teil der untersuchten Sequenz ist oberhalb angegeben, SD, IT und DB sind unterstrichen. Darunter sind die einzelnen Fragmente dargestellt. Der exakte Bereich aus der T7-Sequenz, den sie umfassen, ist in Klammern angegeben. Fragmente dieser Längen mit unterschiedlichen SD wurden in Expressionsvektoren vor geeignete Reportergene einkloniert. Es wurde untersucht, ob und wie stark sie die Translationseffizienz der Reportergene verbessern können.

Shine-Dalgarno-Konsensussequenz:	5' TAAGGAGGTGATC 3'
5er Shine-Dalgarno-Sequenz (WT):	GCACGAGGTAACA
7er Shine-Dalgarno-Sequenz:	GCAGGAGGTAACA
9er Shine-Dalgarno-Sequenz:	GCAGGAGGTGACA
12er Shine-Dalgarno-Sequenz:	TAAGGAGGTGATA

Abb. III.8.2: Aufstellung der Shine-Dalgarno-Veränderungen an der TIR des T7-Gens 0,3. Wiedergegeben ist die SD-Konsensussequenz auf der mRNA sowie Ausschnitte aus der RBS von Konstrukten mit den verlängerten SD. Nukleotide identisch zur Konsensussequenz (komplementär zur 16S rRNA) sind dick gedruckt.

p0,3-28-SD5 ND, p0,3-40-SD5 ND und p0,3-56-SD5 ND wurden von Herrn Dr. Sprengart konstruiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Verlängerung der SD wurde von T. Hotz durchgeführt. Bei den 28er Konstrukten erfolgte sie über die Einklonierung von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden in den Expressionsvektor. Bei den 40er und 56er Konstruktreihen wurden die Veränderungen mittels PCR eingeführt.

III.8.1 *In vitro* Proteinsynthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor

Alle Konstrukte wurden in einem gekoppelten Proteinbiosynthesystem auf ihre Translationseffizienz hin untersucht. Da für den Test Plasmid-DNA eingesetzt wurde ergaben sich nach Auftrennung der synthetisierten, mit ³⁵S-Methionin markierten Proteine in einem SDS-PAGE wenige Banden. Durch Auflegen eines Röntgenfilms wurden diese sichtbar gemacht (Abb. III.8.1.1).

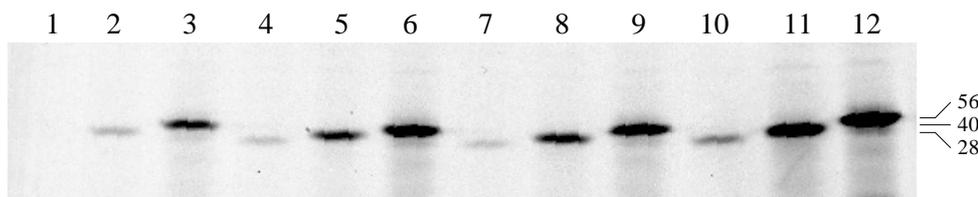


Abb. III.8.1.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der Konstrukte des T7-Gens 0,3 im pDS5-ND-Vektor mit unterschiedlich langen SD zeigt. Die Banden wurden ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Seitlich angegeben ist die Länge des verwendeten T7-Fragments. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p0,3-28-SD5 ND, 2) p0,3-40-SD5 ND, 3) p0,3-56-SD5 ND, 4) p0,3-28-SD7 ND, 5) p0,3-40-SD7 ND, 6) p0,3-56-SD7 ND, 7) p0,3-28-SD9 ND, 8) p0,3-40-SD9 ND, 9) p0,3-56-SD9 ND, 10) p0,3-28-SD12 ND, 11) p0,3-40-SD12 ND, 12) p0,3-56-SD12 ND

Die Banden der Fusionsproteine aus Reporterprotein und einigen Aminosäuren, die in dem jeweils eingesetzten TIR-Fragment kodiert sind, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und ihre Radioaktivität quantitativ im Szintillationszähler bestimmt. Das Ergebnis eines repräsentativen Tests ist in Tabelle III.8.1.1 und Schaubild III.8.1.2 dargestellt.

Ergebnisse

Tab. III.8.1.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 0,3 ND-Konstrukte im *in vitro* Test. Dieser Test wurde vierfach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (1705 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukte	cpm	rel. Expression
p0,3-28-SD5 ND	2	0%
p0,3-28-SD7 ND	29	2%
p0,3-28-SD9 ND	27	2%
p0,3-28-SD12 ND	92	5%
p0,3-40-SD5 ND	45	3%
p0,3-40-SD7 ND	218	13%
p0,3-40-SD9 ND	258	15%
p0,3-40-SD12 ND	1025	60%
p0,3-56-SD5 ND	261	15%
p0,3-56-SD7 ND	748	44%
p0,3-56-SD9 ND	637	37%
p0,3-56-SD12 ND	1705	100%

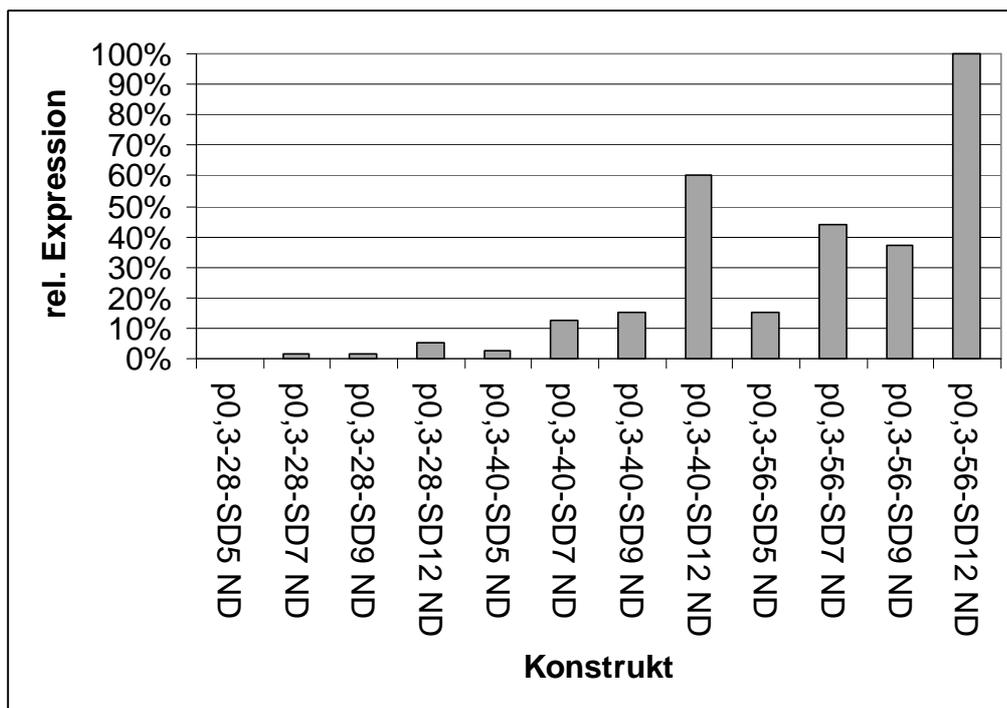


Abb. III.8.1.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor aus Tabelle II.8.1.1 im *in vitro* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD.

Eine Verlängerung der WT-SD ergibt immer eine Erhöhung der Expressionsrate (Abb. III.8.1.3B). In der Regel steigt die Expression mit jeder weiteren Verlängerung der SD an. Bei der 56er Serie ist ein leichter Abfall bei der Erweiterung der SD von 7 auf 9 Nt zu beobachten (15%). Auch bei den 28er Konstrukten ergibt sich beim Übergang von der 7 Nt langen SD zu einer 9 Nt langen SD ein minimaler Rückgang (7%). Die Konstrukte mit der 12 Nt langen SD sind bei allen Serien deutlich am stärksten.

Bei gleichbleibender SD-Länge steigt die Expression mit zunehmender Downstreamlänge (Abb. III.8.1.3A). Die Konstrukte mit dem 28 Nt langen Insert sind bei allen SD-Längen sehr schwach (nur maximal 5% der Expression des stärksten Konstrukts). Diese Konstrukte beinhalten keine Downstream Box, was die schlechten Expressionsraten erklären könnte. Die längeren Konstrukte besitzen die halbe bzw. die ganze DB.

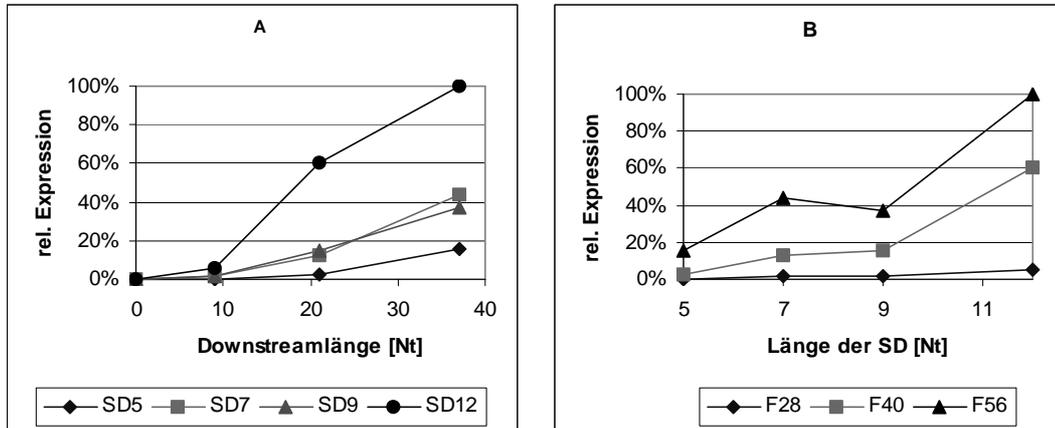


Abb. III.8.1.3: Grafische Darstellung der relativen *in vitro* Expression der T7-Gen 0,3 Konstrukte im Vektor pDS5-ND. A) Relative Expression bei unterschiedlichen SD aufgetragen gegen die Downstreamlänge der inklonierten Fragmente (9, 21 und 37 Nt). B) Relative Expression bei unterschiedlichen Fragmentgrößen (28, 40 und 56 Nt) aufgetragen gegen die Länge der SD

Der Unterschied zwischen den 40er und den 56er Konstrukten mit Downstreamlängen von 21 bzw. 37 Nt, nimmt bei steigender SD-Länge ab. Bei einer SD-Länge von 5 Nt ist das 56er Konstrukt noch sechsmal so stark wie das 40er Konstrukt, bei der längsten SD von 12 Nt nur noch 1,7mal. Die lange SD scheint hier für eine zunehmende Angleichung der Expression der unterschiedlich langen Konstrukte zu sorgen.

III.8.2 In vivo Proteinsynthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im ND-Vektor

Alle ND-Konstrukte des Gens 0,3 wurden *in vivo* getestet. Abbildung III.8.2.1 zeigt einen Röntgenfilm, auf dem das Ergebnis eines solchen *in vivo* Experiments zu sehen ist. Die entsprechenden Proteinbanden wurden ausgeschnitten und quantitativ im Szintillationszähler gemessen. Das Resultat ist in Tabelle III.8.1.1 und Abbildung III.8.2.2 dargelegt.

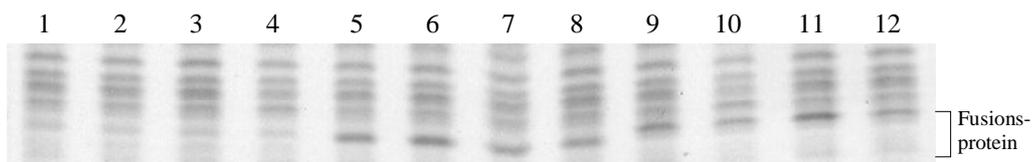


Abb. III.8.2.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vivo* Proteinsynthese der Konstrukte des Gen 0,3 im pDS5-ND-Vektor mit unterschiedlich langen SD zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p0,3-28-SD5 ND, 2) p0,3-40-SD5 ND, 3) p0,3-56-SD5 ND, 4) p0,3-28-SD7 ND, 5) p0,3-40-SD7 ND, 6) p0,3-56-SD7 ND, 7) p0,3-28-SD9 ND, 8) p0,3-40-SD9 ND, 9) p0,3-56-SD9 ND, 10) p0,3-28-SD12 ND, 11) p0,3-40-SD12 ND, 12) p0,3-56-SD12 ND

Ergebnisse

Tab. III.8.2.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor im *in vivo* Test. Dieser Test wurde dreifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (10248 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukte	cpm	rel. Expression
p0,3-28-SD5 ND	0	0%
p0,3-28-SD7 ND	208	2%
p0,3-28-SD9 ND	212	2%
p0,3-28-SD12 ND	358	3%
p0,3-40-SD5 ND	2535	25%
p0,3-40-SD7 ND	3476	34%
p0,3-40-SD9 ND	3418	33%
p0,3-40-SD12 ND	2442	24%
p0,3-56-SD5 ND	7402	72%
p0,3-56-SD7 ND	10248	100%
p0,3-56-SD9 ND	5952	58%
p0,3-56-SD12 ND	4273	42%

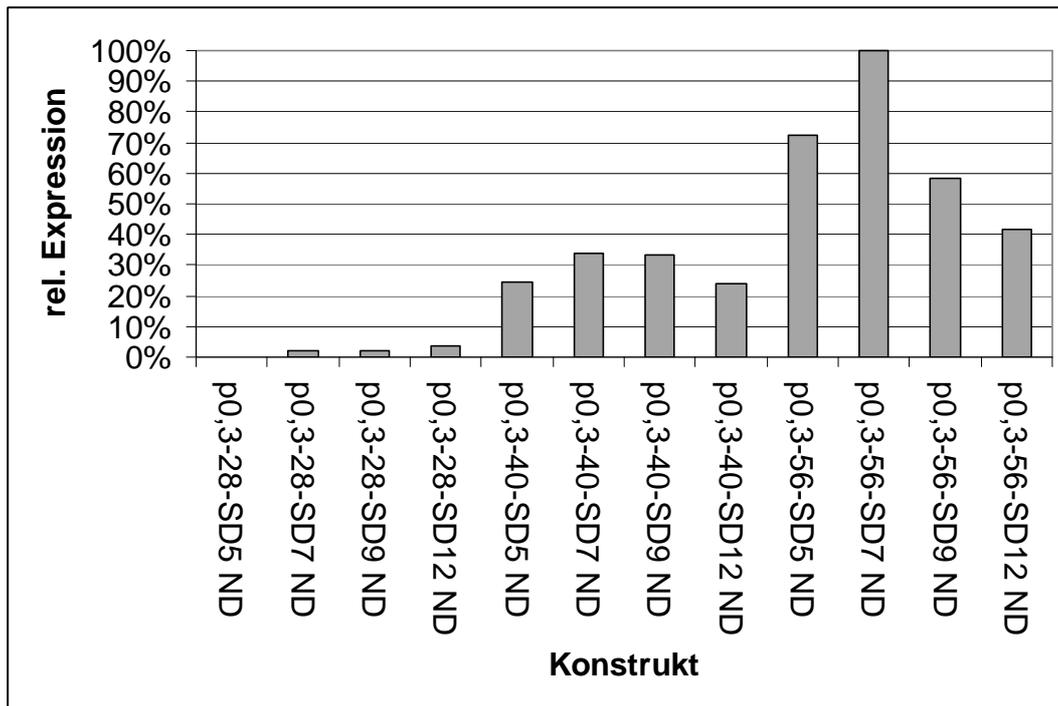


Abb. III.8.2.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor aus Tabelle III.8.2.1 im *in vivo* Test, geordnet nach der Länge des Inserts.

Auch im *in vivo* Versuch ergibt sich durch eine Verlängerung des Downstreambereichs eine deutliche Steigerung der Expressionsrate (Abb. III.8.2.3A). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen langen Inserts sind hier sogar noch etwas deutlicher. Die relative Expression steigt bei der Erweiterung des Downstreambereichs von 9 auf 21 Nt für die SD-Längen von 5, 7, 9 und

12 Nt von 0%, 2%, 2% und 3% auf 25%, 34%, 33% und 24%. Verlängert man den Downstreambereich weiter auf 37 Nt, so erhält man relative Expressionsraten von 72%, 100%, 58% und 42% für die unterschiedlichen SD-Längen.

Eine Abweichung vom *in vitro* Ergebnis ergibt sich bei der Verlängerung der SD (Abb. III.8.2.3B). *In vitro* waren immer die Konstrukte mit der längsten SD deutlich am stärksten. *In vivo* ist dies nur noch bei den schwachen 28er Konstrukten der Fall (SD12 ist um 1/3 stärker als SD9). Bei den 40er und 56er Konstruktreihen nimmt die Expression bei der längsten SD von 12 Nt wieder ab (jeweils um 28%). Im Falle der 56er Konstrukte ist sogar schon eine Verlängerung der SD auf 9 Nt schwächer als eine Verlängerung auf nur 7 Nt (p0,3-56-SD7 ND ist um 42% stärker als p0,3-56-SD9 ND).

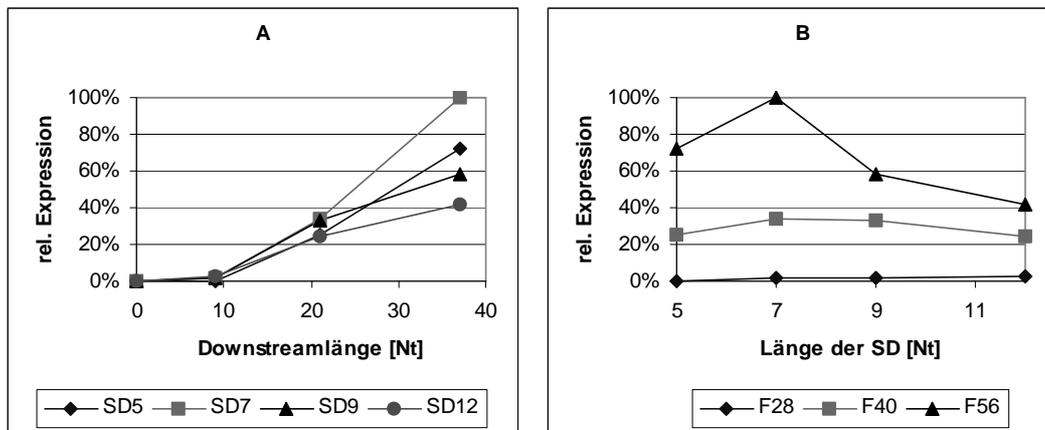


Abb. III.8.2.3: Grafische Darstellung der relativen *in vivo* Expression der T7-Gen 0,3 Konstrukte im Vektor pDS5-ND. A) Relative Expression bei unterschiedlichen SD aufgetragen gegen die Downstreamlänge der einklonierten Fragmente (9, 21 und 37 Nt). B) Relative Expression bei unterschiedlichen Fragmentgrößen (28, 40 und 56 Nt) aufgetragen gegen die Länge der SD

III.8.3 In vitro RNA-Synthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pSD5-ND-Vektor

Durch die Quantifizierung der Transkription soll sichergestellt werden, dass die einklonierten Fragmente keinen Einfluss auf die Stärke des Promotors haben. Das ist die Voraussetzung dafür, dass man aus den Ergebnissen der *in vitro* und *in vivo* Proteinsynthesetests Aussagen über die Translationseffizienz machen kann. Die zu untersuchenden Konstrukte wurden in mindestens zwei unterschiedlichen Konzentrationen für das *in vitro* Testsystem eingesetzt. Die synthetisierte mRNA wurde mittels ¹⁴C-UTP radioaktiv markiert, nach der Inkubation präzipitiert, über Glasfilter filtriert und gewaschen. Die Radioaktivität wurde anschließend im Szintillationszähler gemessen. Was in diesem Test gemessen wird, ist die Gesamtheit der produzierten mRNA, was auch die mRNA für die β -Lactamase einschließt. Deren Promotor besitzt allerdings nur ein Zehntel der Stärke des Promotors unseres Reportergens. Seine Stärke sollte sich auch nicht durch die eingefügten Fragmente ändern.

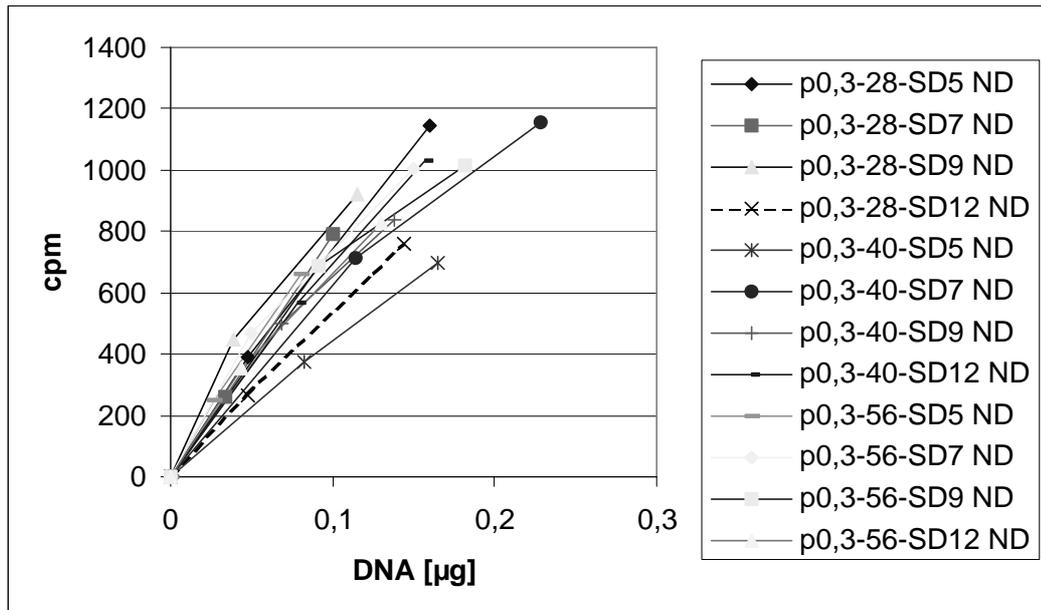


Abb. III.8.3.1: Darstellung der *in vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-ND-Vektor. Unterschiedliche DNA-Mengen der einzelnen Konstrukte wurden im gekoppelten *in vitro* Proteinbiosynthesystem in Gegenwart von ^{14}C -UTP auf ihre mRNA-Synthese untersucht. Die radioaktiv markierte mRNA wurde im Szintillationszähler gemessen. Die erhaltenen cpm Werte sind gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen.

Die synthetisierten mRNA-Mengen der unterschiedlichen Konstrukte weichen in einem vertretbaren Rahmen voneinander ab (Abb. III.8.3.1). Es kann davon ausgegangen werden, dass die eingefügten Fragmente keinen Einfluss auf die Promotorstärke haben.

III.8.4 Umklonierung einiger T7-Gen 0,3 Konstrukte in den pDS5-NC-Vektor

Einige Gen 0,3 Konstrukte wurden in den Vektor pDS5-NC umgesetzt. Es sollte wiederum überprüft werden, ob die Art des Reportergens einen Einfluß auf die verwendete TIR ausübt. Es wurde die komplette Reihe mit der 7 Nt langen SD sowie die komplette 40er Serie umgesetzt. Die Inserts wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI aus dem ND-Vektor ausgeschnitten und in den ebenfalls XhoI/BamHI geschnittenen NC-Vektor inkloniert.

III.8.4.1 *In vitro* Proteinsynthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor

Die Gen 0,3 NC-Konstrukte wurde *in vitro* auf ihre Proteinsynthese getestet. Abbildung III.8.4.1 zeigt einen Ausschnitt eines Röntgenfilms, auf dem die radioaktiv markierten Proteine, die in einem solchen Test synthetisiert wurden, zu sehen sind. Die Banden wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und im Szintillationszähler vermessen. Die erhaltenen cpm-Werte sind in Tabelle III.8.4.1 wiedergegeben. In Abbildung III.8.4.2 wurden die Resultate grafisch dargestellt.

Ergebnisse

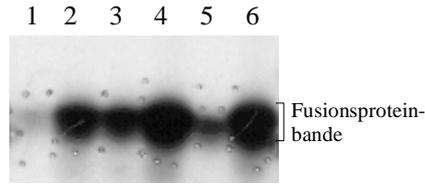


Abb. III.8.4.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der Konstrukte des Gen 0,3 im pDS5-NC-Vektor mit unterschiedlich langen SD zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p0,3-40-SD5 NC, 2) p0,3-40-SD7 NC, 3) p0,3-40-SD9 NC, 4) p0,3-40-SD12 NC, 5) p0,3-28-SD7 NC, 6) p0,3-56-SD7 NC

Tab. III.8.4.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor im *in vitro* Test. Dieser Test wurde dreifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (12495 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p0,3-40-SD5 NC	384	3%
p0,3-40-SD7 NC	4406	35%
p0,3-40-SD9 NC	2498	20%
p0,3-40-SD12 NC	12495	100%
p0,3-28-SD7 NC	1101	9%
p0,3-56-SD7 NC	7755	62%

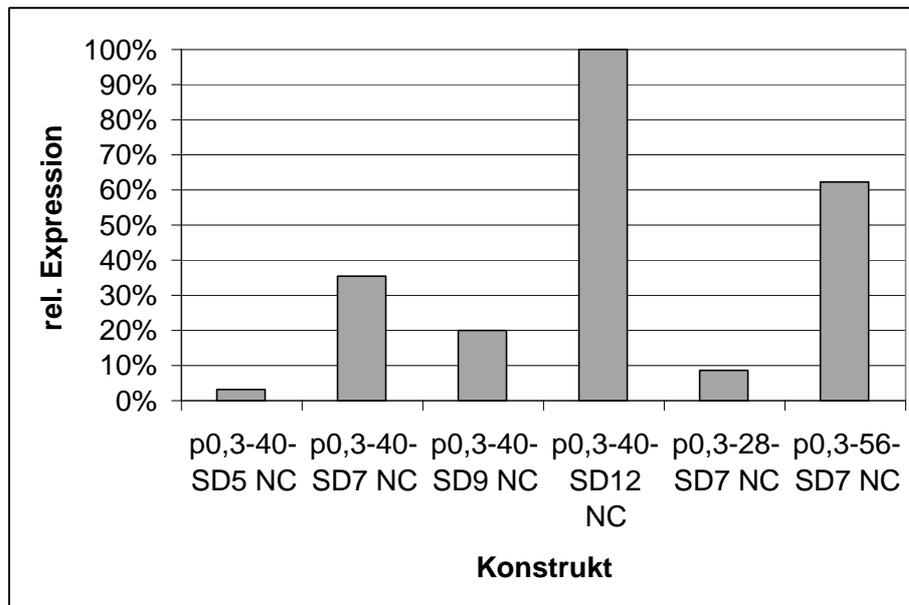


Abb. III.8.4.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor aus Tabelle III.8.4.1 im *in vitro* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD.

Das stärkste Konstrukt bei der *in vitro* Proteinsynthese der T7-Gen 0,3 NC-Konstrukte ist p0,3-40-SD12 NC. Dies deckt sich mit den Ergebnissen für den ND-Vektor (vgl. Abb. III.8.4.2 mit Abb. III.8.1.2). Auch für das zweitstärkste Konstrukt (p0,3-56-SD7 NC) sowie die schwächsten Konstrukte (p0,3-40-SD5 NC und p0,3-28-SD7 NC) stimmen die Resultate mit denen für die *in vitro* Versuche überein. Eine Abweichung ergibt sich mit dem Rückgang der Expression zwischen p0,3-40-SD7 NC und p0,3-40-SD9 NC (-56%). In den *in vitro* Versuchen ergab sich bei einer Verlängerung der SD von 7 auf 9 Nt immer eine leichte Steigerung der Expressionsrate (+15%).

III.8.5 In vivo Proteinsynthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor

Die in den NC-Vektor umgesetzten T7-Gen 0,3 Konstrukte wurden auch *in vivo* auf die Expression ihres cat-Reportergens hin untersucht. Tabelle III.8.5.1 und Abbildung III.8.5.2 zeigen das Ergebnis eines solchen Test.

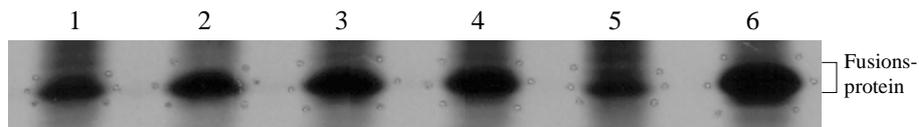


Abb. III.8.5.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vivo* Proteinsynthese der Konstrukte des Gen 0,3 im pDS5-NC-Vektor mit unterschiedlich langen SD zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p0,3-40-SD5 NC, 2) p0,3-40-SD7 NC, 3) p0,3-40-SD9 NC, 4) p0,3-40-SD12 NC, 5) p0,3-28-SD7 NC, 6) p0,3-56-SD7 NC

Tab. III.8.5.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor im *in vivo* Test. Dieser Test wurde zweifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (10624 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p0,3-40-SD5 NC	803	8%
p0,3-40-SD7 NC	4098	39%
p0,3-40-SD9 NC	3351	32%
p0,3-40-SD12 NC	2320	22%
p0,3-28-SD7 NC	664	6%
p0,3-56-SD7 NC	10624	100%

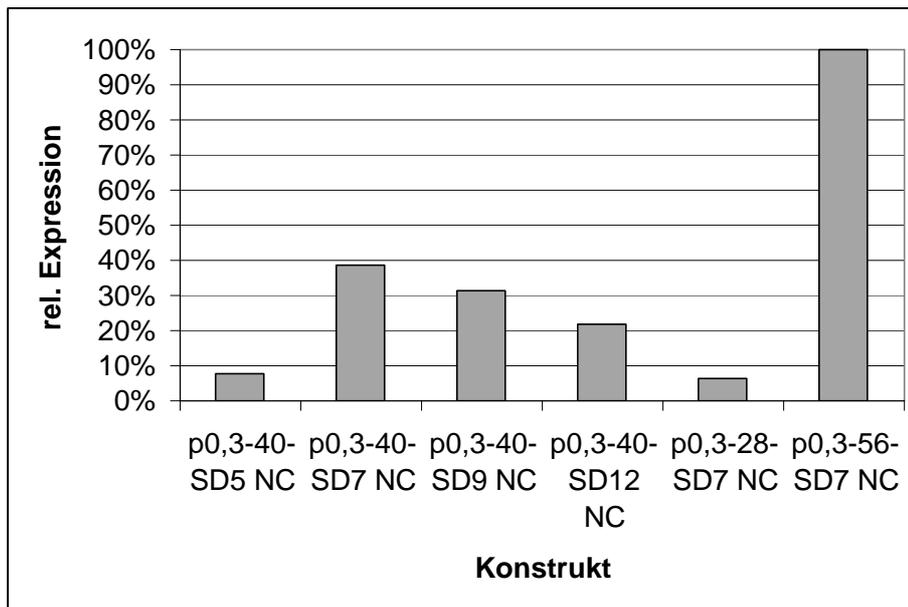


Abb. III.8.5.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor aus Tabelle III.8.5.1 im *in vivo* Test, geordnet nach der Länge des Inserts und der SD.

Die Ergebnisse für die *in vivo* Proteinsynthese der T7-Gen 0,3 NC-Konstrukte zeigen die selben Tendenzen wie bei den *in vivo* Tests der ND-Konstrukte (vgl. Abb. III.8.5.2 mit Abb. III.8.2.2). Eine Verlängerung der WT-SD auf 7 Nt ergibt eine Steigerung der Expression, hier um 80%. Eine weitere Verlängerung der SD resultiert allerdings in einem Rückgang. Bei einer Verlängerung auf 9 Nt sinkt die Expression um 18%, bei einer weiteren Verlängerung um 3 Nt auf 12 Nt nochmals um 31%.

Stärkstes Konstrukt ist mit Abstand p0,3-56-SD7 NC. Auch bei den ND-Konstrukten waren die Konstrukte mit der größten Downstreamlänge am stärksten. p0,3-28-SD7 NC zeigt die erwartet schlechte Expression.

III.8.6 *In vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor

Zur Kontrolle der Promotoraktivität wurde eine *in vitro* RNA-Synthese durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung III.8.6.1 grafisch dargestellt.

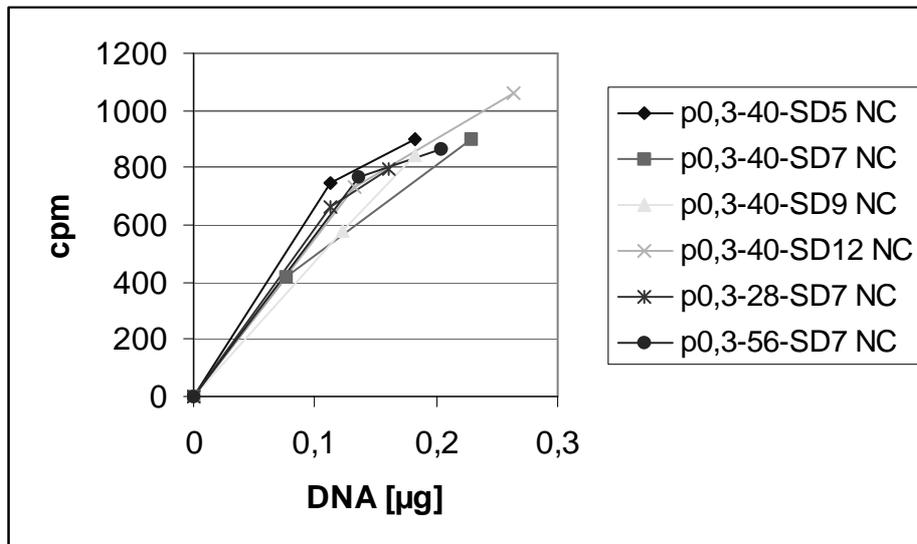


Abb. III.8.6.1: Darstellung der *in vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 0,3 Konstrukte im pDS5-NC-Vektor. Unterschiedliche DNA-Mengen der einzelnen Konstrukte wurden im gekoppelten *in vitro* Proteinbiosynthesystem in Gegenwart von ^{14}C -UTP auf ihre mRNA-Synthese untersucht. Die radioaktiv markierte mRNA wurde im Szintillationszähler gemessen. Die erhaltenen cpm Werte sind gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen.

Alle NC-Konstrukte des T7-Gens 0,3 zeigen praktisch die selbe Menge an mRNA-Synthese. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die einklonierten TIR-Fragmente keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotors haben.

III.9 Untersuchungen zur Funktion des 5'-hairpins der USB des T7-Gens 11

Alle stark exprimierten Gene des Bakteriophagen T7 verfügen über eine unstrukturierte Region (USB) im Bereich ihrer RBS. Das Fehlen von Sekundärstrukturen in diesem Bereich erleichtert die Erkennung der Translationsstartstelle durch die Ribosomen. Vielen USB geht ein 5'-hairpin voraus. Dieser 5'-hairpin kann eine Schnittstelle für die RNaseIII sein (T7-Gene 0,3; 1; 1,3 und 13) und somit das 5'-Ende der mRNA festlegen, oder er wird nicht geschnitten und bleibt im Inneren einer polycistronischen mRNA erhalten (T7-Gene 3,8; 10; 11 und 17). In letzterem Fall dient die Energie, die durch die Bildung dieses hairpins frei wird, vermutlich dazu, die dahinterliegende mRNA-Region vor Einfaltungen durch upstream gelegene Bereiche zu schützen. Somit wäre der 5'-hairpin ein wichtiger Bestandteil der TIR der stark exprimierenden Gene. Das T7-Gen 11 besitzt sowohl eine USB als auch einen davor liegenden 5'-hairpin. Frau Dr. Sahillioglu klonierte Fragmente dieser TIR vor geeignete Reportergene. Der 5'-hairpin dieser TIR fungiert im WT als Transkriptionsterminator. Diese Funktion wurde durch Eliminierung einer dem hairpin folgenden Poly-U-Sequenz zerstört. Bei allen von Frau Dr. Sahillioglu hergestellten Konstrukten befand sich das Gen 11 TIR-Fragment fast am äußersten 5'-Ende der mRNA. Dies entspricht nicht der Situation im WT. Befindet sich der hairpin am Anfang der mRNA, so liegen nur kleine Sequenzbereiche davor, die möglicherweise in die RBS einfallen und die Translationsinitiation behindern können. Liegt der hairpin im Innern einer polycistronischen mRNA, so sollte seine Rolle als Schutz für die nachfolgende USB noch bedeutender sein, da nun ein weit größerer Sequenzbereich upstream der TIR liegt. Ist seine Aufgabe jedoch Kontakte zu den initiiierenden Ribosomen auszubilden, so ist kein Unterschied in der Expression im Vergleich der monocistronischen zur polycistronischen Situation zu erwarten. Um dies zu untersuchen, wurde von mir ein neuer Expressionsvektor konstruiert, bei dem die TIR-Fragmente vor das zweite Gen der mRNA kloniert werden konnten.

III.9.1 Herstellung des Expressionsvektors pDS5-NcD

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung des neuen Expressionsvektors diente der Vektor pDS5-ND (III.3). Aus diesem Vektor wurde zunächst ein nicht benötigtes Gen-Fragment mittels der Restriktionsenzyme Hind III (upstream) und BsmI (downstream) herausgeschnitten.

Das synthetisierte Oligonukleotid NcD.1 ersetzte das ausgeschnittene Stück:

```
NcD.1 : 5' AGCTTGCGGCCGCT 3'
        3'      ACGCCGGC 5'
```

Dieses Oligonukleotid besitzt überhängende HindIII (AGCT) und BsmI (CT) Enden und wurde in den aufgeschnittenen Vektor ligiert.

Das resultierende Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen MfeI und BamHI verdaut. Durch diesen Verdau wird ein Sequenzstück zwischen Promotor und dhfr-Reportergen ausgeschnitten, welches durch ein verkürztes cat-Gen ersetzt werden soll. Der Verdau wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA isoliert.

Aus dem Vektor pDS5-NOK, der downstream des dhfr ein komplettes cat-Gen besitzt, ansonsten aber dem Vektor pDS5-ND entspricht, wurde ein Stück des cat-Gen (522 Nt) mittels der

Ergebnisse

Restriktionsenzyme HindIII (upstream) und NcoI (downstream, schneidet innerhalb der cat-Sequenz) ausgeschnitten. Der Grund dafür, dass nicht das komplette cat-Gen ausgeschnitten wurde, besteht darin, dass das vollständige CAT-Protein in einem SDS-PAGE ungefähr auf der selben Höhe läuft wie ein Fusionsreporterprotein aus DHFR und T7-TIR. Das so entstandene cat-Fragment wurde durch Elektrophorese und Elektroelution gewonnen.

An dieses cat-Fragment wurden upstream das Oligonukleotid NcD.2 und downstream das Oligonukleotid NcD.3 ligiert.

NcD. 2: 5' AATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAC**CCTAGG** 3'
 3' CACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGT**GGATCCT**CGA 5'

Das NcD.2-Oligonukleotid verfügt über ein überhängendes MfeI-Ende (5' AATT) und über ein überhängendes HindIII-Ende (3' TCGA). Mittels des HindIII-Endes wird das Oligonukleotid an das cat-Fragment ligiert. Dieses Oligonukleotid bildet die „vordere Brücke“ zwischen cat-Fragment und Vektor. Es beinhaltet zusätzlich eine AvrII-Schnittstelle (fett).

NcD. 3: 5' CATGGCTTAAG**GAATTC**CCG 3'
 3' CGAATT**CTTAAG**GGCCTAG 5'

Das NcD.3-Oligonukleotid verfügt über ein überhängendes NcoI-Ende (5' CATG) und über ein überhängendes BamHI-Ende (3' CTAG). Das NcoI-Ende erlaubt die Ligation downstream an das cat-Fragment, das BamHI-Ende an den Vektor. Dieses Oligonukleotid bildet die „hintere Brücke“. NcD.3 beinhaltet zusätzlich noch ein Terminationskodon (TAA, kursiv gedruckt) für das cat-Fragment und eine EcoRI-Schnittstelle (GAATTC, fett gedruckt).

Nach der Ligation der Oligonukleotide NcD.2 und NcD.3 an das cat-Fragment wurde das resultierende DNA-Stück mit den Enzymen MfeI und BamHI nochmal geschnitten, um eventuell mehrfach anligierte Oligonukleotide wieder abzutrennen, und dann in den aufgeschnittenen Vektor einligiert. Damit war der neue Expressionsvektor pDS5-NcD (Abb. III.3.) fertiggestellt, der vor dem dhfr-Reportergen noch ein verkürztes cat-Gen trägt (daraus leitet sich die Bezeichnung NcD ab: N25O3O4-Promotor/Operator, cat vor **dhfr**). Das Reportergen ist also nun das zweite Gen auf einer polycistronischen mRNA.

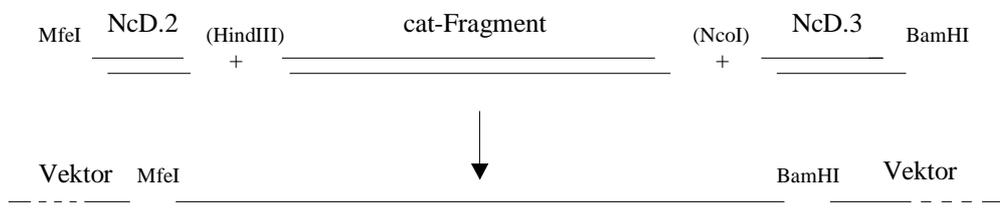


Abb. III.9.1.1: Schematische Darstellung der Ligationsschritte zur Einklonierung des cat-Fragments in den neuen Expressionsvektor. Im ersten Schritt werden die Oligonukleotide NcD.1 und NcD.2 an das cat-Fragment ligiert, danach erfolgt die Einklonierung in den Vektor. MfeI, HindIII, NcoI, BamHI: überhängende Enden der entsprechenden Restriktionsenzyme. Die Erkennungssequenzen für HindIII und NcoI sind unvollständig, es existieren im fertigen Produkt an diesen Stellen keine Schnittstellen für diese Enzyme.

III.9.2 Umsetzung von T7-Gen 11-Konstrukten in den neuen Expressionsvektor

Folgende Konstrukte mit Fragmenten der TIR des T7-Gens 11 wurden freundlicherweise von Frau Dr. U.Sahillioglu zur Verfügung gestellt:

Konstrukt	Hairpin
p11-175 ND	nicht vorhanden
p11-2131 ND	zu 2/3 vorhanden
p11-364l ND	komplett vorhanden
p11-364d ND	deletiert
P11-364linv ND	invertiert

Alle Konstrukte haben den selben Downstreambereich, unterscheiden sich also nur an ihrem 5'-Ende (Abb. III.9.2.1). p11-364l enthält den gesamten 5'-hairpin. Das „l“ weist darauf hin, dass bei diesem Konstrukt die U6-Sequenz des Transkriptionsterminators durch „AAGAGA“ ersetzt wurde („l“ = loss of U6). p11-2131 enthält zweidrittel der hairpin-Sequenz, wodurch sich der hairpin nicht mehr ausbilden kann. p11-175 enthält den hairpin überhaupt nicht mehr. Beim Konstrukt p11-364d wurde der hairpin deletiert. Die Sequenz des hairpins wurde durch die Sequenz „AGATCTGGGCC“, welche Schnittstellen für zwei Restriktionsenzyme enthält, ersetzt. Bei p11-364linv wurde die Sequenz invertiert, d.h. der hairpin wird umgedreht ausgebildet.

Die T7-Gen 11-Inserts wurden mit dem Restriktionsenzym BamHI ausgeschnitten und die DNA isoliert. Danach wurden die Inserts in den ebenfalls BamHI geschnittenen Vektor pDS5-NcD inkloniert.



Abb. III.9.2.1: Schematische Darstellung der verwendeten T7-Gen 11 TIR-Längen. SD: Shine-Dalgarno-Sequenz; IT: Initiationstriplett des T7-Gens 11. Die Zahlenangaben an den Enden beziehen sich auf die Position im T7-Genom, rechts ist die Fragmentlänge angegeben (l steht für loss of U6, d.h. Verlust der Funktion als Transkriptionsterminator).

III.9.3 Vergleich der *in vitro* Proteinsynthese der T7-Gen 11 Konstrukte im pDS5-ND- und pDS5-NcD-Vektor

In vitro wurde die Proteinsynthese der T7-Gen 11 Konstrukte in den zwei Vektoren pDS5-NcD und pDS5-ND miteinander verglichen. Bei den ND-Konstrukten befindet sich die TIR des T7-Gens 11 vor dem ersten und einzigen Gen der mRNA. Der Bereich vor dem hairpin ist also kurz. Im neuen Vektor NcD befindet sich die TIR vor dem zweiten Gen der mRNA, d.h. der Bereich vor dem hairpin ist groß. Durch das Vorhandensein größerer Sequenzabschnitte upstream des hairpins könnte dieser in seiner Funktion als „Abschirmung“ der dahinter liegenden RBS noch wichtiger sein. Die Möglichkeit einer Einfaltung upstream gelegener Sequenzen ist nun größer. Um diese Frage zu klären wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Tests durchgeführt.

Abbildung III.9.3.1 zeigt einen Ausschnitt aus einem Röntgenfilm, der die Banden der *in vitro* synthetisierten Fusionsproteine zeigt. Die Menge an hergestelltem Fusionsprotein wurde mittels Messung der eingebauten Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle III.9.3.1 und Abbildung III.9.3.2 wiedergegeben.

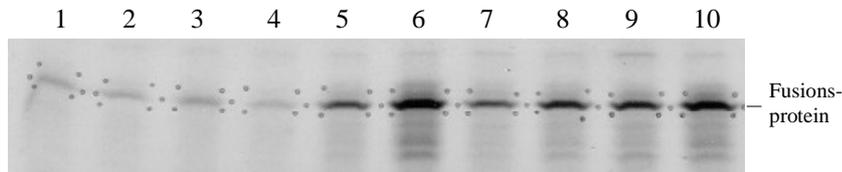


Abb. III.9.3.1: Fluorografie, die die T7-TIR-/DHFR-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der Konstrukte des T7-Gens 11 im pDS5-NcD und pDS5-ND-Vektors. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p11-175 NcD, 2) p11-175 ND, 3) p11-213l NcD, 4) p11-213l ND, 5) p11-364l NcD, 6) p11-364l ND, 7) p11-364d NcD, 8) p11-364d ND, 9) p11-364linv NcD, 10) p11-364linv ND

Tab. III.9.3.1: Relative Proteinsyntheseraten der T7-Gen 11 Konstrukte im pDS5-NcD- und pDS5-ND-Vektor im *in vitro* Test. Dieser Test wurde zweifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (516 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p11-175 NcD	66	13%
p11-175 ND	64	12%
p11-213l NcD	85	16%
P11-213l ND	75	15%
p11-364l NcD	162	31%
P11-364l ND	516	100%
P11-364d NcD	127	25%
p11-364d ND	398	77%
p11-364linv NcD	201	39%
P11-364linv ND	412	80%

Ergebnisse

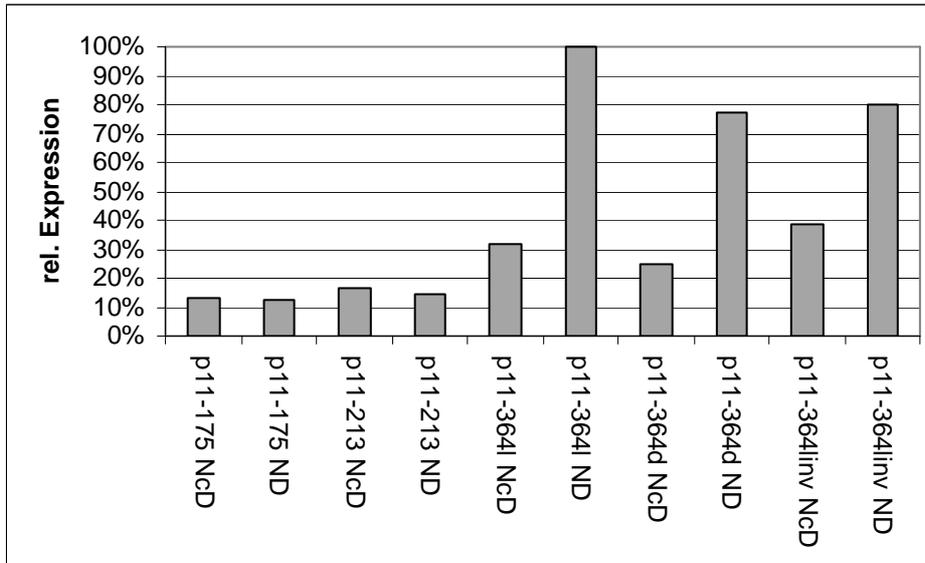


Abb. III.9.3.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 11 Konstrukte im pDS5-NcD- und pDS5-ND-Vektor aus Tabelle III.9.3.1 im *in vitro* Test.

Bei den kurzen Inserts, p11-175 und p11-213, zeigt sich kaum ein Unterschied in der Expression zwischen den zwei verwendeten Vektoren. Bei den längeren Inserts von 364 Nt Länge sind jedoch diejenigen im neuen Vektor deutlich schwächer als die im ND-Vektor.

Die kurzen Inserts verfügen nicht über den 5'-hairpin, aber auch p11-364d hat keinen hairpin, so dass sich aus dem Vorhandensein bzw. nicht Vorhandensein des hairpins die Unterschiede zwischen den kurzen und den langen Inserts nicht erklären lassen. Es wurde aber bereits von Frau Dr. U.Sahillioglu gezeigt, dass eine Deletion des hairpins bei dem 364 Nt langen Insert nicht zu einem Verschwinden, sondern nur zu einer leichten Verkürzung der USB der TIR des T7-Gens 11 führt. Die verbliebene Upstreamsequenz scheint die RBS im ND-Vektor auch ohne hairpin noch ganz gut abschirmen zu können. Im neuen Vektor pNcD scheint es bei den 364er Inserts zur Ausbildung störender Strukturen zu kommen. Leider können computerberechnete Sekundärstrukturmodelle keine Antwort auf diese Frage bieten (Abb. III.9.3.3). Es soll hier aber nochmals darauf hingewiesen werden, dass es sich bei diesen computerberechneten Strukturen nur um Annäherungen an die wirklich vorhandenen Strukturen handeln kann, da nur die Sekundärstruktur berechnet wird und übergeordnete Strukturen nicht berücksichtigt werden, und zudem noch der kinetische Effekt der mRNA-Faltung nicht einfließt. Das Computerprogramm berechnet die Struktur für die gesamte, eingegebene Sequenz, während in den Prokaryoten die mRNA-Faltung vor Beginn der Translation nicht abgeschlossen ist, da ja Transkription und Translation gleichzeitig ablaufen.

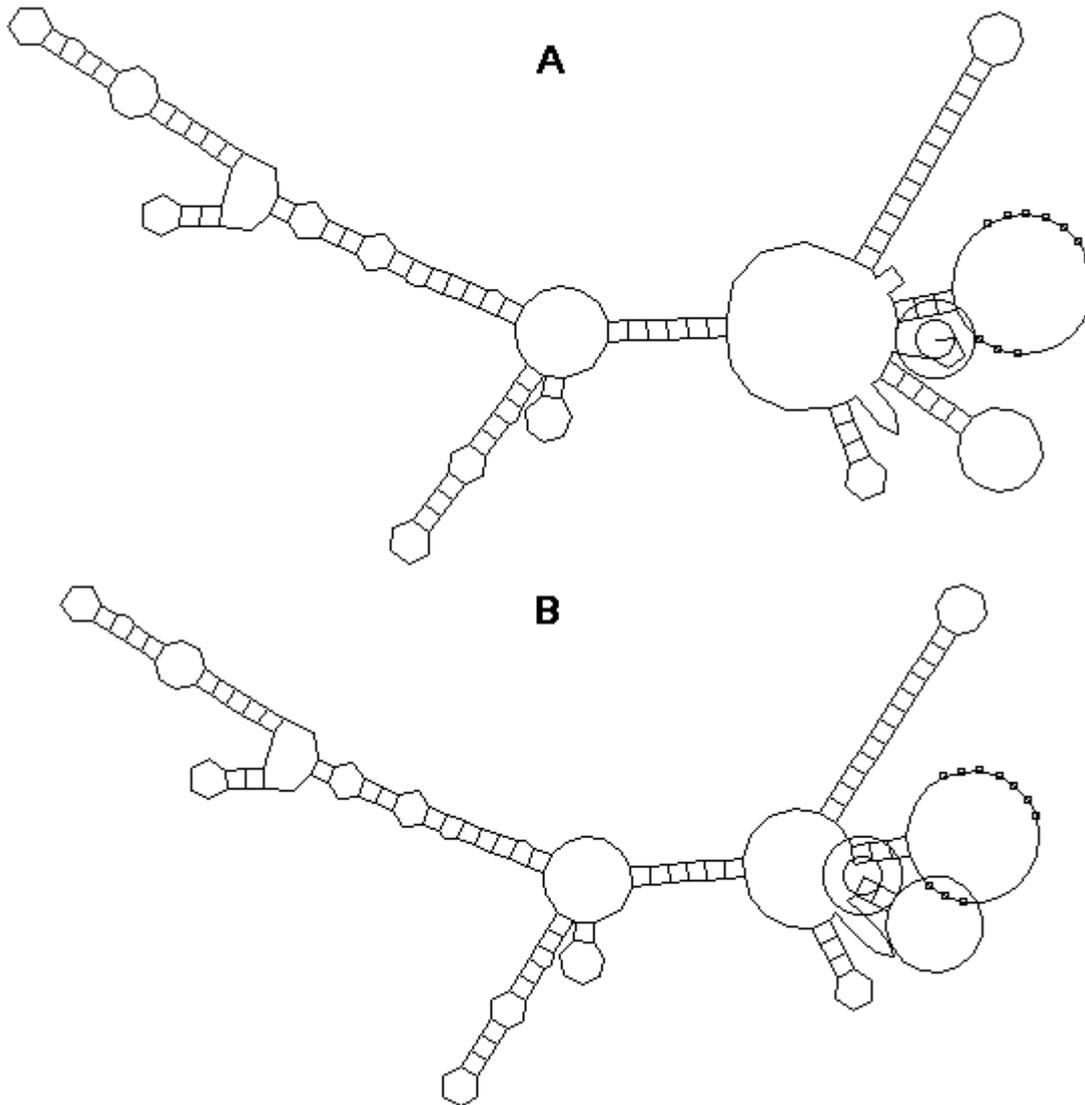


Abb. III.9.3.3: Computerermittelte Sekundärstrukturmodelle der TIR von A) p11-364l ND und B) p11-364l CD. SD und IT sind markiert, das 5'-Ende ist eingekreist. Der 5'-hairpin vor der RBS ist deutlich zu erkennen. Beide Faltungsmodelle sind im Bereich der RBS identisch.

Weiterhin fällt es auf, dass das Konstrukt p11-364linv NcD etwas stärker ist als p11-364l NcD. Im ND-Vektor ist es genau umgekehrt, das Konstrukt mit invertiertem hairpin ist etwas schlechter als das mit dem normalen hairpin.

Durch die Umsetzung der Inserts in den neuen Vektor, hinter das vorausgehende, verkürzte cat-Gen scheint der Abschirmeffekt ob mit oder ohne hairpin deutlich verringert zu sein. Dies zeigt auf, welchen Unterschied es macht, ob eine TIR am 5'-Ende einer mRNA steht oder in deren Mitte.

III.9.4 *In vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 11 Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten über die Verlängerung der SD wurde auch für die T7-Gen 11 Konstrukte eine *in vitro* RNA-Synthese zur Untersuchung der Transkriptionsrate

durchgeführt um sicherzustellen, dass die inklonierten TIR-Fragmente keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotors haben.

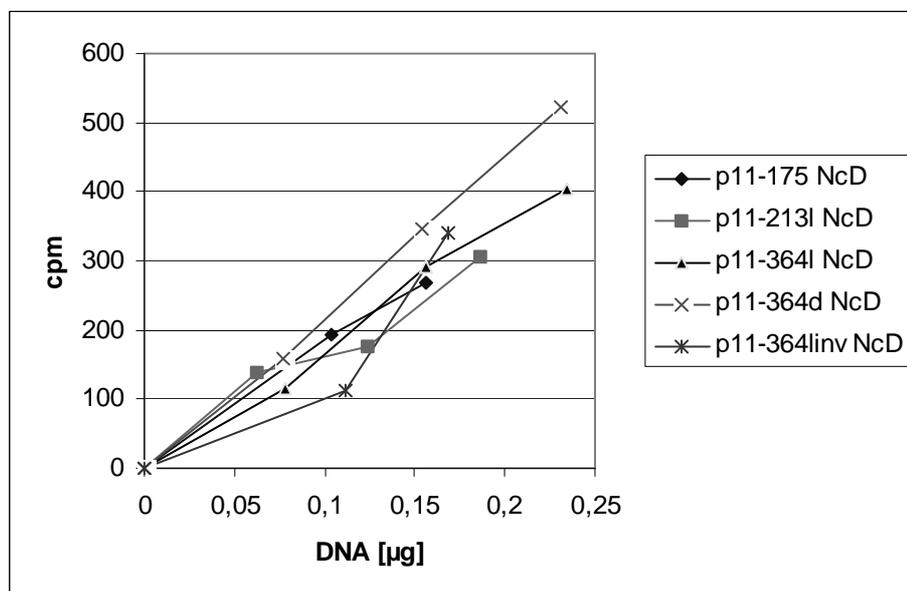


Abb. III.9.4.1: Darstellung der *in vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 11 Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor. Unterschiedliche DNA-Mengen der einzelnen Konstrukte wurden im gekoppelten *in vitro* Proteinbiosynthesystem in Gegenwart von ^{14}C -UTP auf ihre mRNA-Synthese untersucht. Die radioaktiv markierte mRNA wurde im Szintillationszähler gemessen. Die erhaltenen cpm Werte sind gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen.

Aus der Abbildung III.9.4.1 ist zu sehen, dass alle Konstrukte eine ähnlich hohe Transkription aufweisen. Eine Beeinflussung der Promotoraktivität scheint nicht gegeben zu sein.

III.9.5 Einklonierung zur RBS der T7-Gens 11 komplementärer Sequenzen

Aus dem Vergleich der T7-Gen11-Konstrukte im ND-Vektor und im CD-Vektor konnte man keine Rückschlüsse auf eine besondere Wichtigkeit des hairpins in innercistronischer Position ziehen. Um weiteren Aufschluss über die Rolle des 5'-hairpins zur Abschirmung der dahinter liegenden USR vor der Ausbildung von Sekundärstrukturen mit Upstreamsequenzen zu erhalten, wurden daher in Konstrukte mit und ohne hairpin Sequenzen inkloniert, die komplementär zu Teilen der RBS sind (Anti-RBS). Diese Sequenzen bilden Basenpaarungen zur RBS aus, was diese unzugänglicher für die initiiierenden Ribosomen macht. Durch die Länge der exakt komplementären Bereiche kann man, gestützt durch computerberechnete Sekundärstrukturen davon ausgehen, dass sich diese Basenpaarungen tatsächlich formen.

Meine Erwartung war, dass ein vorhandener hairpin in der Lage ist, die RBS wenigstens für kurze Zeit vor einer Paarung mit den komplementären Sequenzen zu schützen, und die RBS so offen zu halten, während bei nicht vorhandenem hairpin die Translationsrate sofort drastisch sinkt.

Anti-RBS wurden in die Konstrukte p11-364l NcD und p11-364d NcD inkloniert. Dazu wurden die Konstrukte mit dem Restriktionsenzym Bpu1102I verdaut. Dieses Enzym schneidet das 364er Insert 17 Nukleotide vor dem hairpin. Die komplementären Sequenzen wurden mit überhängenden Bpu1102I-Enden synthetisiert und in den geöffneten Vektor inkloniert. Es wurden Sequenzen verschiedener Länge verwendet. Zwei Sequenzen waren zu einem großen Teil der RBS komplementär mit einer Länge von 30 bzw 17 Nukleotiden. Konstrukte mit diesen Sequenzen erhalten das Kürzel „30k“ bzw „17k“, wobei „k“ für komplementär steht. Des Weiteren wurden zwei 10 Nt lange Anti-RBS kreiert, eine war komplementär zu einem Bereich direkt vor der SD der RBS, die andere war komplementär zu einem Bereich, der die SD einschloss. Konstrukte mit diesen Anti-RBS erhalten das Kürzel „upSDk“ bzw „SDk“. Mit diesen beiden Anti-RBS kann untersucht werden, ob es einen Unterschied macht, wenn die SD selbst oder nur die Region direkt davor in stabile Basenpaarungen eingebunden ist.

A) 30k

```
5' TGATATCGTATGAGCGCATATAGTTCCCTCCTTTGC 3'
3'   ATAGCATACTCGCGTATATCAAGGAGGAAACGACT 5'
```

B) 17k

```
5' TGACATATAGTTCCCTCCTTTGC 3'
3'   GTATATCAAGGAGGAAACGACT 5'
```

C) SDk

```
5' TGATTCCTCCTTTGC 3'
3'   AAGGAGGAAACGACT 5'
```

D) upSDk

```
5' TGATCAGCTCTCAGC 3'
3'   AGTCGAGAGTCGACT 5'
```

Abb. III.9.5.1: Komplementäre Sequenzen zur RBS des T7-Gens 11. Komplementäre Nukleotide sind in fett dargestellt. A) 30 Nukleotide komplementär zur RBS; B) 17 Nukleotide komplementär zur RBS; C) 10 Nukleotide komplementär zur RBS, beinhaltet SD; D) 10 Nukleotide komplementär zur RBS upstream der SD

III.9.6 In vitro Proteinsynthese der T7-Gen 11 Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor

In diesem Versuch wurden die Konstrukte p11-364l NcD und p11-364d NcD mit und ohne eingesetzte Anti-RBS getestet. Dies geschah in der Erwartung, dass die von p11-364l NcD abgeleiteten Konstrukte durch den vorhandenen hairpin zumindest kurzzeitig vor der Bindung der Anti-RBS an die RBS geschützt sind. Sie sollten dadurch eine höhere Expression zeigen, als die von p11-364d NcD abgeleiteten Konstrukte. Die *in vitro* Versuche wurden durchgeführt wie in II.2. beschrieben. Das Ergebnis ist in den Abbildungen III.9.6.1 und III.9.6.2 sowie in Tabelle III.9.6.1 wiedergegeben.

Ergebnisse

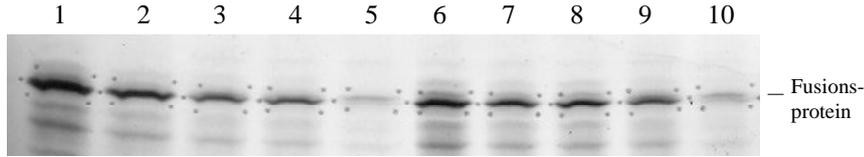


Abb. III.9.6.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der Konstrukte des T7-Gens 11 im pDS5-NcD-Vektor mit Anti-RBS zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p11-364l NcD, 2) p11-364l SDk NcD, 3) p11-364l upSDk NcD, 4) p11-364l 17k NcD, 5) p11-364l 30k NcD, 6) p11-364d NcD, 7) p11-364d SDk NcD, 8) p11-364d upSDk NcD, 9) p11-364d 17k NcD, 10) p11-364d 30k NcD

Tab. III.9.6.1: Relative Proteinsyntheseraten der T7-Gen 11 Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor mit Anti-RBS im *in vitro* Test. Dieser Test wurde vierfach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (1914) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p11-364l NcD	1914	100%
p11-364l SDk NcD	843	44%
p11-364l upSDk NcD	305	16%
p11-364l 17k NcD	317	17%
p11-364l 30k NcD	109	6%
p11-364d NcD	1228	64%
p11-364d SDk NcD	653	34%
p11-364d upSDk NcD	937	49%
p11-364d 17k NcD	303	16%
p11-364d 30k NcD	100	5%

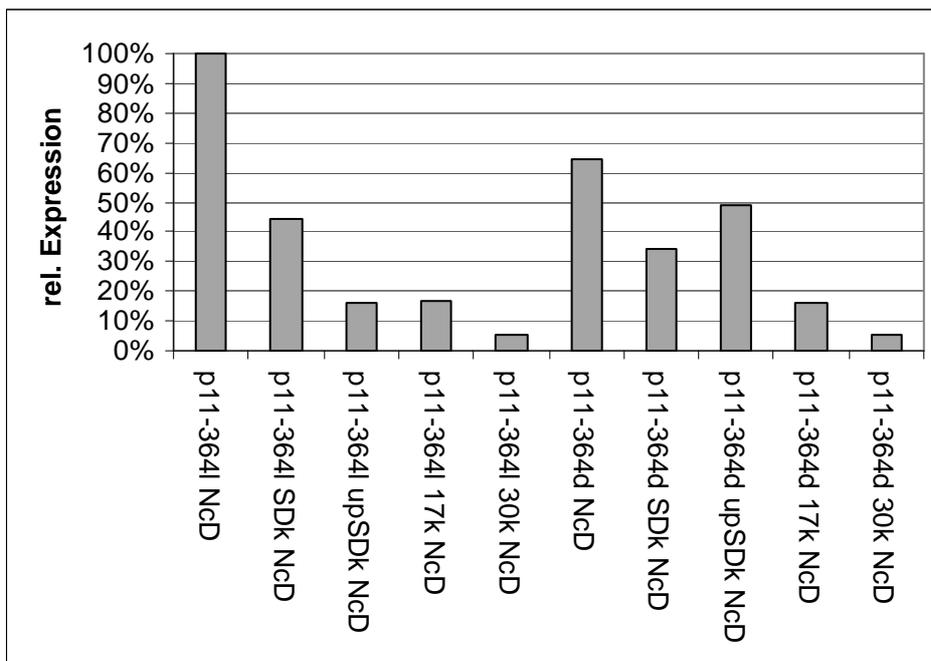


Abb. III.9.6.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 11 Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor mit Anti-RBS aus Tabelle III.9.6.1 im *in vitro* Test.

Das Einsetzen zur RBS komplementärer Sequenzen wirkt sich erwartungsgemäß immer nachteilig auf die Expressionsrate aus. Schon das Einklonieren der 10 Nt langen Anti-RBS bewirkt einen deutlichen Rückgang der Expressionsrate. Eine Ausnahme bildet p11-364d upSDk NcD. Bei diesem Konstrukt beträgt der Rückgang verglichen mit p11-364d NcD nur 24%. In der Serie mit hairpin sinkt die Expression durch Einsetzen der upSDk-Anti-RBS dagegen um 84%. Das Konstrukt mit SDk-Anti-RBS ist hier deutlich stärker. Vergleicht man die computerberechneten Faltungsmodelle (Abb. III.9.6.3) ergibt sich nichts, was diesen Unterschied erklären könnte.

Abgesehen von den beiden Konstrukten mit der upSDk.-Anti-RBS verhalten sich die Konstruktreihen mit und ohne hairpin nach Einsetzen der Anti-RBS sehr ähnlich. Durch die 17 Nt lange Anti-RBS sinkt die Expression schon sehr stark ab, bei der 30 Nt langen Anti-RBS fällt sie beinahe unter die Nachweisgrenze.

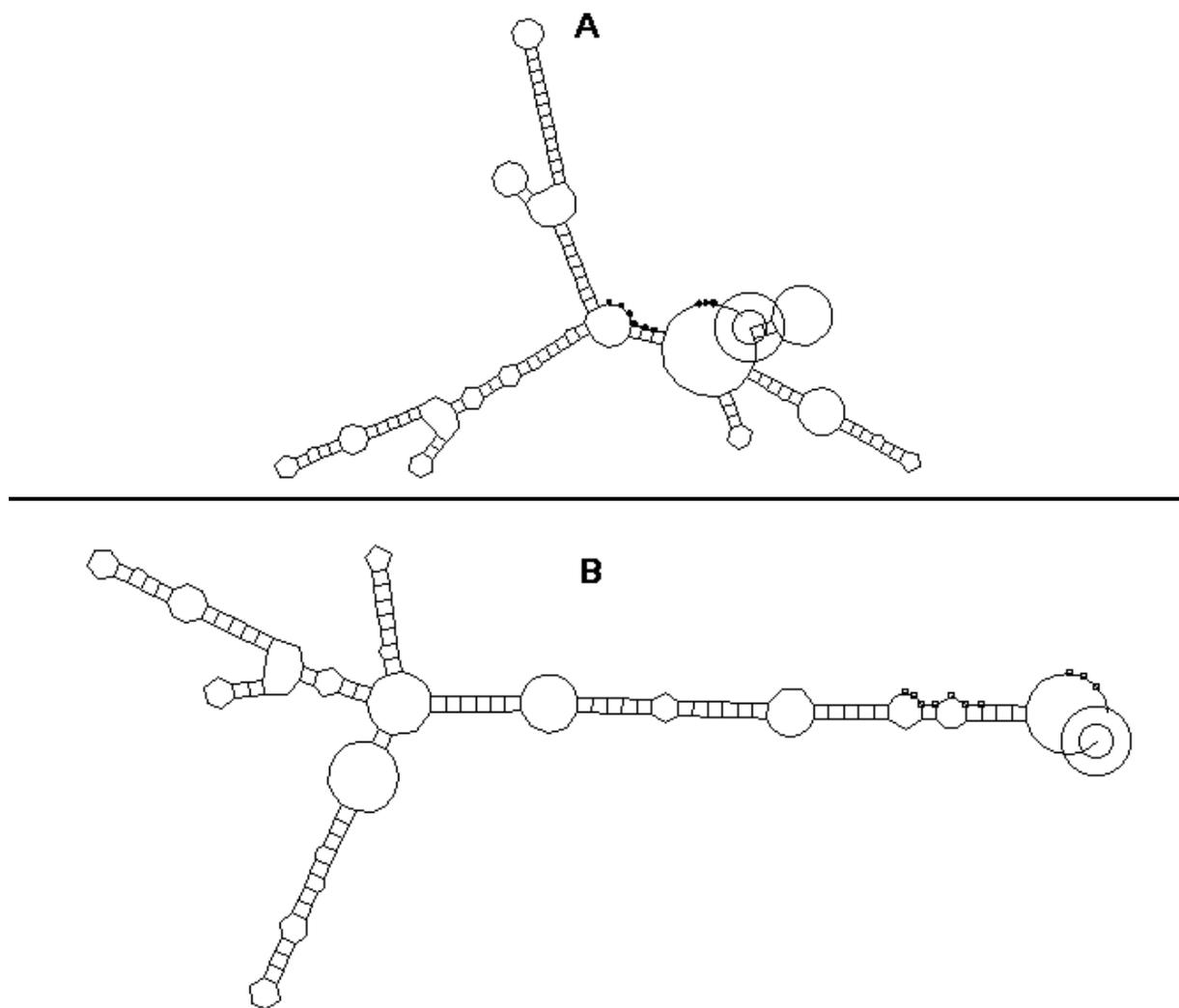


Abb. III.9.6.3 Computerermittelte Sekundärstrukturmodelle der TIR von A) p11-364l upSDk NcD und B) p11-364d upSDk NcD. SD und IT sind markiert, das 5'-Ende ist eingekreist. Bei A ist der 5'-hairpin, der der RBS vorausgeht, deutlich zu sehen. Beide RBS scheinen etwa gleich zugänglich für die Ribosomen zu sein.

III.9.7 In vivo Proteinsynthese der T7-Gen 11 Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor

Es wurden *in vivo* Experimente durchgeführt, um die Expression der T7-Gen 11 NcD-Konstrukte mit Anti-RBS in den lebenden Zellen zu untersuchen. In den Abbildungen III.9.7.1 und III.9.7.2 sowie Tabelle III.9.7.1 ist das Ergebnis dieser Tests dargestellt.

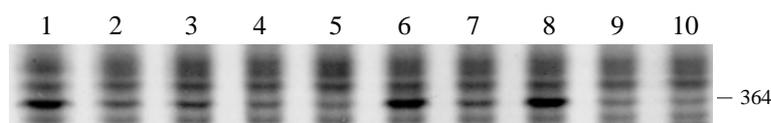


Abb. III.9.7.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vivo* Proteinsynthese der Konstrukte des T7-Gens 11 im pDS5-NcD-Vektor mit Anti-RBS zeigt, die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Seitlich angegeben ist die Länge des verwendeten T7-Fragments. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p11-364l NcD, 2) p11-364l SDk NcD, 3) p11-364l upSDk NcD, 4) p11-364l 17k NcD, 5) p11-364l 30k NcD, 6) p11-364d NcD, 7) p11-364d SDk NcD, 8) p11-364d upSDk NcD, 9) p11-364d 17k NcD, 10) p11-364d 30k NcD

Tab. III.9.7.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 11 Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor mit Anti-RBS im *in vivo* Test. Dieser Test wurde dreifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (878) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p11-364l NcD	878	100%
p11-364l SDk NcD	415	47%
p11-364l upSDk NcD	433	49%
p11-364l 17k NcD	364	41%
p11-364l 30k NcD	328	37%
p11-364d NcD	715	81%
p11-364d SDk NcD	349	40%
p11-364d upSD NcD	779	89%
p11-364d 17k NcD	403	46%
p11-364d 30k NcD	342	39%

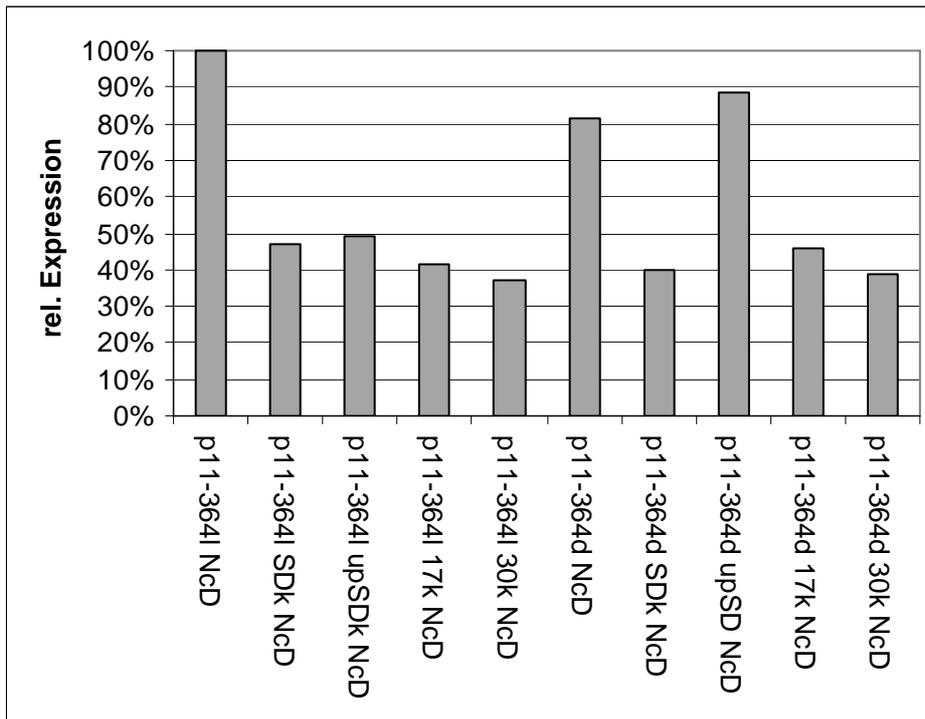


Abb. III.9.7.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 11 Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor mit Anti-RBS aus Tabelle III.9.7.1 im *in vivo* Test.

Im *in vivo* Experiment liegen alle Konstrukte mit einer Anti-RBS relativ gleich auf, nur p11-364d upSD NcD bildet eine Ausnahme. Wie bereits beim *in vitro* Versuch zeigt es eine überraschend starke Expression. Es übertrifft sogar das Ausgangskonstrukt p11-364d NcD leicht. Im Gegensatz zu den *in vitro* Ergebnissen ist hier auch bei der Serie mit hairpin das Konstrukt mit upSDK-Anti-RBS etwas stärker, als dasjenige mit der Anti-RBS komplementär zur SD. P11-364l NcD ist auch *in vivo* das expressionsstärkste Konstrukt im Test. Allerdings ist der Abstand zu p11-364d NcD bzw. p11-364d upSDK NcD nicht so groß (*in vitro* 36%, *in vivo* 19% bzw. 11%).

III.9.8 *In vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 11 Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor

Alle T7-Gen 11 Konstrukte mit eingesetzten Anti-RBS wurden durch *in vitro* RNA-Syntheseexperimente auf ihre Transkriptionsrate hin untersucht. Wie bereits bei den zuvor untersuchten Konstrukten liegen die Syntheseraten dicht beieinander und es ist keinerlei Korrelation zwischen den Unterschieden in der Expression und der mRNA-Syntheserate zu erkennen (Abb. III.9.8.1).

Ergebnisse

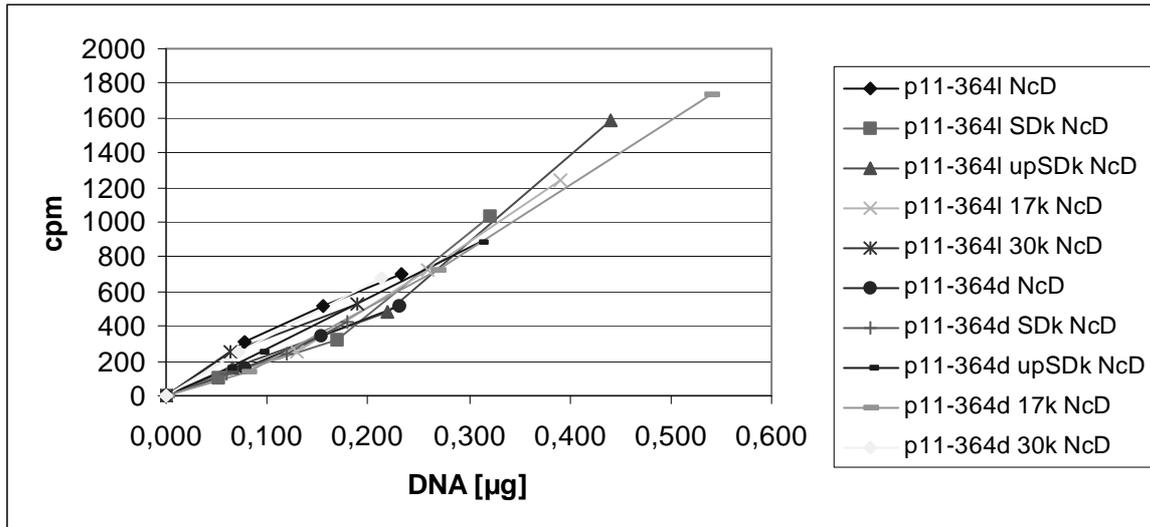


Abb. III.9.8.1: Darstellung der *in vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 11 Konstrukte mit 364 Nt Länge und Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor. Unterschiedliche DNA-Mengen der einzelnen Konstrukte wurden im gekoppelten *in vitro* Proteinbiosynthesesystem in Gegenwart von ^{14}C -UTP auf ihre mRNA-Synthese untersucht. Die radioaktiv markierte mRNA wurde im Szintillationszähler gemessen. Die erhaltenen cpm Werte sind gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen.

III.9.9 Ersetzen der T7-Gen 11 RBS durch die RBS des T7-Gens 1,3

Da die Messwerte für die T7-Gen 11 NcD-Konstrukte mit Anti-RBS teilweise sehr nahe an der Nachweisgrenze waren wurde beschlossen, die RBS des T7-Gens 11 durch die sehr starke RBS des T7-Gens 1,3 zu ersetzen. Zu diesem Zwecke wurden in die Konstrukte p11-364l NcD und p11-364d NcD neue BamHI-Schnittstellen hinter dem hairpin bzw hinter die Sequenz, die den hairpin ersetzt, eingefügt. Dies geschah mittels PCR (II.2.6). Zudem wurde die upstream des 364er Inserts liegende BamHI-Schnittstelle zerstört. Mittels der neuen BamHI-Schnittstelle war es dann sehr einfach möglich, ein TIR-Fragment des T7-Gens 1,3 einzusetzen.

Folgende PCR-Primer wurden für die Konstruktion verwendet:

364l-Bam:

5' GGGTCTTGAGGGGAAGAGAGCGGATCCGAGGAACTATATGCGCTCATACG 3'

Dieser Primer enthält die neue BamHI-Schnittstelle (fett). Sie ersetzt die Sequenz „TGAAAG“ im Originalinsert. Die Bereiche neben der neuen Schnittstelle sind upstream homolog zu Teilen des hairpins und downstream zu Teilen der RBS des T7-Gens 11.

364d-Bam:

5' GCAAGATCTGGGCCCAGAGCG**GAT**CCGAGGAACTATATGCGCTCATACG 3'

Dieser Primer führt die neue BamHI-Schnittstelle in das Konstrukt p11-364d NcD ein, analog wie bei dem oben beschriebenen Primer 364l-Bam.

Skip-Bam:

5' GGCTTAAGAATTCCCGAGTCCGGGGCGCTGC 3'

Dieser Primer hybridisiert an die Klonierungsstelle upstream des 364er Inserts. Die BamHI-Schnittstelle wurde durch die Vertauschung zwei Nukleotide zerstört (fett).

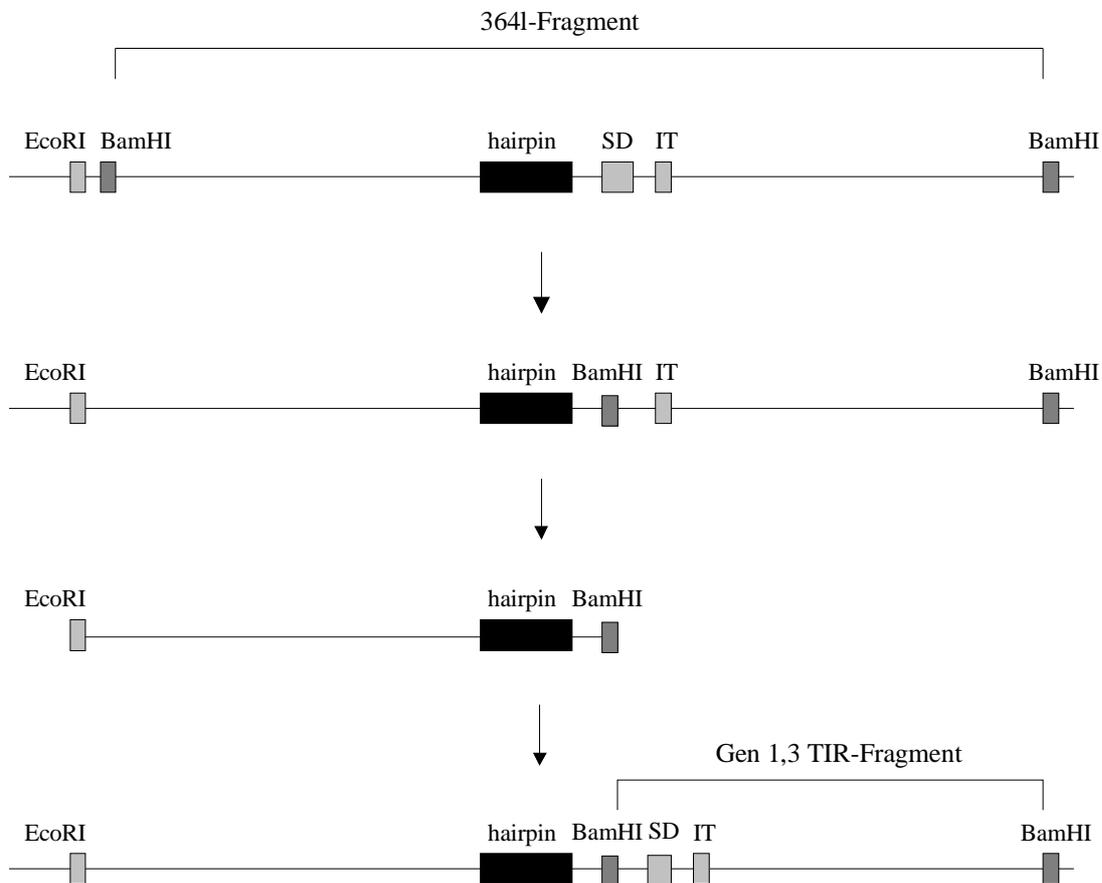


Abb. III.9.9.1: Schematische, nicht maßstabgerechte Darstellung des Austauschs der TIR des T7-Gens 11 gegen die TIR des T7-Gens 1,3. In einem ersten Schritt wurde mittels PCR die upstream-BamHI-Schnittstelle zerstört und eine neue downstream des hairpins eingefügt. Nach Verdauung mit EcoRI und BamHI wurde das restliche Fragment in einen entsprechend geschnittenen Vektor inkliniert und das TIR-Fragment des Gens 1,3 in die BamHI-Schnittstelle eingesetzt. EcoRI, BamHI: Restriktionsschnittstellen; SD: Shine-Dalgarno-Sequenz; IT: Initiationstriplet.

Es wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. Für die eine Reaktion wurde das Konstrukt p11-364l NcD als Template und die beiden Oligonukleotide 364l-Bam und Skip-Bam als Primer verwendet. Analog wurden in einer zweiten Reaktion p11-364d NcD als Template sowie 364d-

Bam und Skip-Bam als Primer eingesetzt. Die aus den beiden Reaktionen gewonnenen Amplifikate enthielten nun hinter dem hairpin bzw dem deletierten hairpin eine neue BamHI-Schnittstelle, während die BamHI-Schnittstelle upstream des Inserts zerstört wurde.

Die PCR-Produkte wurden auf ein 3% Agarosegel aufgetragen, die DNA-Bande ausgeschnitten und die DNA daraus elektroeluiert. Die eluierte DNA wurde dann mit den Enzymen EcoRI und BamHI verdaut. Die EcoRI-Schnittstelle liegt im PCR-Primer Skip-Bam, die BamHI-Schnittstelle wurde neu kreiert. Auch der Verdau wurde auf ein 3% Agarosegel aufgetragen und die DNA aus der Bande elektroeluiert. Die so gewonnenen DNA-Fragmente konnten nun in einen EcoRI/BamHI geschnittenen Vektor p11-364l NcD eingesetzt werden. Durch den Verdau wurde das komplette 364er Insert aus dem Vektor entfernt und wird nun durch das stark verkürzte Fragment ersetzt.

Die entstehenden Konstrukte wurden anhand der Anzahl der verbliebenen Nukleotide aus der T7-Sequenz) mit p11-188l NcD (aus p11-364l NcD hervorgegangen) und p11-159d NcD (aus p11-364d NcD hervorgegangen) bezeichnet. Diese Konstrukte verfügten über keine funktionierende RBS mehr. Aus dem T7-Gen 1,3 Konstrukt p1,3-217 ND, welches von Dr. Michael Vollmer hergestellt wurde, wurde das 217er Fragment mit BamHI ausgeschnitten. Die beiden Konstrukte p11-188l NcD und p11-159d NcD wurden ebenfalls mit BamHI verdaut und das 217er Fragment in diese Konstrukte inkliniert. Das 217er TIR-Fragment des T7-Gens 1,3 sitzt nun also genau hinter dem hairpin bzw der Stelle des deletierten hairpins. Da die eigentliche TIR aus dem Gen 1,3 stammt wurden diese Konstrukte als p1,3-217h+ NcD (h+ bedeutet der hairpin ist vorhanden) und p1,3-217h- NcD (h- bedeutet hairpin ist deletiert) bezeichnet.

Wie für die T7-Gen 11 Konstrukte wurden auch für die T7-Gen 1,3 Konstrukte zur RBS direkt komplementäre Sequenzen inkliniert. Auch hierzu wurde wieder die Bpu1102I-Schnittstelle verwendet. Die Anti-RBS hatten eine Länge von 12 und 20 Nukleotiden. Die entsprechenden Konstrukte erhalten die Kürzel 12SDk und 20SDk.

A) 12SDk

```

5 ` TGATTATCTCCTATTGC      3 `
3 `   AATAGAGGATAACGACT 5 `
    
```

B) 20SDk

```

5 ` TGACATAATGTTTATCTCCTATTGC      3 `
3 `   GTATTACAAATAGAGGATAACGACT 5 `
    
```

Abb. III.9.9.2: Komplementäre Sequenzen zur RBS des T7-Gens 1,3 mit überhängenden Bpu1102I-Enden. Komplementäre Nukleotide sind in fett dargestellt. A) 12 Nukleotide komplementär zur RBS; B) 20 Nukleotide komplementär zur RBS

III.9.10 In vitro Proteinsynthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor

Für die neuen Konstrukte mit der kombinierten TIR aus der RBS des T7-Gens 1,3 sowie der Upstreamsequenz mit oder ohne 5'-hairpin des Gens 11 wurden ebenfalls wieder

Ergebnisse

Proteinsyntheseversuche *in vitro* und *in vivo* durchgeführt. Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche sind in den Abbildungen III.9.10.1 und III.9.10.2 sowie Tabelle III.9.10.1 wiedergegeben.

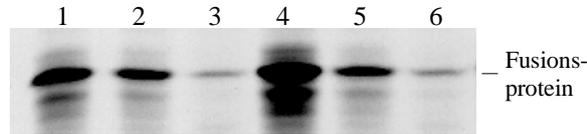


Abb. III.9.10.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der hairpin-Konstrukte des T7-Gens 1,3 mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1,3-217h+ NcD; 2) p1,3-217h+ 12SDk NcD; 3) p1,3-217h+ 20SDk NcD; 4) p1,3-217h- NcD; 5) p1,3-217h- 12SDk NcD; 6) p1,3-217h- 20SDk NcD

Tab. III.9.10.1: Relative Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor im *in vitro* Test. Dieser Test wurde zehnfach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1,3-217h+ NcD	2712	51%
p1,3-217h+ 12SDk NcD	675	27%
p1,3-217h+ 20SDk NcD	79	5%
p1,3-217h- NcD	4129	100%
p1,3-217h- 12SDk NcD	658	29%
p1,3-217h- 20SDk NcD	141	7%

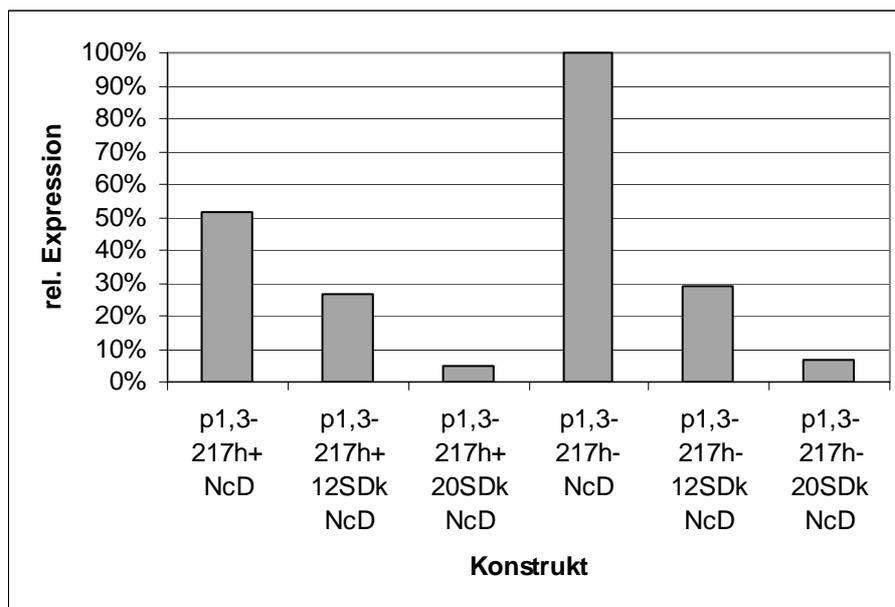


Abb. III.9.10.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor aus Tabelle III.9.10.1 mit Anti-RBS im *in vitro* Test.

Die Ergebnisse aus den *in vitro* Tests der T7-Gen 1,3 Konstrukte mit und ohne hairpin des Gens 11 sind etwas überraschend. Das Konstrukt ohne hairpin ist fast doppelt so stark als das Konstrukt mit hairpin. Computerberechnete Faltungsmodelle der TIR der beiden Konstrukte zeigen keine Erklärung für dieses Phänomen (Abb. III.9.10.3).

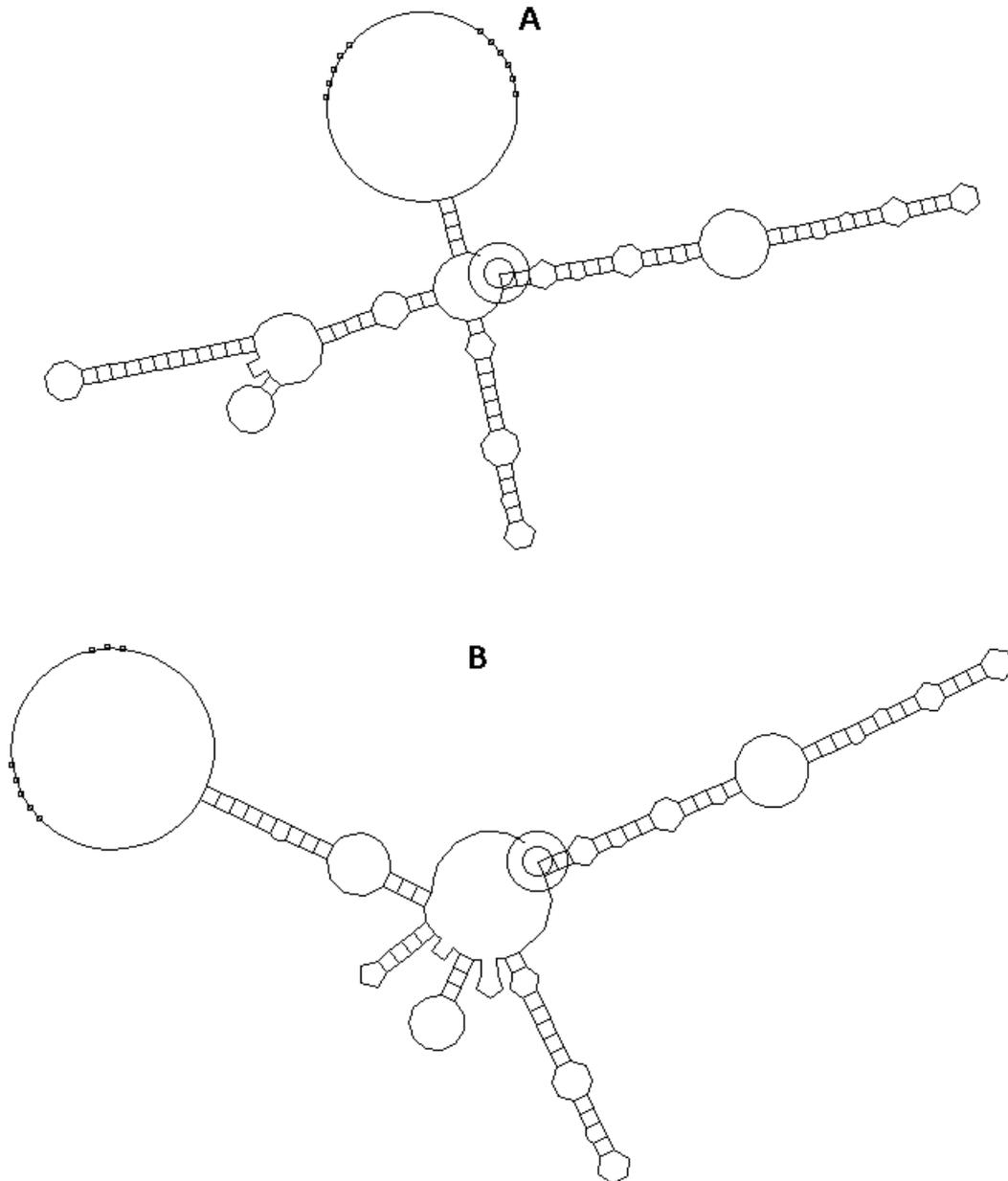


Abb. III.9.10.3: Computerberechnete Sekundärstrukturmodelle der TIR der Konstrukte p1,3-217h+ NcD (A) und p1,3-217h- NcD (B). SD und IT sind markiert, das 5'-Ende ist eingekreist.

Nach dem Einklonieren der Anti-RBS sind beide Konstruktreihen beinahe gleich. Der Rückgang zwischen p1,3-217h+ NcD und p1,3-217h+ 12SDk NcD beträgt 48%, der Rückgang zwischen p1,3-217h- NcD und p1,3-217h- 12SDk NcD 71%.

Was auch immer für die starke Expression des Konstrukts p1,3-217h- NcD verantwortlich ist kann die Inhibition durch die Anti-RBS kaum abschwächen. Computerermittelte Sekundärstrukturfaltungen zeigen nichts, was die besonders starke Expression des Konstrukts ohne hairpin im Vergleich mit dem Konstrukt mit hairpin erklären könnte.

III.9.11 *In vivo* Proteinsynthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor

Die T7-Gen 1,3 NcD-Konstrukte mit Anti-RBS wurden auch *in vivo* auf ihre Fusionsproteinsyntheserate hin untersucht. Abbildung III.9.11.1 zeigt die Fusionsproteinbanden auf einem Röntgenfilm. Nach Messung der Radioaktivität ergaben sich die in Tabelle III.9.11.1 und Abbildung III.9.11.2 dargestellten Resultate.

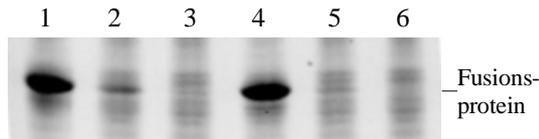


Abb. III.9.11.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vivo* Proteinsynthese der hairpin-Konstrukte des T7-Gens 1,3 mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1,3-217h+ NcD; 2) p1,3-217h+ 12SDk NcD; 3) p1,3-217h+ 20SDk NcD; 4) p1,3-217h- NcD; 5) p1,3-217h- 12SDk NcD; 6) p1,3-217h- 20SDk NcD

Tab. III.9.11.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor im *in vivo* Test. Dieser Test wurde mehrfach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (6036) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1,3-217h+ NcD	8335	68%
P1,3-217h+ 12SDk NcD	917	7%
P1,3-217h+ 20SDk NcD	0	0%
p1,3-217h- NcD	12336	100%
P1,3-217h- 12SDk NcD	417	3%
P1,3-217h- 20SDk NcD	0	0%

Wie bereits im *in vitro* Versuch ist auch *in vivo* das Konstrukt ohne hairpin expressionsstärker als das Konstrukt mit hairpin. Der Unterschied zwischen den beiden ist aber nicht mehr ganz so groß. Durch das Einklonieren von Anti-RBS sinkt die Expressionsrate beider Konstruktreihen dramatisch. Bei einer 20 Nt langen Anti-RBS konnte keine Expression des Fusionsproteins mehr festgestellt werden. Im Gegensatz zum *in vitro* Test zeigt *in vivo* das Konstrukt p1,3-217h+ 12SDk NcD eine etwas höhere Expression als sein Gegenstück ohne hairpin. Zwischen p1,3-217h+ NcD und p1,3-217h+ 12SDk NcD ergibt sich ein Rückgang der Expression um 89%, bei der Konstruktreihe ohne hairpin beträgt der Rückgang 97%.

Ergebnisse

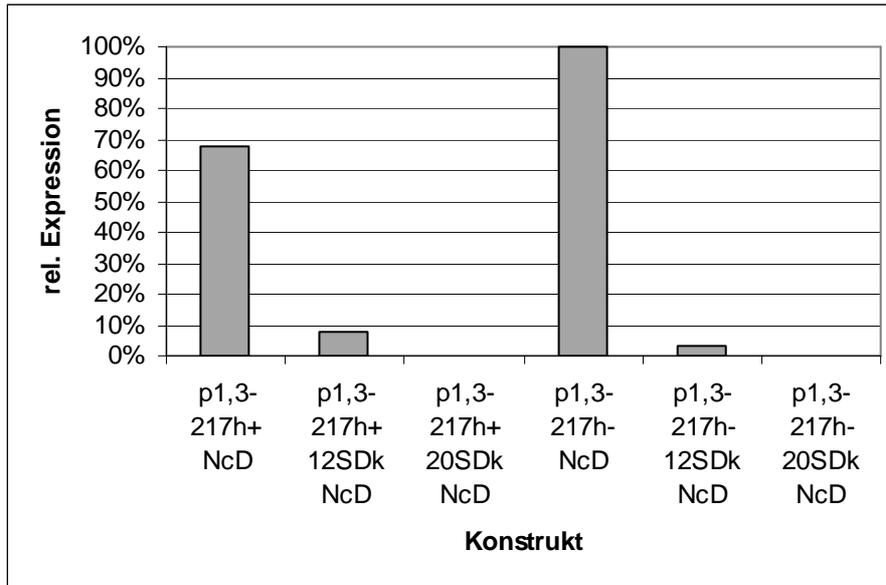


Abb. III.9.11.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-NcD-Vektor aus Tabelle III.9.11.1 im *in vivo* Test.

III.9.12 *In vitro* RNA-Synthese-Kinetik der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor

Für die T7-Gen 1,3 NcD-Konstrukte wurde keine einfache *in vitro* RNA-Synthese durchgeführt wie für die anderen bislang besprochenen Konstrukte sondern exemplarisch eine RNA-Synthese-Kinetik. Dieser Versuch dient dazu festzustellen, ob die Stabilität der synthetisierten mRNA durch die inklinierten Fragmente verändert wird. Hierfür werden Ansätze der verschiedenen Konstrukte mit gleichen DNA-Mengen für unterschiedlich lange Zeitperioden inkubiert. Gewählt wurden die Zeitpunkte 10 min, 20 min und 30 min. Zur Überprüfung der Stabilität der mRNA gab es einen weiteren Ansatz, dem nach 10 min ca 1mMol Actinomycin zugegeben wurde. Actinomycin blockiert die weitere mRNA-Synthese. Nach der Zugabe des Actinomycins wurde dieser Ansatz weitere 10 min inkubiert. Nach Ablauf der unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden alle Ansätze gefällt und weiterverarbeitet wie es bereits für die einfache mRNA-Synthese beschrieben wurde.

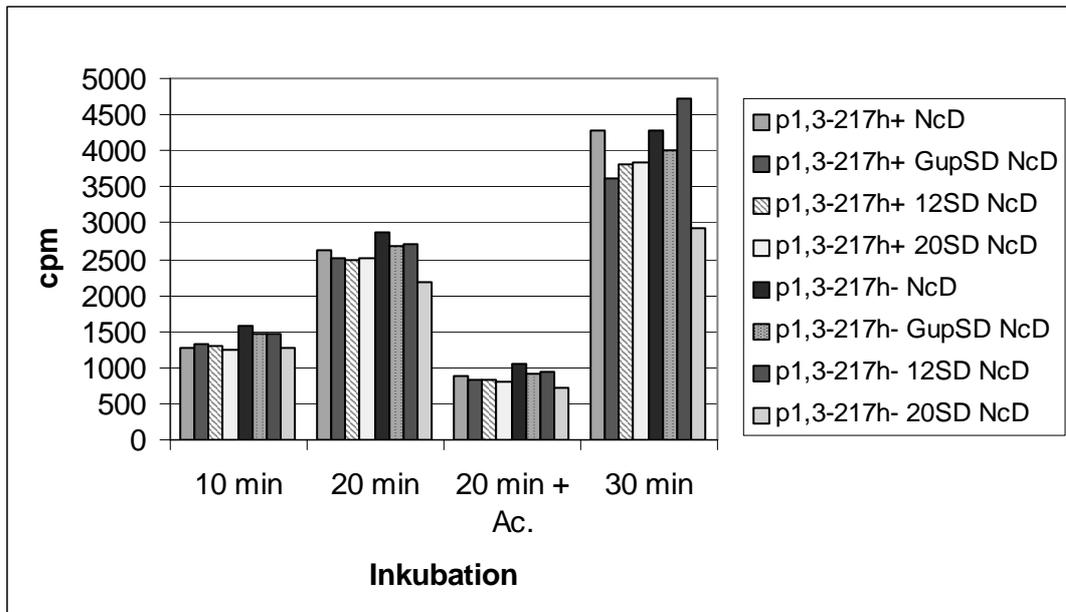


Abb. III.9.12.1: Darstellung der mRNA-Synthese-Kinetik der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte im pDS5-NcD-Vektor. Gleiche DNA-Mengen der unterschiedlichen Konstrukte wurden eingesetzt und unterschiedlich lange inkubiert. Die Minutenangabe bezeichnet die Dauer der Gesamtinkubation. Beim dritten Block (20 min + Ac.) wurde nach 10 min Inkubation 1 mMol Actinomycin zugegeben um die weitere mRNA-Synthese zu stoppen, und dann für weitere 10 min inkubiert. Die synthetisierte mRNA wurde durch den Einbau von ^{14}C -UTP radioaktiv markiert. Im Szintillationszähler wurde die Menge an eingebauter Radioaktivität gemessen.

Die mRNA-Synthese-Kinetik zeigt, dass alle eingesetzten Konstrukte nach 10 oder 20 min Inkubationsdauer etwa die gleiche Menge an mRNA synthetisieren (Abb. III.9.12.1). Das heißt, das einklonierte Konstrukt hat keinen Einfluss auf die Transkriptionsrate. Bei einer Inkubationsdauer von 30 min, was länger ist als die Inkubationszeit unserer *in vitro* Protein- und mRNA-Synthesen, vergrößern sich die Unterschiede etwas.

Gibt man nach 10 min Inkubation Actinomycin hinzu, so sieht man, dass nach weiteren 10 min Inkubation bei allen Konstrukten nur wenig und etwa die selbe Menge an mRNA abgebaut wurde. Das heißt, die Stabilität der mRNA ist bei allen Konstrukten gleich. Eine solche Untersuchung der Stabilität wurde nur exemplarisch für diese Konstruktreihen durchgeführt. Da allerdings auch bei früheren Test niemals ein Einfluss von einklonierten TIR-Fragmenten auf die Stabilität der mRNA festzustellen war kann man annehmen, dass dies nicht nur für die hier untersuchten Konstrukte sondern für alle in dieser Doktorarbeit verwendeten gilt.

III.9.13 Umsetzung der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte in den Vektor pDS5-ND

Alle T7-Gen 1,3-hairpin NcD-Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pDS5-ND umgesetzt. Es sollte untersucht werden, ob sich das Expressionsverhalten der Konstrukte ändert, wenn die TIR am Anfang der mRNA steht, also kein anderes Gen mehr davor liegt.

Die Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI ausgeschnitten und in den ebenfalls EcoRI/BamHI geschnittenen Vektor pDS5-ND einkloniert.

III.9.14 In vitro Proteinsynthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im Vektor pDS5-ND

Es wurde eine *in vitro* Proteinbiosynthese durchgeführt mit den T7-Gen 1,3-hairpin ND-Konstrukten jeweils als Template-DNA. Die Ergebnisse eines solchen Experiments sind in den Abbildungen III.9.14.1 und III.9.14.2 sowie Tabelle III.9.14.1 wiedergegeben.

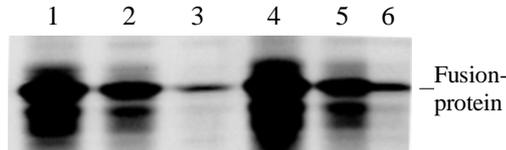


Abb. III.9.14.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der hairpin-Konstrukte des T7-Gens 1,3 mit Anti-RBS im pDS5-ND-Vektor zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1,3-217h+ ND; 2) p1,3-217h+ 12SDk ND; 3) p1,3-217h+ 20SDk ND; 4) p1,3-217h- ND; 5) p1,3-217h- 12SDk ND; 6) p1,3-217h- 20SDk ND

Tab. III.9.14.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-ND-Vektor im *in vitro* Test. Dieser Test wurde fünffach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene (14464 cpm) Wert wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1,3-217h+ ND	8896	55%
p1,3-217h+ 12SDk ND	2847	18%
p1,3-217 20SDk ND	534	3%
p1,3-217h- ND	16191	100%
p1,3-217h- 12SDk ND	2669	16%
p1,3-217h- 20SDk ND	623	4%

Das Ergebnis für die *in vitro* Proteinsynthese im ND-Vektor gleicht den Resultaten für den NcD-Vektor. Auch hier ist das Konstrukt ohne hairpin etwa doppelt so stark wie das Konstrukt mit hairpin. Bei der eingesetzten Anti-RBS von 12 Nt Länge ergibt sich ein etwas stärkerer Rückgang der Expression als im NcD-Vektor. Bei einer Anti-RBS von 20 Nt Länge liegt die Expression wieder knapp über der Nachweisgrenze.

Ergebnisse

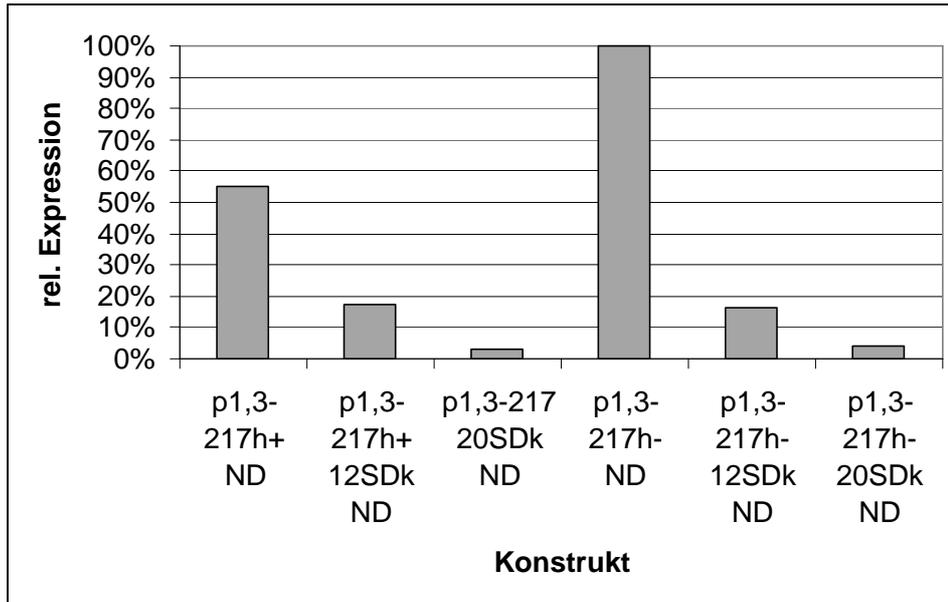


Abb. III.9.14.2: Grafische Darstellung der relativen Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-ND-Vektor aus Tabelle III.9.14.1 im *in vitro* Test.

III.9.15 *In vivo* Proteinsynthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-ND-Vektor

Neben den bereits dargestellten *in vitro* Tests wurden die T7-Gen 1,3 ND-Konstrukte ebenfalls *in vivo* auf ihre Expressionsraten hin untersucht. Abbildung III.9.15.1 zeigt die dabei gebildeten Fusionsproteine, sichtbar gemacht mittels Fluorografie auf einem Röntgenfilm. Nach Ansicht der Banden auf dem Film wurden diese aus den Gelen ausgeschnitten und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Es ergaben sich die in Tabelle III.9.15.1 und Abbildung III.9.15.2 dargestellten Werte.

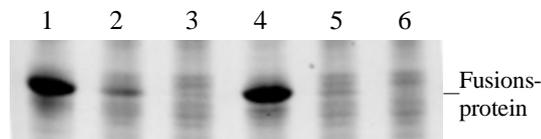


Abb. III.9.15.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vivo* Proteinsynthese der hairpin-Konstrukte des T7-Gens 1,3 mit Anti-RBS im pDS5-ND-Vektor zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1,3-217h+ ND; 2) p1,3-217h+ 12SDk ND; 3) p1,3-217h+ 20SDk ND; 4) p1,3-217h- ND; 5) p1,3-217h- 12SDk ND; 6) p1,3-217h- 20SDk ND

Ergebnisse

Tab. III.9.15.1: Relative Proteinsyntheseraten der Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-ND-Vektor im *in vivo* Test. Dieser Test wurde zweifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (5960 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1,3-217h+ ND	4483	63%
p1,3-217h+ 12SDk ND	403	6%
p1,3-217h+ 20SDk ND	134	2%
p1,3-217h- ND	7173	100%
p1,3-217h- 12SDk ND	0	0%
p1,3-217h- 20SDk ND	0	0%

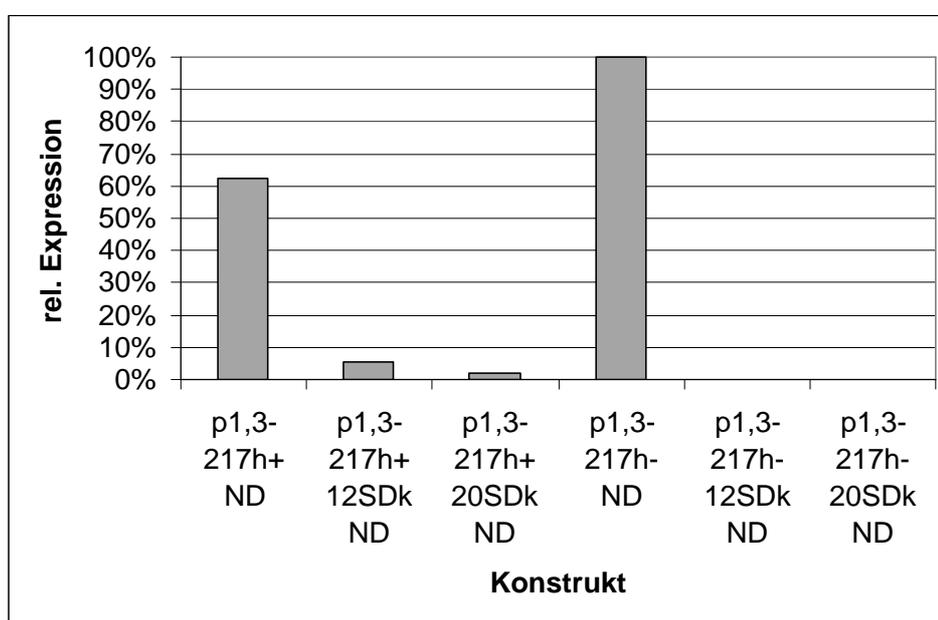


Abb. III.9.15.2: Grafische Darstellung der relative Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-ND-Vektor aus Tabelle III.9.15.1 im *in vivo* Test.

Im *in vivo* Test der ND-Konstrukte verhalten sich die beiden Konstrukte ohne Anti-RBS, p1,3-217h+ ND und p1,3-217h- ND, sehr ähnlich wie im *in vivo* Test der NcD-Konstrukte. Bei eingesetzten Anti-RBS fällt allerdings auf, dass nur die Konstrukte mit hairpin eine nachweisbare, wenngleich sehr niedrige Expression aufweisen. Für die Konstrukte ohne hairpin konnte in keinem Test eine Expression bei vorhandenen Anti-RBS festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den NcD-Konstrukten konnte bei den ND-Konstrukten auch bei p1,3-217h+ 20SDk eine Expression des Fusionsproteins nachgewiesen werden.

III.10.16 *In vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-ND-Vektor

Für die T7-Gen 1,3 ND-Konstrukte mit Anti-RBS wurde eine *in vitro* mRNA-Synthese durchgeführt zur Bestimmung der Transkriptionsrate. Abbildung III.9.16.1 gibt die Ergebnisse wieder.

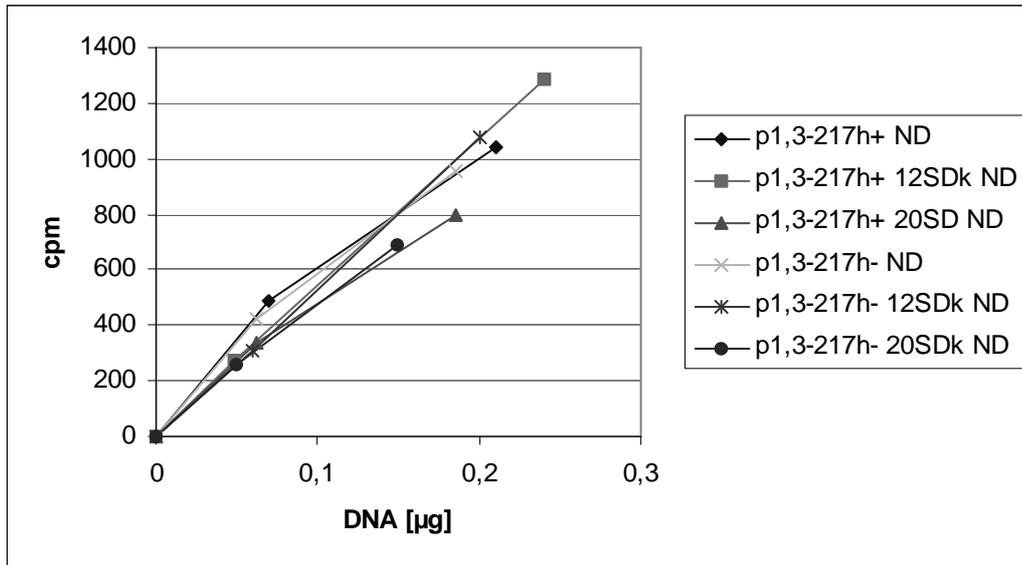


Abb. III.9.16.1: Darstellung der *in vitro* RNA-Synthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte im pDS5-ND-Vektor. Unterschiedliche DNA-Mengen der einzelnen Konstrukte wurden im gekoppelten *in vitro* Proteinbiosynthesystem in Gegenwart von ^{14}C -UTP auf ihre mRNA-Synthese untersucht. Die radioaktiv markierte mRNA wurde im Szintillationszähler gemessen. Die erhaltenen cpm Werte sind gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen.

Alle Konstrukte stellen ungefähr die gleiche Menge an mRNA her. Daher scheinen die inklonierten TIR-Fragmente keinen Einfluss auf die Promotoraktivität zu haben. Da auch

III.9.17 Substitution des Promotors für die E.coli-RNA-Polymerase durch einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase

Für einige Konstrukte wurde der N25O3O4-Promotor für die E.coli-RNA-Polymerase durch einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase ersetzt. Der alte Promotor wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und MfeI ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Fragment ist 58 Nt lang und enthält den kompletten Promotor.

Ein Oligonukleotid mit passenden Enden und der T7-Promotorsequenz wurde synthetisiert und inkloniert. Der so entstandene Expressionsvektor wurde pDS5-TcD genannt, die entsprechenden Konstrukte erhalten das Kürzel TcD.

Ergebnisse

5' TCGAGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAC 3'
 3' CTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGTAA 5'

Abb. III.9.17.1: Oligonukleotid mit der Sequenz des T7-Promotors (fett)

Der Grund für den Tausch des Promotors war die Idee, dass die T7-RNA-Polymerase wesentlich schneller synthetisiert und damit den mit der Translation beginnenden Ribosomen davoneilt. Dadurch sollte die mRNA mehr Zeit für die Ausbildung von Sekundärstrukturen haben, bevor sie von den stetig translatierenden Ribosomen geglättet wird. Eine unterschiedliche Ausbildung von Sekundärstrukturen könnte sich wiederum deutlich auf die Translationseffizienz auswirken.

III.9.18 *In vitro* Proteinsynthese der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-TcD-Vektor

Mit den T7-Gen 1,3 TcD-Konstrukten wurde analog zu den bislang besprochenen Konstrukten eine *in vitro* Proteinbiosynthese durchgeführt. Zusätzlich wurde zu jedem Ansatz 1 µl einer T7-RNA-Polymerase-Lösung von U/ml hinzugegeben. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen III.9.18.1 und III.9.18.2 sowie in Tabelle III.9.18.1 dargestellt.

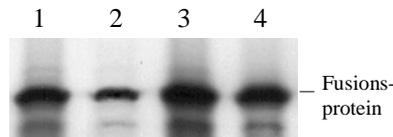


Abb. III.9.18.1: Fluorografie, die die T7-TIR/DHFR-Fusionsproteine der *in vitro* Proteinsynthese der hairpin-Konstrukte des T7-Gens 1,3 mit Anti-RBS im pDS5-TcD-Vektor zeigt. Die Banden wurden zur Quantifizierung ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die einzelnen Spuren geben die Expression der Fusionsproteine folgender Konstrukte wieder: 1) p1,3-217h+ TcD; 2) p1,3-217h+ 12SDk TcD; 3) p1,3-217h- TcD; 4) p1,3-217h- 12SDk TcD

Tab. III.9.18.1: Relative Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-TcD-Vektor im *in vitro* Test. Dieser Test wurde dreifach durchgeführt, die angegebenen Werte sind repräsentativ. Der höchste gemessene Wert (497 cpm) wurde gleich 100% gesetzt.

Konstrukt	cpm	rel. Expression
p1,3-217h+ TcD	308	62%
p1,3-217h+ 12SDk TcD	139	28%
p1,3-217h- TcD	497	100%
p1,3-217h- 12SDk TcD	174	35%

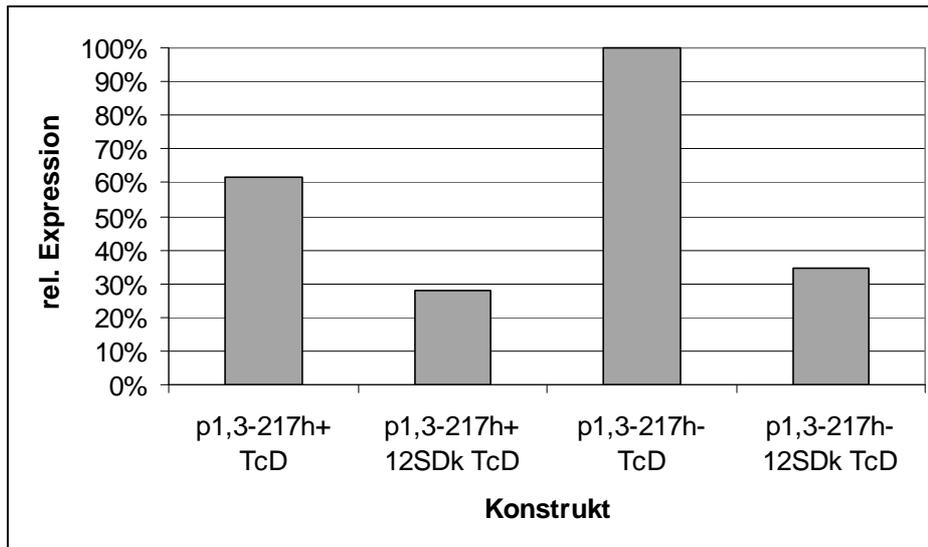


Abb. III.9.18.2: Grafische Darstellung der relative Proteinsyntheseraten der T7-Gen 1,3-hairpin-Konstrukte mit Anti-RBS im pDS5-TcD-Vektor aus Tabelle III.9.18.1 im *in vitro* Test.

Wie schon bei den Vektoren pDS5-NcD und pDS5-ND ist das Konstrukt mit deletiertem hairpin expressionsstärker als das Konstrukt mit hairpin. Der Unterschied ist etwas geringer als bei den *in vitro* Versuchen in den anderen Vektoren und liegt im Bereich der *in vivo* Ergebnisse der anderen beiden Vektoren. Das Einklonieren der 12 Nt langen Anti-RBS hemmt wie erwartet die Translationsinitiation, und zwar in etwa gleichem Ausmaß wie bei den anderen Vektoren mit E.coli-RNA-Polymerase-Promotor.

IV Diskussion

Die Translation ist ein sehr komplizierter und energieaufwendiger Prozess. Ihre Regulation ist von großer Bedeutung. Eine Vielfalt unterschiedlicher Signalelemente spielt hierbei eine Rolle (Fuchs, 1999). Während bei der Transkription die wesentlichen Elemente bekannt und gut erforscht sind, ist dies bei der Translation nicht so einfach. Zur Erforschung bei der Regulation der Translation beteiligter Signalelemente bieten sich die Translations-initiationsregionen (TIR) von lytischen Phagen an. Diese Phagen verfügen über sehr effiziente TIR, da sie in kürzester Zeit möglichst viele neue Phagenpartikel produzieren und dabei keine Rücksicht auf die in der Wirtszelle herrschenden Gleichgewichte nehmen müssen. Es kommt zu einer effizienten Komplexbildung zwischen mRNA und Ribosom, um die Ribosomen von den Wirtssignalen (TIR von *E.coli*) abzuziehen. Für die vorliegende Arbeit wurden TIR aus verschiedenen Genen des Phagen T7 untersucht.

Verlängerung der Shine-Dalgarno-Sequenz

Eine häufige Annahme, gerade auch in Lehrbüchern, ist es, dass Initiationstriplet (IT) und Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) im richtigen Abstand zueinander bei Prokaryonten ausreichend sind für eine effiziente Translationsinitiation (siehe z.B. R. Knippers: „Molekulare Genetik“, 8. Auflage, Kapitel 4, Thieme Verlag; T.A. Brown: „Moderne Genetik“, Kapitel 9, 2. deutsche Auflage, Spektrum Verlag). Es ist zudem eine verbreitete Ansicht, dass je länger die SD, desto effizienter auch die Translationsinitiation (Jackson, 2000). Dass beides nicht zutrifft, zeigen folgende Befunde:

1. im Genom des Bakteriophagen T7 gibt es keine Korrelation zwischen der Größe der SD, dem Spacing und der Effizienz des Signals;
2. die Existenz von Pseudo-RBS, die die Sequenz einer RBS besitzen, jedoch nicht aktiv sind;
3. die große Anzahl an Genen, die keine SD besitzen und dennoch aktiv sind;
4. die Unmöglichkeit portable TIRs nur mit IT und SD herzustellen;
5. die Existenz von Sequenzen im Bereich der TIR, die nachweislich die Translationsinitiation stimulieren (z.B. Downstream Box);
6. weit entfernte Downstreamsequenzen im Genom von RNA-Phagen, die für die Aktivität notwendig sind;
7. die Wichtigkeit von mRNA-Sekundärstrukturen wie USR und 5'-hairpin.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob eine SD im optimalen spacing zum IT bei den TIR stark exprimierender T7-Gene ausreicht für eine optimale Translationsrate.

Für meine Untersuchungen habe ich die TIR der T7-Gene 0,3; 1 und 1,3 verwendet. Alle drei Gene zeigen eine sehr hohe Expression im Wildtyp, haben jedoch nur kurze SD von 4 bzw. 5 Nt. TIR-Fragmente dieser Gene, die nur über kurze Downstreambereiche verfügen, zeigen eine stark verminderte Expression, insbesondere die TIR der Gene 0,3 und 1 (Fatscher et al., 1988). Das TIR-Fragment des Gens 1,3 zeigt eine um ein bis zwei Größenordnungen höhere Translationsrate als die Fragmente der anderen beiden Gene, liegt aber auch noch deutlich unter der Expressionsrate des Wildtyps.

Durch künstliche Verlängerung der SD der drei Gene sollte untersucht werden, ob eine optimale SD den Einfluss downstream gelegener Sequenzen auf die Translationseffizienz kompensieren kann. Das *aligned spacing* (Chen et al., 1994) wurde hierbei nicht verändert. Für das Gen 1 wurde die im WT 4 Nt lange SD auf 7 und 12 Nt verlängert, für das Gen 1,3 wurde die

ursprünglich 5 Nt große SD auf 7, 9 und 11 Nt verlängert und die WT-SD von 4 Nt des Gens 0,3 wurde auf 7, 9 und 12 Nt vergrößert. Die hergestellten Konstrukte wurden vor zwei verschiedene Reportergene, das dhfr-Gen und das cat-Gen, kloniert, und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf ihre Translationseffizienz hin untersucht. Mittels einer *in vitro* mRNA-Synthese wurde gezeigt, dass die eingefügten mutationellen Änderungen keinen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität hatten. Mögliche Auswirkungen der eingefügten Sequenzen auf die Stabilität der mRNA oder des Fusionsproteins oder eventuell stattfindende Prozessierungsvorgänge wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. In früheren Experimenten mit TIR-Fragmenten der verwendeten Gene waren solche Auswirkungen aber, abgesehen von der Bildung von Bruchproteinen bei langen T7-Inserts, niemals beobachtet worden (Geisen et al., 1987; Vollmer, 1993).

Für die TIR der T7-Gene 1 und 0,3 gleichen sich die *in vitro* und *in vivo* erhaltenen Ergebnisse. Die Abbildungen IV.1 und IV.2 geben einen Überblick über die relativen Expressionsraten aller Konstrukte. Bei den *in vitro* Tests kam es durch eine Verlängerung der SD bis auf eine Ausnahme (die Verlängerung der SD des Gens 0,3 von 7 auf 9 Nt) immer zu einer Steigerung der Expression des Fusionsproteins aus T7-TIR und Reporterprotein. Es ließen sich Steigerungen von bis zu einer Größenordnung im Vergleich der kürzesten SD mit den längsten SD erzielen. Die Steigerung der Expression eines Gens durch Verlängerung der SD wurde schon 1992 von Ringquist et al. beschrieben.

Die kürzesten der von mir getesteten Fragmente der TIR der drei T7-Gene, mit dem kleinsten Downstreambereich, profitierten am stärksten von der Erweiterung der SD. Das 29 Nt lange TIR-Fragment des Gens 1 mit der WT-SD von 4 Nt zeigt eine Expression nur knapp über Background-Niveau. Verlängert man die SD steigt die Expression des Fusionsproteins deutlich an (um das 26-fache bei der Verlängerung auf 7 Nt, noch einmal um das 2,3-fache bei der weiteren Verlängerung von 7 auf 12 Nt). Beim 28 bp langen TIR-Fragment des Gens 0,3 liegt die Expression des kleinsten Fragments mit der WT-SD ebenfalls nur knapp über der Signifikanzgrenze. Eine Verlängerung der SD führt zu einem deutlichen Anstieg, jedoch ist

Tab. IV.1: Auflistung aller relativen Expressionsraten der TIR-Konstrukte der Gene 1; 1,3 und 0,3 im pDS5-ND-Vektor. Angegeben sind sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* ermittelten Werte. Der jeweils höchste gemessene Wert der Konstruktreihe eines Gens wurde gleich 100% gesetzt (leicht grau hinterlegt). Für das Gen 1,3 wurde die SD einmal upstream (U) und einmal downstream (D) von 5 auf 7 Nt verlängert.

Relative Expressionsraten der Konstrukte im pDS5-ND-Vektor										
Testbedingung	<i>In vitro</i>					<i>In vivo</i>				
Gen 1										
Länge Insert/SD	4 Nt	7 Nt	12 Nt			4 Nt	7 Nt	12 Nt		
29 Nt	0%	8%	19%			1%	4%	7%		
43 Nt	18%	27%	74%			39%	48%	45%		
63 Nt	36%	53%	79%			62%	97%	70%		
192 Nt	17%	36%	100%			69%	100%	70%		
Gen 1,3										
Länge Insert/SD	5 Nt	7 Nt U	7 Nt D	9 Nt	11 Nt	5 Nt	7Nt U	7 Nt D	9 Nt	11 Nt
31 Nt	17%	12%	23%	22%	5%	62%	46%	69%	49%	45%
49 Nt	91%	89%	56%	68%	48%	98%	100%	93%	63%	74%
175 Nt	100%	87%	66%	55%	36%	83%	52%	60%	52%	47%
Gen 0,3										
Länge Insert/SD	4 Nt	7 Nt	9 Nt	12 Nt		4 Nt	7 Nt	9 Nt	12 Nt	
28 Nt	0%	2%	2%	5%		0%	2%	2%	3%	
40 Nt	3%	13%	15%	60%		25%	34%	33%	24%	
56 Nt	15%	44%	37%	100%		72%	100%	58%	42%	

dieser nicht so hoch wie bei dem kleinsten Fragment des Gens 1 (nur um den Faktor 2 bei einer SD von 7 oder 9 Nt, noch einmal um den Faktor 2,5 bei einer weiteren Verlängerung auf 12 Nt). Beim Gen 1,3 hingegen waren lange SD von Nachteil. Bei zwei der drei verwendeten Insertgrößen (49 und 175 Nt. Länge) ist hier sogar die Wildtyp-SD von 5 Nt Länge am effizientesten. Wie bereits oben angesprochen, ist die TIR des Gens 1,3 als kleines Fragment um ein Vielfaches stärker als die Fragmente der anderen beiden Gene. Durch eine Verlängerung der SD wird sie möglicherweise so stark, dass die Ribosomen zu fest binden und dadurch das Clearing der Translationsstartstelle und der Übergang in die Elongationsphase erschwert wird. Ein ähnliches Phänomen wurde für den Vorgang der Transkription beschrieben (Ellinger et al., 1994). Zu enge Kontakte der E.coli RNA-Polymerase mit den Konsensus-Promotorsequenzen führen zu einem Steckenbleiben der Polymerase und damit verbunden zu einer Verlangsamung der Transkription.

Die *in vivo* Ergebnisse sehen etwas anders aus. Hier erweist sich auch bei den Genen 1 und 0,3 eine lange SD für die meisten getesteten Konstrukte als nachteilhaft. Nur bei den kleinsten Konstrukten, die nur schwach exprimieren, steigt die Expressionsrate auch für die längsten SD an. Dass eine lange SD *in vivo* von Nachteil ist, fanden auch Komarova et al. (2001). Sie testeten drei verschiedene SD-Längen: 6, 8 und 10 Nt. Die höchste Expression ihres lacZ-Reporterproteins erhielten sie mit der 6 Nt langen SD. In weiteren Experimenten fanden sie heraus, dass diesem inhibitorische Effekt der langen SD, den sie ebenfalls auf ein gestörtes Clearing der Startstelle zurückführen, durch das ribosomale Protein S1 entgegen gewirkt wird (Komarova 2002). Durch Einfügung einer A/U-reichen S1-Bindestelle upstream der SD konnte die Translationsrate von langen SD signifikant erhöht werden, wobei das Konstrukt mit der längsten von ihnen getesteten SD-Länge von 10 Nt. immer noch deutlich schwächer war als die Konstrukte mit den kürzeren SD. Warum unterscheiden sich aber nun die Ergebnisse für die langen SD der TIR der T7-Gene *in vitro* und *in vivo*?

Tab. IV.2: Auflistung aller relativen Expressionsraten der TIR-Konstrukte der Gene 1; 1,3 und 0,3 im pDS5-NC-Vektor. Angegeben sind sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* ermittelten Werte. Der jeweils höchste gemessene Wert der Konstruktreihe eines Gens wurde gleich 100% gesetzt (leicht grau hinterlegt). Für das Gen 1,3 wurde die SD einmal upstream (U) und einmal downstream (D) von 5 auf 7 Nt verlängert.

Relative Expression der Konstrukte im pDS5-NC-Vektor										
Testbedingung	<i>In vitro</i>					<i>In vivo</i>				
Gen 1										
Länge Insert/SD	4 Nt	7 Nt	12 Nt			4 Nt	7 Nt	12 Nt		
29 Nt	1%	8%	34%			1%	5%	6%		
43 Nt	6%	53%	100%			16%	33%	31%		
63 Nt	13%	48%	64%			53%	100%	43%		
192 Nt	13%	50%	93%			55%	92%	43%		
Gen 1,3										
Länge Insert/SD	5 Nt	7 Nt U	7 Nt D	9 Nt	11 Nt	5 Nt	7 Nt U	7 Nt D	9 Nt	11 Nt
31 Nt	18%	28%	59%	52%	21%	30%	12%	40%	16%	18%
49 Nt	80%	81%	88%	100%	49%	94%	75%	100%	68%	63%
175 Nt	96%	92%	64%	35%	44%	89%	61%	98%	93%	85%
Gen 0,3										
Länge Insert/SD	4 Nt	7 Nt	9 Nt	12 Nt		4 Nt	7 Nt	9 Nt	12 Nt	
28 Nt		9%					6%			
40 Nt	3%	35%	20%	100%		8%	39%	32%	22%	
56 Nt		62%					100%			

Grund hierfür könnten Channeling-Effekte sein, wie sie von Negrutskii und Deutscher (1991) bei Eukaryonten vorgeschlagen wurden. Beim Channeling werden metabolische Zwischenprodukte direkt von einem Enzym zum nächsten weitergereicht. *In vitro* müssen sich alle an der Translation beteiligten Moleküle durch zufällige Diffusion treffen. In der lebenden Zelle jedoch gibt es Mechanismen, die für eine gezielte Zulieferung von synthetisierten Aminoacyl-tRNAs von der Aminoacyl-tRNA-Synthetase zum Elongationsfaktor und weiter zum translatierenden Ribosomen sorgen. Der reibungslose Ablauf eines solchen Channelings könnte durch das zu feste Anhaften der Ribosomen an die RBS gestört werden. Ein weiterer Punkt wäre die Ribosomenkonzentration, welche *in vivo* deutlich höher ist als *in vitro*. Die lange SD könnte das *in vivo* raschere Initiieren der Ribosomen stören.

Für die TIR des Gens 1 offenbaren Sekundärstrukturberechnungen eine weitere mögliche Erklärung dafür, warum die kleinsten Fragmente *in vivo* ihre maximale Expression bei einer SD von 12 Nt zeigen, während bei den längeren Konstrukten ein Expressionsrückgang bei der Verlängerung der SD von 7 auf 12 Nt zu beobachten ist. Betrachtet man im Computer berechnete Sekundärstrukturen, so fällt auf, dass bei den Konstrukten mit der längsten SD jeweils die meisten Nukleotide der SD in Basenpaarungen eingebunden sind, nämlich 10 Nt bei p1-43-SD12 ND und je 8 Nt bei p1-63-SD12 ND und p1-192-SD12 ND. Beim Konstrukt p1-29-SD12 ND sind jedoch nur 4 Nt der SD gepaart. Der ΔG /Nukleotid-Wert von $-0,1$ kcal/mol für den hairpin des Konstrukts p1-43-SD12 ND (Abb. IV.1) lässt allerdings keine besonders stabile Struktur erwarten.

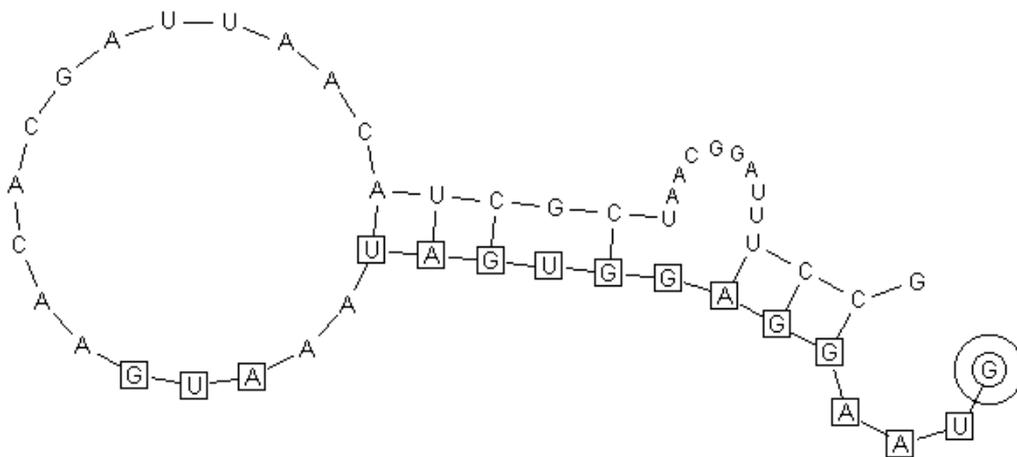


Abb. IV.1: Computerermittelte mRNA-Sekundärstruktur von p1-43-SD12 ND, 46 Basen gefaltet, ΔG /Nukleotid = $-0,1$ kcal/Mol, SD und IT eingerahmt, 5'-Ende durch Doppelpreis markiert

Unter den 9 Basenpaarungen befinden sich nur 3 G-C Paare. Zudem ist der stem von einem sieben Nukleotide langen bulge loop unterbrochen. Auf Grund ihrer geringen Stabilität mag diese Sekundärstruktur keine große Bedeutung haben, aber es ist doch auffällig, dass sie bei allen längeren Konstrukten, die *in vivo* etwas gehemmt sind, auftaucht, nicht jedoch beim Konstrukt p1-29-SD12 ND. Möglicherweise wird diese Struktur *in vivo* durch einen zusätzlichen Faktor stabilisiert, der *in vitro* nicht wirksam ist.

Bei keiner der drei TIRs konnten die Verlängerungen der SD die stimulierenden Einflüsse downstream gelegener Sequenzen vollständig ausgleichen. Gerade die kürzesten der untersuchten TIR-Fragmente waren für alle Gene relativ schwach in der Expression, auch bei

einer auf 11 bzw. 12 Nt erweiterten SD. Diesen Konstrukten fehlt jeweils die ganze (Gen 0,3) bzw. ein Teil der Downstream Box (DB, Gene 1 und 0,3). Dieses von Sprengart et al. 1990 identifizierte regulatorische Element ist in den TIRs vieler Bakterien- und Phagengene zu finden. Es handelt sich um eine Sequenz von 8-13 Nt Länge, die in variablem Abstand downstream des IT, also im kodierenden Bereich des Gens, zu finden ist. Sie weist eine Komplementarität zu den Nukleotiden 1469-1483 der 16S rRNA von *E.coli* auf. Ihre Bedeutung als wichtiger Stimulator der Translationsinitiation wurde für verschiedene Gene demonstriert (Sprengart et al., 1996; Shean und Gottesman, 1992; Winzeler und Shapiro, 1997; Plumbrigde und Söll, 1989; Faxen et al., 1991; Mitta et al., 1997, Etchegaray und Inouye, 1999). Eine lange DB ist beim T7-Gen 10 in der Lage, nach Deletion der SD für eine effiziente Translation zu sorgen (Sprengart et al., 1996). Die DB kann also auch unabhängig von anderen bekannten Signalelementen die Translationsinitiation einleiten, sie ist damit nicht nur ein Verstärker.

Eine fehlende oder verkleinerte DB könnte für die niedrige Expression der kleinen, von mir verwendeten TIR-Fragmente verantwortlich sein, denn eine Verlängerung des Downstreambereichs, so dass die komplette DB enthalten ist, hat für alle untersuchten Gene einen deutlichen Anstieg der Expressionsrate zur Folge.

Vergrößert man den Downstreambereich bei den Konstrukten des Gens 1 weiter, so kann dies zu einer weiteren Erhöhung der Expression führen (bei Erweiterung der Downstreamlänge von 23 auf 43 Nt) oder aber *in vitro* wieder zu einer Abnahme (Verlängerung von 43 Nt auf 172 Nt). Die inhibitorische Wirkung dieser entfernt liegenden Sequenz wurde bereits von Geisen et al. 1987 beschrieben. Sie könnte durch die Ausbildung bestimmter inhibierender Sekundärstrukturen im Bereich der Startstelle bedingt sein, oder es könnte eine Störung der Elongation vorliegen. Da sich der inhibitorische Effekt nur *in vitro* zeigt und zudem eine Verlängerung der SD auf 12 Nt die inhibitorische Wirkung auch *in vitro* wieder aufhebt, scheint eine Störung der Elongation eher unwahrscheinlich.

Beim Gen 0,3 besitzt das längste untersuchte Fragment als einziges die komplette downstream box. Daher ist es nicht verwunderlich, dass es die stärkste Expression zeigt.

Eine Vergrößerung des Downstreambereichs der Gen 1,3 Konstrukte über die downstream box hinaus (175er Konstruktreihe) führt zu keiner weiteren generellen Steigerung der Expression. Für die Konstrukte mit SD5, SD7D und SD11 steigt die Expression *in vitro* leicht an, für die restlichen zwei Konstrukte fällt sie leicht ab. *In vivo* ist immer ein Absinken zu beobachten.

Vergleicht man die Ergebnisse für die beiden unterschiedlichen Expressionsvektoren, pDS5-ND und pDS5-NC mit den Reporter genen dhfr bzw. cat, so stellt man fest, dass es zwar Unterschiede gibt, die Tendenzen jedoch weitgehend übereinstimmen. Bei den Konstrukten des T7-Gens 1 stimmen die Tendenzen für die Verlängerung der SD überein, wenn auch die Verhältnisse zwischen den einzelnen Konstrukten teilweise etwas unterschiedlich sind im Vergleich der beiden Vektoren. Betrachtet man die verschiedenen Konstruktängen, so fällt auf, dass die 63er Konstrukte im pDS5-NC-Vektor etwas schwächer sind als im pDS5-ND-Vektor. Es hat fast den Anschein, als ob die inhibitorischen Einflüsse, die sonst nur bei den Konstrukten mit den längeren, 192 Nt langen Fragmenten beobachtet wurden, bereits wirksam werden. Durch das andere Reporter gen, und damit unterschiedlichen Sequenzen downstream des TIR-Fragments, kommt es vermutlich zur Ausbildung anderer Sekundärstrukturen.

Beim Gen 0,3 wurden nur einige Konstrukte exemplarisch in den zweiten Vektor umgesetzt. Die Ergebnisse stimmen in beiden Vektoren sehr gut überein.

Beim Vergleich der Gen 1,3 NC-Konstrukte mit den ND-Konstrukten fallen trotz vieler Gemeinsamkeiten ein paar Unterschiede auf. Die kleinen Konstrukte mit 31 Nt Länge fallen im Vergleich mit den längeren Konstrukten nicht so weit in der Expression ab. Bei den Konstrukten mittlerer Länge ergibt sich bei einer Verlängerung der SD von 5 auf 7 oder 9 Nt eine Steigerung der Expression. Im ND-Vektor war dies nicht zu beobachten, hier war p1,3-49-SD5 das stärkste Konstrukt. Generell unterscheiden sich die 49er Konstrukte am meisten im Vergleich der beiden

Vektoren. Für die 31er und 175er Serien gleichen sich die Tendenzen. Wodurch sich gerade bei den 49er Konstrukten diese Unterschiede ergeben ist unklar. Die Konstrukte mit der TIR des Gens 1,3 sind durch ihre bereits sehr hohe Grundexpression schwieriger zu handhaben. Die großen Mengen an synthetisiertem Fusionsprotein sind für die Zellen sehr problematisch, so dass Mutationen mit verminderter Expression einen deutlichen Selektionsvorteil haben. Trotz wiederholter Aufreinigung der Konstrukte, erfolgreicher Sequenzierung und Kontrolle der mRNA-Syntheserate kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass nicht doch bei dem einen oder anderen Konstrukt ein etwas größerer Anteil an mutierten Plasmiden mit verminderter Expression enthalten ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei keiner der getesteten TIR eine Verlängerung der SD das Fehlen von Downstreamsequenzen, von besonderer Bedeutung ist hierbei die downstream box, vollständig kompensieren konnte. Die SD hat unzweifelhaft eine sehr große Bedeutung für die Translationsinitiation, ist jedoch längst nicht das einzige wichtige Signalelement. Ein Fehlen der SD kann durch andere Elemente, wie z.B. der DB im Falle des T7-Gens 10, kompensiert werden. Bei verschiedenen Bakterienspezies ist auch der Anteil der Gene, die über eine SD verfügen, sehr unterschiedlich. In einer jüngsten Veröffentlichung wurden die Genome von 30 Bakterienspezies auf den Anteil an Genen mit SD hin untersucht (Ma et al., 2002). Im allgemeinen kann man sagen, dass schnellwachsende Bakterien, Gram-negative Thermophile, Spirochaeten, methanogene Bakterien und hyperthermophile Archaea einen hohen Anteil an Genen mit SD besitzen, während intrazelluläre Parasiten, Oberflächenparasiten, Pathogene und Cyanobakterien einen geringeren Anteil aufweisen. Den höchsten SD Anteil von 30 untersuchten Bakteriengenomen wies das Genom von *Thermotoga maritima* auf, bei dem 90,1% aller Gene über eine SD verfügen. Den niedrigsten Wert hatte *Mycoplasma genitalum* mit 10,8%. *Escherichia coli* hatte laut dieser Studie einen SD-Anteil von 57,1%. Diese Zahlen führen noch einmal vor Augen, dass in einigen Bakterien das Vorhandensein einer SD eher die Ausnahme ist. Selbst beim Modellobjekt *E.coli* verfügt nur knapp über die Hälfte der Gene über eine SD. Beim Bakteriophagen T7, von dem die in meiner Dissertation verwendeten TIR stammten, verfügen alle Gene über eine SD. Die genannte Studie der 30 Bakteriengenomen ergab allerdings auch, dass bei den meisten der 30 untersuchten Genomen die stark exprimierten Gene einen signifikant höheren SD-Anteil aufwiesen als schwächer exprimierte Gene.

Untersuchung der Bedeutung des 5'-hairpins der T7-Gen 11-TIR

Stark exprimierte Gene von T7 besitzen im Bereich ihrer RBS eine unstrukturierte Region (USR), der ein stabiler 5'-hairpin voraus geht. Dieser hairpin kann als Schnittstelle für die RNaseIII dienen, so dass an dieser Stelle das neue 5'-Ende der mRNA erzeugt wird. Ist dies nicht der Fall, und liegt die entsprechende TIR im Innern einer polycistronischen mRNA, so ist es möglicherweise die Aufgabe dieses hairpins, die hinter ihm liegenden Bereiche der mRNA von Sekundärstrukturen frei zuhalten. Entsprechende Hinweise auf eine solche Funktion des hairpins ergaben sich durch Untersuchungen der TIR der T7-Gene 10 und 11; 1,1 und 1 (Sahillioglu, 1999; Jungbluth, 1992; Helke et al., 1993). Deletion des 5'-hairpins dieser Gene resultierte in einem Rückgang der Translation um mindestens den Faktor 2. Anstatt oder neben dem Abschirmeffekt für die RBS könnte der 5'-hairpin auch eine Rolle bei der Erkennung der Translationsinitiationsstelle durch das Ribosom spielen, in dem er mit diesem in Wechselwirkung tritt.

Es wurde auch bereits früh festgestellt, dass sich die Expressionsraten der frühen T7-Gene, mit Ausnahme des Gens 0,3, auch bei Abwesenheit der RNaseIII fast nicht verringern (Dunn und Studier, 1975). In diesem Fall befinden sich auch diejenigen Gene, die über eine RNaseIII-

Schnittstelle verfügen, in einer innercistronischen Position. Der starke 5'-hairpin bleibt jetzt auch bei diesen Genen erhalten.

Das T7-Gen 11 wird zusammen mit dem vorangehenden Gen 10 transkribiert. Seine TIR verfügt sowohl über eine USB als auch über einen davor liegenden 5'-hairpin. Dieser hairpin fungiert auch als Transkriptionsterminator für die T7-RNA-Polymerase. In einem kleinen Prozentsatz der Fälle überliert die Polymerase allerdings den Terminator und transkribiert so das Gen 11. Da sich durch Veränderungen des hairpins auch die Transkriptionsrate verändern würde, wurde die Funktion als Transkriptionsterminator zerstört, indem die dem hairpin folgende, und für die Termination essentielle Sequenz von sechs Uridinen durch die Sequenz 5' AAGAGA 3' ersetzt wurde. Durch diesen Austausch blieb die Struktur des hairpins erhalten. Da sich aus einem Entfernen und Verändern des hairpins nun keine Konsequenzen für die Transkription ergeben, konnte seine Funktion für die Translationsinitiation untersucht werden.

Dr. Sahillioglu untersuchte die Bedeutung des 5'-hairpins für die Effizienz der Translation, jedoch befand sich die TIR des Gens 11 in den von ihr durchgeführten Experimenten vor dem ersten Gen der mRNA. Es gab also nur einen kurzen Sequenzbereich upstream des hairpins, der möglicherweise in die RBS einfallen konnte. Ich wollte nun die Bedeutung dieses hairpins für eine Startstelle innerhalb einer polycistronischen mRNA, entsprechend der Wildtyp-Situation, analysieren.

Für diese Untersuchungen wurde der Expressionsvektor pDS5-NcD konstruiert, bei dem das dhfr-Reportergen hinter einem verkürzten cat-Gen lokalisiert ist. Das cat wurde verkürzt, weil das komplette CAT-Protein im SDS-PAGE auf etwa der selben Höhe läuft wie die T7-TIR-DHFR-Fusionsproteine. TIR-Fragmente des Gens 11 wurden in diesen inkliniert, getestet und mit den entsprechenden Konstrukten im pDS5-ND-Vektor verglichen.

Tab. IV.3: Auflistung der relativen Expression *in vitro* der T7-Gen 11 Konstrukte in den Vektoren pDS5-ND und pDS5-NcD.

Konstrukt	5'-hairpin	Relative Expression	
		pDS5-ND	pDS5-NcD
p11-175	-	12%	13%
p11-213	1/3 +	15%	16%
p11-364l	+	100%	31%
p11-364d	-	77%	25%
p11-364linv	+ (invertiert)	80%	39%

Kleinere TIR-Fragmente des Gens 11, die den hairpin nicht oder nur teilweise beinhalteten, hatten in den beiden Vektoren fast die gleichen Expressionsraten (Tab. IV.3). 364 bp lange Fragmente mit und ohne hairpin bzw. invertiertem hairpin zeigten jedoch ein unterschiedliches Verhalten. Bei diesen Konstrukten war die Expressionsrate in dem neuen Expressionsvektor mit der polycistronischen mRNA deutlich niedriger wie bei den entsprechenden Konstrukten im ND-Vektor. Vermutlich kommt es zur Ausbildung störender Sekundärstrukturen. Leider kann dies nicht mit computerberechneten Faltungsmodellen belegt werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Stabilität der mRNA bei den langen 364er Konstrukten beeinträchtigt ist. Dies ist aber unwahrscheinlich, da sich bei den Konstrukten mit den kürzeren Inserts nichts derartiges feststellen lässt. Die mRNA-Syntheserate wurde für alle Konstrukte gemessen und ist bei allen auf dem gleichen Niveau.

Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich keine gesteigerte Bedeutung des hairpins für die Translationsinitiation innerhalb einer polycistronischen mRNA deuten.

Wie verhält es sich aber, wenn es upstream Sequenzen gibt, die eine sehr große Komplementarität zur RBS aufweisen? Kann der hairpin in diesem Fall eine größere Bedeutung haben? Um dies zu untersuchen, wurden upstream des hairpins bzw. upstream der Stelle des deletierten hairpins der Konstrukte p11-364l NcD und p11-364d NcD unterschiedlich lange Sequenzen einkloniert, die komplementär zur RBS waren (Anti-RBS). Durch das Einsetzen dieser Anti-RBS geht die Expressionsrate *in vitro* deutlich zurück (Tab. IV.4). Je länger die einklonierte Anti-RBS, desto größer die Inhibition. Bei den langen Anti-RBS von 17 oder 30 Nt fast bis auf Background-Niveau. Eine gewisse Ausnahme bildet das Konstrukt p11-364d upSDk NcD. Es enthält eine 10 Nt lange Anti-RBS zu der Sequenz direkt upstream der Shine-Dalgarno-Sequenz. Für dieses Konstrukt ist nur ein relativ geringes Absinken der Expression festzustellen. Bei dem entsprechenden Konstrukt mit hairpin fällt die Hemmung wie erwartet aus. Das merkwürdige Verhalten dieses Konstrukts lässt sich durch die computerberechneten Faltungsmodelle (Abb. III.9.6.3) nicht befriedigend erklären.

Solche computerberechneten Faltungsmodelle der mRNA stellen aber auch bestenfalls nur eine grobe Annäherung an die tatsächlichen Verhältnisse in der Bakterienzelle dar. Bei Prokaryonten laufen Transkription und Translation zeitgleich ab, d.h. die Ribosomen beginnen bereits mit der Translation noch während der laufenden Transkription. Die mRNA hat somit niemals die Möglichkeit, sich in ihre thermodynamisch stabilste Konformation zu falten. Da immer nur Teile der mRNA für Faltungsvorgänge zur Verfügung stehen (aufgrund der noch nicht beendeten Transkription sowie des Glättens der mRNA durch translatierende Ribosomen (Polysomen)) können sich ganz unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbilden. Ebenso zu beachten sind übergeordnete Strukturen (Tertiär- und Quartärstrukturen), die durch Wechselwirkungen der mRNA mit sich selbst oder mit anderen Molekülen, in der Regel Proteinen, gebildet werden. Die Struktur der mRNA unterliegt einem stetigen Fluss, und diese Prozesse wurden durch die Evolution optimiert. Wenn sich durch die computerberechneten Faltungsmodelle keine Erklärungen über beobachtete Phänomene machen lassen, so kann das an der Komplexität der ablaufenden Prozesse liegen.

Abgesehen von der besprochenen Ausnahme des Konstrukts p11-364d upSDk NcD liegt die Expression der restlichen Konstrukte, egal ob der hairpin vorhanden ist oder nicht, auf sehr ähnlichem Niveau. Der hairpin scheint in diesem Fall nicht in der Lage zu sein, die nachfolgende RBS effektiv abzuschirmen. Eine komplette Abschirmung der RBS vor Rückfaltung darf man allerdings sowieso nicht erwarten. Zur Ausbildung der Basenpaarungen zwischen Anti-RBS und RBS wird es kommen, zumindest laut den Computermodellen. Der Gedanke ist vielmehr der, dass der hairpin die nachfolgende RBS für eine kurze Zeit offen hält und so den Ribosomen die Gelegenheit gibt, sofort während der noch laufenden Transkription zu initiieren.

Diese Konstrukte mit Anti-RBS wurden auch *in vivo* auf ihre Expressionsrate hin untersucht.

Die Resultate unterscheiden sich von den in den *in vitro* Experimenten gewonnenen Daten etwas. Alle Konstrukte mit einer Anti-RBS liegen in der Expression des Fusionsproteins dicht beieinander, nur das Konstrukt p11-364d upSDk NcD bildet wieder eine Ausnahme. Auch *in vivo* ist seine Expression sehr hoch, höher noch als die des Konstrukts p11-364d NcD ohne Anti-RBS.

Vergleicht man die Konstrukte p11-364l und p11-364d miteinander, so sieht man die positive Wirkung des hairpins. Da er jedoch anscheinend nicht in der Lage ist, die RBS vor der Einfaltung der Anti-RBS zu schützen, beruht seine stimulierende Wirkung möglicherweise nicht auf dem Abschirmeffekt vor der Einfaltung von Upstreamsequenzen, sondern vielleicht kommt es zu einer Wechselwirkung des Ribosoms mit dem hairpin, und somit zu einer Erleichterung des Findens der Startstelle.

Diskussion

Tab. IV.4: Auflistung der relativen Expression der 364 bp langen T7-Gen 11 Konstrukte mit und ohne hairpin sowie unterschiedlich langen Anti-RBS im Vektor pDS5-NcD *in vitro* und *in vivo*.

Konstrukt	5'-hairpin	Relative Expression	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
p11-364l	+	100%	100%
p11-364l SDK	+	44%	47%
P11-364l upSDK	+	16%	49%
p11-364l 17k	+	17%	41%
p11-364l 30k	+	6%	37%
p11-364d	-	64%	81%
p11-364d SDK	-	34%	40%
p11-364d upSDK	-	49%	89%
p11-364d 17k	-	16%	46%
p11-364d 30k	-	5%	39%

Da nach Einklonierung der Anti-RBS die Expression des Fusionsproteins *in vitro* sehr niedrig wurde und sich keine verstärkte Bedeutung des hairpins nachweisen ließ, wurde die RBS des T7-Gens 11 gegen die wesentlich stärkere, oben bereits besprochene RBS des T7-Gens 1,3 ausgetauscht. Hierzu wurde ein 217 bp langes Fragment der TIR des Gens 1,3 direkt hinter den hairpin bzw. hinter die Stelle des deletierten hairpins einkloniert und die RBS des Gens 11 entfernt. Die Konstrukte wurden auch in den Vektor pDS5-ND umgesetzt, um den Vergleich zwischen der monocistronischen und der polycistronischen Situation zu haben.

Die Herstellung dieser Konstrukte geschah in der Erwartung, dass sich bei dieser deutlich höher exprimierenden RBS die Wirkung des hairpins besser beobachten lässt. Gerade bei einer solchen, von sich aus extrem starken Translationsinitiationsstelle sollte es für eine optimale Initiation von großer Wichtigkeit sein, die RBS von Einfaltungen anderer Sequenzen frei zu halten.

Tab. IV.5: Auflistung der relativen *in vitro* und *in vivo* Expressionsraten der 217 bp langen T7-Gen1,3 Konstrukte in den Vektoren pDS5-NcD, pDS5-ND und pDS5-TcD.

Konstrukt	5'-hairpin	Relative Expression				
		pDS5-NcD		pDS5-ND		pDS5-TcD
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
p1,3-217h+	+	51%	68%	55%	63%	62%
p1,3-217h+ 12SDk	+	27%	7%	18%	6%	28%
p1,3-217h+ 20SDk	+	5%	0%	3%	2%	
p1,3-217h-	-	100%	100%	100%	100%	100%
p1,3-217h- 12SDk	-	29%	3%	16%	0%	35%
p1,3-217h- 20SDk	-	7%	0%	4%	0%	

Bei den Konstrukten mit der TIR des Gens 1,3 ist das Konstrukt ohne hairpin bei allen Expressionsvektoren *in vitro* fast doppelt so stark wie das Konstrukt mit hairpin (Tab. IV.5). Dies ist ein überraschendes Ergebnis. Warum wirkt sich das Vorhandensein der hairpin-Struktur bei diesen Konstrukten negativ auf die Expressionsrate aus? Die Erklärung kann nur in der Ausbildung unterschiedlicher Sekundärstrukturen liegen, wobei der hairpin ja die dahinter

liegende Sequenz vor der Ausbildung eben solcher Strukturen schützen sollte. Computerberechnete Faltungsmodelle bringen aber keine Erklärung für diesen Sachverhalt (Abb. III.9.10.3). Die RBS beider Konstrukte sollte eigentlich sehr ähnlich strukturiert sein. Inhibitorische Faltungen sind nicht zu erkennen. Nach Einklonierung der Anti-RBS von 12 bzw. 20 Nt Länge sinken die Expressionsraten bei beiden Konstruktsreihen auf ein ähnliches Niveau, es ist praktisch kein Unterschied mehr zu sehen zwischen den Konstrukten mit oder ohne hairpin. Der Vorteil des Konstrukts mit deletiertem hairpin wirkt nicht mehr. Auch sieht man praktisch keine Unterschiede zwischen den Konstrukten mit dem Promotor für die E.coli-RNA-Polymerase und denen mit dem Promotor für die T7-RNA-Polymerase. Die schnellere Synthese der T7-RNA-Polymerase, das damit verbundene Entfernen der Polymerase von den translatierenden Ribosomen und damit die längere Zeit, die der mRNA zur Faltung bleibt, scheint sich nicht wesentlich auf die Ausbildung der Sekundärstrukturen im Bereich der TIR auszuwirken.

Bei den *in vivo* Experimenten ist der Unterschied zwischen p1,3-217h⁺ und p1,3-217h⁻ nicht mehr ganz so groß wie *in vitro*. Das Konstrukt ohne hairpin ist hier nur 32% bzw. 37% stärker als das mit hairpin. Deutlichere Unterschiede ergeben sich für die Konstrukte mit Anti-RBS. Bei beiden verwendeten Vektoren zeigen die Konstrukte ohne hairpin nur sehr geringe oder gar nicht mehr nachweisbare Expressionsraten. In den Serien mit hairpin ist die Expression zwar auch niedrig, besonders bei der 20 Nt langen Anti-RBS, aber im Vergleich doch deutlich höher. *In vivo* scheint der hairpin also bei Vorhandensein der direkt zur RBS komplementären Sequenzen doch seine Schutzfunktion ausüben zu können. Es spielt dann aber keine Rolle, ob vor den Anti-RBS noch größere Sequenzbereiche vorhanden sind (pDS5-NcD) oder nicht (pDS5-ND). Es ist überraschend, dass diese Effekte *in vivo* stärker sind als *in vitro*. Üblicherweise verhält es sich eher umgekehrt, denn in den lebenden Zellen existieren in der Regel Mechanismen, die ausgleichend wirken, so wie das auch bei den T7-Gen 11-Konstrukten zu sehen war.

Für die Expression von Genen *in vitro* und *in vivo* wäre die Konstruktion einer portablen TIR, die vor beliebige Gene und in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert eine effiziente Translation garantiert, von großem Nutzen. Bislang ist es noch nicht gelungen, eine solche TIR herzustellen. Welche Bedeutung haben die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Daten für die Konstruktion einer solchen portablen TIR?

Ein Signalelement alleine ist nicht ausreichend für eine optimale Expression. Weder die T7-TIR-Konstrukte ohne DB, noch diejenigen mit einer kleinen SD konnten in den durchgeführten Tests bei allen untersuchten T7-Gen-TIR-Fragmenten für die beste Expression sorgen. In den *in vitro* Versuchen erwies sich bei zwei der drei getesteten TIR eine besonders lange SD als optimal. *In vivo* hingegen waren lange SD inhibitorisch. Eine mittellange SD (7-9 Nt) wäre daher vermutlich am geeignetsten. Die DB sollte, laut meinen Resultaten, auf jeden Fall enthalten sein. Da die DB jedoch im kodierenden Bereich des Gens liegt, ist ihr Einbau in eine portable TIR problematisch, da durch ihre Verwendung einige Codons an das folgende Gen angehängt werden, wodurch das resultierende Fusionsprotein einige zusätzliche AS am N-Terminus besitzt. Von Vorteil ist es auch wenn die RBS in einer USR liegt. Durch den Einsatz der Anti-RBS konnte gezeigt werden, dass die Expressionsrate der entsprechenden Konstrukte dramatisch sinken kann. Die Ausbildung der Sekundärstrukturen hängt jedoch maßgeblich von den die RBS umgebenden Sequenzbereichen ab. Bezüglich der Sequenzen upstream konnte ein Abschirmeffekt eines 5'-hairpins für die folgenden Sequenzbereiche nicht demonstriert werden. Seine Bedeutung als Stimulator der Translationsinitiation wurde allerdings für verschiedene T7-Gene gezeigt. Möglicherweise interagiert er mit den Ribosomen und erleichtert so das Erkennen der Startstellen, so dass seine Verwendung als Element einer portablen TIR von erheblicher Bedeutung sein könnte.

Es wäre aber die beste Lösung, die TIR möglichst weit an den Anfang der mRNA zu positionieren, möglicherweise unter Einsatz von RNaseIII-Schnittstellen. Die Downstreambereiche werden durch das der TIR folgende Gen, welches exprimiert werden soll, vorgegeben. Es ist daher nicht möglich, für Bedingungen zu sorgen, dass eine TIR für alle Gene gut funktioniert. Durch den Einsatz langer Downstreambereiche bei der Konstruktion der TIR könnte dieses Problem teilweise gelöst werden. Man kann natürlich auch dann nicht ausschließen, dass Sequenzen des Gens über eine längere Distanz hinweg in die RBS einfallen. Bei dem Einsatz langer Downstreambereiche kommt es natürlich auch zum Anhängen einer Reihe von AS zum N-Terminus des jeweiligen Proteins, die dessen Aktivität beeinträchtigen können. Dieses Problem könnte man durch den Einbau von Erkennungssequenzen für bestimmte Proteasen beseitigen. Dann dürfte allerdings das zu synthetisierende Protein nicht selbst von dieser Protease gespalten werden.

V. Literaturverzeichnis

- Balakin, A.G., Skipkin, E.A., Shatsky, I.N., Bogdanov, A.A. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20, 563-571
- Beck, E., Sommer, R., Auerswald, E.A., Kurz, C., Zink, B., Osterburg, G., Schaller, H. (1978) *Nucl. Acids Res.* 5, 4495-4503
- Benard, L., Philippe, C., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Portier, C. (1996) *Biochimie* 78, 568-576
- Brombach, H.C., Pon, C.L. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 208, 94-100
- Bücheler, U.S., Werner, D., Schirmer, R.H. (1990) *Gene* 96, 217-276
- Case, C.C., Simons, E.L., Simons, R.W. (1990) *EMBO J.* 9, 1259-1266
- Chen, H., Bjercknes, M., Kumar, R., Jay, E. (1994) *Nuc. Acids Res.* 22, 4953-4957
- Childs, J., Villanueva, K., Barrick, D., Schneider, T.D., Stormo, G.D., Gold, L., Leitner, M., Caruthers, M. (1985) in *Sequence Specificity in Transcription and Translation* Calendar, R., Gold, L. eds Alan R. Liss, New York, pp.
- de Smit, M.H., van Duin, J. (1994) *J. Mol. Biol.* 235, 173-184
- Doherty, E.A., Doudna, J.A. (2001) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 457-475
- Dreyfus, M. (1988) *J. Mol Biol.* 204, 79-94
- Dunn, J., Studier, F.W. (1981) *J. Mol. Microbiol.* 148, 303-330
- Dunn, J.J., Studier, F.W. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 477-535
- Ellinger, T., Behnke, D., Bujard, H., Gralla, J.D. (1994) *J Mol. Biol.* 239, 455-465
- Ellington, A.D., Szostak, J.W. (1990) *Nature* 346, 818-822
- Etchegaray, J.P., Inouye, M. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 10079-10085
- Farwell, M.A., Roberts, M.W., Rabinovitz, J.C. (1992) *Mol. Microbiol.* 6, 3375-3383
- Faxen, M., Plumbridge, J., Isaksson, L.A. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19, 5247-5271
- Fuchs, E. (1999) in *Genetic Engineering*, Vol. 21, ed. Setlow, J.K., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- Gallie, D.R., Kado, D.I. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 129-132
- Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C., Wilson, T.M.A. (1987) *Nucl. Acids Res.* 5, 3257-3273

- Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C., Wilson, T.M.A. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 8693-8711
- Ganoza, M.C., Kofoid, E.C., Marliere, P., Louis, B.G. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 345-360
- Geisen, R.M., Fatscher, H.P., Fuchs, E. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 4931-4943
- Gold, L. (1988) *Annual Reviews of Biochemistry* 57, 199-233
- Gold, L., Stormo, G.D., Saunders, R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 760-764
- Hannon, G.J. (2002) *Nature*, 418, 244-251
- Hartz, D., Mc Pheeters, D.S., Traut, R., Gold, L. (1988) *Methods Enzymol.* 164, 419-425
- Helke, A., Geisen, R.M., Vollmer, M., Sprengart, M.L., Fuchs, E. (1993) *Nucl. Acids Res.* 21, 5705-5711
- Hui, A., de Boer, H.A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4762-4766
- Ivanov, I.G., Alexandrova, R.A., Dragulev, B.P., AbouHaidar, M.G. (1995) *Gene* 160, 75-79
- Jackson, R.J. (2000) *Translational control of gene expression*, eds. Sonnenberg, N., Hershey, J.W.B., Mathews, M.B., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 127-183
- Jakob, W.F., Santer, M., Dahlberg, A.E. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4757-4761
- Jungbluth, A. (1992) Diplomarbeit, Universität Heidelberg
- Komarova, A.V., Chufistofa, L.S., Supina, E.V., Boni, I.V. (2001) *Bioorg Khim* 27, 282-90
- Komarova, A.V., Tchufistova, L.S., Supina, E.V., Boni, I.V. (2002) *RNA* 8, 1137-1147
- Little, S., Hyde, S., Campbell, C.S., Lilley, R.J., Robinson, M.K. (1989) *Bacteriol.* 171, 3518-3522
- Looman, A.C., Bodlaender, J., Comstock, L.J., Eaton, D., Jhurani, P., deBoer, H.A., van Knippenberg, P.H. (1987) *EMBO J.* 6, 2489-2492
- Looman, A.C., van Knippenberg, P.H., (1986) *FEBS Letters* 197, 315-320
- Ma, C., Simons, R.W. (1990) *EMBO J.* 9, 1267-1274
- Ma, J., Campbell, A., Karlin, S. (2002) *J. Bacteriol.* 184, 5733-5745
- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., Turner, D.H. (1999) *J Mol. Biol.* 288, 911-940
- Matzura, O., Wennborg, A. (1996) *CABIOS* 12 247-249
- McCarthy, J.E.G., Brimacombe, R. (1994) *Trends Genet.* 10, 402-407

- McAllister, W.T., McCarron, R.J. (1977) *Viol.* 82, 288-293
- Melancon, P., Leclerc, D., Destroimaisons, N., Brakier-Gingras, L. (1990) *Biochemistry* 29, 3402-3407
- Mitta, M., Fang, L., Inouye, M. (1997) *Mol. Microbiol.* 26, 321-335
- Moffat, B.A., Studier, F.W. (1988) *J. Bakteriolog.* 170, 2095-2105
- Moll, I., Grill, S., Gualerzi, C.O., Bläsi, U. (2002) *Mol. Microbiol.* 43, 239-246
- Munson, L.M., Stormo, G.D., Niece, R.L., Reznikoff, W.S. (1984) *J. Mol. Biol.* 177, 663-683
- Nagai, H., Yuzawa, H., Yura, T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10515-10519
- Narberhaus, F. (2002) *Arch. Microbiol.* 178, 404-410
- Negrutskii, B.S., Deutscher, M.P. (1991) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88, 4991-4995
- Niles, E.G., Condit, R.C. (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 57-67
- Nomura, M., Gourse, R., Baughman, G. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53, 75-117
- Nomura, M., Yates, J.L., Dean, D., Post, L.E. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7084-7088
- O'Connor, M., Asai, T., Squires, C.L., Dahlberg, A.E. (1999) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8973-8978
- Olins, P.O., Devine, C.S., Rangwala, S.H., Kavka, K. (1988) *Gene*, 73, 227-235
- Olins, P.O., Rangwala, S.H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 16973-16976
- Oppenheimer, D.S., Yanofsky, C. (1980) *Genetics* 95, 785-795
- Patel, D.J., Suri, A.K., Jiang, F., Jiang, L., Fan, P., Kumar, R.A., Nonin, S. (1997) *J. Mol. Biol.* 272, 645-664
- Petersen, C. (1989) *J. Mol. Biol.* 206, 323-332
- Philippe, C., Benard, L., Portier, C. Westhof, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C. (1995) *Nucl. Acids. Res.* 23, 18-28
- Plumbridge, J., Söll, D. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 216, 113-119
- Ptashne, M., Backman, K., Humayum, M.Z., Jeffrey, A., Maurer, R., Meyer, B., Sauer, R.T. (1976) *Science* 194, 156-161
- Ray, P.N., Pearson, M.L. (1975) *Nature* 253, 647-650

- Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G.D., Gold, L. (1992) *Mol. Microbiol.* 6, 1219-1229
- Sacerdot, C., Fayat, G., Dessen, P., Springer, M., Plumbridge, J.A., et al. (1982) *EMBO J.* 1, 311-315
- Sahillioglu, U. (1999) *Doctoral Thesis*, Universität Heidelberg
- Saito, H., Richardson, C.C. (1981) *Cell* 27, 533-542
- Scherer, G.F.E., Watkinshaw, M.D., Arnott, S., Morre, D.J. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8, 3895-3907
- Schümperli, D., McKenney, K., Sobieski, D.A., Rosenberg, M. (1982) *Cell* 30, 865-871
- Schwartz, M., Roa, M., Debarbouille, M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2937-2941
- Sclavi, B., Woodson, S., Sullivan, M., Chance, M., Brenowitz, M. (1998) *Meth. Enzymol.* 295, 379-402
- Shean, C.S., Gottesman, M.E. (1992) *Cell* 70, 513-522
- Shine J., Dalgarno, L. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1342-1346
- Shine J., Dalgarno, L. (1975) *Nature* 254, 34-37
- Shinedling, S. (1985) Ph.D. dissertation, University of Colorado, Boulder
- Shinedling, S., Gayle, M., Pribnow, D., Gold, L. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 207, 224-232
- Singer, B.S., Gold, L. (1976) *J. Mol. Biol.* 103, 627-646
- Singer, B.S., Gold, L., Shinedling, S.T., Hunter, L.R.; Pribnow, D., Nelson, M.A. (1981) *J. Mol. Biol.* 149, 405-432
- Singleton, C.K., Roeder, W.D., Bogosian, G., Somerville, R.L., Weith, H.L. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8, 1551-1560
- Sprengart, M.L., Fatscher, H.P., Fuchs, E. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18, 1719-1723
- Sprengart, M.L., Fuchs, E., Porter, A.G. (1996) *EMBO J* 15, 665-674
- Steitz, J.A. (1969) *Nature* 224, 957-964
- Stenström, C.M., Jin, H., Major, L.L., Tate, W.P., Isaksson, L.A. (2001) *Gene* 263, 273-284
- Stormo, G.D. (1986) in *Maximizing Gene Expression* (Reznikoff, W., Gold, L. eds.) pp. 195-224, Butterworths
- Stormo, G.D., Schneider, T.D., Gold, L.M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10, 2971-2996

- Studier, F.W. (1972) *Science* 176, 367-376
- Studier, F.W., Dunn, J.J. (1983) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, 999-1007
- Subramanian, A.R. (1984) *Trends Biochem. Sci.* 9, 491-494
- Thisted, T., Sorensen, N.S., Gerdes, K. (1995) *J. Mol. Biol.* 247, 859-873
- Tinoco, I., Bustamante, C. (1999) *J. Mol. Biol.* 293, 271-281
- Tzareva, N.V., Makhno, V.I., Boni, I.V. (1994) *FEBS Letters* 337, 189-194
- van Duin, J. (1988) *The Bacteriophages* (R. Calendar, ed.) Vol. 1, 117-167 Plenum Press, New York
- Van Etten, W.J., Janssen, G.R. (1998) *Mol. Microbiol.* 27, 987-1001
- Varshney, U., Raj Bhandary, U.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1586-1590
- Vollmer, M. (1993) *Doctoral Thesis*, Universität Heidelberg
- Weiss, R.B., Dunn, D.M., Atkins, J.F., Gesteland, R.F. (1987) *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 52, 687-693
- Wilson, T.M.A., Saunders, K.; Dowson-Day, M.J., Sleat, D.E., Trachsel, H., Mundry, K.W. (1990) in *Post-Transcriptional Control of Gene Expression* (McCarthy, J.E.G., Tuite, M.F. eds.) NATO ASI Series, Vol. H49, pp. 261-275, Springer Verlag Berlin/Heidelberg
- Winzeler, E., Shapiro, L. (1997) *J. Bacteriol.* 179, 3981-3988
- Woese, C.R., Winkler, S., Gutell, R.R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11555-11560
- Woodson, S.A. (2000) *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 796-808
- Yura, T. (1996) *From Genes to Cells* 1, 277-284
- Zarrinkar, P.P., Williamson, J.R. (1994) *Science* 265, 918-924
- Zhang, J, Deutscher, M.P. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 18228-18233
- Zhang, J., Deutscher, M.P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2605-2609
- Zuker, M. (1989) *Methods Enzymol.* 180, 262-288
- Zuker, M. (1994) *Methods Mol. Biol.* 25, 267-294
- Zuker, M., Stiegler, P. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9, 133-148

VI. Anhang**VI.1 Nukleotidsequenz des Expressionsvektors pDS5-ND**

Die Gesamtlänge der Sequenz beträgt 3566 Bp

	10	20	30	40	50	60
1	CCTCGACGTC	GACGTAAACT	GGCTCACCTT	CGGGTGGGCC	TTTCTGCGTT	TATAAGGTAC
61	CTCGAGAAAT	CATAAAAAAT	TTATTTGCTT	TGTGAGCGGA	TAACAATTAT	AATAGATTCA
121	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGAA	TTCCCGGATC	CGGCATCATG	GTTTCGACCAT
181	TGAACTGCAT	CGTCGCCGTG	TCCCAAAATA	TGGGGATTGG	CAAGAACGGA	GACCTACCCCT
241	GGCCTCCGCT	CAGGAACGAG	TTCAAGTACT	TCCAAAGAAT	GACCACAACC	TCTTCAGTGG
301	AAGGTAAACA	GAATCTGGTG	ATTATGGGTA	GGAAAACCTG	GTTCTCCATT	CCTGAGAAGA
361	ATCGACCTTT	AAAGGACAGA	ATTAATATAG	TTCTCAGTAG	AGAACTCAAA	GAACCACCAC
421	GAGGAGCTCA	TTTTCTTGCC	AAAAGTTTGG	ATGATGCCTT	AAGACTTATT	GAACAACCGG
481	AATTGGCAAG	TAAAGTAGAC	ATGGTTTGGG	TAGTCGGAGG	CAGTTCTGTT	TACCAGGAAG
541	CCATGAATCA	ACCAGGCCAC	CTTAGACTCT	TTGTGACAAG	GATCATGCAG	GAATTTGAAA
601	GTGACACGTT	TTTCCAGAAA	ATTGATTTGG	GGAAATATAA	ACTTCTCCCA	GAATACCCAG
661	GCGTCTCTC	TGAGGTCCAG	GAGGAAAAAG	GCATCAAGTA	TAAGTTTGAA	GTCTACGAGA
721	AGAAAGACTA	ACAGGAAGAT	GCTTTCAAGT	TCTCTGCTCC	CCTCCTAAAG	CTATGCATTT
781	TTATAAGACC	ATGGGACTTT	TGCTGGCTTT	AGATCCGGCC	AAGCTTGGCG	AGATTTTCAG
841	GAGCTAAGGA	AGCTAAAATG	GAGAAAAAAA	TCACTGGATA	TACCACCGTT	GATATATCCC
901	AATGGCATCG	TAAAGAACAT	TTTGAGGCAT	TTCAGTCAGT	TGCTCAATGT	ACCTATAACC
961	AGACCGTTCA	GCTGGATATT	ACGGCCTTTT	TAAAGACCGT	AAAGAAAAAT	AAGCACAAGT
1021	TTTATCCGGC	CTTTATTAC	ATTCTTGCCC	GCCTGATGAA	TGCTTAATGA	ATTACAACAG
1081	TACTGCGATG	AGTGGCAGGG	CGGGGCGTAA	TTTTTTTAAAG	GCAGTTATTG	GTGCCCTTAA
1141	ACGCCTGGGG	TAATGACTCT	CTAGCTTGAG	GCATCAAATA	AAACGAAAAG	CTCAGTCGAA
1201	AGACTGGGCC	TTTCGTTTTA	TCTGTTGTTT	GTCGGTGAAC	GCTCTCCTGA	GTAGGACAAA
1261	TCCGCGGCTC	TAGAGCTGCC	TCGCGCGTTT	CGGTGATGAC	GGTGA AAAAC	TCTGACACAT
1321	GAGCTCCCG	GAGACGGTCA	CAGCTGTCT	GTAAGCGGAT	GCCGGGAGCA	GACAAGCCCG
1381	TCAGGGCGCG	TCAGCGGGTG	TTGGCGGGTG	TCGGGGCGCA	GCCATGACCC	AGTACCGTAG
1441	CGATAGCGGA	GTGTATACTG	GCTTAACTAT	CGGGCATCAG	AGCAGATTGT	ACTGAGAGTG
1501	CACCATATGC	GGTGTGAAAT	ACCGCACAGA	TGCGTAAGGA	GAAAAATACCG	CATCAGGCGC
1561	TCTTCCGCTT	CCTCGCTCAC	TGACTCGCTG	CGCTCGGTGCG	TTCGGCTGCG	GCGAGCGGTA
1621	TCAGCTCACT	CAAAGGCGGT	AATACGGTTA	TCCACAGAAT	CAGGGGATAA	CGCAGGAAAG
1681	AACATGTGAG	CAAAGGCCA	GCAAAGGCC	AGGAACCGTA	AAAAGGCCGC	GTTGCTGGCG
1741	TTTTTCCATA	GGCTCCGCC	CCCTGACGAG	CATCACAAAA	ATCGACGCTC	AAGTCAGAGG
1801	TGGCGAAACC	CGACAGGACT	ATAAAGATAC	CAGGCGTTTC	CCCCTGGAAG	CTCCCTCGTG
1861	CGCTCTCCTG	TTCCGACCC	GCCGTTACC	GGATACCTGT	CCGCCTTTCT	CCCTTCGGGA
1921	AGCGTGGCGC	TTTCTCAATG	CTCACGCTGT	AGGTATCTCA	GTTCCGGTGTA	GGTCGTTCCG
1981	TCCAAGCTGG	GCTGTGTGCA	CGAACCCCCC	GTTCAGCCCG	ACCGCTGCGC	CTTATCCGGT
2041	AACTATCGTC	TTGAGTCCAA	CCCGTAAGA	CACGACTTAT	CGCCACTGGC	AGCAGCCACT
2101	GGTAACAGGA	TTAGCAGAGC	GAGGTATGTA	GGCGGTGCTA	CAGAGTTCTT	GAAGTGGTGG
2161	CCTAACTACG	GCTACACTAG	AAGGACAGTA	TTTGGTATCT	GCGCTCTGCT	GAAGCCAGTT
2221	ACCTTCGGAA	AAAGAGTTGG	TAGCTCTTGA	TCCGGCAAAC	AAACCACCGC	TGGTAGCGGT
2281	GGTTTTTTTTG	TTTGCAAGCA	GCAGATTAC	CGCAGAAAAA	AAGGATCTCA	AGAAGATCCT
2341	TTGATCTTTT	CTACGGGGTC	TGACGCTCAG	TGGAACGAAA	ACTCACGTTA	AGGGATTTTG
2401	GTCATGAGAT	TATCAAAAAG	GATCTTCACC	TAGATCCTTT	TAAATTAATA	ATGAAGTTTT
2461	AAATCAATCT	AAAGTATATA	TGAGTAAACT	TGGTCTGACA	GTTACCAATG	CTTAATCAGT
2521	GAGGCACCTA	TCTCAGCGAT	CTGTCTATTT	CGTTCATCCA	TAGTTGCTG	ACTCCCCGTC
2581	GTGTAGATAA	CTACGATACG	GGAGGGCTTA	CCATCTGGCC	CCAGTGCTGC	AATGATACCG
2641	CGAGACCCAC	GCTCACCGGC	TCCAGATTTA	TCAGCAATAA	ACCAGCCAGC	CGGAAGGGCC
2701	GAGCGCAGAA	GTGGTCCTGC	AAC TTTATCC	GCCTCCATCC	AGTCTATTAA	TTGTTGCCGG
2761	GAAGCTAGAG	TAAGTAGTTC	GCCAGTTAAT	AGTTTGC GCA	ACGTTGTTGC	CATTGCTGCA
2821	GGCATCGTGG	TGTCACGCTC	GTCGTTTGGT	ATGGCTTCAT	TCAGCTCCGG	TTCCCAACGA
2881	TCAAGGCGAG	TTACATGATC	CCCCATGTTG	TGCAAAAAAG	CGGTTAGCTC	CTTCGGTCTC
2941	CCGATCGTTG	TCAGAAGTAA	GTTGGCCGCA	GTGTTATCAC	TCATGGTTAT	GGCAGCACTG
3001	CATAATTCTC	TTACTGT CAT	GCCATCCGTA	AGATGCTTTT	CTGTGACTGG	TGAGTACTCA
3061	ACCAAGTCAT	TCTGAGAATA	GTGTATGCGG	CGACCGAGTT	GCTCTTGCCC	GGCGTCAACA
3121	CGGGATAATA	CCGCGCCACA	TAGCAGA AACT	TTAAAAGTGC	TCATCATTTG	AAAACGTTCT

Anhang

```

3181 TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT
3241 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTTACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA
3301 ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC
3361 ATACTCTTCC TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA
3421 TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA
3481 AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG
3541 CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTTCA

```

Positionsangaben wichtiger DNA-Sequenzen im Vektor pDS5-ND:

- XhoI-Schnittstelle: 61
- -35-Region des Promotors N25: 85-90
- Start der Transkription vom Promotor P_{N25O304}: 120
- EcoRI-Schnittstelle: 148
- BamHI-Schnittstelle: 156
- dhfr: 168-728
- βla: 3362-2505

VI.2 Nukleotidsequenz des Expressionsvektors pDS5-NC

Die Gesamtlänge der Sequenz beträgt 3795 Bp.

```

          10          20          30          40          50          60
1 CCTCGAGAAA TCATAAAAAA TTTATTTGCT TTTGTGAGCGG ATAACAATTA TAATAGATTC
61 AATTGTGAGC GGATAACAAT TTCACACAGA ATTCCGGATC CGCGAGCTTA ATGGAGAAAA
121 AAATCACTGG ATATAACCACC GTTGATATAT CCCAATGGCA TCGTAAAGAA CATTTTGAGG
181 CATTTCAGTC AGTTGCTCAA TGTACCTATA ACCAGACCGT TCAGCTGGAT ATTACGGCCT
241 TTTTAAAGAC CGTAAAGAAA AATAAGCACA AGTTTTATCC GGCTTTTATP CACATTCCTG
301 CCCGCCTGAT GAATGCTCAT CCGGAATTTT GTATGGCAAT GAAAAGACGGT GAGCTGGTGA
361 TATGGGATAG TGTTACCCCT TGTTACACCG TTTTCCATGA GCAAACCTGAA ACGTTTTTCAT
421 CGCTCTGGAG TGAATACCAC GACGATTTCC GGCAGTTTCT ACACATATAT TCGCAAGATG
481 TGGCGTGTTA CGGTGAAAAC CTGGCCTATT TCCCTAAAGG GTTTATTGAG AATATGTTTT
541 TCGTCTCAGC CAATCCCTGG GTGAGTTTCA CCAGTTTTGA TTTAAACGTG GCCAATATGG
601 ACAACTTCTT CGCCCCCGTT TTCACCATGG GCAAATATTA TACGCAAGCC GACAAGGTGC
661 TGATGCCGCT GGCGATTGAG GTTCATCATG CCGTCTGTGA TGGCTTCCAT GTCGGCAGAA
721 TGCTTAATGA ATTACAACAG TACTGCGATG AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA TTTTTTTAAG
781 GCAGTTATTG GTGCCCTTAA ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG GCATCAAATA
841 AAACGAAAGG CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTTCGTTTTA TCTGTTGTTT GTCGGTGAAC
901 GCTCTCCTGA GTAGGACAAA TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT CCGTGATGAC
961 GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGCTT GTAAGCGGAT
1021 GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA
1081 GCCATGACCC AGTCACGTAG CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG
1141 AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGGTAAGGA
1201 GAAAATACCG CATCAGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTGCG
1261 TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAA
1321 CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGCCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA
1381 AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAAA
1441 ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC
1501 CCCCTGGAAG CTCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT
1561 CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA
1621 GTTCGGTGTA GGTCGTTTCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCG GTTCAGCCCG
1681 ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT
1741 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA
1801 CAGACTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT
1861 GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGCGAAAC
1921 AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTT TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA

```

```

1981 AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA
2041 ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT
2101 TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA
2161 GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA
2221 TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC
2281 CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA
2341 ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCTCCATCC
2401 AGTCTATTA TTTGTTGCCG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA
2461 ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT
2521 TCAGTCCCG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG
2581 CGGTTAGCTC CTTCCGGTCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC
2641 TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTTACTGTCAT GCCATCGGTA AGATGCTTTT
2701 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT
2761 GCTCTTGCCC GCGCTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTA AAAAGTGC
2821 TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT
2881 CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA
2941 GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGCGCA
3001 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTC AATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG
3061 GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG
3121 TTCCGCGCAT ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGAAATTGT AAACGTTAAT ATTTTGTTAA
3181 AATTGCGGTT AAATTTTGT TAAATCAGCT CATTTT TTA CCAATAGGCC GAAATCGGCA
3241 AAATCCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG AGATAGGGTT GAGTGTGTTT CCAGTTTGGA
3301 ACAAGAGTCC ACTATTAAG AACGTGGACT CCAACGTCAA AGGGCGAAAA ACCGTCTATC
3361 AGGGCGATGG CCCACTACGT GAACCATCAC CCTAATCAAG TTTT TGGGG TCGAGGTGCC
3421 GTAAAGCACT AAATCGGAAC CCTAAAGGGA GCCCCCGATT TAGAGCTTGA CGGGGAAAGC
3481 CGGCGAACGT GGCGAGAAA GAAAGGAAGA AAGCGAAAGG AGCGGGCGCT AGGGCGCTGG
3541 CAAGTGTAGC GGTACGCTG CGCGTAACCA CCACACCCGC CGCGCTTAAT GCGCCGCTAC
3601 AGGGCGGTA CTATGTTGC TTTGACGAGC ACGTATAACG TGCTTTCTC GTTAGAATCA
3661 GAGCGGGAGC TAAACAGGAG GCCGATTAAG GGGATTTTAG ACAGGAACGG TACGCCAGAA
3721 TCCTGACTAA GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAAATAGG GTATCACGAG
3781 GCCCTTTCGT CTTCA

```

Positionsangaben wichtiger DNA-Sequenzen im Vektor pDS5-NC:

- XhoI-Schnittstelle: 2
- -35-Region des Promotors N25: 26-31
- Start der Transkription vom Promotor P_{N25O304}: 61
- EcoRI-Schnittstelle: 89
- BamHI-Schnittstelle: 96
- cat: 111-767
- βla: 3022-2164

VI.3 Nukleotidsequenz des Expressionsvektors pDS5-NcD

Die Gesamtlänge der Sequenz beträgt 3904 Bp.

```

          10          20          30          40          50          60
1 CCTCGACGTC GACGTTAACT GGCTCACCTT CGGGTGGGCC TTTCTGCGTT TATAAGGTAC
61 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
121 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACACCT AGGAGCTTGG CGAGATTTTC AGGAGCTAAG
181 GAAGCTAAAA TGGAGAAAAA AATCACTGGA TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT
241 CGTAAAGAAC ATTTTGAGGC ATTTTCAGTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT
301 CAGCTGGATA TTACGGCCTT TTTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAAGCACAA GTTTTATCCG
361 GCCTTTATTC ACATTCTTGC CCGCCTGATG AATGCTCATC CGGAATTTTC TATGGCAATG

```

Anhang

421	AAAGACGGTG	AGCTGGTGAT	ATGGGATAGT	G TTCACCCCTT	G TTACACCGT	T TTCCATGAG
481	CAAAC T GAAA	CGTTTTTCATC	GCTCTGGAGT	GAATACCACG	ACGATT TCCG	GCAGTTTCTA
541	CACATATATT	CGCAAGATGT	GGCGTGTTAC	GGTGAAAACC	TGGCCTATTT	CCCTAAAGGG
601	TTTATTGAGA	ATATGTTTTT	CGTCTCAGCC	AATCCCTGGG	TGAGTTTCAC	CAGTTTTGAT
661	TTAAACGTGG	CCAATATGGA	CAACTTCTTC	GCCCCCGTTT	TCACCATGGC	TTAAGAAATC
721	CCGGATCCGG	CATCATGGTT	CGACCATTGA	ACTGCATCGT	CGCCGTGTCC	CAAAAATATGG
781	GGATTGGCAA	GAACGGAGAC	CTACCCTGGC	CTCCGCTCAG	GAACGAGTTC	AAGTACTTCC
841	AAAGAATGAC	CACAACCTCT	TCAGTGGAAG	GTAAACAGAA	TCTGGTGATT	ATGGGTAGGA
901	AAACCTGGTT	CTCCATTCTT	GAGAAGAATC	GACCTTTAAA	GGACAGAATT	AAATATAGTTC
961	TCAGTAGAGA	ACTCAAAGAA	CCACCACGAG	GAGCTCATTT	TCTTGCCAAA	AGTTTGGATG
1021	ATGCCTTAAG	ACTTATTGAA	CAACCGGAAT	TGGCAAGTAA	AGTAGACATG	GTTTGGATAG
1081	TCGGAGGCAG	TTCTGTTTAC	CAGGAAGCCA	TGAATCAACC	AGGCCACCTT	AGACTCTTTG
1141	TGACAAGGAT	CATGCAGGAA	TTTGAAAAGT	ACACGTTTTT	CCCAGAAAAT	GATTTGGGGG
1201	AATATAAACT	TCTCCAGAAA	TACCCAGGCG	TCCTCTCTGA	GGTCCAGGAG	GAAAAAGGCA
1261	TCAAGTATAA	GTTTGAAGTC	TACGAGAAGA	AAGACTAACA	GGAAGATGCT	TTCAAGTTCT
1321	CTGCTCCCCT	CCTAAAGCTA	TGCATTTTTA	TAAGACCATG	GGACTTTTGC	TGGCTTTAGA
1381	TCCGGCCAAG	CTTGCGGCCG	CTTAATGAAT	TACAACAGTA	CTGCGATGAG	TGGCAGGGCG
1441	GGGCGTAATT	TTTTTAAGGC	AGTTATTGGT	GCCCTTAAAC	GCCTGGGGTA	ATGACTCTCT
1501	AGCTTGAGGC	ATCAAATAAA	ACGAAAGGCT	CAGTCGAAAG	ACTGGGCCCT	TCGTTTTATC
1561	TGTTGTTTTGT	CGGTGAACGC	TCTCCTGAGT	AGGACAAAATC	CGCCGCTCTA	GAGCTGCCTC
1621	GCGCGTTTTCG	GTGATGACGG	TGAAAACCTC	TGACACATGC	AGCTCCC GGA	GACGGTCACA
1681	GCTTGTCTGT	AAGCGGATGC	CGGGAGCAGA	CAAGCCC GTC	AGGGCGCGTC	AGCGGGTGTT
1741	GGCGGGTGTC	GGGGCGCAGC	CATGACCCAG	TCACGTAGCG	ATAGCGGAGT	GTATACTGGC
1801	TTAACTATGC	GGCATCAGAG	CAGATTGTAC	TGAGAGTGCA	CCATATGCGG	TGTGAAAATAC
1861	CGCACAGATG	CGTAAGGAGA	AAATACCGCA	TCAGGCGCTC	TTCCGCTTCC	TCGCTCACTG
1921	ACTCGTGC	CTCGTTCGTT	CGGCTGCGGC	GAGCGGTATC	AGCTCACTCA	AAGGCGGTAA
1981	TACGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	CAGGAAAGAA	CATGTGAGCA	AAAGGCCAG
2041	AAAAGGCCAG	GAACCGTAAA	AAGGCCGCGT	TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC
2101	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	GTCAGAGGTG	GCGAAAACCG	ACAGGACTAT
2161	AAAGATACCA	GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	CCCTCGTGCG	CTCTCCTGTT	CCGACCCTGC
2221	CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTTCTCC	CTTCGGGAAG	CGTGGCGCTT	TCTCAATGCT
2281	CACGCTGTAG	GTATCTCAGT	TCGGTGTAGG	TCGTTGCTC	CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG
2341	AACCCCCCGT	TCAGCCCCGAC	CGCTGCGCCT	TATCCGGTAA	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC
2401	CGGTAAGACA	CGACTTATCG	CCACTGGCAG	CAGCCACTGG	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA
2461	GGTATGTAGG	CGGTGCTACA	GAGTTCCTGA	AGTGGTGGCC	TAAC TACGGC	TACTACTAGAA
2521	GGACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	AGCCAGTTAC	CTTCGGAAAA	AGAGTTGGTA
2581	GCTCTTGATC	CGGCAAAACA	ACCACCGCTG	GTAGCGGTGG	TTTTTTTGT	TGCAAGCAGC
2641	AGATTACGCG	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	AAGATCCTTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG
2701	ACGCTCAGTG	GAACGAAAAAC	TCACGTTAAG	GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA
2761	TCTTCACCTA	GATCCTTTTA	AATTA AAAAT	GAAGTTTTAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG
2821	AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGCGATCT
2881	GTCTATTTTCG	TTTATCCATA	GTTGCCTGAC	TCCCCGTCGT	GTAGATAACT	ACGATACGGG
2941	AGGGCTTACC	ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	TGATACCGCG	AGACCCACGC	TCACCGGCTC
3001	CAGATTTATC	AGCAATAAAC	CAGCCAGCCG	GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCTTGCAA
3061	CTTTATCCGC	CTCCATCCAG	TCTATTAATT	GTTGCCGGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCGC
3121	CAGTTAATAG	TTTGCGCAAC	GTTGTTGCCA	TTGCTGCAGG	CATCGTGGTG	TCACGCTCGT
3181	CGTTTGGTAT	GGCTTCATTC	AGCTCCGGTT	CCCAACGATC	AAGGCGAGTT	ACATGATCCC
3241	CCATGTTGTG	CAAAAAAGCG	GTTAGCTCCT	TCGGTCTCTC	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT
3301	TGGCCGAGT	GTTATCACTC	ATGGTTATGG	CAGCACTGCA	TAAT TCTCTT	ACTGTCATGC
3361	CATCCGTAAG	ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	AGTACTCAAC	CAAGTCATTC	TGAGAATAGT
3421	GTATGCGGCG	ACCGAGTTGC	TCTTGCCCGG	CGTCAACACG	GGATAATACC	GCGCCACATA
3481	GCAGAACTTT	AAAAGTGCTC	ATCATTGGAA	AACGTTCTTC	GGGGCGAAAA	CTCTCAAGGA
3541	TCTTACCGCT	GTTGAGATCC	AGTTCGATGT	AACCCACTCG	TGCACCCAAC	TGATCTTCAG
3601	CATCTTTTAC	TTTCACCAGC	GTTTCTGGGT	GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCCGCAA
3661	AAAAGGGAAT	AAGGGCGACA	CGGAAATGTT	GAATACTCAT	ACTCTTCTTT	TTTCAATATT
3721	ATTGAAGCAT	TTATCAGGGT	TATTGTCTCA	TGAGCGGATA	CATATTTGAA	TGTATTTAGA
3781	AAAATAAACA	AATAGGGGTT	CCGCGCACAT	TTCCCCGAAA	AGTGCCACCT	GACGTCTAAG
3841	AAACCATTAT	TATCATGACA	TTAACCTATA	AAAATAGGCG	TATCACGAGG	CCCTTTCTGTC
3901	TTCA					

Positionsangaben wichtiger DNA-Sequenzen im Vektor pDS5-NcD:

- XhoI-Schnittstelle: 61
- –35-Region des Promotors N25: 85-90
- Start der Transkription vom Promotor P_{N25O304}: 120
- EcoRI-Schnittstelle: 716
- BamHI-Schnittstelle: 723
- verkürztes cat: 180-714
- dhfr: 735-1285
- βla: 3022-2164

VI.4 Nukleotidsequenz des Expressionsvektors pDS5-TcD

Die Gesamtlänge der Sequenz beträgt 3878 Bp.

	10	20	30	40	50	60
1	CCTCGACGTC	GACGTTAACT	GGCTCACCTT	CGGGTGGGCC	TTTCTGCGTT	TATAAGGTAC
61	CTCGAGAAAT	TAATACGACT	CACTATAGGG	AGACATTGTG	AGCGGATAAC	AATTTACAC
121	ACCTAGGAGC	TTGGCGAGAT	TTTCAGGAGC	TAAGGAAGCT	AAAATGGAGA	AAAAAATCAC
181	TGGATATAAC	ACCGTTGATA	TATCCCAATG	GCATCGTAAA	GAACATTTTG	AGGCATTTCA
241	GTCAGTTGCT	CAATGTACCT	ATAACCAGAC	CGTTCAGCTG	GATATTACGG	CCTTTTTTAAA
301	GACCGTAAAG	AAAAATAAGC	ACAAGTTTTA	TCCGGCCTTT	ATTACACATTC	TTGCCCGCCT
361	GATGAATGCT	CATCCGGAAT	TTCGTATGGC	AATGAAAGAC	GGTGAGCTGG	TGATATGGGA
421	TAGTGTTTAC	CCTTGTTACA	CCGTTTTCCA	TGAGCAAAC	GAAACGTTTT	CATCGCTCTG
481	GAGTGAATAC	CACGACGATT	TCCGGCAGTT	TCTACACATA	TATTCGCAAG	ATGTGGCGTG
541	TTACGGTGAA	AACCTGGCCT	ATTTCCCTAA	AGGGTTTATT	GAGAATATGT	TTTTTCGTCTC
601	AGCCAATCCC	TGGGTGAGTT	TCACCAGTTT	TGATTTAAAC	GTGGCCAATA	TGGACAACCT
661	CTTCGCCCC	GTTTTACCA	TGGCTTAAGA	ATTCCCGGAT	CCGGCATCAT	GGTTCGACCA
721	TTGAACTGCA	TCGTCGCCGT	GTCCCAAAAT	ATGGGGATTG	GCAAGAACGG	AGACCTACCC
781	TGGCCTCCGC	TCAGGAACGA	GTTCAAGTAC	TTCCAAAGAA	TGACCACAAC	CTCTTCAGTG
841	GAAGGTAAAC	AGAATCTGGT	GATTATGGGT	AGGAAAACCT	GGTTCTCCAT	TCCTGAGAAG
901	AATCGACCTT	TAAAGGACAG	AATTAATATA	GTTCTCAGTA	GAGAACTCAA	AGAACCACCA
961	CGAGGAGCTC	ATTTTCTTGC	CAAAAGTTTG	GATGATGCCT	TAAGACTTAT	TGAACAACCG
1021	GAATTGGCAA	GTAAAGTAGA	CATGGTTTGG	ATAGTCGGAG	GCAGTCTGT	TTACCAGGAA
1081	GCCATGAATC	AACCAGGCCA	CCTTAGACTC	TTTGTGACAA	GGATCATGCA	GGAATTTGAA
1141	AGTGACACGT	TTTTCCCAGA	AATTGATTTG	GGGAAATATA	AACTTCTCCC	AGAATACCCA
1201	GGCGTCCTCT	CTGAGGTCCA	GGAGGAAAAA	GGCATCAAGT	ATAAGTTTGA	AGTCTACGAG
1261	AAGAAAGACT	AACAGGAAGA	TGCTTTCAAG	TTCTCTGCTC	CCCTCCTAAA	GCTATGCATT
1321	TTTATAAGAC	CATGGGACTT	TTGCTGGCTT	TAGATCCGGC	CAAGCTTGCG	GCCGCTTAAT
1381	GAATTACAAC	AGTACTGCGA	TGAGTGGCAG	GGCGGGGCGT	AATTTTTTTA	AGGCAGTTAT
1441	TGGTGCCCTT	AAACGCCTGG	GGTAATGACT	CTCTAGCTTG	AGGCATCAA	TAAAACGAAA
1501	GGCTCAGTCG	AAAGACTGGG	CCTTTCGTTT	TATCTGTTGT	TTGTCGGTGA	ACGCTCTCCT
1561	GAGTAGGACA	AATCCGCCGC	TCTAGAGCTG	CCTCGCGCGT	TTCCGGTGAT	ACGGTGA AAA
1621	CCTCTGACAC	ATGCAGCTCC	CGGAGACGGT	CACAGCTTGT	CTGTAAGCGG	ATGCCGGGAG
1681	CAGACAAGCC	CGTCAGGGCG	CGTCAGCGGG	TGTTGGCGGG	TGTCGGGGCG	CAGCCATGAC
1741	CCAGTCACGT	AGCGATAGCG	GAGTGTATAC	TGGCTTAACT	ATGCGGCATC	AGAGCAGATT
1801	GTA CTGAGAG	TGCACCATAT	GCGGTGTGAA	ATACCGCACA	GATGCGTAA	GAGAAAAATAC
1861	CGCATCAGGC	GCTCTTCCGC	TTCTCGCTC	ACTGACTCGC	TGCGCTCGGT	CGTTCCGGCTG
1921	CGGCGAGCGG	TATCAGCTCA	CTCAAAGGCG	GTAATACGGT	TATCCACAGA	ATCAGGGGAT
1981	AACGCAGGAA	AGAACATGTG	AGCAAAAGGC	CAGCAAAAGG	CCAGGAACCG	TAAAAAGGCC
2041	GCGTTGCTGG	CGTTTTTCCA	TAGGCTCCGC	CCCCCTGACG	AGCATCACAA	AAATCGACGC

Anhang

```

2101 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
2161 AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT
2221 CTCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
2281 TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
2341 GCCTTATCCG GTAACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
2401 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
2461 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
2521 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
2581 GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
2641 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAATCACGT
2701 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATPAA
2761 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
2821 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC
2881 TGAATCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
2941 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
3001 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
3061 AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT
3121 GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
3181 GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
3241 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATATC ACTCATGGTT
3301 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
3361 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCAGCCGAG TTGCTCTTGC
3421 CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
3481 GAAAAACGTT CTTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTGC
3541 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTAATTTTAC CAGCGTTTCT
3601 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGAAA
3661 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
3721 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC
3781 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
3841 TATAAAAATA GCGGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCA

```

Positionsangaben wichtiger DNA-Sequenzen im Vektor pDS5-TcD:

- XhoI-Schnittstelle: 61
- T7-Promotor: 85-90
- EcoRI-Schnittstelle: 690
- BamHI-Schnittstelle: 698
- verkürztes cat: 164-688
- dhfr: 709-1259

VI.5 Nukleotidsequenz der T7-Gen 1 TIR-Fragmente

29er-Fragment (T7 Nukleotide 3151-3179):

5' CTAAGTGAAGAGGCACTAAATGAACACG 3'

43er-Fragment (T7 Nukleotide 3151-3193):

5' CTAAGTGAAGAGGCACTAAATGAACACGATTAACATCGCTAA 3'

63er-Fragment (T7 Nukleotide 3151-3213):

5' CTAAGTGAAGAGGCACTAAATGAACACGATTAACATCGCTAAGAACGACTTCTCTGACATCG 3'

192er Fragment (T7 Nukleotide 3151-3342):

5' CTAAGTGAAGAGGCACTAAATGAACACGATTAACATCGCTATTCTCTGACATCGAACTGGCTGCTATCCCG
TTCAACACTCTGTTACGGTGAGCGTTTAGCTCGCGAACAGTTGGCCCTTGAGCAACGAGATGGGTGAAGCAC
GCTTCCGCAAGATGTTTGTAGCGTC 3'

VI.6 Nukleotidsequenz der T7-Gen 1,3 TIR-Fragmente

31er Fragment (T7 Nukleotide 6453-6483):

5' TAACCAATAGGAGATAAACATTATGATGAAC 3'

49er Fragment (T7 Nukleotide 6453-6501):

5' TAACCAATAGGAGATAAACATTATGATGAACATTAAGACTAACCCGTTT 3'

175er Fragment (T7 Nukleotide 6453-6627):

5' TAACCAATAGGAGATAAACATTATGATGAACATTAAGACTAACCCGTTTAAAGCCGTGCTTTTCGTAGAGTC
TGCCATTAAGAAGGCTCTGGATAACGCTGGGTATCTTATCGCTGAAATCAAGTACGATGGTGTACGCGGGAA
CATCTGCGTAGACAATACTGCTAACAGTTAC 3'

VI.7 Nukleotidsequenz der T7-Gen 0,3 TIR-Fragmente

28er Fragmente (T7 Nukleotide 906-933):

5' AATAACTGCACGAGGTAACACAAGATGG 3'

40er Fragmente (T7 Nukleotide 906-945):

5' AATAACTGCACGAGGTAACACAAGATGGCTATGTCTAACA 3'

56er Fragmente (T7 Nukleotide 906-961):

5' AATAACTGCACGAGGTAACACAAGATGGCTATGTCTAACATGACTTACAACAACGTTTTCG 3'

VI.8 Nukleotidsequenz der T7-Gen 11 Fragmente

175-Fragment (T7 Nukleotide 24209-24389):

5' TGAAAGGAGGAACTATATGCGCTCATAACGATATGAACGTTGAGACTGCCGCTGAGTTATCAGCTGTGAACGA
CATTCTGGCGTCTATCGGTGAACCTCCGGTATCAACGCTGGAAGGTGACGCTAACGCAGATGCAGCGAACGC
TCGGCGTATTCTCAACAAGATTAACCGACAGATT 3'

213-Fragment (T7 Nukleotide 24177-24389):

5' GGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGAAGAGAGCTGAAAGGAGGAACTATATGCGCTCATAACGATATGAACGT
TGAGACTGCCGCTGAGTTATCAGCTGTGAACGACATTCTGGCGTCTATCGGTGAACCTCCGGTATCAACGCT
GGAAGGTGACGCTAACGCAGATGCAGCGAACGCTCGGCGTATTCTCAACAAGATTAACCGACAGATT 3'

3641-Fragment (T7 Nukleotide 24026-24389):

5' CGCTGCTAGTCCCGAAGAGGCGAGTGTTACTTCAACAGAAAGAAACCTTAACGCCAGCACAGGAGGCCGCACG
CACCCGCGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATA
ACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGAAGAGAGCTGAAAGGAGGAACTATATGCGCTCATAACGAT
ATGAACGTTGAGACTGCCGCTGAGTTATCAGCTGTGAACGACATTCTGGCGTCTATCGGTGAACCTCCGGTA
TCAACGCTGGAAGGTGACGCTAACGCAGATGCAGCGAACGCTCGGCGTATTCTCAACAAGATTAACCGACAG
ATT 3'

364d-Fragment (T7-Nukleotide 24026-24389, 5'-hairpin-Sequenz deletiert):

5' GGGCGCTGCTAGTCCCGAAGAGGCGAGTGTTACTTCAACAGAAGAAACCTTAACGCCAGCACAGGAGGCCGC
ACGCACCCGCGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC
AAGATCTGGGCCAGAGCTGAAAGGAGGAACTATATGCGCTCATACGATATGAACGTTGAGACTGCCGCTGA
GTTATCAGCTGTGAACGACATTCTGGCGTCTATCGGTGAACCTCCGGTATCAACGCTGGAAGGTGACGCTAA
CGCAGATGCAGCGAACGCTCGGCGTATTCTCAACAAGATTAACCGACAGATT 3'

364linv-Fragment (T7-Nukleotide 24026-24389, 5'-hairpin-Sequenz invertiert):

5' GGGCGCTGCTAGTCCCGAAGAGGCGAGTGTTACTTCAACAGAAGAAACCTTAACGCCAGCACAGGAGGCCGC
ACGCACCCGCGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC
ATAAAGATCTGGGGAGTGGTGGGCAAATCTCCGCTGTTCCCCGGGCCCGGGAAGAGAGCTGAAAGGAGGAAC
TATATGCGCTCATACGATATGAACGTTGAGACTGCCGCTGAGTTATCAGCTGTGAACGACATTCTGGCGTCT
ATCGGTGAACCTCCGGTATCAACGCTGGAAGGTGACGCTAACGCAAGATGCAGCGAACGCTCGGCGTATTCT
CAACAAGATTAACCGACAGATT 3'