



BACHELORARBEIT

Frau
Julia Stiehler

**Etablierung eines universellen *in vitro*
Expressionssystems basierend auf einer menschlichen
Zelllinie**

Mittweida, 2011

Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

BACHELORARBEIT

Etablierung eines universellen *in vitro* Expressionssystems basierend auf einer menschlichen Zelllinie

Autor:

Frau Julia Stiehler

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI08w2-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Wünschiers

Zweitprüfer:

Dipl.-Ing. (FH) Feik

Einreichung:

Mittweida, 25.08.2011

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 30.08.2011

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Professor Wünschiers für die Betreuung der Bachelorarbeit und die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Ich möchte mich ebenfalls bei Frau Dipl.-Ing. (FH) Feik bedanken, für die umfangreiche Unterstützung während der Zeit in der Fachgruppe und bei der Anfertigung meiner Bachelorarbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Fachgruppe Biotechnologie der Hochschule Mittweida für die hilfreichen Anregungen und die ständig aufmunternden Worte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich nicht nur finanziell, sondern auch moralisch immer unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben. Weiterhin möchte ich meinen Freund und meiner Schwester für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht danken.

Ein herzlichen Dank auch an alle Beteiligten, für die vielen Stunden Korrekturlesen.

Bibliografische Beschreibung:

Stiehler, Julia: Etablierung eines *in vitro* Expressionssystem basierend auf einer menschlichen Zelllinie. - 2011. – S. 72 – Mittweida, University of Applied Science Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Bachelorarbeit, 2011

Referat:

Die *in vitro* Expression ist ein leistungsfähiges Werkzeug für eine schnelle und effiziente Proteinsynthese außerhalb von lebenden Zellen. Als nützliche Alternative zur herkömmlichen zellbasierten Proteinexpression, können schnell kleine Menge rekombinanter Proteine synthetisiert und für nachfolgende Methoden zur Verfügung gestellt werden. Diese Technologie ist in der Lage die meisten Hindernisse der *in vivo* Proteinsynthese zu bewältigen. Besonders geeignet ist die zellfreie Expression für strukturelle und funktionelle Fragestellungen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein universelles *in vitro* Expressionssystem basierend auf der menschlichen HeLa-Zelllinie etabliert werden. Die Gene für die β -Galactosidase und das Grün fluoreszierende Protein wurden hierfür in den optimierten Expressionsvektor pT7CFE1-CHis integriert. Weiterhin wurde die Inkubationszeit der Translationsreaktion variiert sowie eine zusätzliche Variante mit erneuter Zugabe der Transkriptionslösung untersucht. Mit Hilfe eines Western-Blots, in Kombination mit anschließender Immunodetektion, sollte die β -Galactosidase nachgewiesen werden. Für die Quantifizierung der aktiven β -Galactosidase wurde das Substrat o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid verwendet. Um die transkribierte messenger-Ribonukleinsäure zu untersuchen, wurde weiterhin eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
2 Grundlagen.....	2
2.1 Die <i>in vitro</i> Expression	2
2.2 Das Zelllysate	4
2.3 Der Expressionsvektor pT7CFE1-CHis	5
2.4 Die verwendeten Proteine.....	8
2.4.1 Die β -Galactosidase	8
2.4.2 Das Grün fluoreszierende Protein (GFP)	9
3 Material	11
3.1 Chemikalien und Reagenzien.....	11
3.2 Organismen.....	13
3.3 Plasmide.....	13
3.4 Molekularbiologische Reagenzien	14
3.5 Kits	15
3.6 Puffer	16
3.7 Weitere Materialien	16
3.8 Geräte.....	16
4 Methoden	18
4.1 Herstellung der Expressionsvektoren pT7CFE1-CHis- <i>lacZ</i> und pT7CFE1-CHis- <i>GFP</i> ...	18
4.1.1 Extraktion des Gens.....	18
4.1.2 Integration des Gens in den Expressionsvektor pT7CFE1-CHis.....	20
4.2 <i>In vitro</i> Expression.....	22
4.2.1 Transkription	22
4.2.2 Translation.....	23
4.3 Western Blot und Immunodetektion	26
4.3.1 Herstellung der Kontroll-Proben	26
4.3.2 SDS-PAGE.....	26
4.3.3 Western Blot.....	28

4.3.4	Immunodetektion.....	29
4.4	Quantifizierung der <i>in vitro</i> exprimierten β -Galactosidase mit ONPG	30
4.5	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese für mRNA	32
4.6	Photometrische Bestimmungen	33
5	Ergebnisse	34
5.1	Herstellung der Expressionsvektoren pT7CFE1-CHis- <i>lacZ</i> und pT7CFE1-CHis- <i>GFP</i> ...	34
5.2	<i>In vitro</i> Expression.....	36
5.3	SDS-PAGE und Western Blot.....	37
5.4	Quantifizierung der <i>in vitro</i> exprimierten β -Galactosidase mit ONPG	40
5.5	Bestimmung des Wellenlängen-Spektrums.....	43
5.6	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	44
6	Diskussion	46
6.1	Herstellung der Expressionsvektoren pT7CFE1-CHis- <i>lacZ</i> und pT7CFE1-CHis- <i>GFP</i> ...	46
6.2	<i>In vitro</i> Expression	47
6.3	Fehlerbetrachtung	49
7	Zusammenfassung	51
8	Ausblick.....	53
	Literatur	55
	Anlagen	62
	Anlagen, Teil 1: Sequenz pT7CFE1-CHis-<i>lacZ</i>.....	63
	Anlagen, Teil 2: Sequenz des Kontrollplasmid pCFE-<i>GFP</i>.....	67
	Anlagen, Teil 3: Extinktionswerte der Regressionsgeraden	69
	Selbstständigkeitserklärung	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Expressionsvektor pT7CFE1-CHis [URL-7]	6
Abbildung 2: Dreidimensionales Modell der β -Galactosidase [PDB: 3MUY]	9
Abbildung 3: Dreidimensionales Modell des GFP-Moleküls [PDB: 1GFL]	10
Abbildung 4: Fragmentgrößen der Expressionsvektoren	34
Abbildung 5: GFP-Kontrolle nach 6 h Translation	36
Abbildung 6: Nitrozellulose-Membran.....	37
Abbildung 7: Detektion der β -Galactosidase	38
Abbildung 8: SDS-Gel nach Coomassie G250 Stain Färbung.....	39
Abbildung 9: Regressionsgerade der β -Galactosidase-Aktivität.....	40
Abbildung 10: Bestimmung des Wellenlängen-Spektrums der <i>lacZ</i> - und <i>GFP</i> -Transkription	44
Abbildung 11: Denaturierendes Agarose-Gel	45
Abbildung 12: Schematische Darstellung der pT7CFE1-CHis- <i>lacZ</i> Sequenz.....	48
Abbildung 13: Schematische Darstellung der pCFE- <i>GFP</i> Sequenz	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Extinktionswerte der Translationsreaktionen 41
Tabelle 2: Extinktionswerte der variierten Translation..... 42
Tabelle 3: Extinktionswerte der beiden Kits 43

Abkürzungsverzeichnis

Amp^R	Ampicillinresistenzgen
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
DTT	1,4-Dithiothreitol
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EC	Enzyme Commission
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
GFP	green fluorescent protein (Grün fluoreszierendes Protein)
HeLa	Henrietta Lacks
HRP	horseradisch peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IRES	internal ribosomal entry site (interne ribosomale Eintrittsstelle)
<i>lac</i>	Laktose
LB	lysogeny broth
kbp	Kilobasenpaare
MCS	multiple cloning site (Polylinker)
mRNA	messenger Ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)

NTP	Nukleosidtriphosphat
OD₆₆₀	Optische Dichte bei 660 nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
ori	origin of replication (Replikationsstart)
ORF	open reading frame
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Poly(A)	Poly-Adenosin
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
Sf	<i>Spodoptera frugiperd</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonucleic acid (transfer Ribonukleinsäure)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-galactopyranosid

1 Einleitung

Proteine wie zum Beispiel Enzyme, Antikörper oder Strukturelemente sind von großer Bedeutung. Aufgrund dessen ist es wichtig neue Technologien für eine effiziente und flexible Produktion von Proteinen zu entwickeln. Mit Hilfe der *in vitro* Synthese können Proteine in kurzer Zeit im Labor hergestellt und für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Um Proteine beispielsweise für Analysemethoden zu verwenden, ist die Verfügbarkeit eines korrekt synthetisierten Proteins in angemessener Menge Voraussetzung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein universelles *in vitro* Expressionssystem basierend auf einer menschlichen Zelllinie etabliert werden. Ziel war es die β -Galactosidase, sowie das Grün fluoreszierende Protein (GFP) *in vitro* mit Hilfe des „Human *In Vitro* Protein Expression Kit for DNA Templates“ zu exprimieren. Das verwendete *in vitro* Expressionssystem basiert auf einem Zelllysate der HeLa-Zelllinie in Kombination mit der T7 RNA-Polymerase. Dabei wurden unterschiedliche Inkubationszeiten der Translationsreaktion, sowie die erneute Zugabe der Transkriptionslösung untersucht und miteinander verglichen. Eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion diente als Nachweismethode für die β -Galactosidase. Hierfür wurden der Primärantikörper Anti- β -Galactosidase, sowie der Sekundärantikörper Anti-Maus-HRP eingesetzt. Die β -Galactosidase ist in der Lage das Substrat o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) zu hydrolysieren. Die Menge des umgesetzten Substrates wurde unter Einsatz eines Spektralphotometers quantifiziert. Weiterhin wurde eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese für die Detektion und Untersuchung der transkribierten messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) verwendet.

2 Grundlagen

2.1 Die *in vitro* Expression

Bei der *in vitro* Expression werden Proteine außerhalb einer Zelle zuverlässig und schnell synthetisiert [Elbaz et al., 2004; Swartz, 2003, S. 2]. Diese Methode wird auch zellfreie Proteinexpression genannt, da die Proteinexpression in Zelllysaten statt in Kulturzellen erfolgt [URL-1]. Es konnte bereits eine breite Palette von Proteinen in zellfreien Systemen erfolgreich hergestellt werden [Kalmbach, 2005]. Seit den weichenstellenden Studien von Nirenberg und Matthaei 1961, stellt die *in vitro* Synthese ein nützliches Werkzeug für die schnelle Produktion kleiner Mengen rekombinanter Proteine dar [Katzen et al., 2005; Spirin, 2002; URL-1]. Zu Beginn wurde diese Methode entwickelt, um zu verstehen, wie eine mRNA in eine funktionelle Polypeptid-Kette übersetzt wird [Katzen et al., 2005]. Dieses Expressionsverfahren stellt eine leistungsfähige Alternative zur herkömmlichen Proteinsynthese in Zellkulturen dar und bietet einige interessante sowie hilfreiche Vorteile gegenüber dem zellbasierten *in vivo* System [Elbaz et al., 2004]. So kann die Expression von Proteinen wesentlich schneller durchgeführt werden, als bei der Synthese in Zellkulturen, da beispielsweise die Gen-Transfektion oder eine aufwendige Proteinaufreinigung entfallen [URL-1]. Bei den zentralen Fragestellungen, wie der Proteinfaltung und den posttranslationalen Modifikationen, bietet das zellfreie System wesentliche Vorteile gegenüber einem *in vivo* System, da hier die Bedingungen leicht angepasst werden können. Mit Hilfe dieser Variabilität kann beispielsweise die Proteinfaltung gefördert werden. Mit etablierten Zellextrakten können Proteine effizient synthetisiert werden, die nur begrenzt *in vivo* exprimiert werden können, so beispielsweise auch Proteine, die toxisch auf eine lebende Zelle wirken [Katzen et al., 2005; URL-6].

Für eine Automatisierung und Miniaturisierung ist das Eingreifen in die Reaktionsbedingungen von Bedeutung [Katzen et al., 2005]. Diese Methode ist ein wichtiges Instrument der Molekularbiologie und ermöglicht eine Vielzahl von Möglichkeiten, besonders im Bereich der Proteomics [Applied Biosystems, 2011]. Eine wichtige Anwendung dieser flexiblen Technologie beinhaltet vor allem strukturelle und funktionelle Analysen von Proteinen, wie die

Beobachtungen von Interaktionen zwischen Proteinen und Aminosäuren oder zwischen Proteinen untereinander [Mikami et al., 2008; URL-1]. Ebenso bietet die Nutzung dieses Systems die Untersuchung der Komponenten, die für die Proteinfaltung und -degeneration verantwortlich sind [URL-1]. Eine wesentliche Innovation ist die Möglichkeit modifizierte Proteine, wie beispielsweise mutierte oder verkürzte Polypeptidketten, herzustellen [Qiagen, 2005; URL-1]. Weiterhin können chemisch veränderte, isotoopenmarkierte oder unnatürliche Aminosäuren (AS) verwendet werden, um Proteine für Strukturanalysen zu markieren [Applied Biosystems, 2011; Spirin 2003; Qiagen, 2005]. Zusätzliche Vorzüge gegenüber der *in vivo* Methode, sind zum Beispiel die Verhinderung eines schnellen proteolytischen Abbaus durch intrazelluläre Proteasen, sowie die Verringerung der Entstehung von unbrauchbaren inclusion bodies [Applied Biosystems, 2011; Wink, 2004, S.234]. Weitere wichtige Anwendungsgebiete beinhalten unter anderem Mutationsanalysen, Epitopkartierungen, Ribosomen-Displays und High-Throughput-Screenings [URL-3].

Bei der Wahl des Template kann zwischen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und mRNA gewählt werden [URL-1]. Als DNA-Template kann entweder ein zirkulärer Plasmid oder ein PCR-Fragment (polymerase chain reaction) genutzt werden. Bei der Verwendung von PCR-Produkten als Template sind zeit- und arbeitsintensive Klonierungsschritte nicht erforderlich [Frauenhofer, 2011; Swartz, 2003, S. 2]. Dabei werden in die Matrize alle Elemente, die für eine effiziente Proteinsynthese notwendig sind, eingebracht. Es stellt somit ein interessantes Tool für das Designen von Proteinen dar [Frauenhofer, 2011]. Bei dieser Variante ist auf Grund der Instabilität der linearen Vorlage und durch im Lysat enthaltene Exonukleasen die Effizienz niedriger, als bei der Anwendung von stabileren doppelsträngigen Plasmid-DNA [Kim et al., 2007]. In dieser Arbeit wurde das gewünschte Gen in den optimierten Expressionsvektor pT7CFE1-CHis eingebacht. Näheres zum Vektor ist in einem der nachfolgenden Abschnitte erläutert.

Mit Hilfe des verwendeten „Human *In Vitro* Protein Expression Kit for DNA Templates“ ist eine exakte Protein-Translation und eine effiziente posttranslationale Modifikation möglich [URL-4]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die β -Galactosidase und das Grün fluoreszierende Protein *in vitro* mit Hilfe des Kits exprimiert werden. Die synthetisierten Proteine können für radioaktive und fluoreszierende Untersuchungen, sowie für Analysen mit Antikörpern, wie beispielsweise einer Immunodetektion, eingesetzt werden.

2.2 Das Zelllysate

Das Rohlysate einer geeigneten Quelle beinhaltet viele der Komponenten, die für eine erfolgreiche Transkription sowie der anschließenden Translation erforderlich sind, so zum Beispiel die Ribosomen und weitere notwendigen Faktoren [Katzen et al., 2005]. Das Zellextrakt wird für eine optimale Proteinsynthese mit einem Template, den Nucleosidtriphosphaten (NTP) und einer geeigneten Polymerase ergänzt [Applied Biosystems, 2011; Katzen et al., 2005]. Um die Proteinexpression anzutreiben wird das Translationsgemisch mit einer Energiequelle und den benötigten Grundbausteinen der Peptidkette, den AS versetzt. Es können Zellextrakte von unterschiedlichen Species genutzt werden, um schnell kleine Menge funktionierender Proteine herzustellen [Katzen et al., 2005]. Die Wahl der Lysate-Quelle hängt von der biologischen Natur des Proteins, der Proteinherkunft, der nachfolgenden Anwendung und der verwendeten Template ab [Katzen et al., 2005; URL-1]. Theoretisch kann jeder Organismus als Quelle für ein Proteinexpressions-System dienen. Allerdings werden für die Herstellung von Zelllysaten häufig Systeme genutzt, von denen bekannt ist, dass sie eine hohe Ausbeute bei der Proteinsynthese absichern können [Applied Biosystems, 2011]. Für die Gewinnung eines Lysates werden die Zellmembranen entfernt, damit die Zellorganellen und weiter erforderliche Komponenten aus der Zelle gewonnen werden können [URL-1].

Das erste bekannte Zelllysate wurde aus *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*) hergestellt. Dieses System liefert eine sehr hohe Proteinausbeute und ist relativ tolerant gegenüber der Zugabe von Zusatzstoffen. Allerdings ist die unterschiedliche Codon usage zwischen eukaryontischen und prokaryontischen Zellen ein häufiges Problem. Bei der Expression in einem bakteriellen System werden viele eukaryontischen Proteine außerdem häufig unlöslich [URL-1]. Inzwischen können die erforderlichen Zellextrakte aus Insektenzellen, beispielsweise der Zelllinie *Spodoptera frugiperd* etwa wie Sf9 oder Sf21, aus Säugetierzellen, wie den Hasen-Retikulozyten, aus Weizenkeimen oder auch aus menschlichen Zellen gewonnen werden [Orr et al., 1992; URL-1]. Allerdings sind diese Lysate weniger produktiv, wie das *E.coli*-System [Katzen et al., 2005]. Im Gegensatz zu Extrakten aus *E.coli* oder Weizenkeimen sind bei Zelllysaten aus Insektenzellen und Hasen-Retikulozyten noch endogene genetische Informationen vorhanden, welche während der Synthesereaktion übersetzt werden können [URL-1]. Diese Lysate können mit *Micrococcus*-Nucleasen vorbehandelt werden, um ausschließlich eine Translation von exogen zugeführten Informationen zu gewährleisten.

Anschließend muss das Extrakt mit RNase-Inhibitoren versetzt werden, um einen Abbau der gewünschten mRNA zu verhindern [URL-1].

Mit der Wahl eines geeigneten Zellextraktes können Säugetierproteine mit dazugehöriger Glykosylierung und arteigener posttranslationalen Modifikation synthetisiert werden [URL-1]. Eine *in vitro* Synthese von Membranproteinen, welche sich korrekt in einer Lipid-Doppelschicht falten, ist ebenso möglich. Bei einer *in vivo* Überexpression von Membranproteinen kommt es neben der Zelltoxizität aufgrund der Hydrophobie, auch zur Entstehung von Protein-Aggregaten, Fehlfaltungen und einer geringeren Ausbeute. Zellfreie Systeme sind in der Lage fast alle diese Hindernisse zu überwinden [Katzen et al, 2005]. Zelllysate, die auf *E.coli*, Hasen-Retikulozyten und Weizenkeimen basieren, sind begrenzt in ihrer Fähigkeit menschliche Proteine vollständig mit ihrer posttranslationalen Modifikation zu synthetisieren, welche die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Proteinen beeinflussen und häufig von essentieller Bedeutung für deren Funktionalität sind [Frauenhofer, 2011].

Das in dieser Arbeit verwendete Extrakt basiert auf der HeLa-Zelllinie (Henrietta Lacks). Sie ist die erste unsterbliche menschliche Zelllinie und ermöglicht co- und posttranslationale Modifikationen [URL-1; URL-11]. Dieses Lysat bietet höhere Proteinausbeuten, als es bei anderen Systemen der Fall ist [URL-1]. Es können unter anderem Phosphoproteine, Glykoproteine und Membranproteine mit Hilfe dieses Systems hergestellt werden [URL-4]. Das HeLa-Zellextrakt enthält die benötigten Ribosome, Initiierungs- und Elongationsfaktoren, sowie tRNAs und weitere grundlegende Komponenten [URL-5]. Für eine erfolgreiche Translation muss das Lysat zusätzlich mit den akzessorischen Proteinen, dem benötigten ATP (Adenosintriphosphat) und einem Energieregenerierungs-System ergänzt werden [URL-4]. Mit diesem Lysat können Proteine aus unterschiedlichen Organismen ohne eine Akkumulation von inhibierenden Nebenprodukten synthetisiert werden [URL-4; URL-5]. Es können Gene aus prokaryontischen und eukaryontischen Quellen eingesetzt werden [URL-5].

2.3 Der Expressionsvektor pT7CFE1-CHis

In dieser Arbeit wurde der Expressionsvektor pT7CFE1-CHis verwendet (siehe Abbildung 1), in welchem das Gen für das Zielprotein eingefügt wurde. Upstream der Gensequenz muss sich

eine Promotorsequenz, an welche die RNA-Polymerase binden kann, befinden [Graw, 2010, S.66; URL-1]. Die RNA-Polymerase kann von Bakterien, Eukaryoten oder auch aus Bakteriophagen stammen [URL-1]. Für die *in vitro* Expression sind besonders RNA-Polymerasen aus Phagen geeignet und werden in Kombination mit eukaryontischen oder prokaryontischen Zelllysaten verwendet [Applied Biosystems, 2011]. Phagen-Polymerasen sind meist Monomere und gewährleisten eine hohe Effizienz [URL-2]. Des Weiteren sind sie für eine schnelle, sowie repetitive Transkription geeignet und benötigen keine zusätzlichen Proteinfaktoren für eine effiziente Übertragung der genetischen Information [URL-1; URL-2]. In dieser Arbeit wurde die T7 RNA-Polymerase aus der gleichnamigen Bakteriophage verwendet. Neben dieser stehen noch weitere zur Auswahl, wie die T3 und die SP6 RNA-Polymerase. Sie unterscheiden sich in der zu erkennenden Promotorsequenz.

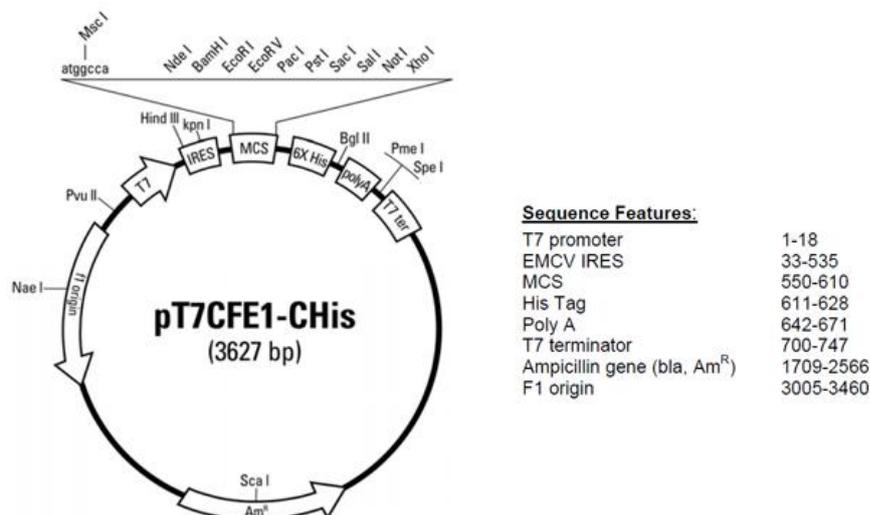


Abbildung 1: Der Expressionsvektor pT7CFE1-CHis [URL-7]

Der Expressionsvektor besitzt einen T7 RNA-Promotor, die Interne-ribosomale-Eintrittsstelle (IRES), die multiple cloning site (MCS), in welche das Gen kloniert wird, eine Hexa-Histidin-Tag Sequenz, eine codierende Sequenz für den poly-Adenosin-Schwanz, den T7 Terminator, das Ampicillinresistenzgen und den f1 origin [URL-2].

In Eukaryoten wird eine posttranskriptionelle Verarbeitung der mRNA unter anderem für eine effiziente Translation benötigt. So wird in einem eukaryontischen *in vivo* System eine Kappen-Struktur am 5'-Ende der pre-mRNA angebracht, um diese vor dem Abbau durch Exonukleasen zu schützen. Bei der *in vitro* Expression können hierfür Sequenzelemente für ähnliche Modifikationen in den Ausgangsvektor aufgenommen werden. In dem verwendeten System

wird die Anlagerung eines Poly-Adenosin-Schwanzes (Poly(A)-tail) durch die Transkription einer entsprechenden Sequenz downstream der multiple cloning site bewirkt. Diese Veränderungen bewirken eine signifikante Erhöhung der Stabilität der mRNA durch Schutz vor einem enzymatischen Abbau, sowie eine Effizienzsteigerung der nachfolgenden Translation [URL-1; URL-2]. Desweiteren wird das IRES-Element genutzt, um eine hohe Ausbeute bei der Synthesereaktion zu garantieren [URL-1]. Dieses IRES-Element stammt aus dem Encephalomyocarditis-Virus (EMCV). Die besondere Sekundärstruktur des transkribierten IRES-Elements verstärkt die Bindung zwischen Ribosom und mRNA [URL-2].

Ein weiteres wichtiges Element ist die MCS, auch Polylinker genannt. Diese Sequenz wird künstlich erzeugt und enthält die Schnittstellen für mehrere, einmalig im Vektor vorkommende, Restriktionsendonukleasen [Clark et al., 2009, S. 675; URI-2]. In die MCS können komplementäre DNA-Fragmente (cDNA), open reading frames (ORFs), oder PCR-Produkte eingebacht werden [URL-7]. Mit Hilfe von passenden Restriktionsenzymen werden sticky ends geschaffen, welche komplementär zum gewünschten Gen-Fragment sind. Mit Hilfe einer Ligase kann anschließend das Gen in den Expressionsvektor pT7CFE1-CHis integriert werden.

Weiterhin besitzt der verwendete Expressionsvektor einen c-terminalen Hexa-Histidin-Tag. Dieser Histidin-Tag wird an das synthetisierte Protein fusioniert und ermöglicht somit eine einfache Aufreinigung und Detektion [Clark et al., 2009, S.669; URL-2]. Die sechs Histidine bilden einen Komplex mit zweiwertigen Metallionen, wie zum Beispiel Nickel, Kobalt und Kupfer [URL-6]. Mit Hilfe der Affinitätschromatographie können so die produzierten Proteine einfach isoliert werden. Zusätzlich können anstelle von proteinspezifischen Antikörpern Anti-His-Tag Antikörper eingesetzt werden, um die Proteine zu detektieren. Weiterhin kann ein ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) oder eine Western-Blot-Detektion mit Hilfe der Nickel-Chelat-Meerrettichperoxidase durchgeführt werden, welche eine Erkennung von His-markierten Proteinen ohne Antikörper ermöglicht. Mit einem metallbasierten Fluoreszenzfarbstoff können Proteine mit His-Tag in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) detektiert werden [URL-6].

Eine entsprechende Sequenz für die Termination markiert das Ende des zu transkribierenden Gens [URL-2]. Der Expressionsvektor besitzt zusätzlich noch das Ampicillinresistenzgen (Amp^R),

welches für die β -Lactamase codiert. Dieses Gen dient als Selektionsmarker. Das Enzym β -Lactamase hydrolysiert die β -Lactam-Ringe und macht somit zum Beispiel im Medium befindliches Ampicillin unschädlich [Theuretzbacher, 1998; URL-12]. Weiterhin besitzt der Vektor einen Replikationsstart, kurz ori (origin of replication) genannt, welcher die Replikation des Vektors im Bakterium gewährleistet [Mühlhardt, 2009, S. 152; Wink, 2004, S. 163].

2.4 Die verwendeten Proteine

2.4.1 Die β -Galactosidase

Die β -Galactosidase, auch β -D-Galactosid-Galactohydrolase genannt, gehört zur Klasse der hydrolytischen Enzyme [Anema, 1964]. Das Enzym mit der EC-Nummer (Enzyme Commission) 3.2.1.23 katalysiert die Spaltung von β -Galactosiden in Monosaccharide [Katrolia et al., 2011; Matthews, 2005]. Es besteht aus vier identischen 1023 Aminosäure langen Ketten und bildet somit ein Tetramer (siehe Abbildung 2) [Matthews, 2005]. Dieses Enzym wird von einigen Prokaryonten, wie zum Beispiel *E. coli* und *Lactobacillus bulgaricus*, sowie eukaryontischen Mikroorganismen, wie Pilzen synthetisiert. In Säugetieren wird die β -Galactosidase beispielsweise in den Milchdrüsen produziert [Darmstadt, 2005]. Als Strukturgen ist es Teil des *lac*-Operons (Laktose) und für die Spaltung des Disaccharids Laktose in Galactose und Glucose verantwortlich [Clark et al., 2009, S. 39]. Die β -Galactosidase wird durch das Gen *lacZ* codiert [Clark et al., 2009 S. 673]. Das Enzym wird industriell genutzt, um auch hier Laktose in Milch und Molke zu spalten und somit die Süßkraft sowie die Säurebildung zu steigern. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit in der Lebensmittelindustrie ist die Herstellung von Laktosesirup [Darmstadt, 2005]. Seine Galaktosyltransferase-Aktivität synthetisiert transgalactosylierte Oligosaccharide, welche als funktionelle Lebensmittel dienen [Cruz et al., 1999]. Häufig wird die β -Galactosidase als Reporter gen eingesetzt, da es leicht gemessen werden kann [Clark et al., 2009 S. 673; Schenkel, 2006].

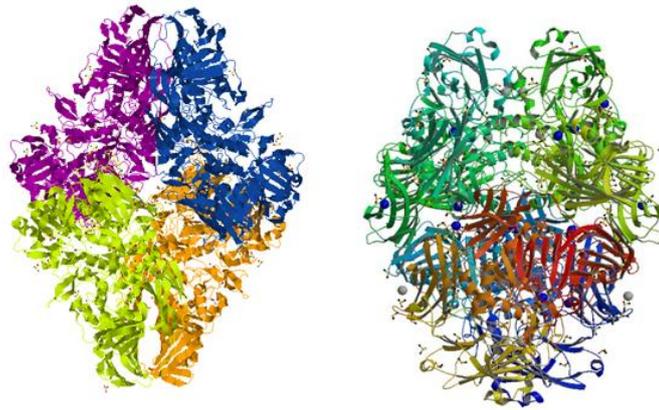


Abbildung 2: Dreidimensionales Modell der β -Galactosidase [PDB: 3MUY]

In der linken Abbildung sind die 4 Domänen der β -Galactosidase dargestellt.

2.4.2 Das Grün fluoreszierende Protein (GFP)

Das Grün fluoreszierende Protein (green fluorescent protein, GFP), wurde zuerst 1961 zufällig in der Qualle *Aequorea victoria* von Osamu Shimomura und Frank Johnson entdeckt [Chalfie et al., 2006; Swatz, 2003, S. 90]. Das GFP dient in den verschiedenen Organismen als ein Akzeptor für den Energie-Transfer. Die Energie stammt, je nach Lebewesen, entweder von einem Luciferase-Oxyluciferin-Komplex oder einem Ca^{2+} -aktivierten Photoprotein. Das nichtkatalytische GFP der Qualle ist sehr stabil, wahrscheinlich aufgrund der kompakten Struktur und denaturiert nur unter sehr harten Bedingungen [Cody et al., 1993; URL-16]. Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren. Es ist in der Lage die blaue Chemilumineszenz, ausgelöst durch Calciumionen, des Photoproteins Aequorin in eine grüne Lichtemission zu verwandeln [Clark et al., 2009, S. 657; Kolb et al., 1996]. Für diese Lichtemission benötigt es kein Substrat oder zusätzliche Cofaktoren [Mühlhardt, 2009]. Die Fluoreszenz des GFPs geht von einem internen Chromophor aus, welches in der Aminosäure-Sequenz kodiert ist und autokatalytisch gebildet wird (siehe Abbildung 3) [Kolb et al., 1996; Swartz, 2003, S. 90]. Die Formation des Chromophor beginnt durch einen Ringschluss, auch Zyklisierung genannt, der Aminosäure-Reste Serin65, Tyrosin66 und Glycin67 der Polypeptidkette [Kolb et al., 1996]. Diese werden dabei in unmittelbare Nähe gebracht [URL-16]. Anschließend wird die Hydroxybenzyl-Seitenkette des Tyrosin66 unter Einfluss von Luftsauerstoff oxidiert [Kolb et al., 1996].

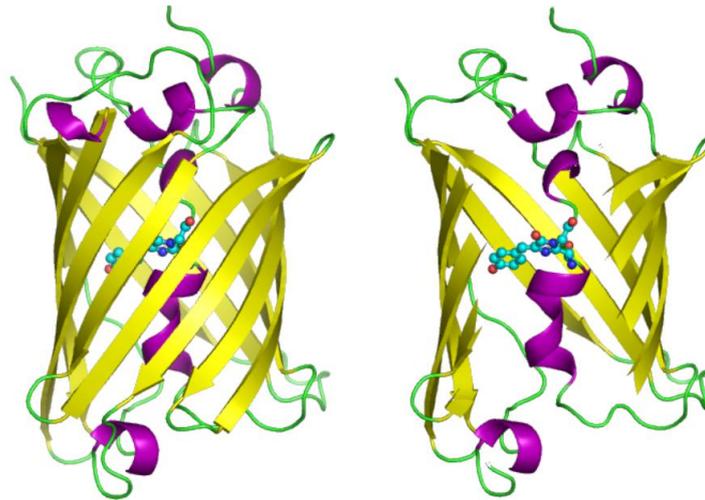


Abbildung 3: Dreidimensionales Modell des GFP-Moleküls [PDB: 1GFL]

Das β -barrel ist gelb eingezeichnet, die α -Helix ist lila dargestellt und das Chromophor ist als Kugel-Stab-Modell hervorgehoben. In der rechten Abbildung wurde ein Teil des β -barrel entfernt, um das Chromophor besser darzustellen.

Es entsteht ein 4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidin-5-on, ein sechsgliedriges Chromopeptid [Kolb et al., 1996; Tsien, 1998]. Das GFP besteht aus elf β -Faltblättern, welche ein barrel bilden. Durch dieses Fass verläuft eine α -Helix, mit welcher das Chromophor verbunden ist [Tsien, 1998]. Es besitzt zwei Absorptionsmaxima aufgrund der unterschiedlichen Formationen des Tyrosin66 und nur ein Emissionsmaximum [URL-16]. Das *Aequorea* GFP absorbiert Licht bei maximal 395 nm, sowie 470 nm und das Fluoreszenz-Emissions-Spektrum zeigt einen Peak bei 509 nm [Swartz, 2003, S. 90; URL-16]. Es ist eines der am häufigsten untersuchten und genutzten Proteine [Tsien, 1998]. Eine zellfreie Synthese ist unter anderem für eine Analyse der GFP-Formation geeignet [Kolb et al., 1996]. GFP wurde bereits in einer Vielzahl von Organismen *in vivo* synthetisiert. Häufig wird das GFP als Fusionsprotein mit anderen Proteinen verwendet, um zum Beispiel Proteine in lebenden Zellen zu lokalisieren, dabei verliert es nicht an Fluoreszenz [Mühlhardt, 2009; URL-16]. Durch die Kopplung an eine Signalpeptidsequenz ist es auch für die Visualisierung von Zellkomponenten geeignet [URL-15].

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Agarose, Certified Molecular Biology ($C_{12}H_{18}O_9$)

Bio-Rad Laboratories Inc., München

Ampicillin Natriumsalz ($C_6H_{18}N_3NaO_4S$, 99 %)

Carl Roth®, Karlsruhe

Ammoniumperoxidisulfat (APS, $H_8N_2O_8S_2$, >98 %)

Merck, Darmstadt

L-Arabinose ($C_5H_{10}O_5$, >99 %)

Carl Roth®, Karlsruhe

5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal, $C_{14}H_{15}BrClNO_6$, >99 %)

Carl Roth®, Karlsruhe

Coomassie G250 Stain, BioSafe™ ($C_{47}H_{48}N_9NaO_7S_2$)

Bio-Rad Laboratories Inc., München

Glycin ($C_2H_5NO_2$, >99 %)

Carl Roth®, Karlsruhe

Hefeextrakt

Carl Roth®, Karlsruhe

Isopropanol (C_3H_8O)

Merck, Darmstadt

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, $C_9H_{18}O_5S$, ≥ 99 %)

neoLab®, Heidelberg

Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$)

Carl Roth®, Karlsruhe

2-Mercaptoethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, 99 %)

Carl Roth®, Karlsruhe

Methanol (CH_3OH , rein)

VEB Laborchemie Apolda GmbH, Apolda

Milchpulver, Blotting grade

Carl Roth®, Karlsruhe

Di-Natriumcarbonat, wasserfrei (Na_2CO_3 , $>99,5\%$)

Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl , $>99,5\%$, p.a., ACS, ISO)

Carl Roth®, Karlsruhe

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $< 99,5\%$)

Sigma-Aldrich®, Taufkirchen

Natriumdodecylsulfat (SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$, 99 %)

Sigma-Aldrich®, Taufkirchen

Di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei (Na_2HPO_4 , $>99\%$, z.A.)

Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid (NaOH , $>99\%$, p.a., ISO)

Carl Roth®, Karlsruhe

o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG, $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_8$)

Carl Roth®, Karlsruhe

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Bio-Rad Laboratories Inc., München

Ponceau S ($\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}_4$)

Applichem, Darmstadt

Rotiphorese-Gel 30 (37,5 : 1)

Carl Roth®, Karlsruhe

Salzsäure rauchend (HCl, 37 %, z.A.)

Merk, Darmstadt

SYBR® Safe

Invitrogen™, Karlsruhe

Tetramethylethyldiamin (TEMED, C₆H₁₆N₂, >99 %)

Carl Roth®, Karlsruhe

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, C₄H₁₁NO₃, >99,9 %, p.a.)

Carl Roth®, Karlsruhe

Triton X-100, reinst (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n)

Carl Roth®, Karlsruhe

Trypton/Pepton aus Casein

Carl Roth®, Karlsruhe

Tween® 20

Bio-Rad Laboratories Inc., München

3.2 Organismen

E.coli K12 JM109 Competent Cells, >10⁸cfu/μg

Promega, Madison

3.3 Plasmide

pUCD-*lacZ*

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

pGLO

Bio-Rad Laboratories Inc., München

3.4 Molekularbiologische Reagenzien

Antikörper

Anti- β -Galactosidase (40-1a)

Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz

Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody

Cell Signaling Technology®, Danvers

Enzyme

Restriktionsenzym *Bam*HI_{HF} [20000 U/ml]

New England Biolabs® Inc., Ipswich

Restriktionsenzym *Eco*RI_{HF} [10000 U/ml]

New England Biolabs® Inc., Ipswich

Restriktionsenzym *Eco*RV [10000 U/ml]

New England Biolabs® Inc., Ipswich

Restriktionsenzym *Sa*I_{HF} [20000 U/ml]

New England Biolabs® Inc., Ipswich

T4 DNA-Ligase [1000 U/ml]

New England Biolabs® Inc., Ipswich

β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*

Sigma-Aldrich®, Taufkirchen

Marker

0,5-10 kb RNA-Ladder

Invitrogen™, Karlsruhe

Quick Load 1 kbp DNA-Ladder

New England Biolabs® Inc., Ipswich

Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard

Bio-Rad Laboratories Inc., München

3.5 Kits

Human *In Vitro* Protein Expression Kit for DNA Templates

Thermo Scientific Inc., Waltham

GeneJET™ Gel Extraction Kit

Fermentas-Life Sciences, St. Leon-Rot

GeneJET™ RNA Purification Kit

Fermentas-Life Sciences, St. Leon-Rot

HRP Conjugate Substrate Kit

Bio-Rad Laboratories Inc., München

PureYield™ Plasmid Midiprep System

Promega, Madison

SurePrep™ TrueTotal™ RNA Purification Kit

Fisher BioReagents®, Waltham

3.6 Puffer

Laemmli-Probenpuffer

Bio-Rad Laboratories Inc., München

Ligasepuffer

New England Biolabs® Inc., Ipswich

New England Biolab-Puffer 4 (NEB-Puffer 4)

New England Biolabs® Inc., Ipswich

Nucleic Acid Sample Loading Buffer

Bio-Rad Laboratories Inc., München

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

Bio-Rad Laboratories Inc., München

3.7 Weitere Materialien

Glass Plates Mini-PROTEAN® 3 System

Bio-Rad Laboratories Inc., München

Nitrocellulose and Blotting Filter Paper

Bio-Rad Laboratories Inc., München

3.8 Geräte

NanoVue™

General Electric, München

Cadas 200

Dr. Bruno Lange GmbH & Co. KG, Düsseldorf

Mini-Sub® Cell GT electrophoresis chamber

Bio-Rad Laboratories Inc., München

Mini-PROTEAN® Tetra Cell

Bio-Rad Laboratories Inc., München

Mini-TransBlot® Cell

Bio-Rad Laboratories Inc., München

Axiovert 200 M

Carl Zeiss, Jena

Filter-Set 09

Carl Zeiss, Jena

BioView UVLight, USDT-20ML-BE Wavelength 312-365nm

biostep® GmbH, Jahnsdorf

Dunkelhaube: DH-30/32

biostep® GmbH, Jahnsdorf

4 Methoden

4.1 Herstellung der Expressionsvektoren pT7CFE1-CHis-*lacZ* und pT7CFE1-CHis-*GFP*

Um die β -Galactosidase beziehungsweise das GFP *in vitro* mit Hilfe des „Human *In Vitro* Protein Expression Kits for DNA Templates“ zu exprimieren, müssen die dafür codierende Gene in den Expressionsvektor pT7CFE1-CHis integriert werden.

4.1.1 Extraktion des Gens

Das benötigte *lacZ*-Gen wurde aus dem pUCD-*lacZ* Plasmid und das *GFP*-Gen aus dem Vektor pGLO gewonnen. Um eine ausreichende Plasmid-Menge zu erhalten, wurden je 100 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* K12 JM109 mit dem entsprechenden Ausgangs-Plasmid hergestellt. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Unter Verwendung der PureYield™ Plasmid Midiprep wurden die Plasmide aus den Bakterienzellen isoliert. Das pUCD-*lacZ* Plasmid wurde zusammen mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen in einem 25 μ l Ansatz für 8 h bei 37 °C inkubiert, während das pGLO Plasmid für 20 min bei 37 °C inkubiert wurde. Der Expressionsvektor pT7CFE1-CHis wurde ebenfalls bei entsprechenden Bedingungen mit den jeweiligen Restriktionsenzymen inkubiert. Die entstandenen Fragmente wurden in einem 1 %-igem Agarose-TAE-Gel, gefärbt mit SYBR® Safe, elektrophoretisch der Größe nach getrennt. Je 20 μ l Restriktionsansatz wurden mit 1 μ l Nukleinsäure-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel geladen. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden 10 μ l des 1 kbp DNA-Ladders mitgeführt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 100 V für 45 min, konnten die Fragmente durch das Gel wandern. Die entstandenen Gele konnten unter dem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 312 nm ausgewertet werden. Die geschnittenen DNA-Fragmente und der linearisierte pT7CFE1-CHis Vektor wurden unter Einsatz des GeneJET™ Gel Extraction Kits aus dem Agarose-Gel extrahiert.

Medium für die Übernachtskultur von *E.coli* K12 JM109 pUCD-*lacZ*

LB/IPTG/X-Gal/Ampicillin	Trypton	0,1 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,05 % (w/v)
	NaCl	0,1 % (w/v)
	Ampicillin	0,005 % (w/v)
	X-Gal	0,004 % (w/v)
	IPTG	0,002 % (w/v)
	pH 7,0 (NaOH)	

Medium für die Übernachtskultur von *E.coli* K12 JM109 pGLO

LB /Ampicillin/L-Arabinose	Trypton	0,1 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,05 % (w/v)
	NaCl	0,1 % (w/v)
	Ampicillin	0,005 % (v/v)
	L-Arabinose	0,025 % (v/v)
	pH 7,0 (NaOH)	

Zusammensetzungen der Restriktionsansätze

pUCD- <i>lacZ</i> , <i>Sall</i> _{HF} , <i>Bam</i> HI _{HF}	pUCD- <i>lacZ</i>	80 ng/μl
	<i>Sall</i> _{HF} [20.000 U/ml]	1,6 U/μl
	<i>Bam</i> HI _{HF} [20.000 U/ml]	1,6 U/μl
	NEB-Puffer 4 [10 x]	1 x

pGLO, <i>EcoRI</i> _{HF} , <i>EcoRV</i>	pGLO	60 ng/μl
	<i>EcoRI</i> _{HF} [10.000 U/ml]	0,6 U/μl
	<i>EcoRV</i> [10.000 U/ml]	1,2 U/μl
	NEB-Puffer 4 [10 x]	1 x
	BSA [1 mg/ml]	100 μg/ml
pT7CFE1-CHis, <i>Sall</i> _{HF} , <i>BamHI</i> _{HF}	pT7CFE1-CHis	80 ng/μl
	<i>Sall</i> _{HF} [20.000 U/ml]	1,6 U/μl
	<i>BamHI</i> _{HF} [20.000 U/ml]	1,6 U/μl
	NEB-Puffer 4 [10 x]	1 x
pT7CFE1-CHis, <i>EcoRI</i> _{HF} , <i>EcoRV</i>	pT7CFE1-CHis	80 ng/μl
	<i>EcoRI</i> _{HF} [10.000 U/ml]	0,8 U/μl
	<i>EcoRV</i> [10.000 U/ml]	1,6 U/μl
	NEB-Puffer 4 [10 x]	1 x
	BSA [1 mg/ml]	100 μg/ml

Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gel, 1 % (w/v)	Agarose	1 % (w/v)
	1x TAE-Puffer	30 ml
	SYBR® Safe [10000 x]	1 x

4.1.2 Integration des Gens in den Expressionsvektor pT7CFE1-CHis

Das aus dem Gel extrahierte *lacZ*-Gen wurde zusammen mit dem für 20 min bei 65 °C inaktivierten Restriktionsansatz des pT7CFE1-CHis Expressionsvektors inkubiert. Für die Ligation des *GFP*-Gens wurden zwei Varianten durchgeführt. Zum einen wurde das extrahierte

Gen mit dem zuvor entsprechend inaktivierten Restriktionsansatz pT7CFE1-CHis inkubiert. Bei der zweiten Variante wurde sowohl das *GFP*-Gen, als auch der pT7CFE1-CHis Vektor aus dem Gel extrahiert. Beide Fragmente wurden anschließend für die Ligation miteinander inkubiert. Je 30 µl der Ligationsansätze wurden über Nacht in einem Eisbad aufbewahrt.

Um die rekombinanten Vektoren pT7CFE1-CHis-*lacZ* und pT7CFE1-CHis-*GFP* zu vervielfältigen, wurden diese in chemisch kompetente *E.coli* JM109 Zellen transformiert. Hierfür wurden je 30 µl Ligationsansatz zu 100 µl kompetenten Bakterienzellen gegeben. Nach vorsichtigem Vermischen der Ansätze wurden diese für 10 min auf Eis gelagert, damit sich die Plasmid-DNA auf der bakteriellen Zellmembran anlagern konnte. Für das Einschleusen der DNA in die Bakterienzelle wurden die Transformationsansätze für exakt 1 min bei 42 °C erwärmt. Mit Hilfe des Hitzeschocks entstehen kleine Poren in den Zellwänden der Bakterien. Durch diese gelangen die Plasmide in das Zellinnere. Die Suspensionen wurden anschließend für 15 min auf Eis gelagert. Die Ansätze wurden mit 500 µl LB-Medium versetzt und bei 37 °C für 90 min inkubiert.

Um die erfolgreich transformierten Bakterienzellen zu selektieren, wurden je 100 µl der Transformationsansätze und einer 1:100 Verdünnung mit LB-Medium auf entsprechenden Selektionsmedien (siehe 4.1.1) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert. Für die Plasmidpräparation der rekombinanten Expressionsvektoren mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, wurden je 5 ml einer Übernachtskultur verwendet. Für diese Bakterienkulturen wurde jeweils eine erfolgreich transformierte Kolonie von einer Transformationsplatte gepickt und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm inkubiert.

Zusammensetzungen für die Ligationen

<i>lacZ</i> -Gen	pT7CFE1-CHis	2,67 ng/µl
	<i>lacZ</i> -Gen	7,253 ng/µl
	T4 DNA-Ligase [1000 U/ml]	0,1 U/µl
	Ligasepuffer [10 x]	1 x

<i>GFP</i> -Gen	pT7CFE1-CHis	2,67 ng/ μ l
	<i>GFP</i> -Gen	7,93 ng/ μ l
	T4 DNA-Ligase [1000 U/ml]	0,1 U/ μ l
	Ligasepuffer [10 x]	1 x

4.2 *In vitro* Expression

Die β -Galactosidase und das GFP sollten mit dem „Human *In Vitro* Protein Expression Kit for DNA Templates“ exprimiert werden. Dafür wurde im Abschnitt 4.1 das entsprechende Gen in den mitgelieferten Expressionsvektor pT7CFE1-CHis integriert. Als Positiv-Kontrolle dient das pCFE-*GFP* Plasmid aus dem Kit. Es wurden jeweils zwei Kits verwendet.

4.2.1 Transkription

Zunächst wurde der pT7CFE1-CHis-*lacZ* Vektor für die Expression eingesetzt. Alle Komponenten des Kits wurden auf Eis aufgetaut und in angegebener Reihenfolge bei Raumtemperatur in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Das Gesamtvolumen betrug jeweils 20 μ l. Die Transkriptions-Lösungen wurden vorsichtig vermischt und für 80 min bei 32 °C inkubiert.

Zusammensetzungen der Transkriptions-Reaktionen

<i>GFP</i> -Transkription	nuklease-freies Wasser	40 % (v/v)
	Transkriptionspuffer [5 x]	1 x
	NTP-Mix	20 % (v/v)
	pCFE- <i>GFP</i> [0,5 μ g/ μ l]	10 % (v/v)
	T7 RNA-Polymerase	10 % (v/v)

<i>lacZ</i> -Transkription	nuklease-freies Wasser	37,5 % (v/v)
	Transkriptionspuffer [5 x]	1 x
	NTP-Mix	20 % (v/v)
	pT7CFE1-CHis- <i>lacZ</i>	
	[411,16 ng/ μ l]	12,5 % (v/v)
	T7 RNA-Polymerase	10 % (v/v)
Wasser-Kontrolle	nuklease-freies Wasser	50 % (v/v)
	Transkriptionspuffer [5 x]	1 x
	NTP-Mix	20 % (v/v)
	T7 RNA-Polymerase	10 % (v/v)

4.2.2 Translation

Die Reagenzien für die Translation wurden auf Eis aufgetaut und in angegebener Reihenfolge auf Eis pipettiert. Das Endvolumen betrug je 25 μ l. Das Lysat wurde zusammen mit den akzessorischen Proteinen für 5 min inkubiert, bevor die weiteren Komponenten hinzugegeben wurden. Die Translations-Gemische wurden vorsichtig vermischt. Es wurden je zwei Inkubationszeiten getestet. Zum einen wurden die Proben bei 30 °C für 90 min sowie bei der maximalen Inkubationszeit von 6 h inkubiert. Zusätzlich wurde ein Versuch mit erneuter Zugabe von 2 μ l Translationslösung nach 2 h durchgeführt. Diese Proben wurden anschließend weitere 4 h inkubiert. Von der GFP-Translation wurden 2 μ l auf einen Objektträger gegeben und nach 20 min unter dem Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 200 M mit Hilfe des Filter-Sets 09 der Firma Carl Zeiss sichtbar gemacht, da sich nach einigen Minuten die Intensität des Fluoreszenzsignals verstärkte. Als Parameter wurden eine Belichtung von 1 s, eine 1,2-fache Steigerung und ein mittlerer Kontrast eingestellt. Alle Translations-Reaktionen wurden

anschließend bei 4 °C aufbewahrt, um eine vollständige Faltung des GFP-Chromophors zu gewährleisten.

Zusammensetzungen der Translations-Reaktionen

GFP-Translation	Lysat	50 % (v/v)
	akzessorische Proteine	10 % (v/v)
	nuklease-freies Wasser	15 % (v/v)
	Salzlösung A	4 % (v/v)
	AS-Mix minus Methionin	2 % (v/v)
	AS-Mix minus Leucin	2 % (v/v)
	RNase-Inhibitor	4 % (v/v)
	Energie-Mix	5 % (v/v)
	<i>GFP</i> -Transkription	8 % (v/v)
β-Galactosidase Translation	Lysat	50 % (v/v)
	akzessorische Proteine	10 % (v/v)
	nuklease-freies Wasser	15 % (v/v)
	Salzlösung A	4 % (v/v)
	AS-Mix minus Methionin	2 % (v/v)
	AS-Mix minus Leucin	2 % (v/v)
	RNase-Inhibitor	4 % (v/v)
	Energie-Mix	5 % (v/v)

	<i>lacZ</i> -Transkription	8 % (v/v)
Wasser-Kontrolle	Lysat	50 % (v/v)
	akzessorische Proteine	10 % (v/v)
	nuklease-freies Wasser	15 % (v/v)
	Salzlösung A	4 % (v/v)
	AS-Mix minus Methionin	2 % (v/v)
	AS-Mix minus Leucin	2 % (v/v)
	RNase-Inhibitor	4 % (v/v)
	Energie-Mix	5 % (v/v)
	Wasser-Kontrolle Transkription	8 % (v/v)
Negativ-Kontrolle	Lysat	50 % (v/v)
	akzessorische Proteine	10 % (v/v)
	nuklease-freies Wasser	23 % (v/v)
	Salzlösung A	4 % (v/v)
	AS-Mix minus Methionin	2 % (v/v)
	AS-Mix minus Leucin	2 % (v/v)
	RNase-Inhibitor	4 % (v/v)
	Energie-Mix	5 % (v/v)

4.3 Western Blot und Immunodetektion

Für den Nachweis der *in vitro* exprimierten β -Galactosidase diente der Western Blot mit anschließender Immunodetektion. Hierfür wurden die Proteine die sich in der Translationsreaktion befanden, anhand ihres Molekulargewichts in einer diskontinuierlichen denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Auf dieser soll die exprimierte β -Galactosidase mit Hilfe der Antikörper Anti- β -Galactosidase und Anti-Maus-HRP (horseradish peroxidase) detektiert werden.

4.3.1 Herstellung der Kontroll-Proben

Als Positiv-Kontrolle diente ein erfolgreich ligierter Transformant. Hierfür wurde eine 1 ml *E.coli* K12 JM109 pT7CFE1-CHis-*lacZ* Übernachtskultur (inkubiert bei 37 °C, sowie 300 rpm) hergestellt, welche anschließend in 50 ml LB/IPTG/X-Gal/Amp-Medium (siehe 4.1.1) pipettiert und bis zu einer OD₆₆₀ von 0,6 bei 37 °C und 120 rpm inkubiert wurde. Davon wurden 3 ml für 5 min bei 5000 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 μ l Laemmli-Puffer resuspendiert und anschließend für 20 min bei 50 °C erwärmt. Diese Herstellungsmethode wurde bereits mit einer anderen Variante, bei der zusätzlich 1 x PBS eingesetzt wurde, verglichen. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Zellysate aus einem *E.coli* K12 JM109 Stamm (D (lac-proAB)) entsprechend hergestellt.

4.3.2 SDS-PAGE

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE wurden 6 ml 8 %-iges SDS-Trenngel hergestellt. Nach Einfüllen des SDS-Trenngels zwischen den Glasplatten wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, um eine luftblasenfreie und glatte Oberfläche zu schaffen. Nach dem Auspolarisieren des Gels wurde das Isopropanol verworfen. Anschließend wurden 2,9 ml des 5 %-ige SDS-Sammelgels zwischen die Glasplatten pipettiert. Als Laufpuffer wurde ein einfach konzentrierter Tris/Glycin/SDS-Laufpuffer verwendet. Um festzustellen, welche Menge für den visuellen Nachweis der β -Galactosidase ausreichend ist, wurden 5 μ l, 10 μ l und 15 μ l der β -Galactosidase Translationslösung eingesetzt. Die Proben wurden mit 100 % (v/v) Laemmli-Puffer versetzt und für 20 min bei 50 °C erwärmt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden 5 μ l des Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards mitgeführt. Desweiteren wurden jeweils 10 μ l der Kontroll-Proben aufgetragen. Eine elektrische Spannung von 200 V

wurde zur Trennung der Proteine für 90 min angelegt. Zusätzlich wurde eine SDS-PAGE mit jeweils 2,5 µl der β -Galactosidase- und GFP-Translationslösung, sowie der Negativ- und Wasser-Kontrolle nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Die Proben wurden jeweils mit 7,5 µl Laemmli-Puffer versetzt und entsprechend erwärmt. Auf das SDS-Gel wurden außerdem 12,5 µl der Positiv-Kontrolle aufgetragen. Die getrennten Proteine wurden anschließend für 1 h mit Coomassie G250 Stain angefärbt. Das Gel wurde über Nacht in Reinstwasser entfärbt.

Pufferzusammensetzungen für die SDS-PAGE

Tris/Glycin-Puffer [10 x]	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	pH 8,3 (HCl)	
Tris/Glycin/SDS-Puffer [10 x]	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	1 % (w/v)
	pH 8,3 (HCl)	
Trenngel-Puffer [4 x]	Tris	1,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
	pH 8,8 (HCl)	
Sammelgel-Puffer [4 x]	Tris	0,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
	pH 6,8 (HCl)	

Zusammensetzungen für das Trenn- und Sammelgel

SDS-Trenngel, 8% (v/v)	Trenngel-Puffer [4x]	1 x
	Rotiphorese-Gel 30	26,7 % (v/v)
	TEMED	0,08 % (v/v)
	APS	10 % (v/v)
SDS-Sammelgel, 5% (v/v)	Sammelgel-Puffer [4x]	1 x
	Rotiphorese-Gel 30	17,2 % (v/v)
	TEMED	0,087 % (v/v)
	APS	10 % (v/v)

4.3.3 Western Blot

Durch die Verwendung von SDS konnten die negativ geladenen Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden [Clark et al., 2009]. Dafür wurden das SDS-Trenn- und SDS-Sammelgel, sowie alle Komponenten des Blotting-Sandwiches in Blotting-Puffer getränkt. Nach einem groben Faser-Pad und Blotting-Papier wurde das Gel, gefolgt von der Nitrozellulose-Membran in die Blotting-Kassette gelegt. Darüber wurden ein weiteres Blotting-Papier und ein Faser-Pad angebracht. Es wurde darauf geachtet, dass sich zwischen dem Gel und der Nitrozellulose-Membran möglichst keine Luftblasen befanden. Nach Füllen des Puffertanks mit Blotting-Puffer wurde eine elektrische Spannung von 100 V für 45 min angelegt.

Pufferzusammensetzung für den Western Blot

Blotting-Puffer	Tris/Glycin-Puffer [10 x]	1 x
	Methanol	20 % (v/v)

4.3.4 Immunodetektion

Die geblotteten Proteine wurden mit Ponceau S-Lösung auf der Nitrozellulose-Membran für 2 min angefärbt. Nach gründlichem Waschen der Membran mit Reinstwasser wurde die Nitrozellulose-Membran für eine 1 h in Blocklösung auf einer Schwenkplatte inkubiert. Das in der Lösung enthaltene Milchpulver maskiert die nicht besetzten, reaktiven Stellen auf der Membran [Clark et al.]. Nach diesem sogenannten Membran-Blocken, wurde der Träger für 10 min mit 10 ml der Primärantikörper-Lösung inkubiert. Nach einem 2-fachen Waschschrift mit je 50 ml Waschpuffer, für jeweils 3 min, wurden 10 ml Sekundärantikörper-Lösung gegeben. Diese wurde 5 min zusammen mit dem Trägermaterial inkubiert und anschließend wurde die Membran wie bereits beschrieben gewaschen. In Folge dessen, wurde die Nitrozellulose-Membran mit 10 ml der HRP color detection reagent inkubiert, bis eine Farbreaktion zu sehen war. Zum Schluss wurde die Membran gründlich mit Reinstwasser gewaschen. Alle Inkubationsschritte wurden auf einer Schwenkplatte durchgeführt.

Zusammensetzungen der Lösungen für die Immunodetektion

Block-Lösung	PBS [10 x]	1 x
	Tween 20 [10 %]	0,25 % (v/v)
	Milchpulver	5 % (w/v)
Waschpuffer	PBS [10 x]	1 x
	Tween 20 [10 %]	0,25 % (v/v)
Primärantikörper	Anti- β -Galactosidase	0,25 % (v/v)
	Block-Lösung	99,75% (v/v)

Sekundärantikörper	Anti-Maus-HRP	0,25 % (v/v)
	Block-Lösung	99,75% (v/v)
HRP color detection reagent	PBS [10 x]	1 x
	HRP color detection reagent A	9 % (v/v)
	HRP color detection reagent B	0,55% (v/v)

4.4 Quantifizierung der *in vitro* exprimierten β -Galactosidase mit ONPG

Zur Quantifizierung der *in vitro* synthetisierten aktiven β -Galactosidase, wurde eine Regressionsgerade der Enzymaktivität erstellt. Dafür wurde das synthetische Substrat ONPG eingesetzt, welches von der β -Galactosidase hydrolytisch gespalten wird [Huaqiang et al., 2009]. Dieses farblose Substrat wird von der β -Galactosidase hydrolytisch in β -D-Galactose und das gelbe o-Nitrophenol gespalten [URL-14]. Durch Zugabe von Natriumcarbonat wird die Enzymreaktion gestoppt, da dies eine Erhöhung des pH-Wertes zur Folge hat [URL-13]. Denn das o-Nitrophenol liegt bei einem pH-Wert über 7,2 hauptsächlich als o-Nitrophenolat-Anion vor, welches eine noch intensivere Gelbfärbung aufweist und die eigentlich zu detektierende Komponente ist [URL-13].

Für die Erstellung der Regressionsgeraden, wurden verschiedene β -Galactosidase-Konzentrationen, zwischen 0,078 Units und 0,0039 Units in dreifacher Ausführung eingesetzt. Der Einsatz einer höheren Konzentration zeigte bereits eine Enzymsättigung. Um die *in vitro* exprimierte β -Galactosidase zu quantifizieren, wurden je 5 μ l und 10 μ l der Translationsreaktion eingesetzt. Außerdem wurden 5 μ l der GFP-Translation, sowie die Wasser- und Negativ-Kontrolle der Translation verwendet, um zu überprüfen, in wie weit die Enzyme der Expressionsreaktion einen Einfluss auf die Spaltung oder den Zerfall von ONPG haben. Für jede Reaktion wurden die Komponenten in einem 300 μ l Ansatz durch Vortexen gut gemischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Hydrolyse von

ONPG durch Zugabe von je 500 µl 1 M Natriumcarbonat-Lösung gestoppt. Die Reaktionslösungen wurden anschließend durch Vortexen gründlich vermischt, um eine vollständige Inaktivierung der β -Galactosidase zu gewährleisten. Die entstandene Gelbfärbung konnte im Spektralphotometer bei 420 nm bestimmt werden. In der Referenzprobe wurde anstelle der β -Galactosidase-Lösung der Natriumphosphatpuffer eingesetzt.

Zusammensetzung der Enzymreaktion

ONPG-Assay	Magnesiumchlorid-Lösung [100 x]	1 x
	ONPG-Lösung [8000 mg/ml]	22 % (v/v)
	Natriumphosphat-Puffer [0,1 M]	67 % (v/v)
	β -Galactosidase [2,6 U/ml]	10 % (v/v)
	β -Galactosidase Transkription	3,33 % (v/v)/
		1,67 % (v/v)
	GFP-Transkription, Wasser-Kontrolle, Negativ-Kontrolle	1,67 % (v/v)

Verwendete Lösungen für die Hydrolyse von ONPG

Magnesiumchlorid-Lösung [100 x]	1 M MgCl ₂	10 % (v/v)
	14,3 M β -Mercaptoethanol	25 % (v/v)
0,1 M Natriumphosphat- Puffer	1 M Na ₂ HPO ₄	8,2 % (v/v)
	1 M NaH ₂ PO ₄	1,8 % (v/v)

ONPG-Lösung [8000 mg/ml]	ONPG	52,8 mg/ml
	0,1 M Natriumphosphat-Puffer	80 % (v/v)

4.5 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese für mRNA

Zum Nachweis der entstandenen mRNA wurde eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Positiv-Kontrolle wurde eine 10 ml *E.coli* K12 JM109 pT7CFE1-CHis-*lacZ* Kultur hergestellt (siehe 4.1.1). Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Unter Einsatz des SurePrep™ TrueTotal™ RNA Purification Kits wurde die mRNA aus den Zellen extrahiert und in der denaturierenden Gelelektrophorese als Positiv-Kontrolle mitgeführt. Die Elektrophorese-Kammer und der Proben-Kamm wurden vor der Verwendung für 30 min mit einer 3 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung desinfiziert. Je 15,75 µl der Transkriptionslösungen, wurden mit je 0,75 µl einer 5 M Harnstofflösung und 2 µl Nukleinsäure-Auftragspuffer versetzt. Als Standard wurden 10 µl des 0,5-10 kb RNA-Ladder mitgeführt. Die RNA-Fragmente wurden in einem 1,2 %-igen Agarose-TAE-Gel, gefärbt mit SYBR® Safe (siehe 4.1.1), der Größe nach getrennt. Hierfür wurde eine Spannung von 100 V für 30 min angelegt. Mit Hilfe des Transilluminators konnten die Fragmente bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht werden.

Probenzusammensetzungen

0,5-10 kbp RNA-Ladder	RNA-Ladder	25,4 % (v/v)
	Harnstoff [5 M]	4,8 % (v/v)
RNA-Extrakt	RNA-Extrakt [500 ng]	66 % (v/v)
	Harnstoff [5 M]	4,8 % (v/v)

Transkription	Proben der Transkription	95,2 % (v/v)
	Harnstoff [5 M]	4,8 % (v/v)

4.6 Photometrische Bestimmungen

Die Konzentrationen der isolierten Plasmide und der extrahierten DNA-Fragmente wurden im NanoVue gemessen. Für die Bestimmung des Wellenlängen-Spektrums der Transkriptionslösungen, wurden die *GFP*- und die *lacZ*-Lösungen 1:10 verdünnt und gegen die ebenfalls verdünnte Negativ-Kontrolle im NanoVue gemessen. Da die Werte der ursprünglichen Transkriptionslösungen zu hoch waren und nicht mehr von dem Gerät erfasst werden konnten, mussten die Lösungen für die Messungen verdünnt werden. Das Probenvolumen betrug jeweils 2 μl . Für die Quantifizierung der β -Galactosidase wurde das Spektralphotometer Cadas 200 verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung der Expressionsvektoren pT7CFE1-CHis-*lacZ* und pT7CFE1-CHis-*GFP*

Die mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Sall*_{HF} und *Bam*HI_{HF} aus dem pUCD-*lacZ* Plasmid geschnittene Sequenz, besitzt eine Größe von 3273 bp. Diese Nukleotidsequenz enthält neben dem *lacZ*-Gen noch zusätzliche Basenpaare des Ausgangsplasmids. Bei diesem Schritt musste die Inkubationszeit auf 8 h erhöht werden, um einen vollständigen Verdau der Plasmide zu gewährleisten, da das Enzym *Sall* Plasmid-DNA in supercoil Form nur schlecht schneidet [Mühlhardt, 2009]. Für die Integration der herausgeschnittenen Sequenz in den pT7CFE1-CHis Expressionsplasmid, musste dieser ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Sall*_{HF} und *Bam*HI_{HF} inkubiert werden. Dabei wurde aus den 3627 bp langen Vektoren ein 39 bp großes Fragment aus der MCS (multiple cloning site) geschnitten. Unter Nutzung der *T4* DNA-Ligase konnten die beiden Fragmente zum pT7CFE1-CHis-*lacZ* Plasmid, mit einer Größe von 6861 bp, verknüpft werden. Die Größen der einzelnen Fragmente sind in dem Agarose-Gelbild in Abbildung 4 zusehen.

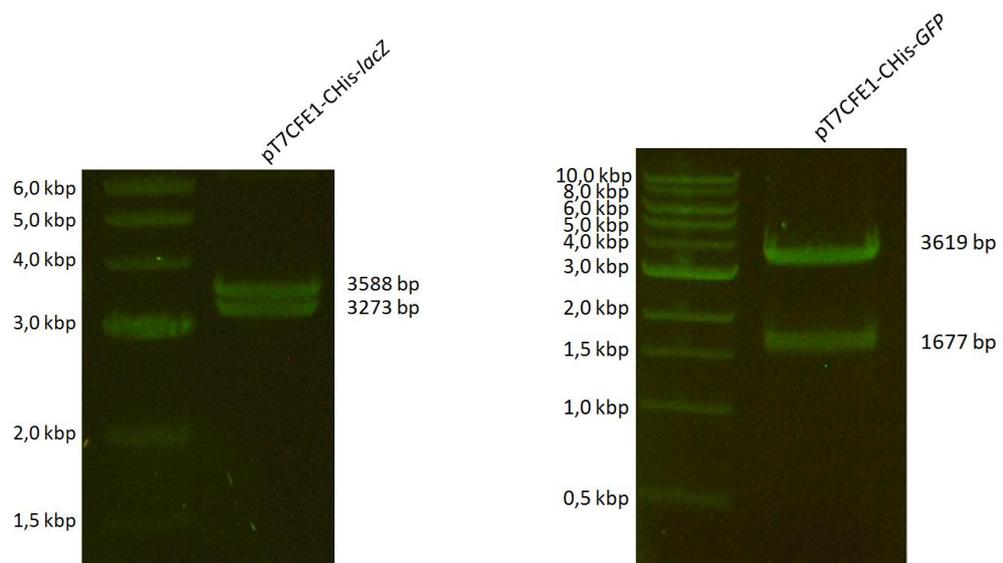


Abbildung 4: Fragmentgrößen der Expressionsvektoren

pT7CFE1-CHis-*lacZ*, geschnitten mit *Sall*_{HF}, sowie *Bam*HI_{HF} (A) und das pT7CFE1-CHis-*GFP*, geschnitten mit *Eco*RI_{HF} und *Eco*RV (B)

Bei dem Verdau des pGLO Plasmid mit den Enzymen *EcoRI*_{HF} und *EcoRV* wurde das *GFP*-Gen zusammen mit einem Teil des *araC*-Gens (Arabinose Promotor_C) herausgeschnitten. Dieses Fragment weist eine Größe von 1677 bp auf (siehe Abbildung 4). Das *araC*-Gen ist ein Teil des Arabinose-Operons und kodiert für das AraC Protein, welches die RNA-Polymerase rekrutiert. Das *GFP*-Gen ist mit dem *araC*-Gen gekoppelt und kann nur exprimiert werden, wenn sich L-Arabinose im Medium befindet [URL-9]. Das AraC Protein bindet an die DNA, allerdings in der falschen Konfiguration. Gelangt Arabinose in die Zelle, kann diese an das AraC binden. Dies führt zur Konfigurationsänderung des Proteins, was die Rekrutierung der RNA-Polymerase an den Promotor zur Folge hat. Dadurch wird der Promotor aktiviert und das *GFP*-Gen kann transkribiert werden [URL-10]. Das mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierte Expressionsplasmid pT7CFE1-CHis besitzt eine Größe von 3619 bp. Das neu entstandene pT7CFE1-CHis-*GFP* Plasmid besitzt dementsprechend eine Größe von 5296 bp.

Die entstandenen Expressionsvektoren wurden anschließend in chemisch kompetente *E.coli* K12 JM109 Zellen transformiert. Auf den entsprechenden Selektivplatten LB/IPTG/X-Gal/Ampicillin für pT7CFE1-CHis-*lacZ*, beziehungsweise LB/L-Arabinose/Ampicillin für pT7CFE1-CHis-*GFP*, konnten alle Transformanden wachsen, die ein Plasmid aufgenommen hatten. Denn das Plasmid pT7CFE1-CHis trägt das Ampicillinresistenzgen (*Amp*^R), welches die plasmidtragenden Bakterien immun gegen dieses Antibiotikum macht. Das *Amp*^R-Gen codiert für die β -Lactamase, welche β -Lactam-Antibiotikas hydrolisiert und damit unschädlich macht [Theuretzbacher, 1998]. Die Transformationseffizienz lag bei der Transformation mit dem pT7CFE1-CHis-*lacZ* Plasmid bei 30707 Zellen/ μ g Plasmid-DNA. Der Vektor pT7CFE1-CHis-*GFP* wurde auf zwei verschiedene Varianten hergestellt. Bei der ersten Variation wurde das extrahierte Gen in den zuvor geöffneten pT7CFE1-CHis Vektor integriert. Hier lag die Transformationseffizienz bei 5748 Zellen/ μ g Plasmid-DNA. Desweiteren wurde sowohl das *GFP*-Gen, als auch der pT7CFE1-CHis Vektor aus dem Gel extrahiert und beide Fragmente wurden zusammen inkubiert. Die Transformationseffizienz betrug dabei 12875 Zellen/ μ g Plasmid-DNA.

Bei dem Ligationsvorgang kam es teilweise zum Wiedereinbau des aus der MCS geschnittenen kurzen Fragments. Um das erfolgreich ligierten pT7CFE1-CHis-*lacZ* Plasmid von den Religanden zu unterscheiden, wurde X-Gal zum Medium gegeben. Die *in vivo* exprimierte β -Galactosidase setzt dieses künstliche Substrat um. Das entstandene Produkt reagiert anschließend mit Luftsauerstoff zu einem Indigofarbstoff, welcher die Bakterien blau erscheinen lässt [Clark et

al., 2009, S. 257]. Die religierten Plasmide können keine β -Galactosidase exprimieren, welche das X-Gal spalten könnte. Das zusätzlich im Festmedium enthaltene IPTG steigert lediglich die *in vivo* Enzymproduktion und trägt nicht zur Selektion bei. Bei der Herstellung des pT7CFE1-CHis-GFP Plasmiden können die Liganden die gekoppelten Gene *araC* und *GFP* exprimieren, dabei lässt das *GFP* als Genprodukt die Bakterienzelle grün leuchten. Die Kolonien der Religanden erscheinen weiß auf den Selektionsplatten, was eine einfache Bestimmung der erfolgreich ligierten Kolonien möglich macht. Das Verhältnis von Religation zu Ligation lag bei der Herstellung des pT7CFE1-CHis-*lacZ* Plasmid bei 1:3. Bei der pT7CFE1-CHis-GFP Variation in der lediglich das *GFP*-Gen aus dem Agarose-Gel extrahiert wurde, lag das Verhältnis von Religation zu Ligation bei 1:16. Das Gen-Fragment wurde demzufolge bevorzugt eingebaut. Im Vergleich dazu, lag das Verhältnis bei der zweiten Variante bei 1:1,44.

5.2 *In vitro* Expression

Nach einer 90 minütigen Inkubationszeit konnte kein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden. Laut Hersteller sollte ein Signal bereits im Reaktionsgefäß zu sehen sein [URL-5]. Allerdings konnte das GFP lediglich nach 6 h unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 5). Als Negativ-Kontrolle wurde Wasser verwendet.



Abbildung 5: GFP-Kontrolle nach 6 h Translation

Mit Hilfe des Filter-Sets 09 der Firma Carl Zeiss konnte das GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Weiterhin wurde die Expression mit einer erneuten Zugabe an Transkriptionslösung untersucht. Hier betrug die gesamte Inkubationszeit ebenfalls 6 h. Die Fluoreszenzuntersuchung zeigte dabei eine ähnliche Intensität unter dem Mikroskop. Die

Expression wurde zusätzlich mit einem neuen Kit durchgeführt. Hier konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden.

5.3 SDS-PAGE und Western Blot

Die Proteine der β -Galactosidase Expression wurden in einer SDS-PAGE elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. In Abbildung 6 sind die geblotteten Proteine der Expressionslösung nach der Färbung mit Ponceau S zusehen. Auf der Membran sind weiße Flecken entstanden. An diesen Stellen konnten, auf Grund von Luftblasen, keine Proteine geblottet werden. Die Banden der Kontrollen sind nur sehr schwach zu erkennen. Außerdem sind bei den Kontrollproben weniger Proteine als in den Spuren der β -Galactosidase Expression enthalten. Beim Vergleich der unterschiedlich aufgetragenen Volumina ist zu sehen, dass sich bei 15 μ l der Expressionslösung eine sehr breite Spur, aufgrund des großen Auftragsvolumens, gebildet hat. Alle Translationslösungen zeigen einen breiten Schmier. Dieser ist auf Grund der vielen Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht in der Reaktionslösung entstanden.

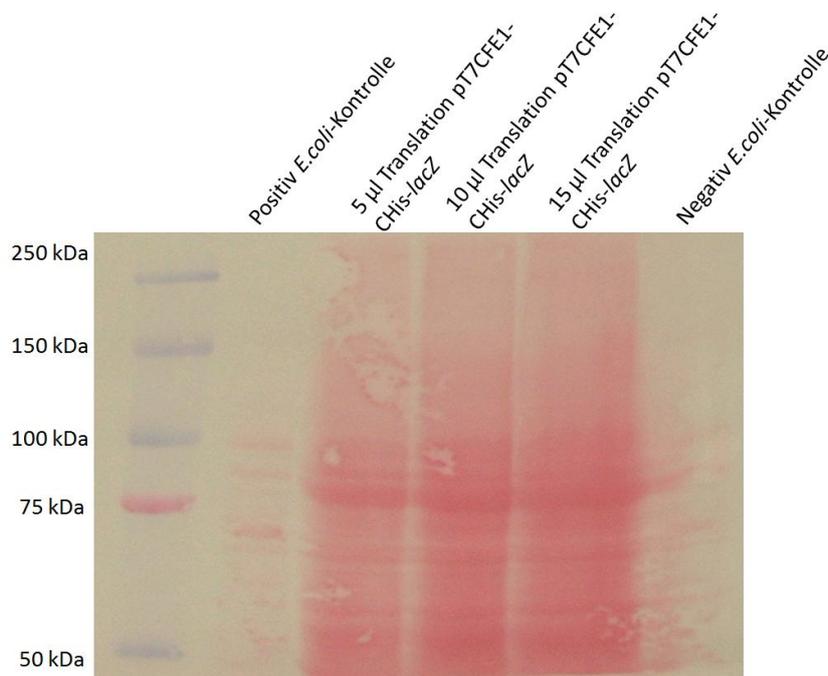


Abbildung 6: Nitrozellulose-Membran

Bei allen drei Spuren der Expressionslösung ist neben einzelner Banden auf gleicher Höhe jeweils ein breiter Schmier, auf Grund der vielen Proteine entstanden.

In allen drei Spuren werden ähnliche Bandenmuster deutlich. Dabei handelt es sich um Proteine, die für die Transkription beziehungsweise Translation benötigt werden. Die β -Galactosidase sollte anschließend mit Hilfe des Primärantikörper Anti- β -Galactosidase und dem Sekundärantikörper Anti-Maus-HRP auf der Nitrozellulose-Membran detektiert werden (siehe Abbildung 8). Lediglich in der Spur der Positiv *E.coli*-Kontrolle ist eine Bande, also eine Farbreaktion, entstanden. Hier konnte der Primärantikörper die β -Galactosidase auf der Membran lokalisieren. Der Sekundärantikörper, welcher mit dem Enzym HRP konjugiert ist, konnte an die Fc-Region des primären Antikörpers binden [Mülhardt, 2009]. Das Substrat 4-Chloro-1-Naphtol, konnte anschließend von dem Enzym HRP zu einem lila Farbstoff oxidiert werden, welcher auf der Membran den Ort der β -Galactosidase angibt. Die β -Galactosidase besitzt normalerweise ein Molekulargewicht von 116 kDa. Jedoch kann, aufgrund von posttranslationalen Veränderungen, das Laufverhalten von Proteinen so beeinflusst werden, dass sich die Proteinbanden weiter oben beziehungsweise unten im Gel befinden. Laut der Firma Santa Cruz Biotechnology, liegt aufgrund dessen das Molekulargewicht der β -Galactosidase bei zirka 130 kDa, wie auch in der Abbildung 7 zu erkennen [www.scbio.de, 2011].

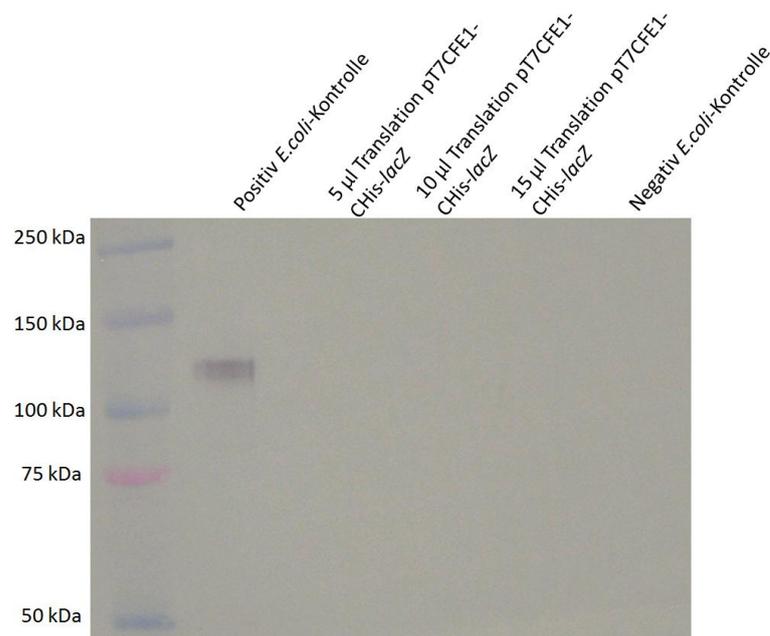


Abbildung 7: Detektion der β -Galactosidase

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper Anti- β -Galactosidase, dem Sekundärantikörper Anti-Maus-HRP und der HRP color detection reagent konnte lediglich bei der Positiv-Kontrolle die β -Galactosidase nachgewiesen werden.

In den Spuren der zu untersuchenden Expressionslösung ist keine Bande entstanden. Es kann folglich nicht abgeschätzt werden, welches Volumen der Expressionslösung eingesetzt werden muss, um die β -Galactosidase nachweisen zu können. Wie zu erwarten zeigt die Negativ-Kontrolle keine Bande, da der *E.coli* K12 JM109 Stamm (D (lac-proAB)) kein *lacZ*-Gen aufweist. Dieser Stamm kann aufgrund dessen keine β -Galactosidase exprimieren, welche mittels der eingesetzten Antikörper nachgewiesen werden könnte. Bei einer weiteren Zugabe an Transkriptions-Lösung zur Translationsreaktion konnte auch bei der Immunodetektion keine Bande in den pT7CFE1-CHis-*lacZ* Spuren nachgewiesen werden.

Da nach der Immunodetektion in der Translationslösung keine β -Galactosidase nachgewiesen werden konnte, wurde je eine Probe ohne Template und eine mit Wasser untersucht. Die Proteine der β -Galactosidase- und GFP-Translation beziehungsweise der Wasser- sowie Negativ-Kontrolle wurden in einer SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt, um sie zu vergleichen. Nach der Trennung wurden die Proteine mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie G250 Stain sichtbar gemacht (siehe Abbildung 8).

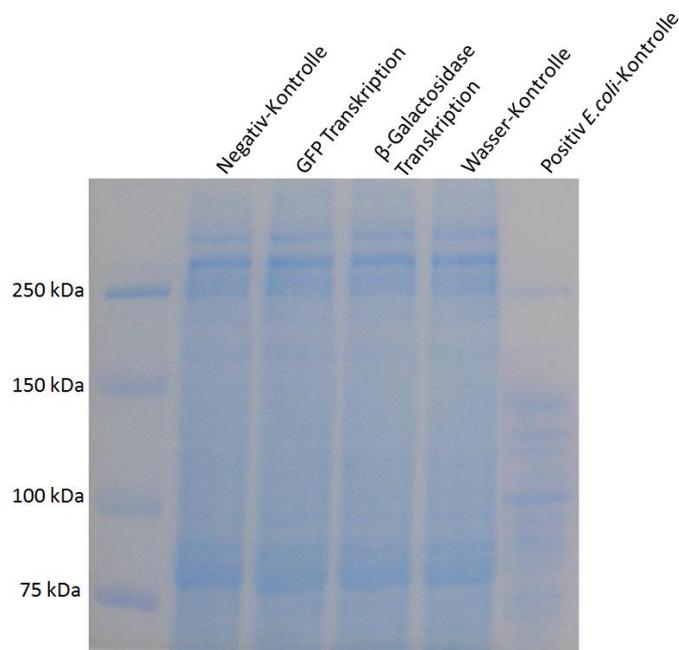


Abbildung 8: SDS-Gel nach Coomassie G250 Stain Färbung

Zwischen den einzelnen Spuren ist kein wesentlicher Unterschied zu erkennen.

Aufgrund des starken Signals bei der vorhergehenden Untersuchung, wurde das Volumen noch einmal auf 2,5 μ l verringert. Die Banden in den Spuren der Expressions-Lösungen sind nun

besser zu erkennen. Es ist zu sehen, dass in allen vier Spuren ähnliche Bandenmuster entstanden sind. Dabei handelt es sich um die eingesetzten Proteine für die Transkription, beziehungsweise für die Translation. In der β -Galactosidase-Expressions Spur ist keine zusätzliche Bande zwischen 100 kDa und 150 kDa zu sehen. Allerdings bedeutet dies nicht, dass keine β -Galactosidase exprimiert werden konnte, wie die Positivkontrolle des vorherigen Beispiels zeigt. Hier war vor der Detektion auch keine Bande bei dem entsprechenden Molekulargewicht zu erkennen. Um sicher zu gehen, dass keine β -Galactosidase exprimiert wurde, sollte auch hier ein Western Blot mit anschließender Immunodetektion durchgeführt werden.

5.4 Quantifizierung der *in vitro* exprimierten β -Galactosidase mit ONPG

Durch Einsatz der variierten β -Galactosidase Enzymmenge, konnte die in Abbildung 9 zu sehende Regressionsgerade erstellt werden. Es ist zu erkennen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Extinktion und der Enzymaktivität besteht. Die Extinktion und somit die Menge an hydrolysiertem ONPG steigt direkt proportional mit der Konzentration an eingesetzter β -Galactosidase.

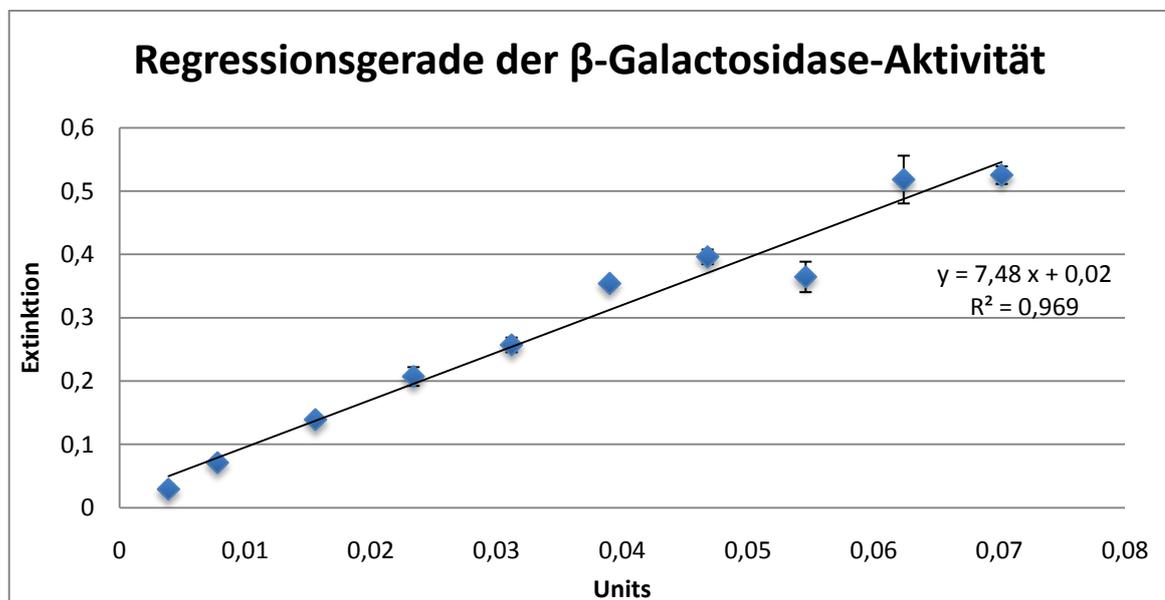


Abbildung 9: Regressionsgerade der β -Galactosidase-Aktivität

Das Substrat ONPG wurde von verschiedenen Konzentrationen β -Galactosidase umgesetzt.

Für jede Konzentration wurde ein Triplett-Ansatz untersucht. Das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,969$ zeigt ein gutes Ergebnis. Nur bei wenigen Punkten ist eine Standardabweichung zu erkennen. Unter Einsatz der Reaktionsgleichung $y = 7,48x + 0,02$ kann die *in vitro* exprimierte Enzymmenge bestimmt werden. Die Werte zur Grafik sind im Anhang 3 zu finden.

Unter Einsatz des ONPG-Assays sollte die Enzymaktivität der *in vitro* exprimierten β -Galactosidase bestimmt werden.

Tabelle 1: Extinktionswerte der Translationsreaktionen

Probe	Negativ-Kontrolle		Wasser-Kontrolle		GFP-Translation		β -Galactosidase-Translation	
	Extinktion (5 μ l)	Extinktion (30 μ l)	Extinktion (5 μ l)	Extinktion (30 μ l)	Extinktion (5 μ l)	Extinktion (30 μ l)	Extinktion (5 μ l)	Extinktion (30 μ l)
1.Messung	0,012	0,072	0,013	0,078	0,015	0,09	0,01	0,06
2.Messung	0,018	0,108	0,011	0,066	0,013	0,078	0,024	0,072
3.Messung	0,017	0,102	0,008	0,048	0,011	0,066	0,027	0,106
Mittelwert		0,094		0,064		0,078		0,0793
Standardabweichung		0,0193		0,0151		0,0120		0,0239

Bei dem Vergleich der vier verschiedenen Proben ist zu erkennen, dass die Extinktionswerte nah beieinander liegen. Die Extinktionswerte für die β -Galactosidase sollte sich allerdings von den anderen Werten unterscheiden. Um auszuschließen, dass die Komponenten der Reaktion zum Zerfall des ONPGs führen, wurde statt der Translationslösung Wasser hinzugegeben, was sich in einem Rauschen der Extinktionswerte äußerte (nicht in der Tabelle aufgeführt). Die Standardabweichungen der einzelnen Werte sind relativ gering.

Weiterhin wurden die Extinktionswerte der β -Galactosidase nach 6 h (Standardprotokoll) und nach erneuter Zugabe von 2 μ l Translationslösung nach 2 h untersucht.

Tabelle 2: Extinktionswerte der variierten Translation

Probe	Standard-Protokoll				erneute Zugabe			
	β-Galactosidase-Translation		GFP-Translation		β-Galactosidase-Translation		GFP-Translation	
Volumen	Extinktion (5 µl)	Extinktion (30 µl)	Extinktion (5 µl)	Extinktion (30 µl)	Extinktion (5 µl)	Extinktion (30 µl)	Extinktion (5 µl)	Extinktion (30 µl)
1.Messung	0,02	0,12	0,031	0,186	0,019	0,114	0,017	0,102
2.Messung	0,0185	0,111	0,021	0,126	0,018	0,108	0,007	0,042
3.Messung	0,012	0,072	0,015	0,09	0,0183	0,1098	0,01	0,06
Mittelwert		0,101		0,134		0,1106		0,068
Standard-abweichung		0,0255		0,0485		0,0031		0,0308

Bei einem Vergleich der Werte lässt sich erkennen, dass auch hier die Extinktionen der einzelnen Proben ähnlich sind. Die Werte der β-Galactosidase-Translation zeigen so gut wie keinen Unterschied zu den anderen Proben. Lediglich bei der GFP-Translation ist eine leichte Abweichung zwischen den Extinktion zu den anderen Proben zu sehen, allerdings handelt es sich dabei wahrscheinlich um eine leichte Schwankung. Weiterhin zeigen die Standardabweichungen nur einen geringen Wert. Es konnte also kein Unterschied in Bezug auf eine erneute Zugabe der Transkriptionslösung festgestellt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein neues Kit verwendet. Die gemessenen Extinktionswerte sind in nachfolgender Tabelle ersichtlich. Auch hier sind die Werte bei einem Vergleich untereinander ähnlich.

Tabelle 3: Extinktionswerte der beiden Kits

Probe	erstes Kit				zweites Kit			
	β-Galactosidase-Translation		GFP-Translation		β-Galactosidase-Translation		GFP-Translation	
Volumen	Extinktion (5 µl)	Extinktion (30 µl)	Extinktion (5 µl)	Extinktion (30 µl)	Extinktion (5 µl)	Extinktion (30 µl)	Extinktion (5 µl)	Extinktion (30 µl)
1.Messung	0,019	0,114	0,017	0,102	0,021	0,126	0,013	0,078
2.Messung	0,018	0,108	0,007	0,042	0,019	0,114	0,012	0,072
3.Messung	0,0183	0,1098	0,01	0,06	0,015	0,09	0,007	0,042
Mittelwert		0,1106		0,068		0,11		0,064
Standardabweichung		0,0031		0,0308		0,0183		0,0193

Da davon ausgegangen werden kann, dass keine β-Galactosidase *in vitro* synthetisiert werden konnte, wie anhand der Untersuchungen gezeigt werden konnte, konnte die ermittelte Regressionsgerade für die Quantifizierung der Enzymmenge nicht verwendet werden. Bei einer erfolgreichen Expression müsste der Wert einer Kontrolle von dem Extinktionswert der β-Galactosidase abgezogen werden, um das eigentliche Ergebnis zu erhalten. Da in diesem Fall eine Extinktion von -0,0147 erhalten wird, konnte gezeigt werden, dass keine β-Galactosidase synthetisiert werden konnte.

5.5 Bestimmung des Wellenlängen-Spektrums

Um herauszufinden, ob mRNA während der Transkription synthetisiert wurde, wurde das Wellenlängenspektrum der *GFP*- und der *lacZ*-Transkription untersucht (siehe Abbildung 10). Es ist ein ähnlicher Kurvenverlauf beider Proben zu erkennen. Deutlich werden Peaks bei den Wellenlängen von 215 nm, 225 nm und 260 nm. Für die ersten beiden Peaks sind die in der Lösung enthaltenen Peptidbindungen verantwortlich. Diese absorbieren das einfallende Licht bei 215 nm und 225 nm. Bei 260 nm werden Nukleinsäuren absorbiert, was zur Ausprägung des dritten Peaks führte [URL-8]. Da für die Nullmessung die Negativ-Kontrolle verwendet wurde, sind störende Signale bereits heraus gefiltert worden.

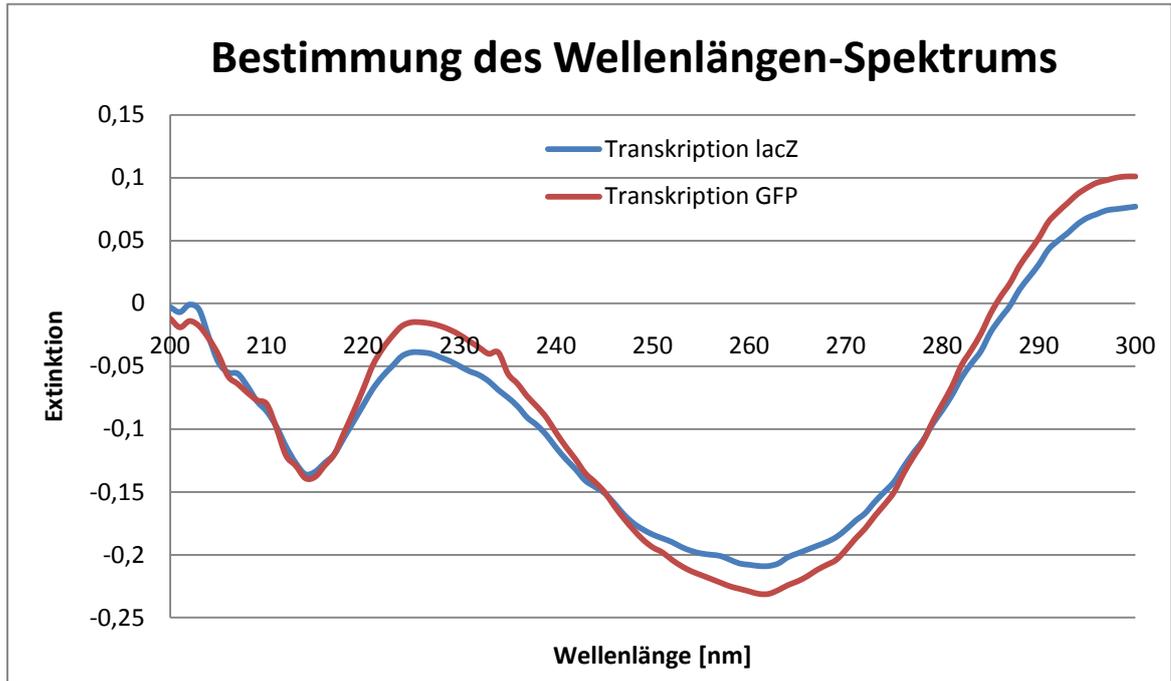


Abbildung 10: Bestimmung des Wellenlängen-Spektrums der *lacZ*- und *GFP*-Transkription

Der Kurvenverlauf beider Proben ist ähnlich. Es ist ein Peak bei 260 nm zu erkennen. Dieser wird durch die Absorption von Nukleinsäuren verursacht. Die Peaks bei 215 nm und 225 nm sind durch Peptidbindungen entstanden.

5.6 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese sollte festgestellt werden, ob während der Transkriptionsreaktion mRNA entstanden ist. Dafür wurde die RNA mit Harnstoff versetzt und erhitzt, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA zu unterbinden. In Abbildung 11 ist das unter dem Transilluminator betrachtete Agarose-Gel zu erkennen. In der Spur des *E.coli* RNA-Extrakts sind diverse RNA-Spezies zu sehen. Dabei bilden die beiden mittleren Banden die 23S rRNA und die 16S rRNA. Die unterste Bande am Gelende stellt die Small RNA, mit einer Fragmentlänge von unter 200 bp dar. Bei dem schwachen Schmier zwischen den Banden handelt es sich vermutlich um mRNA-Fragmente [Fisher BioReagents, 2011].

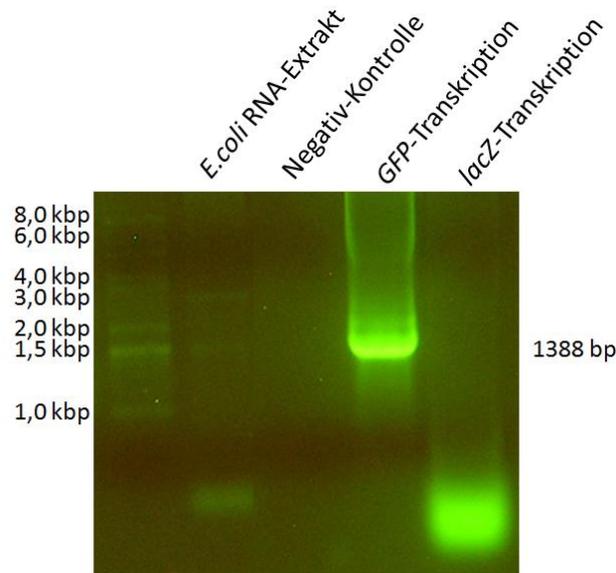


Abbildung 11: Denaturierendes Agarose-Gel

Bei dem *E.coli* RNA-Extrakt sind diverse Arten von RNA zu erkennen. Die Negativ-Kontrolle zeigt keine Bande. Bei der *GFP*-Transkription ist wahrscheinlich mRNA entstanden. Hingegen zeigt die Spur der *lacZ*-Transkription nur RNA-Bruchstücke.

In der Spur der Negativ-Kontrolle ist wie zu erwarten, kein Signal zu erkennen, da hier keine DNA für die Synthese der RNA vorhanden war. Bei der *GFP*-Transkription ist eine intensive Bande entstanden. Die Fragmentgröße der *GFP* mRNA liegt bei 1388 bp, wie auch im Gelbild zu erkennen. Aufgrund der großen Menge der entstanden mRNA, ist über der Bande ein Schmier zu sehen. In der Spur der *lacZ*-Transkription ist ein Signal am unteren Ende des Gels zu sehen. Dabei handelt es sich, angesichts der geringen Größe, um mRNA-Bruchstücke. Es konnte keine vollständige mRNA von 4020 bp nachgewiesen werden.

Da bei der Verwendung des pT7CFE1-CHis-*lacZ* Plasmid kein Protein exprimiert werden konnte, wurde vorerst auf den Einsatz des pT7CFE1-CHis-*GFP* Vektors verzichtet.

6 Diskussion

6.1 Herstellung der Expressionsvektoren pT7CFE1-CHis-*lacZ* und pT7CFE1-CHis-*GFP*

In allen drei Fällen ist die Transformationseffizienz sehr gering, im Vergleich zu einer durchschnittlichen Effizienz von 10^8 Zellen/ μg DNA [Promega, 2009]. Der Grund für die geringe Transformationseffizienz könnte unter anderem an der verhältnismäßig hohen Größe der beiden Plasmide liegen. Es entstehen nur sehr kleine Poren in der bakteriellen Zellwand der kompetenten Bakterien, somit ist es für größere Plasmide schwieriger in das Zellinnere zu gelangen. Die Inkubationszeiten auf Eis können nicht optimal sein und können noch angepasst werden, um beispielsweise sicher zu stellen, dass sich eine größere Menge extrazellulärer DNA an die Bakterien-Membran nicht-kovalent bindet [Graw, 2010, S. 119]. So ist auch die Einwirkzeit des Hitzeschocks noch nicht optimiert wurden. Die meisten Zellen sterben bei diesem Vorgang, aufgrund der Destabilisierung der Lipide in der Zellhülle, ab [Becker, 1996, S. 106; Clarck et al., S.76, 2009]. Auch der Einsatz von zu hohen DNA-Mengen oder unreinen Plasmid-Proben kann zu einer Verringerung der Effizienz führen [Becker, 1996; Mühlhardt, 2009, S. 162]. So kann es bei der Herstellungsvariante des pT7FE1-CHis-*GFP*, bei dem das Plasmid nicht auf das Gel aufgetragen wurde, aufgrund der sich noch im Ansatz befindenden Restriktionskomponenten zu einer geringeren Transformationseffizienz gekommen sein. Zusätzlich nehmen nicht alle Bakterienzellen ein Plasmid auf, beziehungsweise reproduzieren es, was auch zu einer Effizienzverringerng führen kann [URL-10]. Weiterhin können die Bakterien aufgrund zu langer Lagerzeit an Kompetenz verloren haben, was auch ein Grund für die höhere Transformationseffizienz bei dem pT7CFE1-CHis-*lacZ* Plasmid sein kann, da dieser Versuch einige Zeit eher durchgeführt wurde.

Da sich bei der Ligation von pT7FE1-CHis mit *lacZ* noch das 39 bp große Fragment in der Reaktionslösung befand, kam es hier in jedem dritten Fall zum Wiedereinbau dieses Fragmentes. Die Versionen der pT7FE1-CHis-*GFP* Herstellung zeigen einen sehr großen Unterschied. Dabei zeigt die Version bei der lediglich das *GFP*-Fragment aus dem Gel extrahiert wurde ein besseres Ligationsverhältnis. Da das geöffnete Plasmid aus dem Gel extrahiert

wurde, kann es sein, dass ein Teil der Plasmide abgeschnitten wurde und somit weniger intaktes Plasmid mit entsprechenden kohäsiven Enden vorhanden war. Die Plasmidkompatibilität kann ein weiterer Grund für die Ergebnisse sein. Nimmt beispielsweise eine Bakterienzelle beide Arten der Plasmide auf, also den ursprünglichen Expressionsvektor und jenen mit Insert, wird sich nur einer davon behaupten. Denn eine Bakterienzelle kann nicht zwei Plasmide mit ähnlichem Replikationsursprung aufweisen. Somit könnte das Plasmid mit Insert von der Zelle bevorzugt worden sein [Clark et al., 2009, S. 76]. Auch nach einer Extraktion des pTCFE1-CHis Vektors kam es zu Religationen. Da nur ein sehr kleines Fragment aus dem Plasmid entfernt wurde, befand sich die Bande des geöffneten Vektors in unmittelbarer Nähe der ungeschnittenen Fragmente, welche aufgrund dessen mit aus dem Gel extrahiert wurden. Um dies zu umgehen, sollten die unterschiedlichen Vektorformen vor der Extraktion durch eine längere Laufzeit voneinander getrennt oder der Restriktionsverdau hinsichtlich der Inkubationszeit optimiert werden.

6.2 In vitro Expression

Bei dem Versuch die β -Galactosidase mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren, konnte keine entsprechende Bande nachgewiesen werden, da zu wenig beziehungsweise keine β -Galactosidase exprimiert wurde. Da in der Spur der Positiv-Kontrolle eine Bande entstanden ist, kann davon ausgegangen werden, dass die durchgeführte Methode für eine Detektion geeignet ist. Bei der Negativ-Kontrolle ist keine Bande entstanden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die verwendeten Antikörper spezifisch an die β -Galactosidase binden.

Mit Hilfe des Programmes „pDRAW32“ konnte festgestellt werden, dass sich in der herausgeschnittenen Sequenz, vor dem *lacZ*-Gen, mehrere Stopcodons befinden. Durch den Einbau der Gensequenz, inklusive der vorangehenden Sequenz, befinden sich somit hinter der T7 Promotorsequenz und dem Startcodon mehrere Stopcodons. Diese führen dazu, dass bei der Translation, die Übersetzung von der Nukleotid-Sequenz in eine Aminosäure-Sequenz stoppt, da es für ein Stopcodon keine passende beladenen tRNA mit entsprechendem Anticodon gibt [Graw, 2010]. Zusätzlich befindet sich am Anfang der MCS die Base Adenin, gefolgt von der *MscI* Restriktionsschnittstelle mit der Erkennungssequenz TGGCCA. Dieses Adenin bildet zusammen mit den ersten beiden Basen der Schnittstelle das Startcodon ATG. Hier könnte die Synthese der Polypeptidkette erneut beginnen. Jedoch befinden sich hinter diesem zusätzlichen Startcodon noch weitere störende Stopcodons. In Abbildung 12 ist eine

schematische Darstellung der Situation dargestellt. Ein Teil der pT7CFE1-CHis-*lacZ* Plasmid-Sequenz ist im Anhang 1 ersichtlich.

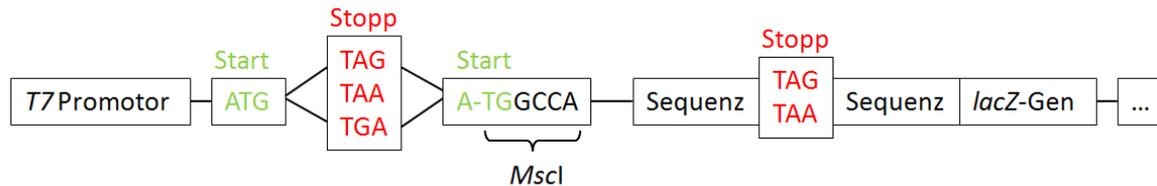


Abbildung 12: Schematische Darstellung der pT7CFE1-CHis-*lacZ* Sequenz

Aufgrund der Stopcodons vor der Gensequenz, kann das *lacZ*-Gen nicht in die β -Galactosidase umgeschrieben werden

Ein weiteres Problem ist, dass das eigentliche Startcodon nicht mit der Gen-Sequenz verbunden ist, da das 159 bp große Fragment dazwischen liegt. Dies ist wichtig, um eine korrekte Translation sicher zustellen [URL-2]. Außerdem befindet sich zwischen der Transkriptions- und Translations- Startstelle eine zulange nicht codierende Sequenz. Diese kann Sekundärstrukturen ausbilden und somit die Translation hemmen [URL-3]. Für die Elimination der Stopcodons, müsste ein anderes Restriktionsenzym verwendet werden, welches näher an der Gensequenz schneidet, als das verwendete Enzym *Bam*HI_{HF}. Es könnte auch ein blunt end cutter verwendet werden, welcher genau an dem Anfang der Gensequenz schneidet und somit die störenden Sequenzen eliminiert. Dies unterstützt die Ergebnisse der Immunodetektion sowie das ONPG-Assay. Bei beiden Methoden konnte keine β -Galactosidase nachgewiesen werden. Bei dem Kontrollplasmid pCFE-*GFP* wiederum existiert kein weiteres Stopcodon hinter dem zusätzlichen Startcodon, aus Adenin und der *MscI* Schnittstelle, wie in Abbildung 13 dargestellt. Hier konnte eine vollständige mRNA synthetisiert werden, wie auch im Gelbild zusehen.

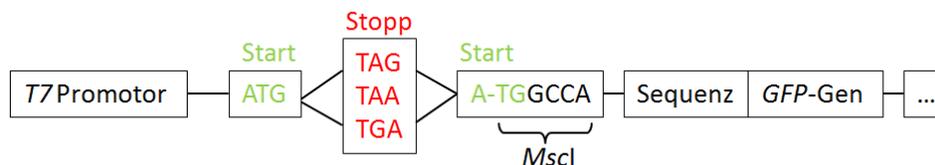


Abbildung 13: Schematische Darstellung der pCFE-*GFP* Sequenz

Eine vollständige Translation des GFP-Gens ist aufgrund des zusätzlichen Startcodons möglich.

Im Anhang 2 ist ein Teil der pCFE-*GFP* Sequenz dargestellt.

Alle Proben zeigten bei dem ONPG-Assay ähnliche Extinktionswerte. Aufgrund der Proteine in der Transkriptions- und Translationslösung kam es wahrscheinlich zur Spaltung des eingesetzten ONPGs, beziehungsweise zum Zerfall dieses Substrates. Die β -Galactosidase-Probe müsste einen erhöhten Extinktionswert zeigen, wenn sich in der Translationslösung das exprimierte Protein befinden würde. Da dieser Wert allerdings nicht von den anderen Werten abweicht, kann davon ausgegangen werden, dass keine β -Galactosidase *in vitro* exprimiert werden konnte. Dieses Ergebnis bestätigt das Resultat der Nitrozellulose-Membran nach der Immunodetektion. Hier konnte ebenfalls keine β -Galactosidase nachgewiesen werden. Durch sorgfältiges Mischen der Proben und die gleichzeitige Durchführung weniger Ansätze konnte die Standardabweichung, sowie das Bestimmtheitsmaß verbessert werden. Bei der Analyse der variierten Translationsreaktion konnte auch durch erneute Zugabe der Transkriptionslösung keine signifikante Steigerung der Extinktionswerte beobachtet werden. Der Vergleich des ersten mit dem zweiten Kit zeigt, dass die Proteine der Transkription und Translation verantwortlich für die Extinktionswerte sind, da die Werte beider Kits relativ ähnlich sind.

6.3 Fehlerbetrachtung

Da das Kontroll-GFP sowie die β -Galactosidase nicht in einem zufriedenstellenden Maß exprimiert wurden, sollte die mRNA-Synthese untersucht werden. Das Wellenlängenspektrum beider Proben ist ähnlich, was auf einen charakteristischen Kurvenverlauf hinweist. Anhand der Grafik lässt sich nicht erkennen, ob es sich bei dem Peak bei 260 nm um RNA oder DNA handelt. Es lässt sich somit nicht bestimmen, ob sich mRNA in den jeweiligen Proben befand. Da die Menge an zugegebener Plasmid-DNA gleich war, müsste aufgrund des ähnlichen Kurvenverlaufs auch die Menge an RNA ungefähr übereinstimmen. Da mithilfe dieser Methode keine Unterschiede festzustellen war, wurde versucht die RNA in der Elektrophorese nachzuweisen.

Wie mit Hilfe der denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese gezeigt werden konnte, wurde anscheinend genügend mRNA bei der Transkription des mitgelieferten *GFP*-Kontrollplasmids synthetisiert. Allerdings konnte lediglich die Fluoreszenz des GFP unter dem Mikroskop gezeigt werden. Laut Hersteller sollte bereits im Reaktionsgefäß das GFP nachweisbar sein [URL-5]. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem limitierenden Schritt um die Translationsreaktion handelt, da im Agarose-Gel bei der Kontrolle ausreichend mRNA sichtbar wurde. Wahrscheinlich ist das Lysat der Grund für das Nichtgelingen der *in vitro*

Proteinexpression. Denn das mitgelieferte menschliche Zelllysate ist sehr anfällig gegenüber steigenden Temperaturen. So kann es sein, dass es während dem Transport zum Anstieg der Temperatur kam und das Extrakt somit an Aktivität verlor. So ließe sich das schwache Signal der *in vitro* exprimierten GFP-Kontrolle erklären. Mit Hilfe des Einsatzes eines Translations-Kits einer anderen Firma, beziehungsweise mit einem selbst hergestellten Lysat, könnte diese Vermutung überprüft werden, wenn die GFP-Kontrolle in einer angemessenen Weise exprimiert werden könnte. Dieses verwendete Zellextrakt müsste nicht zwingen aus einer menschliche Zelllinie hergestellt sein, sondern könnte auch auf prokaryotischen Zellen, beziehungsweise anderen eukaryotischen Quellen, basieren. Da bei dem zweiten Kit nicht einmal eine Fluoreszenz unter dem Mikroskop nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass auch hier das Lysat einen Schaden durch den Transport davon getragen hat.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, ob von dem *lacZ*-Gen mRNA transkribiert wurde. Es wäre möglich das die 159 bp große Sequenz vor dem *lacZ*-Gen, die T7 RNA-Polymerase behindert. So kann es dazu kommen, dass die T7 RNA-Polymerase die DNA verlässt, bevor sie die eigentliche Gensequenz, das gewünschte *lacZ*-Gen, übersetzen kann. Demzufolge kann es nicht zur Synthese einer vollständigen mRNA kommen. Diese Vermutung würde das Gelbild der denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese bestätigen. Denn hier befanden sich am Ende des Gels lediglich einige RNA-Bruchstücke. Allerdings kann auch die Menge der synthetisierten *lacZ* mRNA zu gering gewesen sein, um mit Hilfe des Nukleinsäure-Farbstoffes SYBR® Safe detektiert werden zu können, da dieser nicht optimal ist, um mRNA nachzuweisen. So kann es sein, dass aufgrund eines eventuellen Erreichens der Nachweisgrenze keine mRNA im Gel zu erkennen war.

7 Zusammenfassung

Durch die Nutzung der Restriktionsenzyme *Sall*_{HF} und *Bam*HI_{HF}, konnte das für die β -Galactosidase codierende *lacZ*-Gen aus dem pUCD-*lacZ* Plasmid heraus geschnitten und mit Hilfe der *T4* DNA-Ligase in den linearisierten Expressionsvektor pT7CFE1-CHis ligiert werden. Ebenso wurde das *GFP*-Gen mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Eco*RI_{HF} und *Eco*RV aus dem Ausgangs-Plasmiden pGLO geschnitten und anschließend in den Expressionsvektor integriert. Für die Selektion der erfolgreich ligierten Plasmide, wurden diese jeweils in chemisch kompetente *E.coli* K12 JM109 Zellen, mit Hilfe eines Hitzeschocks, transformiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze auf Selektionsmedien ausplattiert. Von diesen Platten konnte jeweils ein erfolgreicher Transformand für die Plasmidisolierung gepickt werden.

Zu Beginn wurde lediglich der Vektor mit dem *lacZ*-Gen für die Expression eingesetzt. Als Kontrolle wurde das mitgelieferte pCFE-*GFP* Plasmid verwendet. Die Bedingungen der Translationsreaktion wurden für einen Vergleich variiert. Die Proben wurden zum einen für 90 min, sowie für 6 h inkubiert. Bei der dritten Variation wurden nach 2 h erneut 2 μ l der Transkriptionslösung zur Reaktion gegeben. Dieser Ansatz wurde anschließend für weitere 4 h inkubiert. Nach 6 h konnte das exprimierte GFP des Kontrollplasmids lediglich von einem der beiden Kits mit Hilfe des Filtersets 09 der Firma Carl Zeiss unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens sollte die β -Galactosidase nachgewiesen werden. Dafür wurde ein Immunoblot mit dem Primärantikörper Anti- β -Galactosidase und dem Sekundärantikörper Anti-Maus-HRP durchgeführt. Allerdings konnte bei keiner der Variationen *in vitro* exprimierte β -Galactosidase nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung der synthetisierten aktiven Enzymmenge wurde das Substrat ONPG verwendet. Hierfür wurde eine bereits bestehende Regressionsgerade der β -Galactosidase-Aktivität verbessert und die Standardabweichungen verringert. Bei diesem Versuch wurden neben der Translationslösung der β -Galactosidase noch die Lösungen der GFP-Translation, sowie eine Wasser- und eine Negativ-Kontrolle eingesetzt. Bei dem Vergleich der Extinktionswerte der vier Translationsproben, sowie bei den variierten Translationsbedingungen und der beiden eingesetzten Kits konnte kein Unterschied

festgestellt werden. Auf Grund dieses Ergebnisses, sowie dem Resultat der Immunodetektion, kann davon ausgegangen werden, dass keine β -Galactosidase *in vitro* mit Hilfe des „Human *In Vitro* Protein Expression Kit for DNA Templates“ exprimiert werden konnte. Infolgedessen wurde eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um zu überprüfen ob zumindest mRNA synthetisiert werden konnte. Hier konnte bei der *lacZ*-Transkription keine vollständige mRNA nachgewiesen werden. Lediglich bei der Positiv-Kontrolle des pCFE-*GFP* Plasmid konnte mRNA nachgewiesen werden. Allerdings konnte auch hier keine ausreichende Menge des Proteins exprimiert werden. Daher lässt sich schlussfolgern, dass der Translationsschritt der Grund für das Nichtgelingen der *in vitro* Expression sein muss. Es wird vermutet, dass das verwendete Zelllysate bei dem Transport an Aktivität verlor. Um dies zu bestätigen, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Einige Möglichkeiten für weitere Untersuchungen sind im nächsten Abschnitt aufgeführt. Aufgrund der Ergebnisse wurde zunächst auf den Einsatz des hergestellten pT7CFE1-CHis-*GFP* Vektors verzichtet.

8 Ausblick

Durch die Variation der einzelnen Inkubationszeiten könnte die Transformationseffizienz erhöht und eine breitere Datenbasis verglichen werden. Weiterhin könnten andere Restriktionsenzyme genutzt werden, die näher an der eigentlichen Gensequenz schneiden. Dadurch könnte die Größe des zu transformierenden resultierenden Plasmids verringert werden, was wiederum die Wahrscheinlichkeit für das Einschleusen des Vektors erhöhen würde. Beispielsweise könnte dadurch auch das *araC*-Gen beseitigt werden. Weiterhin könnte somit die anscheinend störende Sequenz vor dem *lacZ*-Gen eliminiert werden. Es müsste ein Restriktionsenzym gewählt werden, welches nach den Stopcodons und noch vor beziehungsweise unmittelbar an der Gen-Sequenz schneidet. Eine andere Möglichkeit wäre, sich ein PCR-Fragment mit allen notwendigen Elementen zu generieren. Dies würde eine zusätzliche Zeit- sowie Arbeitersparnis mit sich bringen, da unter anderem die Klonierungs- und Selektionsschritte entfallen. Weiterhin könnte eine RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) durchgeführt werden, um eine eventuell entstandene mRNA mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern in cDNA umzuschreiben. Diese Primer lagern sich an den Poly(A)-tail der mRNA an und dienen somit als Startpunkt für eine anschließende Amplifikation. Durch die Verwendung von spezifischen Primern, welche an die entgegengesetzten Stränge der amplifizierten cDNA hybridisieren, könnte ein Teil der Gensequenz amplifiziert werden. Durch die Vervielfältigung der DNA-Menge können die Proben anschließend für eine Analyse auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden. Durch den Nachweis einer entsprechenden Bande im Gel, könnte festgestellt werden, ob mRNA-Moleküle während des Transkriptionsschrittes synthetisiert werden konnten.

Da mit Hilfe des „Human *In Vitro* Protein Expression Kit for DNA Templates“ keine ausreichende Proteinmenge hergestellt werden konnte, müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um herauszufinden was der Grund dafür ist. Um zu überprüfen, ob es an einem eventuellen Aktivitätsverlust des Lysats liegt, könnte der Translationsschritt mit einem anderen Kit, beziehungsweise mit einem selbst hergestellten Zellextrakt, durchgeführt werden. Dafür könnten auch andere eukaryotische, sowie prokaryotische Zellen als Basis verwendet werden. Weiterhin könnte eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese mit SYBR® Gold als

geeigneteren Nukleinsäure-Farbstoff durchgeführt werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, ob von dem *lacZ*-Gen mRNA transkribiert wurde. Zusätzlich könnte eine vorhergehende mRNA-Reinigung mit eventueller Konzentrierung durchgeführt werden. Um eine möglichst hohe mRNA-Ausbeute zu garantieren kann eine Reinigung der Plasmid-DNA mit Cäsiumchloridgradienten, Anionenaustauschersäulen oder Glasmilch durchgeführt werden [Mühlhardt, 2009]. Ein weiteres Experiment im Rahmen dieses Themas, wäre beispielsweise eine Aufreinigung des exprimierten Proteins mit Hilfe des Hexa-Histidin-Tags. Dieser könnte mit Nickelionen in einer Säule interagieren. Anschließend könnte der Western Blot mit anschließender Immunodetektion und das ONPG-Assay mit dem aufgereinigtem Protein durchgeführt und mit den vorherigen Ergebnissen verglichen werden. Konnte die Positivkontrolle sowie die β -Galactosidase erfolgreich exprimiert werden, könnte der pT7CFE1-CHis-GFP Vektor eingesetzt werden. Eine Möglichkeit für den Nachweis des erfolgreich exprimierten GFPs, wäre der Einsatz von entsprechenden proteinspezifischen Antikörpern oder Anti-His-Tag Antikörper. Alternativ könnte eine native PAGE durchgeführt werden. Aufgrund der fehlenden Detergenz-Komponente SDS, würde das GFP seine dreidimensionale Faltung und somit die Chromophor-Formation behalten. Im Gel müsste dann, mit Hilfe von UV-Licht, die entsprechende GFP-Bande grün leuchten. Auch hier könnte zuerst eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese mit dem geeigneteren Nukleinsäurefarbstoff SYBR® Gold durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob eine ausreichende Menge mRNA synthetisiert werden konnte. Das entstandene Gelbild könnte mit dem bereits vorhandenen Ergebnis verglichen werden, um hier eventuell neue Erkenntnisse zu erlangen.

Würde die *in vitro* Proteinexpression mit Hilfe dieses Kits funktionieren, könnten die empfohlenen optionalen Schritte der Kitanleitung, im Hinblick auf eine Steigerung der Ausbeute, überprüft werden. Eine Möglichkeit wäre, die fünf minütige Vorinkubation des Lysats mit den akzessorischen Proteinen zu vernachlässigen. Weiterhin könnte auf den RNase-Inhibitor verzichtet werden. Zusätzlich könnte die Variante mit einer erneuten Zugabe der Transkriptionslösung nach 2 h noch weiter überprüft werden. Mit Hilfe des ONPG-Assays könnte überprüft werden, in wie weit sich die Menge der aktiven β -Galactosidase ändert. Auch könnten die radioaktiv-markierten Aminosäuren eingesetzt werden, um die Proteine mit Hilfe der Autoradiographie zu detektieren. Nach einer entsprechend erfolgreichen Etablierung dieses Kits könnten noch weitere Proteine exprimiert werden und hinsichtlich neuer Fragestellungen, wie zum Beispiel funktioneller und struktureller Analysen, untersucht werden.

Literatur

Bücher

- [Becker et al., 1996] J. Becker, G. Caldwell, E. Zachgo: Biotechnology Laboratory Course, San Diego, Academic Press Inc., 2. Auflage, 1996, S.1
- [Chalfie et a., 2006] M. Chalfie, S. Kain: Green fluorescent protein: Properties, Applications and Protocols, New Jersey, Wiley-Interscience, 2. Auflage, 2006, S. 1
- [Clark et al., 2009] D. Clark, N. Pazdernik: Molekulare Biotechnologie-Grundlagen und Anwendungen, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2009
- [Graw, 2010] J. Graw: Genetik, Heidelberg, Springer Verlag, 5. Auflage, 2010
- [Mühlhardt, 2009] C. Mühlhardt: Der Experimentator-Molekularbiologie/Genomics, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage, 2009
- [Schenkel, 2006] J. Schenkel: Transgene Tiere, Berlin, Springer Verlag, 2. Auflage, 2006, S.6
- [Spirin, 2002] A. Spirin: Cell-Free Translation Systems, Berlin, Springer Verlag, 2002, S. 4

-
- [Swartz, 2003] J. Swartz: Cell-Free Protein Expression, Berlin, Springer Verlag, 2003
- [Wink, 2004] M. Wink: Molekulare Biotechnologie-Konzepte und Methoden, Weinheim, Wiley-Vch Verlag, 2004

Paper

- [Alakhov et al., 1993] J. Alakhov, V. Baranov, S. Ovodov, L. Ryabova, A. Spirin (1993): Method of obtaining polypeptides in cell-free translation system. freepatentsonline
- [Anema, 1964] P. Anema (1964): Purification and some properties of β -galactosidase of *Bacillus Subtilis*. Biochimica et Biophysica acta 89:495
- [Cody et al., 1993] C. Cody, D. Prasher, W. Westler, F. Prendergast, W. Ward (1993): Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the aequorea green-fluorescent protein. Biochemistry 32(5): 1212
- [Cruz et al., 1999] R. Cruz, V. Cruz, J. Belote, M. Khenayfes, C. Dorta, L. Oliveira (1999): Properties of a new fungal β -galactosidase with potential application in the dairy industry. Revista de Microbiologia 30: 265
- [Elbaz et al., 2004] Y. Elbaz, S. Steiner-Mordoch, S. Schuldiner, T. Danieli (2004): In vitro Expression of the Multidrug Transporter EmrE Using the Rapid Translation System (RTS). Biochemica: 23
- [Huaiqiang et al., 2009]. Z. Huaiqiang, W. Lushan, G. Peiji (2009): Use of the contour approach for visualizing the dynamic behavior of intermediates during O-nitrophenyl- β -D-galactoside hydrolysis by β -galactosidase.

Process Biochemistry 44: 1374

- [Katrolia et al., 2011] P. Katrolia, Q. Yan, H. Jia, Y. Li, Z. Jiang, C. Song (2011): Molecular cloning and high-level expression of a β -galactosidase gene from *Paecilomyces aeruginus* in *Pichia pastoris*. Journal of Molecular Catalysis B 69: Enzymatic:112
- [Katzen et al., 2005] F. Katzen, G. Chang, W. Kudlicki (2005): The past, present and future of cell-free protein synthesis. TRENDS in Biotechnology 23: 150-155
- [Kim et al., 2007] D. Kim, J. Ahn, C. Choi (2007): Cell-Free Protein Synthesis. freepatentsonline
- [Kolb et al., 1996] V. Kolb, E. Makeyev, W. Ward, A. Spirin (1996): Synthesis and maturation of green fluorescent protein in a cell-free translation system. Biotechnologie Letters 18: 1447
- [Matthews, 2005] B. Matthews (2005): The structure of E.coli β -galactosidase. C. R. Biologies 328: 549
- [Orr et al., 1992] N. Orr, G. Orr, R. Hollingworth (1992): The Sf9 cell line as a model for studying insect octopamine-receptors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 22: 591
- [Spirin, 2003] A. Spirin (2003): Continuous cell-free translation systems: history of the invention, reaction modes, and applications: 2
- [Theuretzbacher, 1998] U. Theuretzbacher (1998): Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren. Chemotherapie Journal 4: 136

-
- [Tsien, 1998] R. Tsien (1998): The green fluorescent protein. Annual Review of Biochemistry 67: 509

Internetseiten

- [URL-1] Verfasser unbekannt: Cell-free *in vitro* Recombinant Protein Expression, URL:<<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4E53C1E3-5056-8A76-4E0E-DA9DEC1400D1>>, verfügbar am 18.08.2011
- [URL-2] Verfasser unbekannt: Getting started with human *in vitro* translation, URL:<<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=B9F793EE-E7A3-8CCF-B137-AEE281F977B0>>, verfügbar am 18.08.2011
- [URL-3] Verfasser unbekannt: Protein Expression, URL:<<http://www.promega.com/de-de/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/protein-expression/>>, verfügbar am 18.08.2011
- [URL-4] Verfasser unbekannt: Human In Vitro Protein Expression Kit, URL:<<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=EDB3A93E-5056-8A76-4EA0-1F4489020C8A>>, verfügbar am 18.08.2011
- [URL-5] Verfasser unbekannt: Human *In Vitro* Translation Products, URL:<<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=EDB0FD96-5056-8A76-4E08-99DA5DF1F072>>, verfügbar am 18.08.2011
- [URL-6] Verfasser unbekannt: His-tagged Proteins, URL:<<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=1470D72F-469A-424B-90F7-2EDBCFBD33FC>>, verfügbar am 18.08.2011

-
- [URL-7] Verfasser unbekannt: pT7CFE1 Expression Vector,
URL:<<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4BFDE151-5056-8A76-4EDE-996258BA9B14>>, verfügbar am 18.08.2011
- [URL-8] Verfasser unbekannt: Proteinisolierung,
URL:<http://hikwww8.fzk.de:8080/imb/bionmr/teaching/Bp_Proteinisolierung_Theorie_Chromatographie.pdf>, verfügbar am 18.08.2011
- [URL-9] Verfasser unbekannt: Grün leuchtende Bakterien,
URL:<<http://www.gymnasium-bethel.de/Schulleben/projekte/1biochem/gruenbak07/bakterien.htm>>, verfügbar am 18.08. 2011
- [URL-10] Verfasser unbekannt: Genetic Transformation of Bacteria with the gene for Green fluorescent Protein (GFP),
URL:<<http://www.westminster.edu/acad/sim/pdf/SpGLOTransformation.pdf>>, verfügbar am 18.08.2011
- [URL-11] J. Schlütter: Die unsterblichen Krebszellen der Henrietta Lacks,
URL:<<http://www.welt.de/gesundheit/article9762115/Die-unsterblichen-Krebszellen-der-Henrietta-Lacks.html>>, verfügbar am 18.08.2011
- [URL-12] Verfasser unbekannt: Blue Genes-Experiment zur Klonierung von Bakterien,
URL:<<http://www.sg.hdh.bw.schule.de/neu/bluegene.htm>>, verfügbar am 18.08.2011
- [URL-13] Verfasser unbekannt: Photometrie, Enzymologie,
URL:<<http://www.uni->

bc.gwdg.de/fileadmin/user_upload/Studenten/Begleitmaterial-PDF-PPT/Skripte%20zum%20Praktikum/Versuch1.pdf>, verfügbar am 18.08.2011

[URL-14] Verfasser unbekannt: Der β -Galactosidase-Test, URL:<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden/expressionsanalyse/lacz_test/lacz_test.vscml.html>, verfügbar am 18.08.2011

[URL-15] *P. Blank: GFP* oder das Grün fluoreszierendes Protein, URL:<<http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/293.htm>>, verfügbar am 18.08.2011

[URL-16] Verfasser unbekannt: Fluoreszierende Proteine, URL:<<http://www.ruhr-uni-bochum.de/ag-hovemann/mam/content/lehre/bachelor/gfp-zusatz.pdf>>, verfügbar am 18.08.2011

Sonstiges

[Applied Biosystems, 2011] In Vitro Translation: The Basics. Technical Resources

[Fisher BioReagents, 2011] SurePrep™ TrueTotal™ RNA Purification Kit, Fisher BioReagents®, 2011

[Fraunhofer, 2011] Biomoleküle vom Band, Pressemitteilung, Fraunhofer-Gesellschaft 17.03.2011

- [Darmstadt, 2005] Isolierung der β -Galactosidase aus *Kluyveromyces marxianus*, Biochemisches Grundpraktikum, 2005
- [Invitrogen, 2011] Nucleic Acid Gel Electrophoresis & Blotting: Nucleic Acid Stains, 2011
- [Kalmbach, 2005] R.Kalmbach (2005): *In vivo* und *in vitro* Expression von Membranproteinen am Beispiel archae- und eubakterieller Rhodopsine. Dissertation: S. 12
- [Promega, 2009] JM109 Competent Cells, Product Contents, 2009
- [Qiagen, 2005] EasyXpress™ Protein Synthesis Handbook, 2005

Anlagen

Teil 1: Sequenz pT7CFE1-CHis- <i>lacZ</i>	A-71
Teil 2: Sequenz pCFE- <i>GFP</i>	A-75
Teil 3: Extinktionswerte der Regressionsgeraden	A-77

Anlagen, Teil 1: Sequenz pT7CFE1-CHis-*lacZ*



Insert



Terminator

*lacZ*-Gen

Promotor

unterstrichen: ORF

Restriktionsenzyme: *Bam*HI, *Sal*I

*

Stopcodon

ATG (*Msc*I)

Poly(A)-tail



```

1  TAATACGACT  CACTATAGGG  CGAATTAATT  CCGGTTATTT  TCCACCATAT
   N T T  H Y R A  N * F  R L F  S T I L  Frame 2

51  TGCCGTCCTT  TGGCAATGTG  AGGGCCCGGA  AACCTGGCCC  TGTCTTCTTG
   P S F  G N V  R A R K  P G P  V F L  Frame 2

101  ACGAGCATTC  CTAGGGGTCT  TTCCCCTCTC  GCCAAAGGAA  TGCAAGGTCT
   T S I P  R G L  S P L  A K G M  Q G L  Frame 2

151  GTTGAATGTC  GTGAAGGAAG  CAGTTCCTCT  GGAAGCTTCT  TGAAGACAAA
   L N V  V K E A  V P L  E A S  * R Q T  Frame 2

201  CAACGTCTGT  AGCGACCCTT  TGCAGGCAGC  GGAACCCCCC  ACCTGGCGAC
   T S V  A T L  C R Q R  N P P  P G D  Frame 2

251  AGGTGCCTCT  GCGGCCAAAA  GCCACGTGTA  TAAGATACAC  CTGCAAAGGC
   R C L C  G Q K  P R V  * D T P  A K A  Frame 2

301  GGCACAACCC  CAGTGCCACG  TTGTGAGTTG  GATAGTTGTG  GAAAGAGTCA
   A Q P  Q C H V  V S W  I V V  E R V K  Frame 2

351  AATGGCTCAC  CTCAAGCGTA  TTCAACAAGG  GGCTGAAGGA  TGCCAGAAG
   W L T  S S V  F N K G  L K D  A Q K  Frame 2

401  GTACCCCAT  GTATGGGATC  TGATCTGGGG  CCTCGGTGCA  CATGCTTTAC
   V P H C  M G S  D L G  P R C T  C F T  Frame 2

451  ATGTGTTTAG  TCGAGGTAA  AAAACGTCTA  GGCCCCCGA  ACCACGGGGA
   C V *  S R L K  N V *  A P R  T T G T  Frame 2

                                     MscI
501  CGTGGTTTTC  CTTTGAAAA  CACGATGATA  ATATGGCCAC  CACCCATATG
   W F S  F E K  H D D N  M A T  T H M  Frame 2

BamHI
551  GGATCCTCTA  GCACTAGTCT  CGAGAAAGCG  GGCAGTGAGC  GCAACGCAAT
   G S S S  T S L  E K A  G S E R  N A I  Frame 2

601  TAATGTGACC  TAGGTACAT  TAATGGCACC  CCAGGCTTTA  CACTTTATGC
   N V T  * V T L  M A P  Q A L  H F M L  Frame 2

651  TTCCGGCTCG  TATGTTGTGT  GGAATTGTGA  GCGGATAACA  ATTCACACAG
   P A R  M L C  G I V S  G * Q  F T Q  Frame 2

701  GAAACAGCTA  TGACCATGAT  TACGAATTCA  CTGGCCGTCT  TTTTACAACG
   E T A M  T M I  T N S  L A V V  L Q R  Frame 2

751  TCGTGACTGG  GAAAACCCTG  GCGTTACCCA  ACTTAATCGC  CTTGCAGCAC
   R D W  E N P G  V T Q  L N R  L A A H  Frame 2

```

801	ATCCCCCTTT	CGCCAGCTGG	CGTAATAGCG	AAGAGGCCCG	CACCGATCGC	
	P P F	A S W	R N S	E E A	R T D	Frame 2
851	CCTTCCCAAC	AGTTGCGCAG	CCTGAATGGC	GAATGGCGCT	TTGCCTGGTT	
	P S Q Q	L R S	L N G	E W R	F A W	Frame 2
901	TCCGGCACCA	GAAGCGGTGC	CGGAAAGCTG	GCTGGAGTGC	GATCTTCCTG	
	P A P	E A V	P E S	W L E	C D L	Frame 2
951	AGGCCGATAC	TGTCGTCGTC	CCCTCAAAC	GGCAGATGCA	CGGTTACGAT	
	A D T	V V V	P S N	W Q M	H G Y	Frame 2
1001	GCGCCCATCT	ACACCAACGT	AACCTATCCC	ATTACGGTCA	ATCCGCCGTT	
	A P I	Y T N	V T Y	P I T	V N P	Frame 2
1051	TGTTCCACAG	GAGAATCCGA	CGGGTTGTTA	CTCGCTCACA	TTTAATGTTG	
	V P T	E N P	T G C	Y S L	T F N	Frame 2
1101	ATGAAAGCTG	GCTACAGGAA	GGCCAGACGC	GAATTATTTT	TGATGGCGTT	
	E S W	L Q E	G Q T	R I I	F D G	Frame 2
1151	AACTCGGCGT	TTCATCTGTG	GTGCAACGGG	CGCTGGGTCG	GTTACGGCCA	
	N S A	F H L	W C N	G R W	V G Y	Frame 2
1201	GGACAGTCGT	TTGCCGCTCG	AATTTGACCT	GAGCGCATTT	TTACGCGCCG	
	D S R	L P S	E F D	L S A	F L R	Frame 2
1251	GAGAAAACCG	CCTCGCGGTG	ATGGTGCTGC	GTTGGAGTGA	CGGCAGTTAT	
	E N R	L A V	M V L	R W S	D G S	Frame 2
1301	CTGGAAGATC	AGGATATGTG	GCGGATGAGC	GGCATTTCCT	GTGACGTCTC	
	L E D	Q D M	W R M	S G I	F R D	Frame 2
1351	GTTGCTGCAT	AAACCGACTA	CACAAATCAG	CGATTTCAT	GTTGCCACTC	
	L L H	K P T	T Q I	S D F	H V A	Frame 2
1401	GCTTTAATGA	TGATTTCAGC	CGCGCTGTAC	TGGAGGCTGA	AGTTCAGATG	
	F N D	D F S	R A V	L E A	E V Q	Frame 2
1451	TGCGGCGAGT	TGCGTGAATA	CCTACGGGTA	ACAGTTTCTT	TATGGCAGGG	
	C G E	L R D	Y L R	V T V	S L W	Frame 2
1501	TGAAACGCAG	GTCCGCCAGC	GCACCGCGCC	TTTCGCGGGT	GAAATTATCG	
	E T Q	V A S	G T A	P F G	G E I	Frame 2
1551	ATGAGCGTGG	TGGTTATGCC	GATCGCGTCA	CACCTACGCT	GAACGTCGAA	
	E R G	G Y A	D R V	T L R	L N V	Frame 2
1601	AACCCGAAAC	TGTGGAGCGC	CGAAATCCCG	AATCTCTATC	GTGCGGTGGT	
	N P K	L W S	A E I	P N L	Y R A	Frame 2
1651	TGAACTGCAC	ACCGCCGACG	GCACGCTGAT	TGAAGCAGAA	GCCTGCGATG	
	E L H	T A D	G T L	I E A	E A C	Frame 2
1701	TCGGTTTCCG	CGAGGTGCGG	ATTGAAAATG	GTCTGCTGCT	GCTGAACGGC	
	G F R	E V R	I E N	G L L	L L N	Frame 2
1751	AAGCCGTTGC	TGATTCGAGG	CGTTAACCGT	CACGAGCATC	ATCCTCTGCA	
	K P L	L I R	G V N	R H E	H H P	Frame 2
1801	TGGTCAGGTC	ATGGATGAGC	AGACGATGGT	GCAGGATATC	CTGCTGATGA	
	G Q V	M D E	Q T M	V Q D	I L L	Frame 2
1851	AGCAGAACAA	CTTTAACGCC	GTGCGCTGTT	CGCATTATCC	GAACCATCCG	
	Q N N	F N A	V R C	S H Y	P N H	Frame 2
1901	CTGTGGTACA	CGCTGTGCGA	CCGCTACGGC	CTGTATGTGG	TGGATGAAGC	
	L W Y	T L C	D R Y	G L Y	V V D	Frame 2

1951 CAATATTGAA ACCCACGGCA TGGTGCCAAT GAATCGTCTG ACCGATGATC
N I E T H G M V P M N R L T D D P Frame 2

2001 CGCGCTGGCT ACCGGCGATG AGCGAACGCG TAACGCGAAT GGTGCAGCGC
R W L P A M S E R V T R M V Q R Frame 2

2051 GATCGTAATC ACCCGAGTGT GATCATCTGG TCGCTGGGGA ATGAATCAGG
D R N H P S V I I W S L G N E S G Frame 2

2101 CCACGGCGCT AATCACGACG CGCTGTATCG CTGGATCAAA TCTGTGATC
H G A N H D A L Y R W I K S V D P Frame 2

2151 CTTCCCGCCC GGTGCAGTAT GAAGCGGCG GAGCCGACAC CACGGCCACC
S R P V Q Y E G G G A D T T A T Frame 2

2201 GATATTATTT GCCCGATGTA CGCGCGCGTG GATGAAGACC AGCCCTTCCC
D I I C P M Y A R V D E D Q P F P Frame 2

2251 GGCTGTGCCG AAATGGTCCA TCAAAAATG GCTTTCGCTA CCTGGAGAGA
A V P K W S I K K W L S L P G E T Frame 2

2301 CGCGCCCGCT GATCCTTTCG GAATACGCC ACGCGATGGG TAACAGTCTT
R P L I L C E Y A H A M G N S L Frame 2

2351 GGCGGTTTCG CTAATACTG GCAGGCGTTT CGTCAGTATC CCCGTTTACA
G G F A K Y W Q A F R Q Y P R L Q Frame 2

2401 GGGCGGCTTC GTCTGGGACT GGGTGGATCA GTCGCTGATT AAATATGATG
G G F V W D W V D Q S L I K Y D E Frame 2

2451 AAAACGGCAA CCCGTGGTCG GCTTACGGCG GTGATTTTGG CGATACGCCG
N G N P W S A Y G G D F G D T P Frame 2

2501 AACGATCGCC AGTTCTGTAT GAACGGTCTG GTCTTTGCCG ACCGCACGCC
N D R Q F C M N G L V F A D R T P Frame 2

2551 GCATCCAGCG CTGACGGAAG CAAAACACCA GCAGCAGTTT TTCCAGTTCC
H P A L T E A K H Q Q Q F F Q F R Frame 2

2601 GTTTATCCGG GCAAACCATC GAAGTGACCA GCGAATACCT GTTCCGTCAT
L S G Q T I E V T S E Y L F R H Frame 2

2651 AGCGATAACG AGCTCCTGCA CTGGATGGTG GCGCTGGATG GTAAGCCGCT
S D N E L L H W M V A L D G K P L Frame 2

2701 GGCAAGCGGT GAAGTGCCCTC TGGATGTCGC TCCACAAGGT AAACAGTTGA
A S G E V P L D V A P Q G K Q L I Frame 2

2751 TTGAAGTCC TGAAGTACCG CAGCCGAGGA GCGCCGGCA ACTCTGGCTC
E L P E L P Q P E S A G Q L W L Frame 2

2801 ACAGTACGCG TAGTGCAACC GAACGCGACC GCATGGTCAG AAGCCGGGCA
T V R V V Q P N A T A W S E A G H Frame 2

2851 CATCAGCGCC TGGCAGCAGT GGCCTCTGGC GGAAAACCTC AGTGTGACGC
I S A W Q Q W R L A E N L S V T L Frame 2

2901 TCCCCGCCGC GTCCCACGCC ATCCCGCATC TGACCACCAG CGAAATGGAT
P A A S H A I P H L T T S E M D Frame 2

2951 TTTTGCATCG AGCTGGGTAA TAAGCGTTGG CAATTTAACC GCCAGTCAGG
F C I E L G N K R W Q F N R Q S G Frame 2

3001 CTTTCTTTCA CAGATGTGGA TTGGCGATAA AAAACAACCTG CTGACGCCGC
F L S Q M W I G D K K Q L L T P L Frame 2

3051	TGCGCGATCA GTTCACCCGT GCACCGCTGG ATAACGACAT TGGCGTAAGT	
	R D Q F T R A P L D N D I G V S	Frame 2
3101	GAAGCGACCC GCATTGACCC TAACGCCTGG GTCGAACGCT GGAAGGCGGC	
	E A T R I D P N A W V E R W K A A	Frame 2
3151	GGGCCATTAC CAGGCCGAAG CAGCGTTGTT GCAGTGCACG GCAGATACAC	
	G H Y Q A E A A L L Q C T A D T L	Frame 2
3201	TTGCTGATGC GGTGCTGATT ACGACCGCTC ACGCGTGGCA GCATCAGGGG	
	A D A V L I T T A H A W Q H Q G	Frame 2
3251	AAAACCTTAT TTATCAGCCG GAAAACCTAC CGGATTGATG GTAGTGGTCA	
	K T L F I S R K T Y R I D G S G Q	Frame 2
3301	AATGGCGATT ACCGTTGATG TTGAAGTGGC GAGCGATACA CCGCATCCGG	
	M A I T V D V E V A S D T P H P A	Frame 2
3351	CGCGGATTGG CCTGAACTGC CAGCTGGCGC AGGTAGCAGA GCGGGTAAAC	
	R I G L N C Q L A Q V A E R V N	Frame 2
3401	TGGCTCGGAT TAGGGCCGCA AGAAAACCTAT CCCGACCGCC TTACTGCCGC	
	W L G L G P Q E N Y P D R L T A A	Frame 2
3451	CTGTTTTGAC CGCTGGGATC TGCCATTGTC AGACATGTAT ACCCCGTACG	
	C F D R W D L P L S D M Y T P Y V	Frame 2
3501	TCTTCCCGAG CGAAAACGGT CTGCGCTGCG GGACGCGCGA ATTGAATTAT	
	F P S E N G L R C G T R E L N Y	Frame 2
3551	GGCCACACC AGTGGCGCGG CGACTTCCAG TTCAACATCA GCCGCTACAG	
	G P H Q W R G D F Q F N I S R Y S	Frame 2
3601	TCAACAGCAA CTGATGGAAA CCAGCCATCG CCATCTGCTG CACGCGGAAG	
	Q Q Q L M E T S H R H L L H A E E	Frame 2
3651	AAGGCACATG GCTGAATATC GACGGTTTCC ATATGGGGAT TGGTGGCGAC	
	G T W L N I D G F H M G I G G D	Frame 2
3701	GACTCCTGGA GCCCGTCAGT ATCGGCGGAA TTCCAGCTGA GCGCCGGTCC	
	D S W S P S V S A E F Q L S A G R	Frame 2
3751	CTACCATTAC CAGTTGGTCT GGTGTCAAAA ATAATAATAA CCGGGCAGGC	
	Y H Y Q L V W C Q K * * * P G R P	Frame 2
	<i>SaI</i>	
3801	CATGTCTGCC CGTATTTGCT AGAGTCGACG CGGCCGCACT CGAGCACCAC	
	C L P V F A R V D A A A L E H H	Frame 2
3851	CACCACCACC ACTGAGATCT GACTGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	
	H H H H * D L T E K K K K K K K K	Frame 2
3901	AAAAA GTTTA AACACTAGTC CGCTGAGCAA TAACTAGCAT AACCCCTTGG	
	K S L N T S P L S N N * H N P L G	Frame 2
3951	GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGA ACTATAT	
	P L N G S * G V F C * K E E L Y	Frame 2
4001	CGGGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC	
	P G F L A H * L A A L G R S A A A	Frame 2
.		
.		
6851	CCAGTGAATT G	
	P V N	Frame 2

Anlagen, Teil 2: Sequenz des Kontrollplasmid pCFE-GFP

	Insert		Poly(A)-tail
<u> </u>	ORF		ATG (<i>MscI</i>)
*	Stopcodon		Terminator

```

1  GGGCGAATTA ATTCCGGTTA TTTTCCACCA TATTGCCGTC TTTTGGCAAT
   A N * F R L F S T I L P S F G N      Frame 3

51  GTGAGGGCCC GGAAACCTGG CCCTGTCTTC TTGACGAGCA TTCCTAGGGG
   V R A R K P G P V F L T S I P R G      Frame 3

101 TCTTTCCCCT CTCGCCAAAG GAATGCAAGG TCTGTTGAAT GTCGTGAAGG
   L S P L A K G M Q G L L N V V K E      Frame 3

151 AAGCAGTTCC TCTGGAAGCT TCTTGAAGAC AAACAACGTC TGTAGCGACC
   A V P L E A S * R Q T T S V A T      Frame 3

201 CTTTGCAGGC AGCGGAACCC CCCACCTGGC GACAGGTGCC TCTGCGGCCA
   L C R Q R N P P P G D R C L C G Q      Frame 3

251 AAAGCCACGT GTATAAGATA CACCTGCAAA GGCGGCACAA CCCCAGTGCC
   K P R V * D T P A K A A Q P Q C H      Frame 3

301 ACGTTGTGAG TTGGATAGTT GTGGAAAGAG TCAAATGGCT CACCTCAAGC
   V V S W I V V E R V K W L T S S      Frame 3

351 GTATTCAACA AGGGGCTGAA GGATGCCCAG AAGGTACCCC ATTGTATGGG
   V F N K G L K D A Q K V P H C M G      Frame 3

401 ATCTGATCTG GGGCCTCGGT GCACATGCTT TACATGTGTT TAGTCGAGGT
   S D L G P R C T C F T C V * S R L      Frame 3

451 TAAAAACGCT CTAGGCCCCC CGAACACGGG GGACGTGGTT TTCCTTTGAA
   K N V * A P R T T G T W F S F E      Frame 3

                                     MscI
501 AAACACGATG ATAATATGGC CACCACCCAT ATGGAGAGCG ACGAGAGCGG
   K H D D N M A T T H M E S D E S G      Frame 3

551 CCTGCCCGCC ATGGAGATCG AGTGCCGCAT CACCGGCACC CTGAACGGCG
   L P A M E I E C R I T G T L N G V      Frame 3

601 TGGAGTTCGA GCTGGTGGGC GCGGAGAGG GCACCCCGA GCAGGGCCGC
   E F E L V G G G E G T P E Q G R      Frame 3

651 ATGACCAACA AGATGAAGAG CACCAAAGC GCCCTGACCT TCAGCCCTA
   M T N K M K S T K G A L T F S P Y      Frame 3

701 CCTGCTGAGC CACGTGATGG GCTACGGCTT CTACCACTTC GGCACCTACC
   L L S H V M G Y G F Y H F G T Y P      Frame 3

751 CCAGCGGCTA CGAGAACCCC TTCCTGCACG CCATCAACAA CGGCGGCTAC
   S G Y E N P F L H A I N N G G Y      Frame 3

801 ACCAACACCC GCATCGAGAA GTACGAGGAC GCGGCGTGC TGCACGTGAG
   T N T R I E K Y E D G G V L H V S      Frame 3

851 CTTACGCTAC CGCTACGAGG CCGGCCCGCT GATCGGCGAC TTCAAGGTGA
   F S Y R Y E A G R V I G D F K V M      Frame 3

```

901 TGGGCACCGG CTTCCCCGAG GACAGCGTGA TCTTCACCGA CAAGATCATC
 G T G F P E D S V I F T D K I I Frame 3

951 CGCAGCAACG CCACCGTGGG GCACCTGCAC CCCATGGGCG ATAACGATCT
 R S N A T V E H L H P M G D N D L Frame 3

1001 GGATGGCAGC TTCACCCGCA CCTTCAGCCT GCGCGACGGC GGCTACTACA
 D G S F T R T F S L R D G G Y Y S Frame 3

1051 GCTCCGTGGT GGACAGCCAC ATGCACTTCA AGAGCGCCAT CCACCCAGC
 S V V D S H M H F K S A I H P S Frame 3

1101 ATCCTGCAGA ACGGGGGCCC CATGTTCGCC TTCCGCCGCG TGGAGGAGGA
 I L Q N G G P M F A F R R V E E D Frame 3

1151 TCACAGCAAC ACCGAGCTGG GCATCGTGGG GTACCAGCAC GCCTTCAAGA
 H S N T E L G I V E Y Q H A F K T Frame 3

1201 CCCC GGATGC AGATGCCGGT GAAGAACTCG AGCACCACCA CCACCACCAC
 P D A D A G E E L E H H H H H H H Frame 3

1251 TGAGATCTGA CTGAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAGTTTAAA
 * D L T E K K K K K K K K S L N Frame 3

1301 CACTAGTCCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCCCTTGGGG CCTCTAAACG
 T S P L S N N * H N P L G P L N G Frame 3

1351 GGTCTTGAGG GGTTTTTTGC TGAAAGGAGG AACTATATCC GGGCTTCCTC
 S * G V F C * K E E L Y P G F L Frame 3

.
 .
 .

4251 AATACGACTC ACTATA
 N T T H Y Frame 3

Anlagen, Teil 3: Extinktionswerte der Regressionsgeraden

Wellenlänge [nm]	Extinktion	
	β -Galactosidase (1:10)	GFP (1:10)
200	-0,003	-0,012
201	-0,007	-0,019
202	-0,001	-0,014
203	-0,005	-0,018
204	-0,027	-0,028
205	-0,047	-0,041
206	-0,055	-0,058
207	-0,056	-0,064
208	-0,066	-0,071
209	-0,078	-0,077
210	-0,086	-0,08
211	-0,098	-0,099
212	-0,114	-0,121
213	-0,127	-0,129
214	-0,136	-0,139
215	-0,134	-0,138
216	-0,127	-0,129
217	-0,12	-0,12
218	-0,107	-0,103
219	-0,094	-0,086
220	-0,081	-0,068
221	-0,068	-0,049
222	-0,058	-0,036
223	-0,05	-0,026
224	-0,042	-0,018
225	-0,039	-0,015
226	-0,039	-0,015
227	-0,04	-0,016
228	-0,043	-0,018
229	-0,046	-0,021
230	-0,05	-0,025

231	-0,054	-0,03
232	-0,057	-0,035
233	-0,062	-0,04
234	-0,069	-0,039
235	-0,075	-0,056
236	-0,082	-0,064
237	-0,091	-0,074
238	-0,097	-0,082
239	-0,105	-0,091
240	-0,115	-0,103
241	-0,124	-0,114
242	-0,132	-0,124
243	-0,141	-0,135
244	-0,146	-0,142
245	-0,151	-0,15
246	-0,159	-0,161
247	-0,168	-0,171
248	-0,175	-0,18
249	-0,18	-0,188
250	-0,184	-0,194
251	-0,187	-0,198
252	-0,19	-0,204
253	-0,194	-0,209
254	-0,197	-0,213
255	-0,199	-0,216
256	-0,2	-0,219
257	-0,201	-0,222
258	-0,204	-0,225
259	-0,207	-0,227
260	-0,208	-0,229
261	-0,209	-0,231
262	-0,209	-0,231
263	-0,207	-0,228
264	-0,202	-0,224
265	-0,199	-0,221
266	-0,196	-0,217
267	-0,193	-0,212
268	-0,19	-0,208
269	-0,186	-0,204
270	-0,18	-0,196
271	-0,173	-0,187
272	-0,167	-0,179
273	-0,158	-0,169
274	-0,15	-0,16
275	-0,142	-0,15

276	-0,13	-0,135
277	-0,119	-0,122
278	-0,109	-0,11
279	-0,096	-0,094
280	-0,085	-0,08
281	-0,073	-0,066
282	-0,059	-0,049
283	-0,048	-0,037
284	-0,038	-0,024
285	-0,023	-0,008
286	-0,012	0,005
287	-0,002	0,016
288	0,011	0,03
289	0,021	0,041
290	0,031	0,052
291	0,043	0,065
292	0,05	0,073
293	0,056	0,08
294	0,063	0,087
295	0,068	0,092
296	0,071	0,096
297	0,074	0,098
298	0,075	0,1
299	0,076	0,101
300	0,077	0,101

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 25. August 2011

Julia Stiehler