

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellen von Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Amersham-Bioscience Europe GmbH, Freiburg (GE Healthcare)

[γ 32 P]-Adenosine-5'-triphosphate (PB 10218)

Bovine Serum Albumine (BSA, RNase/DNase Free; 2,6 mg/ml), (27-8914-02)

ECL Kit für Westernblots (RPN2108)

L-[4,5- 3 H]-Leucin (TRK 510)

L-[4- 3 H]-Phenylalanin (TRK 204)

L-[U- 14 C]-Phenylalanin (CFB 70)

Poly(A), (27-4110-01)

Poly(U), (27-4440-02)

L-(methyl- 14 C)-Methionin

Biorad, Richmond (USA)

Ammoniumperoxodisulphat

2x Laemmli Sample Buffer (161-0737)

2x Native Sample Buffer (161-0738)

Premixed 10x SDS-Tris-Glycine Buffer (161-0732)

Premixed 10x Tris-Glycine Buffer (161-0734)

Sodium-dodecyl-sulfate (SDS), (161-0301)

Beckman

Ultrazentrifugen Becher (Ultra-Clear) SW 60, SW40 and SW28, (344060, 344058)

Calbiochem, Frankfurt

HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure), Free Acid, ULTROL®
Grade (391338)

Difco, Detroit (USA)

Bacto agar®

Bacto tryptone®

Yeast extract

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat

Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat

Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat

Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat

Didesoxy-Adenosin-5'-triphosphat

Didesoxy-Cytidin-5'-triphosphat

Didesoxy-Guanosin-5'-triphosphat

Didesoxy-Thymidin-5'-triphosphat

AMV Reverse Transkriptase

MMLV Reverse Transkriptase

Polynukleotid-Kinase (aus E. coli)

Polynucleotid-Kinase (aus T4 Phage)

2x Loading Dye Solution for RNA electrophoresis (#R 0641)

6x Loading Dye Solution (#R 0611)

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder RNA ladder (#SM 0241)

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (#SM 0311)

RNA Ladder, Low Range (#SM 0411)

T4 DNA Ligase, (#EL 0015)

Fluka, Neu-Ulm

Spermidin

Spermin

Harnstoff (Fluka 02493, 2,5 kg, Sequenziergrad)

Gibco-BRL, Eggenstein

Agarose (Ultra pure)

Urea (Ultrapure)

Saccharose (Ultrapure)

TEMED (NNN`N`-Tetramethylethyldiamin)

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Topo TA cloning® kit

Quick change® site directed mutageneses kit

Merck, Darmstadt

Alle Chemikalien, die im Labor benutzt wurden und nicht gesondert aufgeführt sind stammen von Merck, z.B. Bromphenolblau, Ethidiumbromid (1%), Tris ((Tris-hydroxymethyl)-aminomethan), Xylencyanol...

Millipore

Filters 0,45 µm (HAW02500)

Packard, Frankfurt

Filter Count (Szintillations-Flüssigkeit)

Promega

DualGlo™ Luciferase Assay System

SteadyGlo™ Luciferase Assay System

Qiagen, Hilden

Qiagen Maxi Prep® Tip 500

Qiagen Midi Prep® Tip 100

Qiagen Mini Prep®

QIAquick® PCR Purification kit

QIAquick® Nucleotide Removal kit

QIAquick®Gel Extraction Kit

Ni-NTA Agarose (100 ml), (30 230)

Roche Pharmaceuticals

1,4-Dithiothreitol (DTT) (1 583 786)

DNase I, RNase-free (10 776 785 001)

dNTPs für PCR: dATP, dCTP, dGTP, dUTP

(1 051 440, 1 051 458, 1 051 466, 1 420 470)

Phosphatase, alkaline (AP) from calf intestine (713 023)

Polynucleotide kinase (174 645)

Pyruvate kinase (PK), (109 045)

Rapid Translation System 100, RTS 100 *E. coli* HY Kit (3 186 156)

tRNA^{bulk} from *E. coli* MRE 600 (RNase negative), (109 550)

Roth, Karlsruhe

1,4-Dithioerythritol (DTE), (8814.1)

Ampicillin (K029.2)

Isopropylthiogalaktosid IPTG 25g (2316.4)

Phenol (0040.2)

Roti-Mark STANDARD 1 ml (T851.1)

Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), (3029.1)

Rotiphorese® Gel 40 (19:1), (3030.1)

Trichloroacetic acid (TCA), (8789.1)

Sartorius, Göttingen

Nitrozellulose Filter (Nr. 11306)

Schleicher and Schüll

Glass Fibre Filters Ø23 mm (10 370 021)

Faltenfilter 595 ½ (10311647) Φ=185 mm

Serva

Aluminiumoxid Alcoa A-305 (12293)

Coomassie[®] Brilliant Blue G-250 (17524)

Coomassie[®] Brilliant Blue R-250 (17525)

Sigma, Deisenhofen

Albumin, bovine (A-7906)

Ficol 400 (F-4375)

Formaldehyde (F-8775)

Lithium potassium acetyl phosphate (A 0262)

Lysozyme (L-6876)

ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix with MgCl₂ (P-4600)

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

2.2.1 Bakterienstämme

MRE 600

Der *E. coli* Stamm MRE600 ist ein prototropher „wildtype“ Stamm, der aus südafrikanischen Bodenproben isoliert wurde. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine extrem reduzierte RNaseI Aktivität (0,2% von wt K12) aus (Vanatalu et al., 1993).

CAN20-12E

Dieser Stamm ist ein Rnase defizientes K12 Derivat (RNase BN, II, D , I) (Zaniewski et al., 1984). Er wird standardmäßig zur Isolierung von Ribosomen eingesetzt. Dieser Stamm trägt eine Tetrazyklin Resistenz.

DH5α

DH5α ist ein Rekombinations-defizienter *E. coli*-Stamm, der durch die Mutation im *lacZ*-Gen die α-Komplementation mit Plasmid-kodiertem α-Fragment (*LacZ*; N-terminales β-Galaktosidasefragment) erlaubt. Bei Transformation mit Plasmiden, die eine blau/weiß-Selektion ermöglichen, lassen sich Klone mit re-ligierten Vektoren von Klonen unterscheiden, die Vektoren mit Insertionen enthalten.

HB101

Ein *E. coli*-Hybridstamm aus den Stämmen K12 und B. Dieser Rekombinations-defiziente Laborstamm eignet sich für die Plasmidpropagierung und für die Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA. Durch eine Mutation im ribosomalen Protein S12(*rpsL20*) weist dieser Stamm eine Streptomycin-Resistenz auf.

XL1-Blue

XL1-Blue ist ein Rekombinations-defizienter *E. coli*-Stamm, der durch die Mutation im *lacZ*-Gen die α -Komplementation mit Plasmid-kodiertem α -Fragment (*lacZ'*; N-terminales β -Galaktosidasefragment) erlaubt. Bei Transformation mit Plasmiden, die eine blau/weiß-Selektion ermöglichen, lassen sich Klone mit re-ligierten Vektoren von Klonen unterscheiden, die Vektoren mit Insertionen enthalten.

BL21(DE3)

Expressionsstamm für T7 Promotor basierende Expressionssysteme. Dieser Stamm zeichnet sich durch reduzierte Proteaseaktivität aus ($F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal bcm$ (DE3)).

CL5

CL5 ist ein temperatursensitiver *E. coli*-Stamm, der durch die Insertion einer Tetrazyklinresistenz-Kassette in das Gen für RF3 (*prfC*) die Fähigkeit verloren hat, bei niedrigeren Temperaturen (20-30 °C) zu wachsen (Pavlov et al., 1997a).

FTP4993

Der Stamm [FTP4993](#) ist der Kontrollstamm zu CL5.

Die Stämme CL5 und FTP4991 wurden freundlicher Weise von Prof. Dr. R. Buckingham (Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, F-75005 Paris) zur Verfügung gestellt.

$\Delta 7$ (AVS69009)

Der *E. coli*-Stamm AVS69009 (oder auch $\Delta 7$) trägt eine Deletion der 16S und 23S rRNA in allen sieben chromosomalen rRNA Operons (Asai et al., 1999).

Die Synthese der rRNA Moleküle erfolgt in diesem Stamm nur von einem Multicopy-Plasmid, welches ein einzelnes rRNA Operon (*rrnB*) trägt.

Zur Analyse der Funktion der ribosomalen E-Stelle wurde ein Derivat des oben genannten Stammes, welcher das Plasmid pLK1192U mit einer Punktmutation an der Position C2394G der 23S rRNA trägt, verwendet. Dieser Stamm und der $\Delta 7$ (AVS69009) wt (Sergiev et al.,

2005) wurden freundlicherweise von der Dr Petr Sergiev und Mitarbeiter der Moscow State University zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Plasmide

pCR[®] II-Topo[®]

Der pCR[®] II-Topo[®]-Vektor ist Bestandteil des TopoTA Cloning[®] Kits (Invitrogen). Dieser Vektor wird linearisiert geliefert. Die einzelnen 3' Thymidinüberhänge und die kovalent gebundene Topoisomerase erlauben die sehr schnelle Ligation von *Taq*-Polymerase (*Thermus aquaticus*) amplifizierten PCR-Produkten. Die Vektorkarte des pCR[®] II-Topo[®] ist unter der folgenden Internet-Adresse einzusehen:

<http://www.invitrogen.com>

pQE-70

Der Vektor pQE-70 (QIAGEN) ist ein Expressionsvektor, der es erlaubt, dem klonierten codierenden Bereich eine C-terminale Hexahistidin-Markierung zur Isolierung anzufügen, die die chromatographische Isolierung und Reinigung des Proteins ermöglicht.

Die Vektorkarte ist unter der folgenden Internet-Adresse einzusehen:

<http://QIAGEN.com>

pQE-60

Der Vektor pQE-60 (QIAGEN) ist ein Expressionsvektor, der es erlaubt dem klonierten codierenden Bereich eine C-terminale Hexahistidin-Markierung zur Isolierung anzufügen, die die chromatographische Isolierung und Reinigung des Proteins ermöglicht.

<http://QIAGEN.com>

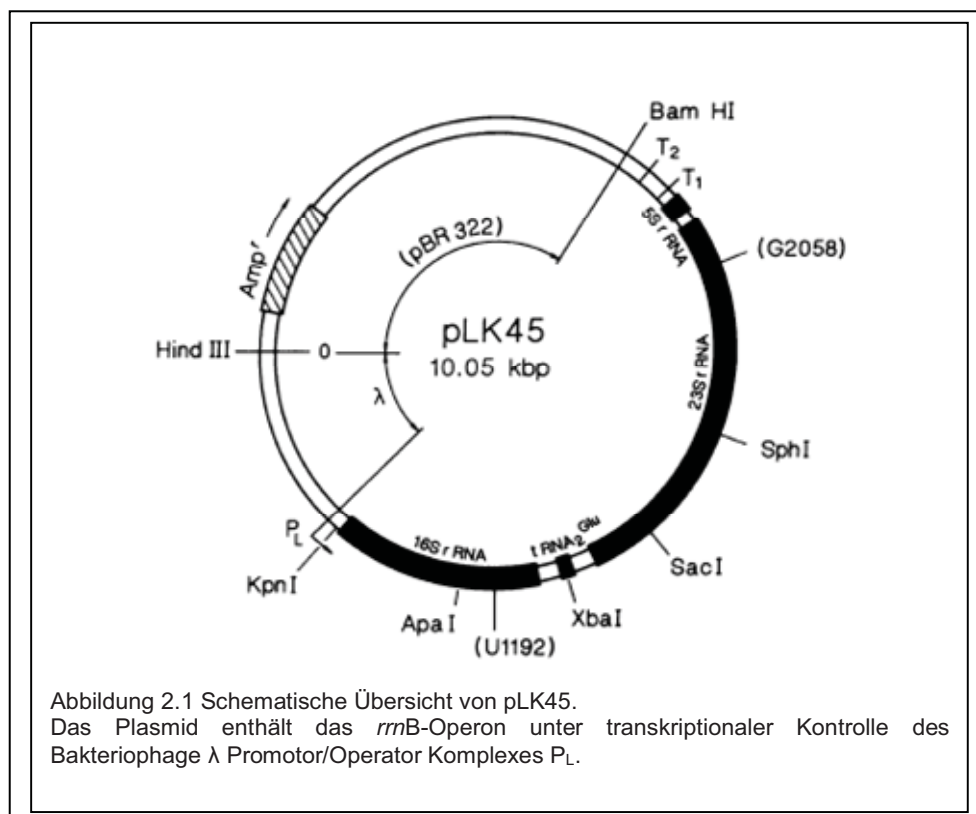
pSP65

Der Vektor psp65 (Promega) ist ein sehr einfacher Vektor, der zur Klonierung von Konstrukten für T7 *in vitro*-Transkription eingesetzt werden kann. Dieser Vektor trägt ein β -Lactamase-Gen zur Selektion und den SP6 Promotor vor der Polylinkerregion (MCS = multiple cloning site). Durch diese geringe Ausstattung ist dieser Vektor besonders geeignet für die Aufnahme spezieller DNA Fragmente für die RNA Synthese. Die Vektorkarte des pSP65 ist auf der folgenden Internetseite zu finden:

<http://www.promega.com/vectors/allvectors.htm>

pLK1192U (pLK45)

pLK45 ist ein pBR322 Derivat (Powers and Noller, 1990). Es verleiht Resistenz gegen Ampicillin und enthält das gesamte *rrnB*-Operon unter transkriptionaler Kontrolle des Bakteriophage λ Promotor/Operator Komplexes P_L . Das *rrnB* Operon wird konstitutiv exprimiert, da keine Bakteriophage λ Repressorgene vorhanden sind. pLK1192U ist identisch mit pLK45, bis auf die Spectinomycinresistenz-verleihende Mutation C1192U im 16S rRNA Gen.



pKK1067U (pKK3535)

pKK3535 (Abbildung 2.1) ist ebenfalls ein pBR322 Derivat (Brosius et al., 1981). Es verleiht Resistenz gegen Ampicillin und enthält das gesamte *rrnB*-Operon unter Kontrolle der natürlichen Promotoren P_1 und P_2 . Das Operon wird daher konstitutiv exprimiert. pKK1067U (Thompson et al., 1988) ist identisch mit pKK3535, bis auf die Thiostreptonresistenz-verleihende Mutation A1067U im 23S rRNA Gen.

pET-14b Vektor (Novagen)

Dieser Vektor erlaubt Klonierung von DNA zur die Markierung von Proteinen mit Hexahistidin am N-Terminus, die durch die folgende Thrombinschnittstelle entfernt werden kann. Das Gen befindet sich unter der Kontrolle eines T7 Promotors. Die Selektion kann mit Hilfe der Resistenz gegen Ampicilin erfolgen.

<http://www.novagen.com>

2.3 Puffer, Lösungen und mikrobiologische Medien

2.3.1 Gellösungen und Elektrophoresepuffer

2.3.1.1 Agarosegele

10X TBE-Puffer	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	9,6 g
	Wasser (MQ)	ad 1000 ml

Agarosegellösung (n%)	10X Puffer	10 ml
	Agarose	n x g
	Ethidiumbromid (1%)	5 µl
	Wasser (MQ)	100 ml

6X Probenpuffer	Ficoll 400	15% (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 (w/v)
	Xylencyanol	0,25(w/v)

Elektrophoresepuffer (1X TBE)	10X TBE	100 ml
	Wasser (MQ)	ad 1000 ml

2.3.1.2 Protein-SDS-Polyacrylamidgele

Acrylamidvorratslösung (37,5:1)	Roti40 für Proteine
----------------------------------	---------------------

Sammelgelpuffer	Tris	60 g
(0,5 M Tris-HCl pH 6,8)	Wasser (MQ)	800 ml
	mit konz. HCl auf pH=6,8 einstellen	
	Wasser (MQ)	ad 1000 ml

Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl pH=8,8)	Tris	180 g
	Wasser (MQ)	800 ml
	mit konz. HCl auf pH=8,8 einstellen	
	Wasser (MQ)	ad 1000 ml
5X Probenpuffer	SDS	0,2 g
	0,5 M Tris-HCl pH=6,8	1,8 ml
	Glycerol (85%)	1 ml
	β-Mercaptoethanol	20 µl
	0,2% (w/v) Bromphenolblau	50 µl
	Wasser (MQ)	ad 10 ml
SDS Page Elektrophoresepuffer (5X Stock)	Tris	60 g
	Glycin	288 g
	SDS	10 g
	Wasser (MQ)	2000 ml
SDS PAGE Elektrophoresepuffer (1X)	5X Elektrophoresepuffer	200 ml
	Wasser (MQ)	ad 1000 ml
10X Nativ Elektrophorese Puffer	Fertiglösung von Biorad (10X Tris/Glycin Puffer)	
Coomassie-Blau Färbelösung	Coomassie-Blau	5 g
	Essigsäure	10 ml
	Methanol	35 ml
	Wasser (MQ)	ad 1000 ml
Coomassie Entfärber	Essigsäure	10 ml
	Methanol	35 ml
	Wasser (MQ)	ad 1000 ml

2.3.1.3 Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (RNA)

Acrylamidvorratslösung (19:1) Roti40 für DNA/RNA

6X RNA-Probenpuffer	Ficoll 400	15% (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 (w/v)
	Xylencyanol	0,25 (w/v)
	Harnstoff	7 M
Elektrophoresepuffer (1X TBE)	10X TBE	100 ml
	Wasser (MQ)	ad 1000 ml
Toluidinblau Färbelösung	Essigsäure (100%)	100 ml
	Toluidinblau	1 g
	Wasser (MQ)	ad 1000 ml

2.3.2 Pufferlösungen

2.3.2.1 Puffer für Plasmidisolierungen

P1 (Resuspensionspuffer)	Tris-HCl pH=8,0	50 mM
	EDTA	10 mM
P2 (Zell-Lyse Puffer)	NaOH	200 mM
	SDS	1% w/v
P3 (Neutralisationspuffer)	Kaliumacetat, pH=5,5	3 M
QBT (Equilibrierungspuffer)	MOPS-KOH pH=7,0	50 mM
	NaCl	1000 mM
	Ethanol	15% v/v
QC (Wasch-Puffer)	MOPS-KOH pH 7,0	50 mM
	NaCl	1250 mM
	Ethanol	15% v/v
QF (Elutionspuffer)	Tris-HCl, pH=8,5	50 mM
	NaCl	1250 mM
	Ethanol	15% v/v

TE	Tris-HCl, pH =8,0	10 mM
	EDTA	1 mM

2.3.2.2 Puffer für Ni-NTA Spin Kit

Lyse-Puffer, pH=8,0	Natriumdihydrogenphosphat	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
Wasch-Puffer, pH=8,0	Natriumdihydrogenphosphat	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
Elutions-Puffer, pH=8,0	Natriumdihydrogenphosphat	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM

2.3.2.3 Puffer für molekulargenetische Methoden

10X Klenow-Puffer	Tris-HCl, pH=7,6	500 mM
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	10 mM
	BSA (DNase frei)	500 µg/ml
10X Transkriptions-Puffer	Tris-HCl, pH= 8,0	400 mM
	MgCl ₂	220 mM
	Spermidin	10 mM
RNA-Extraktion-Puffer	Tris-HCl, pH 7,8	10 mM
	Dithioerithrol (DTE)	1 mM
	SDS	1% w/v
	NaCl	100 mM

2.3.2.4 Puffer für Westernblot

Transferpuffer	Tris-HCl, pH=7,6	25 mM
	Glycin	200 mM
	Methanol	20%
5x PBS (Phosphatbuffered Saline), pH 7,5	Dinatriumhydrogenphosphat	57,5 g
	Natriumdihydrogenphosphat	14,8 g
	Natriumchlorid	29,2 g

	MilliQ	1000 ml
PBS-Tween 20	5X PBS	50 ml
	Tween 20	100 µl
	MilliQ	200 ml
Blockpuffer	PBS-Tween	100 ml
	BSA/ oder Milchpulver	3 g-5 g

3.3.3 Mikrobiologische Medien

LB (Luria-Bertani) Flüssigmedium	Bacto-Pepton	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Wasser (MQ)	ad 1000 ml

Nach dem vollständigen Lösen aller Komponenten wird der pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydroxidlösung auf 7,4 eingestellt. Anschließend erfolgt die Sterilisation bei 120°C und 2 bar für 20 Minuten (Wasserdampfsterilisation) im Autoklav.

LB-Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wird dem oben beschriebenen LB-Medium vor der Sterilisation Bacto-Agar zugegeben. Agarplatten enthalten 1,5- 2% (w/v) Bacto-Agar.

2.3.4 Puffer und Lösungen für *in vitro* Systeme

2.3.4.1 Nicht-enzymatische stellenspezifische tRNA-Bindung (modifizierter Watanabe-Assay)

Der Watanabe-Assay ist ein modular aufgebautes *in vitro* System. Folgende Puffermodule werden verwendet:

Tico-Puffer	Hepes-KOH, pH=7,5	20 mM
	Magnesiumacetat	6 mM
	Ammoniumacetat	30 mM
HMK Puffer	β-Mercaptoethanol	4 mM
	Hepes-KOH, pH=7,5	20 mM
	Magnesiumacetat	6 mM

	Kaliumchlorid	150 mM
	β -Mercaptoethanol	4 mM
Mix I	Hepes-KOH, pH=7,5	60 mM
H ₆₀ M _{10,5} N ₆₉₀ SH ₁₂ Spd ₁₀ Spm _{0,25}	Magnesiumacetat	10,5 mM
(Watanabe Mix I)	Ammoniumacetat	690 mM
	β -Mercaptoethanol	12 mM
	Spermidin	10 mM
	Spermin	0,25 mM
Mix II	Hepes-KOH, pH=7,5	100 mM
H ₁₀₀ M _{22,5} N ₇₅₀ SH ₂₀ Spd ₁₀ Spm _{0,25}	Magnesiumacetat	22,5 mM
(Watanabe Mix II)	NH ₄ Ac	750 mM
	β -Mercaptoethanol	20 mM
	Spermidin	10 mM
	Spermin	0,25 mM
Mix III	Hepes-KOH, pH=7,5	66,7 mM
	Magnesiumacetat	12,6 mM
	NH ₄ Ac	500 mM
	β -Mercaptoethanol	13,4 mM
	Spermidin	10 mM
	Spermin	0,25 mM
Bindungspuffer	Hepes-KOH, pH=7,5	20 mM
(H ₂₀ M _{4,5} N ₁₅₀ SH ₄ Spd ₂ Spm _{0,05})	MgAc	4,5 mM
	NH ₄ Ac	150 mM
	β -Mercaptoethanol	4 mM
	Spermidin	2 mM
	Spermin	0,05 mM

Die Pufferlösungen werden in 10 ml Ansätzen aus Vorratslösungen hergestellt, anschließend in 2 ml Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Zusammensetzung der Vorratslösungen zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle 2.1 Konzentrationen der Vorratslösungen

Vorratslösung	Konzentration [M]
HEPES-KOH pH=7,5 / 0°C	1
Magnesiumacetat	1
Ammoniumcarbonat	4
β-Mercaptoethanol	14,3
Spermidin	0,5
Spermin	0,1

2.3.4.2 Enzymatische stellenspezifische tRNA-Bindung (modifizierter Watanabe-Assay)

Bei der enzymatischen Variante der stellenspezifischen tRNA Bindung werden die oben beschriebenen Puffer verwendet. Einzige Ausnahme bildet der Puffer II, der durch den Puffer Ie ausgetauscht wird.

Mix Iie	Hepes-KOH, pH=7,5	40 mM
H ₄₀ M _{8,3} N ₃₀₀ SH ₈ Spd ₅ Spm _{0,125}	Magnesiumacetat	8,3 mM
(Watanabe Mix Iie)	NH ₄ Ac	300 mM
	β-Mercaptoethanol	8 mM
	Spermidin	5 mM
	Spermin	0,125 mM

2.3.4.3 Pufferlösungen für die Poly-Uridin abhängige Poly-Phenylalanin Synthese

Tico-Puffer	Hepes-KOH, pH=7,5	20 mM
H ₂₀ M ₆ N ₃₀ SH ₄	Magnesiumacetat	6 mM
	Ammoniumacetat	30 mM
	β-Mercaptoethanol	4 mM
Mix I	Hepes-KOH, pH=7,5	100 mM
H ₁₀₀ M ₂₁ N ₈₇₀ SH _{20,4} Spd ₁₂ Spm _{0,3}	Magnesiumacetat	21 mM
(Poly(U) Mix I)	Ammoniumacetat	870 mM
	β-Mercaptoethanol	20,4 mM

	Spermidin	12 mM
	Spermin	0,3 mM
Mix II	Hepes-KOH, pH=7,5	80 mM
H ₈₀ M ₁₅ N ₈₄₀ SH ₁₆ Spd ₁₂ Spm _{0,3}	Magnesiumacetat	15 mM
(Poly(U) Mix II)	NH ₄ Ac	840 mM
	β-Mercaptoethanol	16 mM
	Spermidin	12 mM
	Spermin	0,3 mM

2.3.4.4 Pufferlösungen für die Toeprinting und RNA Sequenzierung

MMLV Mix	5X VD +Mg	2 µl
	BSA	6 µl
	dNTP Mix	6 µl
	MilliQ	6 µl
	MMLV (200U/µl)	4 µl
5X VD+Mg	Tris HCl	50 mM
	Ammoniumchlorid	300 mM
	β-Mercaptoethanol	30 mM
	Magnesiumacetat	50 mM
dNTP Mix	dNTP 100 mM	je 3 µl
	(vier verschiedene)	
	5X VD+Mg	16 µl
	Milli Q	52 µl
5X ddNTP Mix für Sequenzierung	ddNTP 100 mM	5 µl
(für jedes ddNTP einzeln ansetzen)	10X RT+	16 µl
	MilliQ	120 µl
10X Reverse Transkription Puffer für	Tris HCl pH 8,3	500 mM
Sequenzierung (10X RT+)	Natriumchlorid	600 mM
	DTT	100 mM
	Magnesiumacetat	60 mM
AMV Sequenziermix	10X RT+	1 µl
	Milli Q	8 µl

	AMV (10U/ μ l)	1 μ l
dNTP/ddNTP Sequenziermixe	dNTPs (100 mM)	je 5 μ l
	5X ddNTP (5 mM)	20 μ l
	(ddATP oder ddCTP oder ddGTP oder ddTTP)	
	10X RT+ Puffer	8 μ l
	Milli Q	52 μ l
MMLV Proben Puffer	10M Harnstoff	160 μ l
	10X TBE	20 μ l
	10%Bromphenolblau/	10 μ l
	Xyancyanol	
	0,5M EDTA	10 μ l
HMK Puffer	Hepes-KOH, pH=7,5	20 mM
H ₂₀ M ₆ K ₁₅₀ SH ₄	Magnesiumacetat	6 mM
	Kaliumchlorid	150 mM
	β -Mercaptoethanol	4 mM
Mix I	Hepes-KOH, pH=7,5	60 mM
H ₆₀ M _{10,5} N ₆₉₀ SH ₁₂ Spd ₁₀ Spm _{0,25}	Magnesiumacetat	10,5 mM
(Watanabe Mix I)	Ammoniumacetat	690 mM
	β -Mercaptoethanol	12 mM
	Spermidin	10 mM
	Spermin	0,25 mM
Mix II	Hepes-KOH, pH=7,5	100 mM
H ₁₀₀ M _{22,5} N ₇₅₀ SH ₂₀ Spd ₁₀ Spm _{0,25}	Magnesiumacetat	22,5 mM
(Watanabe Mix II)	NH ₄ Ac	750 mM
	β -Mercaptoethanol	20 mM
	Spermidin	10 mM
	Spermin	0,25 mM

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmungen

Die photometrische Konzentrationsbestimmung kann für DNA, RNA und ribosomale Partikel (70S, 50S oder 30S) in geeigneter Verdünnung bei einer Wellenlänge von 260 nm erfolgen.

Für die Bestimmung der Extinktion wurde eine Mikroküvette (Beckman Coulter) mit einem Volumen von 100 μl und einem Lichtweg von einem Zentimeter verwendet. Dadurch vereinfacht sich das Lambert-Beer Gesetz:

$$A = -\lg (E/E_0) = c * \epsilon * d$$

Zu:

$$A_{260} = c * \epsilon_{260}$$

Geeignete Verdünnungen liefern Absorptionen, die im Bereich von 0,1 – 0,8 liegen.

Es können folgende Vereinfachungen zur Konzentrationsbestimmung angenommen werden (Sambrook et al., 1989):

$$\begin{aligned} 1 A_{260} &= 50 \mu\text{g/ml doppelsträngige DNA} \\ &= 40 \mu\text{g/ml einzelsträngige DNA oder RNA} \\ &= 20 \mu\text{g/ml Oligonukleotide} \end{aligned}$$

und für ribosomale Partikel und tRNA

$$\begin{aligned} 1 A_{260} &= 24 \text{ pmol } 70\text{S Ribosomen } (\epsilon = 4,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}) \\ &= 36 \text{ pmol } 50 \text{ S Untereinheit } (\epsilon = 2,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}) \\ &= 72 \text{ pmol } 30 \text{ S Untereinheit } (\epsilon = 1,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}) \\ &= 1500 \text{ pmol tRNA} \end{aligned}$$

Für genauere Berechnungen können die molekularen Extinktionskoeffizienten der Basen der Nukleotide oder Ribonukleotide verwendet werden.

$$\text{Adenin: } \epsilon_{260} [\text{A}] = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Guanin: } \epsilon_{260} [\text{G}] = 1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Uridin : } \epsilon_{260} [\text{U}] = 1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Cytidin: } \epsilon_{260} [\text{C}] = 0,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Thymidin: } \epsilon_{260} [\text{T}] = 1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Die Berechnung kann aus der Summe der molekularen Extinktionskoeffizienten nach Multiplikation mit dem jeweiligen Anteil der Nukleotide erfolgen. Um den Hyperchromie-Effekt auszugleichen, sollte der erhaltene Wert der Konzentration um 10% reduziert werden.

2.4.2 Radioaktivitätsmessung

Die Messung der radioaktiven Proben erfolgte im Szintillationscounter Wallac 1409.

2.4.3 Elektrophoresen

2.4.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese kann zur Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von DNA und RNA genutzt werden. Die geladenen Nukleinsäuremoleküle wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Auftrennung ist im Wesentlichen vom Molekulargewicht und der Konformation der Nukleinsäure abhängig. Agarosekonzentrationen zwischen 0.3% und 4% können für die Trennung eingesetzt werden.

Für die Herstellung von Agarose-Gelen werden 100 ml 1X TBE-Lösung mit der entsprechenden Menge Agarose (z.B. 1 g für 1%) vermischt und in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Die etwas abgekühlte Agaroselösung wird mit 5 µl 1%iger Ethidiumbromid-Lösung vermischt und in die Gelkammer gegossen. Der Geltaschenformer (Kamm) wird eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wird der Kamm entfernt und das Gel mit 1X TBE Puffer überschichtet. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei 5-10 V/cm.

Nach erfolgter Trennung kann die DNA unter UV-Licht detektiert werden. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA oder RNA und wird durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Die Detektion des Fluoreszenzlichts erfolgt mit dem Herolab Gel-Dokumentations-System.

2.4.3.2 Protein-Gelelektrophorese

SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) kann zur Auftrennung von Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt werden. Die Trennung der Proteine nach dem diskontinuierlichen Verfahren erfolgt im zweiphasigen Gelsystem. Im Sammelgel werden die SDS-Proteinkomplexe aufkonzentriert, dies ermöglicht eine scharfe Trennung der Proteine im Trenngel. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nach ihrer molekularen Masse, da die Eigenladung durch die Anlagerung von SDS überdeckt wird und die Gestalt aufgrund der Denaturierung für alle Proteine vergleichbar geworden ist. Die Anzahl der gebundenen SDS-Moleküle ist abhängig von der Anzahl der Aminosäuren, die resultierende Ladung der SDS-Proteinkomplexe ist somit abhängig vom Molekulargewicht des Proteins.

Herstellung der Gele

Für die SDS-Page kann die Mini Protean II Gelelektrophorese-Anlage der Firma Biorad genutzt werden. Zur Herstellung der Gele werden folgende Lösungen zusammengegeben:

Tabelle 2.2 Trenngel, 12% Acrylamid

Anzahl der Gele	1	2	3	4
30% Acrylamid	2 ml	4 ml	6 ml	8 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	1,3 ml	2,6 ml	3,9 ml	5,2 ml
H ₂ O	1,6 ml	3,2 ml	4,8 ml	6,4 ml
10% SDS	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl
10% APS	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl
TEMED	2,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl

Pro Trenngel werden 3,4 ml verwendet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wird das Sammelgel hergestellt.

Tabelle 2.2 Sammelgel, 4% Acrylamid

Anzahl der Gele	1	2	3	4
30% Acrylamid	0,2 ml	0,4 ml	0,6 ml	0,8 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	0,18 ml	0,36 ml	0,54 ml	0,72 ml
H ₂ O	1,1 ml	2,2 ml	3,3 ml	4,4 ml
10% SDS	15 µl	30 µl	45 µl	60 µl
10% APS	7,5 µl	15 µl	22,5 µl	30 µl
TEMED	1,25 µl	2,5 µl	3,75 µl	5 µl

Proteingelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Die Trennung der Proteine erfolgt nach dem diskontinuierlichen Verfahren im zweiphasigen Gelsystem unter nativen Bedingungen. Im Sammelgel werden die Proteinkomplexe aufkonzentriert, dies ermöglicht eine scharfe Trennung der Proteine im Trenngel. Im Trenngel erfolgt die Trennung nach Eigenladung und Molekulargewicht.

Die Herstellung der Gele erfolgt wie oben unter SDS-PAGE beschrieben, aber unter Austausch der SDS Lösung durch Wasser. Der Gellauf erfolgt unter nativen Laufbedingungen.

2.4.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (RNA-Gele)

Zur Kontrolle und Trennung der Transkripte aus *in vitro*-Transkriptionen kann die Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt werden (Ogden and Adams, 1987). Für Transkripte zwischen 40 und 100 Nukleotiden werden 10%ige Polyacrylamidgele im TBE-Puffersystem verwendet, diese Gele enthalten 8 M Harnstoff, um die RNA zu denaturieren. Die Detektion der RNA kann durch Toluidinblau-Färbung erfolgen.

Gelvorbereitung:

Für die analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese kann das Mini-Protean II System von Biorad genutzt werden. Die Glasplatten werden zur Zerstörung von RNasen drei Stunden auf 180°C erhitzt. Kunststoffteile werden gründlich mit 10% SDS-Lösung gereinigt und mit sterilem Wasser gespült.

Für jedes Gel werden ca. 6 ml Gellösung folgender Zusammensetzung benötigt:

Acrylamidlösung (19:1)	1,5 ml
Harnstoff	2,5 g
10 X TBE	0,6 ml
Wasser (MQ)	ad 6 ml
10% APS	30 µl
TEMED	5 µl

Für die präparative Gelelektrophorese werden Gelelektrophorese-Apparaturen eigener Herstellung (MPI, Elektrowerkstatt) verwendet. Glasplatten im Format 160 mm x 140 mm und ein Abstandshalter mit einer Dicke von 1 mm werden verwendet. Ein spezieller Geltaschenformer dient zur Bildung einer 10 mm * 100 mm Tasche. Für diese Gele wird ein Volumen von ca. 25 ml Gellösung benötigt.

Nach erfolgter Polymerisation werden die Gele in die Apparatur eingesetzt und der Geltaschenformer wird entfernt. Es erfolgt ein Vorlauf der Gele bei 280 V für 30 Minuten.

Probenvorbereitung und Elektrophorese

Aus der analytischen Transkription werden 3 μl , 7 μl und 15 μl mit 5 μl 4X RNA-Probenpuffer versetzt und auf 20 μl Endvolumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Auftragung der Proben erfolgt nach Spülen der Taschen.

Für die präparative Gelelektrophorese werden die Transkriptionsansätze lyophilisiert und anschließend in RNA-Probenpuffer gelöst. Dadurch kann das Probenvolumen gering gehalten werden und es erfolgt eine schärfere Trennung der Transkriptionsprodukte.

Die Elektrophorese erfolgt für ca. 2 Stunden bei 280 V, solange bis die Bromphenolfront das Ende des Gels erreicht hat.

Färbung mit Toluidinblau

Zur Färbung der RNA werden die Gele für 10 Minuten in Toluidinblau-Färbelösung vorsichtig geschwenkt. Die Entfärbung der Gelmatrix erfolgt durch Schwenken der Gele in destilliertem Wasser. Die Färbung der RNA bleibt dabei erhalten.

2.4.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Sequenziergele)

Die Auftrennung von radioaktiv markierter DNA Moleküle der Sequenzirreaktion oder des toeprints erfolgt in 0,4 mm dicken Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen. Die Gellösung für Sequenziergele (8% PAA, 8M Harnstoff in TBE Puffer) sollte immer frisch herstellen werden, da ansonsten der zugegebene Harnstoff zerfallen könnte. Zum Lösen des Harnstoffs werden ca. sechzig Minuten benötigt. Anschließend wird die Gellösung filtrieren (Faltenfilter Schleicher und Schüll 595 $\frac{1}{2}$ No10311647 $\Phi=185$ mm) und unter Vakuum entgast.

Vorbereitung der Glasplatten für Sequenziergele

Die Ohrenplatte wird mit Dimethylsilan (Fluka) beschichtet (sialinisiert), dadurch erhält sie eine Wasser und Gel-abweisende Oberfläche. Somit können nach der Elektrophorese die sehr dünnen Gele leichter auf ein Filterpapier übertragen werden.

Die Reinigung der Glasplatten erfolgt mit destilliertem Wasser, hierfür werden sie im ersten Schritt vollständig benetzt und mit einem Papierhandtuch anschließend trocken gerieben. Dabei ist es wichtig, die Glasplatten mit einer Hand fest auf die Tischplatte zu drücken und sie damit gegen verrutschen zu sichern. Anschließend erfolgt die gleiche Prozedur mit 96% Ethanol. Danach werden die Seiten-Spacer und Grund-Spacer (Biorad 165-3818) mit Ethanol abgerieben und so zwischen die Platten eingesetzt, dass sie etwa 0,5 cm überstehen. Spacer mit 7 Klammern fixieren, obere Klammern nur so fest (ggf. verschieben), dass der Kamm gut

eingesetzt werden kann. Spacer mit 1% Agarose versiegeln. Agaroselösung kann über längeren Zeitraum (Tage) bei 65°C flüssig gehalten werden.

Gießen der Gele

Nach dem Filtrieren der oben beschriebenen Gellösung werden zu 50 ml Gellösung 250 µl 10% Ammoniumperoxosulfat (APS) Lösung zugegeben und gut gemischt (250 ml Becherglas, Rühren mit der Pipettenspitze und durch Schwenken des Becherglases) dann erfolgt die Zugabe von 25 µl TEMED, erneut gut mischen.

Gellösung langsam an einer Ecke einfüllen. Die Glasplatten dabei leicht angekippt halten, so dass Luftblasen vermieden werden. Interne Luftblasen entstehen bevorzugt wenn die Gelplatten nicht sauber sind, die Sialinisierung nicht mehr ausreichend ist oder die Gellösung zu schnell die gesamte Breite des Gels ausnutzt.

Das Herstellen der Gele (Polymerisieren) kann (sollte) einen Tag vorher durchgeführt werden, da die Polymerisierung ca. 2 Stunden benötigt.

Gelvorlauf (in 1X TBE)

Bevor die Proben geladen werden muss das Gel mindestens 30 Minuten (Maximal 45 Minuten) einen Vorlauf absolvieren; 15-30 mA fest (aber mindestens selbe Stromstärke wie Hauptlauf, Hauptlauf kann aber auch mit weniger Strom betrieben werden. Daraus ergibt sich ca. 1,5 kV-2,0 kV, mehr sollte nicht angestrebt werden, um eine Überhitzung des Gels zu vermeiden). Achtung bei höherprozentigen Gelen muss die Stromstärke reduziert werden da sonst die Gele überhitzen. Nach dem Vorlauf müssen die Taschen gründlich gespült werden (2-3 X), um den diffundierten Harnstoff zu entfernen. Anderenfalls kann keine Probe in die Taschen geladen werden. Achtung Luftblasen vermeiden!

Der Probenauftrag erfolgt in Abhängigkeit vom verwendeten Kamm (Eckige Tasche, oder Sägezahnkamm), beim eckigen Kamm können 8 µl gut geladen werden. Bei Verwendung des Sägezahnkamms sollten 3 µl nicht überschritten werden.

Maße der Spacer: (Länge ca. 60 cm, 40 cm ausreichend, Breite 2 cm; Dicke 0,4 mm; können bei Biorad bestellt werden)

Kamm (22 Taschen) Breite 14 cm, Taschen 0,5 cm Breite, Steg ungefähr 1,5mm

Gelhauptlauf (in 1x TBE)

Der Hauptlauf zur Trennung der Proben erfolgt bei maximal 25 mA. Je langsamer der Hauptlauf erfolgt desto Schärfer werden die Banden getrennt. Der Hauptlauf dauert ca. drei Stunden.

Auseinanderbauen und Trockner der Gele

Das Auseinanderbauen sollte möglichst schnell erfolgen, Glasplatten werden mit der Ohrenplatte nach oben platziert und die Ohrenplatte abgehoben.

Das Gel sollte dabei an der unteren Platte verbleiben. Sofort ein Watmann Papier entsprechender Größe auflegen und schnell das Whatman Papier mit dem Gel anheben. Sollte das Gel an der Platte haften bleiben, hilft es, wenn man die Platte schnell umdreht (Whatman unten) und versucht mit etwas Wasser das Gel vom Glas zu lösen.

Das Trocknen der Gele erfolgt bei 60°C-70°C unter Vakuum (im Geltrockner), benötigt ca. 1 Stunde.

Phosphorimageing

Die Exposition der Phosphorimage Platte (Amersham) erfolgt über Nacht (12 –16 Stunden), für schärfere Banden und Background Reduzierung bis zu vier Tage.

2.4.4 Analytische Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Analyse von ribosomalen Komplexen und deren Untereinheiten kann die analytische Dichtegradienten Zentrifugation eingesetzt werden. Es werden lineare Saccharose-Gradienten von 10%-40% [w/v], die in mechanischen Gradientenmischern hergestellt werden, verwendet.

Die Auftrennung der Proben erfolgt in der Ultrazentrifuge in geeigneten Ausschwingbechern (SW60, SW40 oder SW28; Beckman), hierbei wird die Laufzeit und Drehzahl (bzw. Erdbeschleunigung) so gewählt, dass eine optimale Trennung erfolgt.

Bsp.:

Polysomen Profil in SW60, 38.000 rpm und 120 Minuten

Untereinheiten Profil in SW60, 38.000 rpm und 240 Minuten

Polysomen Profil in SW40, 18.000 rpm und 16 Stunden

Untereinheiten Profil in SW40, 22.000 rpm und 18 Stunden

Die Analyse erfolgt durch Auspumpen der Gradienten durch ein Durchflussphotometer. Hier kann die Absorption bei 260 nm oder 280 nm erfolgen.

2.4.5 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) zur Bestimmung der Dipeptidformation

Die Analyse der Dipeptidformation im enzymatischen und nichtenzymatischen Watanabe (siehe 2.7.1) kann mittels reversed-Phase HPLC auf einer Nucleosil C18 Säule erfolgen.

Zur Trennung wurde folgendes Gradientenprogramm bei einer Flussrate von 0,5 ml/min genutzt:

Waschen der Säule nach Probenauftrag	t= 0-5 min, 100% Lösung I 0,1% Trifluoressigsäure
Start des Gradienten	t=5-90 min, linearer Gradient von 0% auf 100% Lösung II (60% Acetonitril mit 0,1% Trifluoressigsäure) t=90-110 min, Lösung III (60% Acetonitril)

Die Fraktionen werden mit Hilfe eines Autosamplers im 2 Minuten Takt (1 ml) selbsttätig aufgenommen und die Elution der Aminosäuren und des Dipeptids werden durch Messung der Radiaktivität der Fraktionen verfolgt.

2.4.6 Westernblot zur Detektion vom Hexahistidin-markierten Proteinen

Die zu analysierenden Proben werden durch SDS PAGE aufgetrennt. Der Transfer der Proteine auf eine (Polyvinylidene Difluorid) PVDF Membran erfolgt in einer Mini Trans-Blot Cell (Biorad) in Transferbuffer (25 mM Tris pH 8,2; 200 mM Glycin; 20% Methanol) bei 100V für eine Stunde.

Der Transfer wird durch Färben mit Ponceau rot auf der Membran und Coomassie Färbung des Gels geprüft. Die Membran wird nun zur Vorbereitung der Antikörperbindung mit PBS (Phosphat Buffered Saline) gewaschen (3 X 50 ml für 20 Minuten).

Anschließend erfolgt die Blockierung der unspezifischen Antikörperbindestellen mit 3% Milchpulver in PBS (Entweder 2 Stunden bei RT oder 4°C für 16 Stunden).

Nach erneutem dreimaligem Wasen mit 50 ml PBS erfolgt die Inkubation mit dem Anti-Histidin-Antikörper (1:5000 in PBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der Anti-Histidin-Antikörper trägt eine konjugierte Rettich-Peroxidase (HRP), die zum Nachweis genutzt werden kann.

Die Entwicklung des Signals erfolgt mit dem ECL Kit für Westernblots (GE Healthcare) nach Herstellerangaben.

2.4.7 RNA Sequenzierung durch Reverse Transkription

Zur Sequenzierung einer mRNA wird der zweifache Überschuss an Sequenzierprimer an die mRNA angelagert. 0,1-0,2 pmol des mRNA* Primer Hybrids werden in der Sequenzierreaktion verwendet.

Annealing reaction	
10 x RT – Mg ²⁺	1 µl
mRNA (0.25 pmol/µl)	2,4 µl
primer (0.5 pmol/µl)	2,4 µl
<u>DEPC-H₂O</u>	<u>4,2 µl</u>
	10 µl

Für 3 Minuten bei 80°C denaturieren und danach in flüssigem Stickstoff schockgefrieren. Anschließend langsam auf Eis auftauen lassen und 2 µl 36mM MgCl₂ in 1 x RT zugeben

Sequencing reaction	
1 x RT+	1 µl
Ann. mix	2 µl
5 x dNTP's	4 µl
5 x ddNTP's (4 separate Reaktionen!)	4 µl
<u>AMV-RT-Mix</u>	<u>1 µl</u>
	10 µl

10 –15 Minuten bei 42°C inkubieren und dann mit denaturierendem Probenpuffer (10 µl) stoppen und bei 90°C 2 Minuten denaturieren. 6-8 µl der Reaktion im Sequenziergel analysieren.

2.4.8 Toeprint Experiment für Ribosomale Komplexe unter *in vivo*-nahen Pufferbedingungen

Für die toeprint Analyse wird der zweifache Überschuss an Sequenzierprimer zur Bildung des mRNA* Primer Hybrids benutzt. Das mRNA* Primer Hybrid wird im Watanabe Experiment zur Herstellung ribosomaler Komplexe genutzt.

<u>Annealing Reaktion</u>	
1 x VD-buffer – Mg ²⁺	17 µl
mRNA (200 pmol/µl)	2 µl
primer (200 pmol/µl)	4 µl
<u>Milli Q</u>	<u>2 µl</u>
	25 µl

➔ Für 3 Minuten bei 80°C denaturieren und danach in flüssigem Stickstoff schockgefrieren. Anschließend langsam auf Eis auftauen lassen.

toeprint Reaktion

Watanabe Puffer	3 μ l
tRNA (8 pmol/ μ l)	2 μ l
tRNA ^{Phe} (8 pmol/ μ l) oder H ₂ O	2 μ l
Annealin Reaktion	1 μ l
30S oder 70S (2 pmol/ μ l)	2 μ l
<u>Milli Q</u>	5 μ l
	15 μ l

→ 10 Minuten bei 37°C inkubieren (Anstelle der oben beschriebenen Reaktion können hier auch die ribosomalen Komplexe des Watanabe Experiments eingesetzt werden). 2 μ l MMLV-Mix zugeben 10 Minuten bei 37°C inkubieren, mit 20 μ l MMLV-Probenpuffer abstoppen und für 5 Minuten bei 95°C 4-8 μ l auf einen Sequenziergel analysieren (Taschen vorher spülen!)

2.5 Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden

2.5.1 Anzucht und Konservierung von *E. coli*

LB-Medium dient als Standardnährmedium zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen. Um Plasmidtragende Stämme zu selektionieren, wird dem LB Medium ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Die plasmidkodierte Resistenz ermöglichte das Wachstum der plasmidtragenden Stämme. Die Inkubation erfolgt bei 37°C, flüssige LB-Kulturen werden im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert.

Einzelkolonien können auf festen Nährmedien erhalten werden (LB-Agarplatten), diese dienen auch der kurzfristigen Konservierung der *E. coli* Stämme (mehrere Wochen bei 4°C) und der Reaktivierung von Glycerinkulturen.

Glycerinkulturen dienen der Dauerkonservierung. Hierfür werden 1 ml einer Übernacht-Kultur (LB-Medium) mit 333 μ l einer sterilen 50%igen (v/v) Glycerinlösung versetzt. Nach gründlicher Durchmischung erfolgt das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und die anschließende Lagerung bei -80°C.

2.5.2 Herstellung von transformationskompetenten Zellen für die Elektroporation

Zur Herstellung von transformationskompetenten Zellen für die Elektroporation werden 500 ml LB-Medium mit dem zur Transformation bestimmten *E. coli*-Stamm angeimpft und bis zu einer Absorption bei 560 nm von 0,7 bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend erfolgt die Zellernte bei 10.000 x g für 15 Minuten. Die Zellen werden in 100 ml kaltem Milli Q Wasser resuspendiert und erneut 15 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt. Anschließend wird das Zellpellet in 4 ml kalter 10%iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert, in 40 μ l Aliquots aufgeteilt und in flüssigem

Stickstoff eingefroren. Die Lagerung kann bei -80°C erfolgen. Alle Zentrifugationen und die Wachschriffe müssen bei 4°C erfolgen.

2.5.3 Transformation mittels Elektroporation

Die zur Transformation bestimmten Zellen werden bei 4°C aufgetaut und vorsichtig mit einem entsprechenden Volumen eines Ligationsansatzes (siehe 2.5.5 oder 2.5.6) oder 0,1-1 ng Plasmid-DNA gemischt und für ein bis fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Ligationsansätze in gekühlte Biorad Einmalküvetten (0,2 cm Elektrodenanstand) überführt. Die Elektroporation erfolgt mittels Elektroporator (Biorad Gene Pulser/ Pulscontrol System) mit der folgenden Einstellung: Spannung $U=1,5\text{ kV}$, Widerstand $200\ \Omega$ und Kapazität $C=25\ \mu\text{F}$. Dabei sollte die Zeitkonstante für eine erfolgreiche Transformation zwischen vier und fünf Millisekunden liegen. Direkt nach dem Puls werden die Zellen in 1 ml LB-Medium oder 250 μl SOC-Medium (Topo TA Cloning® kit) oder LB Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Es werden 10-200 μl des inkubierten Mediums zur Selektion der Transformaten auf LB Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum Zusatz (z.B.: Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ausplattiert.

2.5.4 Restriktionsverdau von DNA

Unter Restriktionsverdau versteht man die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen. Es werden in der Regel Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet. Durch Restriktionsendonukleasen können je nach verwendetem Enzym 3' oder 5' Überhänge (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends) erzeugt werden. Die Wahl der Restriktionsenzyme hängt von der Aufgabenstellung ab.

Für Klonierungen werden bevorzugt Restriktionsendonukleasen verwendet, die Überhänge erzeugen, da diese eine orientierungsspezifische Ligation des zu klonierenden Fragments (Insert) mit dem Zielplasmid (Vektor) erleichtern.

Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen ist in Unit (U) angegeben. Ein U ist definiert als die Menge Enzym die innerhalb einer Stunde 1 μg Standard-DNA (z.B.: Genom des Phagen Lambda (λ)) unter Standardbedingungen (37°C , Reaktionspuffer) vollständig verdaut. Der Phage λ trägt im 48 Kilobasen großen Genom unterschiedlich viele Schnittstellen für die verschiedenen Restriktionsenzyme, dies sollte bei der Wahl der Enzymmenge berücksichtigt werden. Für schnelle analytische Restriktionen wird häufig die folgende Faustregel

verwendet: Für 1µg Plasmid DNA wird 1Unit Restriktionsenzym verwendet. Die Reaktion erfolgt bei 37°C im vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer für 1-2 Stunden.

Für kleinere DNA Fragmente (z.B. PCR-Produkte, Produkte der Klenow-Reaktion) ist eine genaue Berechnung der Enzymmenge sinnvoll.

Die folgende Gleichung berücksichtigt die Größe und die Anzahl der Schnittstellen des zu verdauenden DNA Fragments und die Größe und die Anzahl der Restriktionsstellen im Lambdagenom oder entsprechender Standard-DNA:

$$\text{Einzusetzende Units pro } \mu\text{g /h} = \frac{\text{Größe der Standard-DNA (bp)} * \text{Anzahl Schnittstellen (Fragment)}}{\text{Größe der Fragment-DNA (bp)} * \text{Anzahl Schnittstellen (Standard-DNA)}}$$

2.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgt mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) oder dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche). Hierbei werden das zu klonierende DNA-Fragment (Insert) und das Plasmid (Vektor) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (siehe 2.5.4) vorbereitet und über präparative Gelextraktion gereinigt (siehe 2.6.5). Die gereinigten Produkte (Insert und Vektor) werden in einem molekularen Verhältnis von 1:1 bis 4:1 (Insert zu Vektor) eingesetzt. Eine typische Reaktionsansatz unter Verwendung der T4 DNA Ligase (NEB) ist im folgenden Pipettierschema dargestellt:

Tabelle 2.4 Ligationsansatz

	1:1 Ansatz	4:1 Ansatz	Plasmidkontrolle	Negativ Kontrolle
H ₂ O	14 µl	8 µl	16 µl	17 µl
10 X Reaktionspuffer	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Insert (≅ 0,3 µg/µl)	2 µl	8 µl	--	--
Plasmid (≅ 1 µg/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	--
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

Die Reaktionsansätze werden bei 16°C für 16 Stunden inkubiert. Anschließend kann eine Dialyse auf einem schwimmenden Nitrozellulose-Filter gegen Wasser erfolgen, um die

Salzkonzentration des Ligationsansatzes für die Elektroporation zu senken. Die Ligationsansätze können mittels Elektroporation (siehe 2.5.3) in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert werden.

Bei Verwendung des Rapid DNA Ligations Kit ist zu beachten, dass der 10 X Reaktionspuffer durch einen 5 X DNA Verdünnungspuffer und einen 2 X Reaktionspuffer ersetzt ist. Entsprechende Veränderungen im Pipettierschema müssen vorgenommen werden. Die Inkubationszeit mit dem Rapid Ligation Kit kann laut Herstellerangabe auf 5 Minuten bei Raumtemperatur verkürzt werden.

2.5.6 Ligation und Transformation unter Verwendung des Topo TA Kloning Kit (Invitrogen)

Die Topo TA Cloning[®] Technologie (Invitrogen) erlaubt die schnelle Klonierung und anschließende Sequenzbestimmung von *Taq*-Polymerase-amplifizierten DNA-Fragmenten oder von DNA-Fragmenten, die durch Inkubation mit *Taq*-Polymerase mit einem 3'Adeninüberhang versehen wurden. Diese Fragmente werden mit einem linearisierten Vektor (z.B.: pCR[®]II-Topo[®]) inkubiert. Dieser aktivierte Vektor trägt jeweils einen einzelnen 3'Thymidinüberhang und an der 3'Hydroxylgruppe über einen Phosphodiester eine kovalente Bindung zur Topoisomerase I (*Vaccinia Virus*).

Die Topoisomerase I erkennt 5'CCCTT und spaltet den Phosphodiesterstrang der DNA auf der 3'Seite durch Umesterung der 5'->3'-Phosphodiesterbindung zu einer Topoisomerase I Tyrosyl->3'-Phosphodiesterbindung (Shuman, 1991). Die Energie der Phosphodiesterbindung der DNA bleibt in der Tyrosyl->3'-Phosphodiesterbindung gespeichert und kann für die Ligation eines oben beschriebenen DNA Fragments genutzt werden (Shuman, 1991).

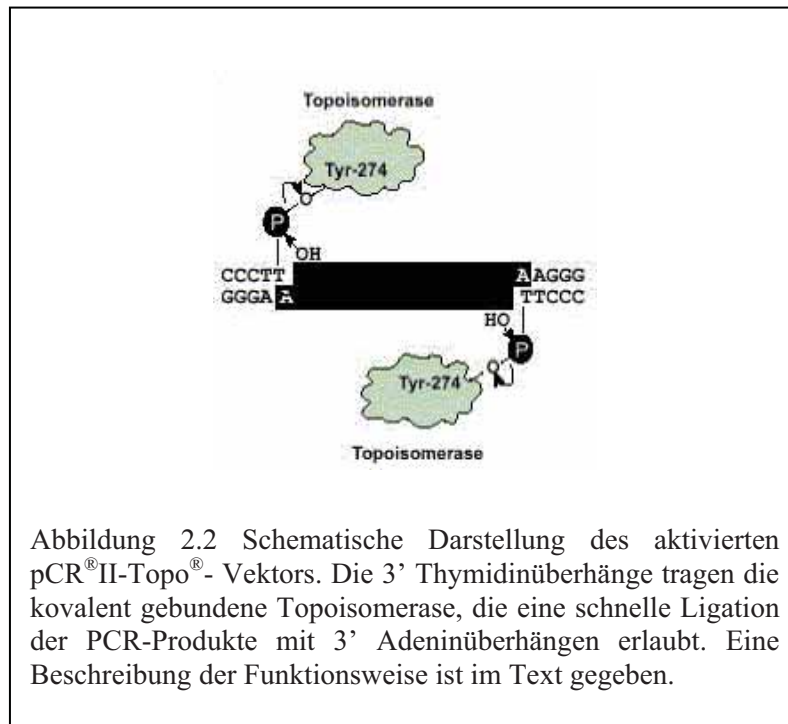
Taq-amplifizierte PCR-Produkte können direkt ohne Aufreinigung in die Ligation gegeben werden oder nach Isolierung und Reinigung des gewünschten PCR-Produkts durch Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion (2.6.2).

Die Durchführung der Ligation und Transformation erfolgt nach Herstellerangaben (Topo TA cloning Instruction Manual, Invitrogen).

Für die Transformation von elektrokompenten Top10 Zellen (Invitrogen) werden 0,5 - 4 µl des PCR-Produkts (ca. 4-12 pmol) mit 1 µl Pufferlösung (1:4 verdünnter Salt Solution, Invitrogen) und 1 µl pCR[®]Topo[®] Vektor (10 ng/µl) in einem Gesamtvolumen von 6 µl für 5

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl des Ligationsansatzes werden zu 50 µl Top10 elektrokompenten Zellen gegeben und vorsichtig vermischt.

Die Elektroporation erfolgt, wie unter 2.5.3 beschrieben.



2.5.7 Synthese von kurzen dsDNA-Fragmenten mittels Klenow-Reaktion

Die Klenow-Polymerase ist das große Fragment der DNA Polymerase I aus *E. coli*. Das Klenow-Fragment trägt die 5'→3' DNA-abhängige DNA-Polymerasefunktion und die 5'→3' Exonukleasefunktion und eignet sich hervorragend für die so genannte Auffüllreaktion von Einzelstrangbereichen. Für die Synthese von dsDNA Fragmenten werden zwei DNA Einzelstränge, die in einem Bereich von 15-30 Nukleotiden am jeweiligen 3'Ende komplementär sind, denaturiert und anschließend hybridisiert.

Dabei entsteht ein partieller Doppelstrangbereich, der die freien 3'Hydroxylgruppe für die Synthese des komplementären Stranges des Einzelstrangbereiches zur Verfügung stellt. Die Klenow-Polymerase füllt nun den Einzelstrangbereich durch ihre DNA-abhängige DNA-Polymerasefunktion auf. Es entsteht ein DNA-Doppelstrangfragment.

Durchführung:

Für eine Klenowauffüllreaktion werden jeweils 250 pmol der Oligonukleotide in einem Volumen von 15 µl für 15 Minuten bei 75°C denaturiert und anschließend zur Hybridisierung langsam auf 37°C heruntergekühlt.

Nach Erreichen der Reaktionstemperatur von 37°C werden jeweils 2,5 µl destilliertes Wasser, 10X Klenowreaktionspuffer, Desoxribonukleotidmischung (jedes Nukleotid 20 mM) und Klenow-Polymerase (à 2 U/µl) zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend kann das erhaltene Produkt durch Phenolextraktion gereinigt werden (siehe 2.6.3).

Es wurden die folgenden Oligonukleotide für die Klenow-Reaktion verwendet:

Zur Herstellung des MFStop Konstrukts:

Oligonukleotid 1:

5'CCG GGA TCC CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAA AAG AAA AGA AAA GAA
AAT GTT CTA ATA AAA G-3'

Oligonukleotid 2:

5'CCG GAA TTC CGA ATA TTT CCG TAG CTC TGT CTC CTT TTT CTT TTC TTT TCT
TTT CTT TTA TTA GAA C-3'

Zur Herstellung des 8Codon (MFKRSIYVStop) Konstrukts

Oligonukleotid 1:

5'CCG CGG ATC CAT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CAA AGG AGG TAT TAT TAA
TGT TCA AAC GAT CAA TCT ACG TAT AAT-3'

Oligonukleotid 2:

5'CTC GGA ATT CGT TAA TCT GTG ATG TCC TTT TCT TTT CTT TTC TTT TCT TTT
CTT TTA TTA TAC GTA GAT TGA TCG-3'

Die erhaltenen doppelsträngigen DNA Fragmente können nun mit EcoRI und BamHI geschnitten und kloniert werden.

2.5.8 *In vitro* Transkription mittels T7-Polymerase

Die Transkription erfolgt durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen (Transkriptasen). Die Transkriptasen aus Phagen, wie T7, T3 oder SP6 eignen sich besonders für *in vitro* Transkription, da sie nur aus einer Untereinheit bestehen und somit leichter zu Isolieren und Reinigen sind. Phagen-Transkriptasen zeichnen sich außerdem durch eine hohe Prozessivität

aus. Als Template können PCR Produkte und Plasmide, die mit einem entsprechenden Promotor versehen wurden, eingesetzt werden. In den durchgeführten Versuchen wird linearisierte Plasmid-DNA in der so genannten run-off-Transkription verwendet (Bommer et al., 1996). Das Plasmid wird durch Verwendung eines Restriktionsenzym direkt hinter dem zu transkribierenden Bereich geöffnet.

Die Abschätzung der einzusetzenden Menge an linearisiertem Plasmid erfolgt in einem analytischen Ansatz von 50 μl . Als Richtwert gilt der Einsatz von ca. 0,5–1 pmol/ μl linearisiertes Plasmid. Es werden je 1,8 μl ATP, GTP, UTP und CTP (jeweils 100 mM) mit 5 μl Transkriptionspuffer (10 X) und der entsprechenden Menge destilliertem Wasser bei 0°C gemischt. Der Reaktionsansatz wird auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend erfolgt die Zugabe des linearisierten Plasmids, sowie 2,1 μl RNase freies BSA (3 mg/ml) und 1,4 μl RNasin (40 U/ μl). Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,25 Units Pyrophosphatase und 0,7 μl T7-Transkriptase (40 pmol/ μl) gestartet. Die Inkubation erfolgt bei 37°C. Der Erfolg der Transkription wird in einer analytischen denaturierenden Polyacrylamid Elektrophorese untersucht. Nach Abschätzung der einzusetzenden Plasmidmenge erfolgt für die präparative Transkription die proportionale Erhöhung des Reaktionsvolumens auf 300 μl . Die Isolierung und Reinigung der RNA erfolgt durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen und anschließender Extraktion der RNA aus dem Gel mittels gepufferter Phenollösung und Extraktionspuffer.

2.5.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Im Reaktionsansatz werden geringe Mengen Matrizen DNA (Template), Desoxyribonukleotid-Triphosphate, komplementäre Oligonukleotide (Primer) und eine thermostabile DNA-Polymerase als synthetisierendes Enzym, z.B. *Taq*-Polymerase oder *Pwo*-Polymerase, gemischt.

Die PCR-Reaktion beginnt mit einer initialen Denaturierung des Templates, gefolgt von einer zyklischen Reaktionsfolge. Jeder Zyklus beginnt mit einer erneuten Denaturierung, gefolgt von der Anlagerung der Oligonukleotide (Annealing) an das Template und der Synthesephase. In der Synthesephase erfolgt die sequenzspezifische Synthese des neuen DNA Stranges. Nach Abschluss der vorgesehenen Anzahl von Zyklen wird eine verlängerte Synthesephase eingeschoben, um unvollständige Produkte zu vervollständigen. Durch Kühlung auf vier Grad Celsius wird die Reaktion beendet.

Folgende Tabelle zeigt ein typisches PCR-Programm.

Tabelle 2.5 PCR-Programm

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Wdh.
Denaturierung	94	300	1
<i>Denaturierung</i>	94	30	30
<i>Annealing</i>	55	30	30
<i>Synthese</i>	72	120	30
Endsynthese	72	600	1
Kühlung	4		1

Zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide kann ein Temperatur-Gradienten Programm verwendet werden. In diesem Programm kann der Temperaturbereich um den ermittelten Schmelzpunkt der Oligonukleotide (oder der Herstellerangabe) untersucht werden. In der Regel wird der Temperaturbereich von $\pm 10^{\circ}\text{C}$ um den Schmelzpunkt untersucht.

Tabelle 2.6 Standard 50 μl PCR Ansatz (Amplifikation von genomischer DNA)

Milli Q	ad 50 μl
10X PCR-Puffer	5 μl
dNTP Mix (jedes 10 mM)	1 μl
Primer A (50 μM)	1 μl
Primer B (50 μM)	1 μl
DNA Template (gDNA)	40 ng
DNA Polymerase	2 U

2.5.10 Klonierung des RFF-Gens (DR1510) aus *Deinococcus radiodurans*

2.5.10.1 Klonierungsstrategie

Ausgehend von genomischer DNA aus *Deinococcus radiodurans* soll der kodierende Bereich mittels PCR amplifiziert, und unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen NdeI und

BAM HI in den Vektor pET14b kloniert werden. Die Expression des so klonierten RFF-Gens soll ein Protein liefern, dem am C-Terminus eine Hexahistidin-Markierung angefügt ist, die durch die Thrombin-Schnittstelle entfernt werden kann. Diese Hexahistidinmarkierung soll zur Reinigung des Proteins über Nickelaffinitätschromatographie genutzt werden.

2.5.10.2 Primerauswahl

Für die Amplifikation des kodierenden Bereichs des RFF-Gens aus *Deinococcus radiodurans* mittels PCR und anschließender Klonierung des PCR Produkts in den Expressionsvektor pet14b wurden folgende Primer ausgewählt. Die Auswahl der Primer erfolgte auf der Basis der Gensequenz des RFF- Gens, Genbankeintrag: [AE001995.1](#)

Primer 1

DradioRRF14bf (30mer) :5' GACTTCC**CATATGG**CAGACATGAAATCCATC 3' **NdeI**

Primer 2

DradioRRFr: (30mer):5' CTCGCGGATCCATCAACCTA**GGATTTCCTG** 3' **Bam HI**

Die PCR-Primer wurden von der Firma TIP Molbiol, Berlin synthetisiert.

Das PCR Produkt wurde mittels Gelextraktion gereinigt und in den Topo TA Vektor ligiert und zur Sequenzanalyse geschickt. Anschließend erfolgte die Subklonierung in den pet14b Vektor unter Verwendung der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI. Nach dem Test der Expression wurden Stockkulturen angelegt und die Sequenz nach Plasmidisolierung erneut geprüft.

2.5.11 Überexpression von Hexahistidinmarkierten Proteinen

Die Analyse der Überexpression des hexahistidinmarkiertem RF3 in HB101 Zellen erfolgt durch SDS-PAGE. Die Kultur des Stammes zur Expression eines gewünschten Proteins wird bis zu einer Absorption bei 560nm von 0,6 inkubiert. Anschließend wird die Kultur in zwei 25 ml Kulturen aufgeteilt. Bei einer der beiden Kulturen erfolgt die Induktion der Expression durch Zugabe von Isopropylthiogalatosid (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM. Die Kulturen werden anschließend weiter bei 37°C inkubiert. Nach 1 oder 2 Stunden nach der Induktion werden von den beiden Kulturen je 1 ml Kulturmedium abgenommen und die Absorption bei 560 nm bestimmt. Die Zellen der 1 ml Proben werden bei 4.000g in der Tischzentrifuge sedimentiert. Das erhaltene Sediment wird in 100 µl SDS-Probenpuffer

aufgenommen und zum Aufschluss der Zellen und zur Denaturierung der Proteine für 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend können die Proteine der Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach erfolgter Coomassie-Färbung analysiert werden.

2.6 Präparative Methoden

2.6.1 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* kann mittels Plasmidisolierungs-Kits der Firma Qiagen erfolgen. Dabei werden je nach benötigter Plasmidmenge der QIAprep Miniprep Kit oder Qiagen Midi oder Maxi Plasmid Kit verwendet.

Die Isolierung der Plasmide basiert auf einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim, 1983). Nach Aufschluss der Bakterienzellen erfolgt die Adsorption der Plasmid-DNA an Silikagel-Säulen (Miniprep) oder Anionentauscher-Säulen (Midi und Maxi prep). Die Reinigung der Plasmid-DNA wird durch Waschen der Säulen erzielt. Bei der Miniprep erfolgt die Elution unter geringer Salzkonzentration (Wasser oder 10 mM Tris-HCl, pH 8,5), das erhaltene Eluat enthält das gereinigte Plasmid. Bei Verwendung der Anionentauschersäulen (Midi und Maxi prep) erfolgt die Elution unter Hochsalzbedingungen (Puffer QF). Die Plasmid-DNA kann durch Isopropanolfällung aus dem Eluat gefällt werden.

Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben (QIAprep Mini Handbook, March 2001; Qiagen Plasmid Purifikation Handook, September 2000). Abweichend von den Herstellerangaben wird auf die Inkubation mit RNase A verzichtet, um Laborkontamination mit RNase zu vermeiden. 2 ml einer 5 ml LB-Übernachtskultur werden für die Plasmid-Minipräparation verwendet. Eine 50 ml LB-Übernachtskultur wird für die Midipräparation und eine 200 ml Übernachtskultur für die Maxipräparation verwendet.

2.6.2 Reinigung von DNA über Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten kann nach Auftrennung in der Agarose Gelelektrophorese direkt aus dem Agarosegel erfolgen. Unter UV-Licht sichtbar gemachte DNA (Ethidiumbromid-Methode) kann mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel

ausgeschnitten werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus diesem Gelstück erfolgt mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben.

2.6.3 Phenol-Chloroform-Isoamyalkohol Extraktion

Proteine können aus wässrigen Nukleinsäurelösungen durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln entfernt werden. Die DNA-haltige Lösung wird mit dem selbem Volumen 70% (v/v) Phenollösung versetzt und für mindestens eine Minute kräftig durchmischt. Die anschließende Phasentrennung kann durch Zentrifugation (1 min, 10.000 x g) beschleunigt werden. Die denaturierten Proteine sammeln sich an der Phasengrenze (Interphase) und in der organischen Phase, während die DNA in der wässrigen Phase verbleibt. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Dadurch werden Phenolreste aus der wässrigen Phase entfernt. Eine erneute Phasentrennung wird durch Zentrifugation (1 min, 10.000 x g) erzielt. Die wässrige Phase enthält die gereinigte DNA.

2.6.4 Ethanol-Präzipitation von DNA

Nukleinsäuren können in Gegenwart von monovalenten Kationen durch Zugabe von Ethanol aus wässrigen Lösungen gefällt werden. Durch Zugabe von 0,1 Volumen einer 3M Natriumacetat Lösung wird eine geeignete Kationenkonzentration eingestellt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem 96%igem (v/v) Ethanol erfolgt die Fällung der DNA. Die Fällung wird durch Zentrifugation (30 min, 10.000 x g, 4°C) unterstützt. Der Überstand wird dekantiert und das erhaltene Pellet mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Durch Zentrifugation (15 min, 10.000 x g, 4°C) soll das Pellet während des Waschens stabilisiert werden. Der Überstand wird dekantiert. Das Pellet kann bei Raumtemperatur oder in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet werden. Anschließend wird das Pellet in einem geeignetem Volumen Pufferlösung oder destilliertem Wasser aufgenommen.

2.6.5 Präparative Aufreinigung von mRNA aus Polyacrylamidgelen

Durch präparative Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennte RNA (2.4.3.3) kann durch Extraktion mit Chloroform und Extraktionspuffer aus dem Gel extrahiert werden. Das entsprechende Gelstück, das die zu extrahierende RNA enthält, wird zerkleinert, indem es durch eine 10 ml Spritze gepresst wird. Es wird dann mit 10 ml Chloroform (70% in Extraktionspuffer) und 10 ml Extraktionspuffer versetzt. Die Extraktion erfolgt innerhalb von

12 Stunden durch kräftiges Durchmischen der Lösung unter stetigem kühlen (4°C). Anschließend wird in einer Zentrifugation für 60 Minuten bei 7.000 x g die Phasentrennung herbeigeführt. Die wässrige Phase wird abgenommen und die Phenolphase mit weiteren 10 ml Extraktionspuffer reextrahiert. Die wässrigen Phasen aus beiden Extraktionen werden vereinigt und die RNA mit dem 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Die Präzipitation wird durch Zentrifugation für 2 Stunden bei 7.000 x g unterstützt. Das erhaltene Präzipitat wird mit 70% Ethanol gewaschen. Die gereinigte RNA wird in destilliertem Wasser aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.6.6 Herstellung ³²P-markierte Oligonukleotiden

Die Herstellung von ³²P markierten Oligonukleotiden kann enzymatisch mittels T4 Polynukleotidkinase und [γ -³²P]-Adenosine-5'-triphosphate erfolgen. Es werden 500 bis 2000 pmol des Oligonukleotides mit 50- 200 μ Ci [γ ³²P]-Adenosine-5'-triphosphate im Reaktionspuffer (Tris-HCl pH 7,5 50 mM; Magnesiumchlorid 10 mM; Dithiothreitol 5 mM; Spermidin 0,1 mM und EDTA 0,1 mM) und 1 Unit T4 Polyneukleotidkinase inkubiert.

Anschließend erfolgt Präzipitation durch Ethanol in Gegenwart von 300 mM Ammoniumacetat (pH 5,5) oder Reinigung mittels Gelfiltration oder Extraktion aus Polyacrylamidgelen.

Bei natürlich hergestellten rRNA (tRNA, mRNA) muss vor der radioaktiven Markierung die 5' Phosphatgruppe entfernt werden. Dies kann enzymatisch durch Reaktion von alkalischer Phosphatase (aus Kalb) erfolgen. 500 pmol RNA werden dafür in Reaktionspuffer (Tris-HCl pH 7,5 10 mM; Magnesiumchlorid 10 mM) für 30 Minuten bei 37°C mit 1 Unit inkubiert.

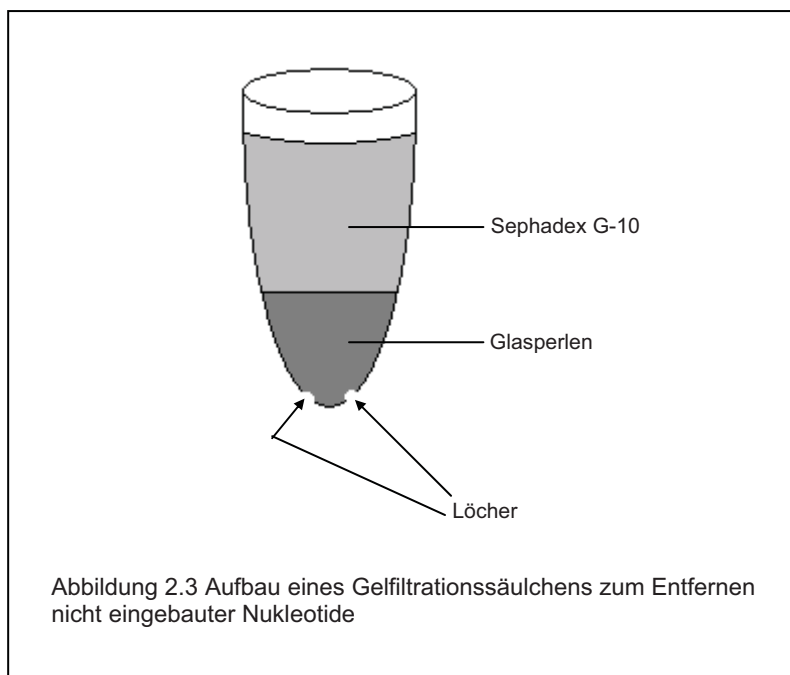
2.6.6.1 Gelextraktion von kurzen Oligonukleotiden

Die Isolierung und Reinigung der DNA erfolgt durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen und anschließender Extraktion der DNA aus dem Gel mittels gepufferter Phenollösung und RNA-Extraktionspuffer. Die Elution erfolgt für kurze DNA Oligonukleotide bei Raumtemperatur, dadurch kann die Ausbeute deutlich erhöht werden. .

2.6.6.2 Gelfiltration von kurzen Oligonukleotiden

Das markierte Produkt kann durch Gelfiltration von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden befreit werden, da das Oligodesoxyribonukleotid ein wesentlich höheres Molekulargewicht als das γ -[³²P]-ATP oder das schon abgespaltene, aber nicht eingebaute

anorganische ^{32}P Phosphat hat. Gelfiltrationssäulen können im Selbstbau hergestellt werden. Hierzu sticht man mit einer möglichst dünnen Kanüle zwei Löcher in den Boden eines 2 ml Eppendorf-Gefäßes und füllt es mit kleinen Glasperlen und einer Sephadex G-10 Suspension wie in Abbildung 2.3 gezeigt. Zum Herstellen dieser Suspension wiegt man 5 g Sephadex G-10 in einen Erlenmeyerkolben ein und inkubiert es mit 30 ml $\text{T}_{10}\text{E}_1\text{NA}_{100}$ für 1 h bei 90°C . Das Eppendorfgefäß wird gefüllt, bis es nach dem Absetzen des Gelfiltrationsmaterials fast voll ist. Das Röhrchen wird in ein 12 ml PPN-Röhrchen gesetzt und 2 Min. bei 2.000 rpm im HB4-Rotor zentrifugiert. Nun füllt man das Säulchen mit $\text{T}_{10}\text{E}_1\text{NA}_{100}$ auf, lässt es mindestens 20 Min. oder länger bei Raumtemperatur stehen und zentrifugiert wieder 2 Min. bei 2.000 rpm. Den letzten Schritt wiederholt man noch zweimal, wobei die letzte Zentrifugation 10 Minuten betragen soll und erst direkt vor dem Auftragen der Probe erfolgt. Das Säulchen zentrifugiert man mit der Probe für 2 Minuten bei 2.000 rpm und nimmt das gereinigte und markierte Oligodesoxyribonukleotid in einem frischen PPN-Röhrchen auf. Die Gelfiltration kann auch in anderen als oben angegebenen Puffern oder Milli Q erfolgen.



2.6.7 Fraktionierung von Poly(U)

Die Fraktionierung des Poly(U), das in der vom Hersteller gelieferten Form eine Mischung aus Poly(U) Ketten von ca. 40 bis 1400 nt aufweist, erfolgte nach dem Protokoll nach (Schäfer et al., 2002)

2.6.8 Isolierung von Ribosomen, ribosomalen Untereinheiten und Reassoziierung zu „reassozierten“ 70S

2.6.8.1 Ribosomenisolation

Die Isolation der Ribosomen erfolgt nach der Methode von Bommer et al. (Bommer et al., 1996). Es werden *in vivo* ähnliche Ionenbedingungen (H_2O , $\text{M}_6\text{N}_3\text{SH}_4$; Tico Puffer) verwendet, die eine Gewinnung von 70S Ribosomen (Hapke and Noll, 1976) garantiert. In einer Präparation werden ca. 200 g gefrorene *E. coli*-Zellen des Stamms K12, CAN/20-12E durch Resuspension in 400 ml Tico-Puffer langsam unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur aufgetaut. Diese Bakteriensuspension sollte gut homogenisiert werden, bevor sie in einem Mikrofluidizer aufgebrochen werden. Der Mikrofluidizer wird vor seiner Nutzung mehrmals mit Tico-Puffer gewaschen und equilibriert, dann mit der Zellsuspension befüllt, diese wird dann unter hohem Druck (18 atm), durch einen kleinen Kanal gedrückt. Dabei zerbrechen die Zellen. Die Prozedur wird dreimal wiederholt. Die nun entstehende Suspension wird gesammelt und in saubere Zentrifugen-Röhrchen überführt. Zentrifugiert wird bei 16.000 rpm für 45 Minuten in eine SA-600 Rotor. Das Pellet (Zelltrümmer) wird danach verworfen und der die Ribosomen und lösliche Enzyme enthaltende Überstand (S-30) weiter bei 22.000 rpm für 20 h in 45Ti-Rotoren zentrifugiert, um die 70S-Ribosomen zu pelletieren. Das Pellet wird danach in Tico-Puffer aufgenommen und erneut bei 8.000 rpm für 10 min zentrifugiert, um unlösliche Aggregate zu beseitigen. Die erhaltenen Ribosomen (krude 70S) werden in Aliquots mit 6.000 A_{260} Einheiten aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Überstand (S-100) wird ebenfalls Aliquotiert und kann für die Poly-Uridin abhängige Poly-Phenylalaninsynthese eingesetzt werden.

Die Ausbeute an Ribosomen (krude 70S) liegt bei ca. 400 A_{260} pro g Zellen.

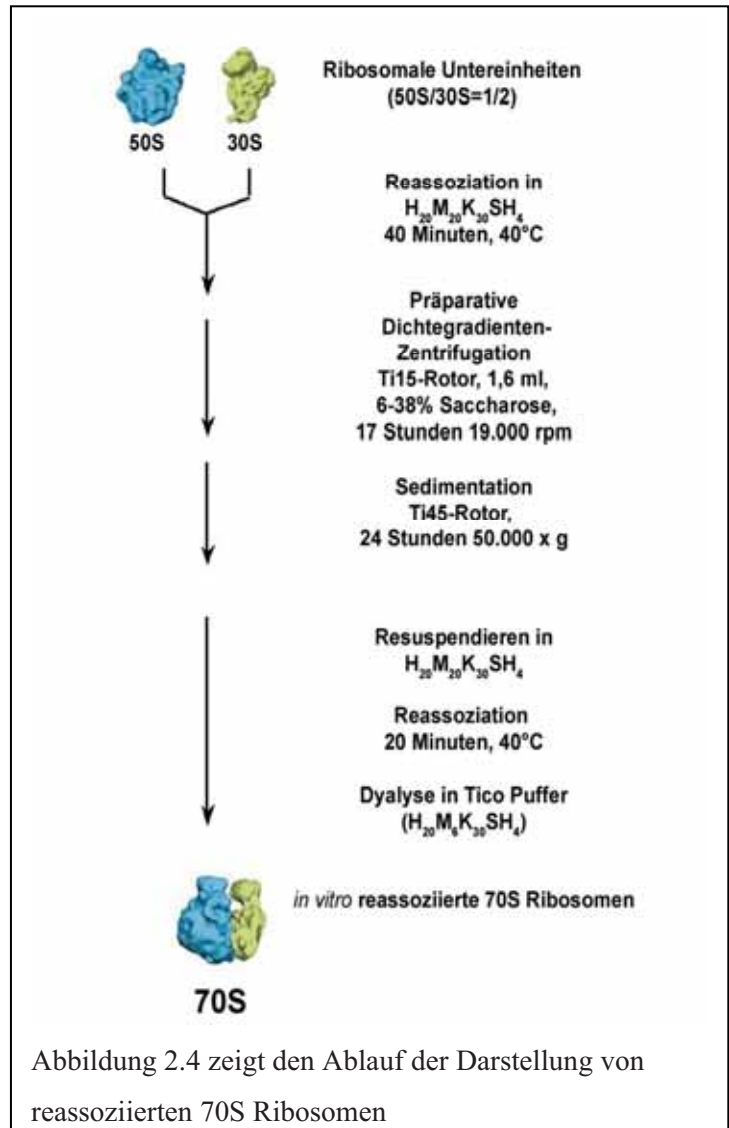
2.6.8.2 Präparative Isolation von 30S und 50S Untereinheiten

Die ribosomalen Untereinheiten können aus den oben beschriebenen kruden Ribosomen durch Dissoziation und Zonalzentrifugation im linearen Saccharose-Gradienten von 0-38% unter dissoziierenden Bedingungen (in Dissoziationspuffer) gewonnen werden. Bei jeder Zonalzentrifugation werden ca. 3.000 A_{260} krude 70S Ribosomen eingesetzt. Die Zentrifugation wird mit einem Beckman Zonalrotor Ti15 bei 22.000 rpm für 17 h (4°C) durchgeführt. Anschließend erfolgt ein Auspumpen des Gradienten durch zuleiten von 50%-Saccharoselösung in den Rotor bei 3.000 rpm. Die Auftrennung der Untereinheiten und das Nach der Zonalzentrifugation werden Fraktionen mit 50S und 30S Untereinheiten vereinigt. Die Untereinheiten werden dann bei 34.000 rpm 22 h lang bei 4°C sedimentiert. Die Pellets

werden in ca. 1 ml (abhängig von der Größe des erhaltenen Pellets) Tico-Puffer oder Reassoziierungs-Puffer resuspendiert. Um Aggregate zu entfernen, werden die resuspendierten Untereinheiten nochmals einem kurzen Zentrifugationsschritt (15 min bei 7.000 rpm) unterzogen. Die Konzentration der Untereinheit wird danach durch Messung der optischen Dichte bei A_{260} gemessen. Danach wird die Suspension in kleine 50 μ l Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Die typische Ausbeute liegt ausgehend von einer Menge von 3000 A_{260} bei ca. 600 A_{260} 30S und 800 50S Untereinheiten.

2.6.8.3 Präparation von reassozierten 70S-Ribosomen

Die isolierten kruden Ribosomen werden zum Teil von aktiven tranlatierenden Ribosomen (Polysomen) aus der Zelle gewonnen und beinhalten so meist noch einige tRNAs und kleinere Fragmente von mRNA. Diese werden durch die oben beschriebene Trennung in Untereinheiten abgetrennt. Anschließend erfolgt eine Reassoziation unter hohen Mg^{2+} -Konzentrationen um reassozierte



70S-Ribosomen zu erhalten (Blaha et al., 2000). Reassozierte Ribosomen sind im Vergleich zu „tight coupled“ Ribosomen (Tico Ribosomen) sowohl in der Bindung von tRNA, als auch in der poly(U) anhängigen poly(Phe)-Synthese effizienter. Tico-70S Ribosomen beinhalten mRNA-Fragmente und tRNAs (im Durchschnitt ca. 0,6 tRNAs pro 70S; (Remme et al., 1989). Nach Prüfung der Untereinheiten auf intakte RNA werden ca. 6.000 A_{260} gereinigte 30S-Untereinheiten mit 50S-Untereinheiten ($A_{260}=4.000$) im molaren Verhältnis von 2:1 bei 40°C für 30 Minuten im Reassoziationspuffer inkubiert. Der Überschuss an 30S-Untereinheiten sichert eine quantitative Umwandlung von 50S mit dem Überschuss an 30S zu 70S Ribosomen. Die überflüssigen 30S können dann in der Zonalzentrifugation im linearen

Saccharosegradienten (0%-38% in Tico Buffer) von den gebildeten reassozierten Ribosomen abgetrennt werden (Blaha et al., 2000).

Hierfür wird die Probe 17 h bei 19.000 rpm (4°C) in einem Beckman Zonalrotor mit angelegtem 0%-38% Saccharosegradienten gefahren. Der Gradient wird fraktioniert, der 70S-Peak gesammelt und bei 24.000 rpm über 24 Stunden in 45 Ti-Rotoren werden die reassozierten 70S Ribosomen pelletiert. Danach werden die Ribosomen in Reassoziationspuffer aufgenommen und 20 min bei 40°C inkubiert um den Reassoziierungsprozess zu optimieren. Die Konzentration der reassozierten Ribosomen wird im Anschluss bei 260nm bestimmt, die Ribosomen Aliquotiert und bei -80°C gelagert. Eine hohe Konzentration an Ribosomen von 400-700 A₂₆₀/ml kann erreicht werden.

2.6.8.4 Qualitäts- und Funktionalitätsbestimmung der Ribosomenpräparation

Die Qualität der Ribosomenpräparation kann durch drei verschiedene Experimente geprüft werden: (1) ein Zentrifugationslauf mit SW40 (angelegter Saccharosegradient von 15-45% in Bindungspuffer, um die Homogenität der ribosomalen Partikel (30S und 50S) sowie der reassozierten 70S-Ribosomen zu kontrollieren; (2) RNA-Agarose-Gele, um die Integrität der ribosomalen RNA zu überprüfen. Durch diese Analyse kann eine Degradation der ribosomalen 16S und 23S rRNA sichtbar gemacht werden. Beide, sowohl die analytische Saccharosegradienten-Zentrifugation, als auch RNA-Gel-Analyse kann wichtige Informationen über den strukturellen Zustand der ribosomalen Partikel liefern. (3) Die Aktivität der Ribosomen in der Poly-Uridin abhängigen Poly-Phenylalanin Synthese ist das dritte Experiment, das Aufschluss über den Zustand und die Aktivität der Ribosomen gibt (siehe 2.7.2).

2.6.9 Isolierung und Aufreinigung von Polysomen

Die Isolierung der Polysomen erfolgt nach einem Protokoll von (Hirashima and Kaji, 1972b) mit geringen Modifikationen, um größere Ausbeuten zu erhalten. Aus einer LB Vorkultur von *E. coli* (z.B. MRE 600) in der mittleren logarithmischen Phase erfolgt die Anzucht der LB Hauptkultur mit einem Startpunkt von ca. 0,01 A₅₆₀/ml bis zur erneuten mittleren logarithmischen Phase (ca. 5 Stunden). Direkt vor der Ernte der Zellen wird Tetracyclin in einer finalen Konzentration von 300 µM zu der Kultur gegeben. Anschließend erfolgt das sofortige Herunterkühlen im Aceton/Trockeneisbad und Überführen in vorgeföhlte Zentrifugenbecher. Alle weiteren Schritte sollten so schnell wie möglich und bei 4°C erfolgen um die Ausbeute an Polysomen zu erhöhen.

Die Zellen werden fünf Minuten bei 5.000 rpm im SS34 Rotor (Sorval) pelletiert und anschließend in der gewünschten Pufferlösung mit 0,4 mg/ml Lysozyme resuspendiert (mit der Pipette auf und ab). Nach der Überführung in ein Eppendorfgesäß werden 5 µl DNase (RNase free; 10 U/µl, Roche) zugegeben und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und über Nacht gelagert. Nach dem Auftauen bei 4°C erfolgt eine Zentrifugation zur Abtrennung des Zelldebris. Die Überstände von mehreren Präparationen werden vereint und durch Gelfiltration werden die Polysomen von den enzymatischen Anteilen des Zytosol getrennt.

Die Gelfiltration erfolgt in einer mit Sepharose4B gefüllte Glassäule (L: 400mm; Ø: 20mm) unter den gewünschten Pufferbedingungen. Das Elutionsprofil wird bei 260 nm aufgezeichnet.

2.6.10 Isolierung von Oligonukleotiden und NTPs mittels HPLC

2.6.10.1 Trennung von NTPs und kurzen Oligonukleotiden

Der Trennwirkung von Polyethylenimin (PEI) für unterschiedlich phosphorylierte Nukleotide beruht auf dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie kann zur Analyse und zur präparativen Reinigung von Nukleotiden verwendet werden. Hier ist das Polyethylenimin kovalent mit dem Trägermaterial (Silicat) verknüpft ist. Eine HPLC-Säule (BioBasic AX PEI) von Thermo® wurde mit einer Fließrate von 0,75 ml min⁻¹ an einer HPLC-Anlage von Hewlett-Packard (Serie 1100) installiert.

Mit dem folgenden 160-minütigen Lauf wird bei Verwendung von Puffer A (5 mM KH₂PO₄; pH 3,2) und B (750 mM KH₂PO₄; pH 3,2) eine Trennung der Nukleotide erreicht.

Waschen der Säule nach Probenauftrag	t= 0-10 min, 100% Puffer A
Start des Gradienten	t=10-170 min, linearer Gradient von 0% auf 100% Puffer B
	t=170 min, linearer Abfall von 100% auf 0% Puffer B

Die Proben werden mit Hilfe eines Autosamplers selbsttätig aufgenommen und analysiert.

Die Detektion erfolgt über einen Dioden-Array- (DA-) Detektor zur Messung der Absorption bei 260 nm.

Zur Aufreinigung von Guanosin-(β - γ -imino)-triphosphat (GDPNP) werden 5,3 mg in 1 ml Puffer A gelöst und auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgt mit dem oben beschriebenen Gradientenprogramm und die Fraktionen des Hauptpeaks werden vereinigt und durch Gelfiltration über Sephadex G10 (Säule: Länge: 40 cm; Durchmesser: 2 cm) in MilliQ (2% Methanol) entsalzt.

Die Fraktionen des ersten Peaks des Eluats enthält das gereinigte GDPNP. Die Aufzeichnung erfolgt bei 253 nm.

2.6.10.2 Reinigung von Aminoacyl-tRNA mittels Reversed-Phase HPLC

Die Aminoacylierung von tRNA^{Phe} kann enzymatisch mit tRNA freiem S100 Extrakt erfolgen. Die Entfernung der tRNA aus dem S100 Extrakt hat zwei Vorteile: 1. Es erfolgt die Anreicherung der Aminoacyl-tRNA Synthetasen und 2. Es werden endogene RNA, daran gebundene RNasen und Aminosäuren, die die spezifische Aminoacylierung beeinflussen könnten, entfernt. Die Präparation des tRNA freien S100 erfolgt nach dem Protokoll von Triana (Doktorarbeit) und tRNA freien S100 Extrakt wurde freundlicherweise von Edda Einfeldt zur Verfügung gestellt.

Die Aminoacylierung erfolgt nach folgendem Protokoll in Puffer A.

Es werden 750 μ l 10X Puffer I mit 450 μ l 50 mM ATP und 400 μ l tRNA^{Phe} (40-50 A₂₆₀) und radioaktiver Aminosäure Phenylalanin (3X tRNA) gemischt und mit MilliQ auf 3.750 μ l aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit KOH auf 7,5 eingestellt. Anschließend werden 2.950 μ l Tico Puffer und 800 μ l tRNA freien S100 Extrakt (in Tico) zugegeben. Nach Inkubation von 15 Minuten bei 37°C erfolgt die Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat und anschließend Phenol/Chloroform Extraktion zur Entfernung der Enzyme. Anschließend wird die Aminoacyl-tRNA mit Ethanol gefällt und in 1 ml MilliQ aufgenommen.

Die so gewonnene Phe-tRNA^{Phe} kann nun über Reversed-Phase HPLC gereinigt werden oder zur Herstellung des Peptidyl-tRNA Analogon Ac-Phe-tRNA^{Phe} benutzt werden.

Die Herstellung von Ac-Phe-tRNA^{Phe} kann nichtenzymatisch aus Phe-tRNA^{Phe} und einen Acetylgruppen Donor (Essigsäureanhydrid) bei pH 5 zu 90% erfolgen (Haenni and Chapeville, 1966). Im Abstand von 15 Minuten werden 20 A₂₆₀ zu Phe-tRNA^{Phe} viermal 1/33 Volumen Essigsäureanhydrid zugegeben. Nach 60 Minuten erfolgt Ethanolpräzipitation. Zur Abtrennung der nicht-reagierten Phe-tRNA^{Phe} erfolgt die enzymatische Deacylierung, die nur Phe-tRNA^{Phe} aber nicht Ac-Phe-tRNA^{Phe} umsetzt.

Es werden 150 μl 10X Puffer I mit 500 μl Ac-Phe-tRNA^{Phe} und 45 μl 0,2 M Adenosinmonophosphat und 45 μl 0,2 M Pyrophosphat (PP_i) gemischt und mit MilliQ auf 750 μl aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit KOH auf 7,5 eingestellt. Anschließend werden 550 μl Tico Puffer und 200 μl tRNA freien S100 Extrakt (in Tico) zugegeben.

Bereits nach 4 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat Lösung abgebrochen und die Enzyme durch Phenol/Chloroform Extraktion entfernt. Die tRNA durch Ethanol präzipitiert und anschließend zur Reinigung in der HPLC in 1 ml MilliQ aufgenommen.

Reinigung von Phe-tRNA^{Phe} und Ac-Phe-tRNA^{Phe} mittels Reversed-Phase HPLC

Die Reinigung von 20-50 Phe-tRNA^{Phe} und Ac-Phe-tRNA^{Phe} erfolgt nach 5 Minuten Zentrifugation bei 15.000xg um unlösliche Aggregate abzutrennen. Der Überstand wird dann auf eine Nucleosil C4 Säule (250 mm X 4 mm, 5 μm , 300 Å Porendurchmesser), die in Puffer I equilibriert ist. Die Auftrennung erfolgt bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit dem folgenden Gradientenprogramm.

Waschen der Säule nach Probenauftrag	t= 0-10 min, 100% Puffer I
Start des Gradienten	t=10-70 min, linearer Gradient von 0% auf 40%Puffer II
	t=70 min, linearer Abfall von 100% auf 0% Puffer II

Die Proben werden mit Hilfe eines Autosamplers selbsttätig aufgenommen und analysiert.

Die Detektion erfolgt über einen Dioden-Array- (DA-) Detektor zur Messung der Absorption bei 290 nm.

2.6.11 Entfernung von EF-G von POST Ribosomen

Posttranslokationale Zustände (POST) des Ribosoms können im Watanabe Experiment durch Translokation mit EF-G*GTP aus den prätranslokationalen Zustand (PRE) hergestellt werden. Die Bindung von Antibiotika oder Proteinen an das POST Ribosomen kann durch die Präsenz von EF-G beeinflusst werden. Die Entfernung von EF-G konnte durch die folgenden zwei Methoden erzielt werden.

2.6.11.1 Entfernung von EF-G durch Zentrifugation durch ein Saccharose

Kissen

10 A₂₆₀ (240 pmol) POST Ribosomen in Bindungspuffer werden durch 2 ml 10% Saccharose in Bindungspuffer bei 78.000 rpm für 16 Stunden im TLA 100.3 Rotor (Beckman) oder bei 48.000 rpm für 20 Stunden im TLA 100.3 Rotor zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in Bindungspuffer oder Tico aufgenommen und die Konzentration der Ribosomen bei 260 nm in einer 1:500 Verdünnung gemessen.

2.6.11.2 Entfernung von EF-G durch Nickelagarose (Ni-NTA Quiagen)

Die Entfernung von EF-G(His₆) von POST Ribosomen kann durch Nickel-Agarose Affinitätschromatographie erfolgen.

1 ml Nickel-Agarose wird in 10 ml Bindungspuffer (H₂₀Mg_{4.5}K₁₅₀Spd₂Spm_{0.5}SH₄)

fünf Minuten geschwenkt, zwei Minuten bei 150g zentrifugiert und erneut in 10 ml Bindungspuffer (H₂₀Mg_{4.5}K₁₅₀Spd₂Spm_{0.5}SH₄) aufgenommen. Diese Schritte werden fünffach wiederholt.

Anschließend werden 780 µl einer 0,3 µM EF-G Lösung (240 pmol) mit 250 µl der mit Bindungspuffer equilibrierten Nickel-Agarose Lösung inkubiert (30 Minuten, 4°C, leicht schwenken).

Anschließend wird die in eine vorbereitete Minisäule geben und mit 3X 250 µl Bindungspuffer gewaschen. Der Durchfluss und die Waschfraktionen werden aufgefangen, vereinigt und gefriergetrocknet und anschließend in (einem Zehntel des Ausgangsvolumens) Bindungspuffer aufgenommen (150 µl). Diese Lösung wird gegen Bindungspuffer (1.000-faches Volumen) dialysiert und erneut gefriergetrocknet und in (einem Zehntel des Ausgangsvolumens, 40 µl) Milli Q aufgenommen.

Die Entfernen des an die Nickelagarose gebundenen EF-G erfolgt mit zwei Mal 500 µl (H₂₀Mg_{4.5}K₁₅₀Spd₂Spm_{0.5}SH₄Imida₂₅₀) pH 7,6 4°C.

Die Eluate werden gefriergetrocknet und in einem Zehntel Ausgangsvolumen Bindungspuffer (100 µl) aufnehmen. Anschließend wird gegen Bindungspuffer (1.000-faches Volumen) dialysiert und erneut gefriergetrocknet und in erneut in einem Zehntel des Ausgangsvolumens, 150 µl, Milli Q aufgenommen. Erneut gegen Bindungspuffer (1.000-faches Volumen) dialysiert und gefriergetrocknet und anschließend in 40 µl Milli Q aufgenommen.

Für die Entfernung von EFG aus den POST Ribosomen wird erneut 1 ml Nickel-Agarose in 10 ml Bindungspuffer ($\text{H}_{20}\text{Mg}_{4.5}\text{K}_{150}\text{Spd}_2\text{Spm}_{0.5}\text{SH}_4$) für fünf Minuten geschwenkt, zwei Minuten bei 150g zentrifugiert und erneut in 10 ml Bindungspuffer ($\text{H}_{20}\text{Mg}_{4.5}\text{K}_{150}\text{Spd}_2\text{Spm}_{0.5}\text{SH}_4$) aufgenommen. Diese Schritte werden fünffach wiederholt.

Anschließend werden 10 A_{260} (240 pmol) POST Ribosomen in Bindungspuffer mit 250 μl der mit Bindungspuffer equilibrierten Nickel-Agarose Lösung inkubiert (30 Minuten, 4°C, leicht geschwenkt).

Anschließend wird die Nickelagarose in eine vorbereitete Minisäule geben und mit 3X 250 μl Bindungspuffer gewaschen. Der Durchfluss und die Waschfraktionen werden aufgefangen und vereinigt. Sie enthalten nun die EF-G freien Ribosomen.

2.6.12 Reinigung von hexahistidinmarkierten Proteinen (Ni-NTA Spin Kit)

Die Reinigung von hexahistidinmarkierten (His_6 -markierte) Proteinen kann mit dem Ni-NTA Spin Kit (analytisch) oder durch Verwendung von Nickelagarose erfolgen. Die Reinigung der Proteine erfolgt dabei nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie.


Das Silikatsäulenmaterial der Säulen bzw. die Agarose trägt Nitriloessigsäure. Die Nitriloessigsäure chelatiert Nickelionen, vier der sechs möglichen Koordinierungsstellen des Nickels werden dabei besetzt. Die verbliebenen zwei stehen für die effektive Bindung der Hexahistidinmarkierung zur Verfügung. Die Bindung der His_6 -Markierung ist stark, so dass mehrere Waschschrte durchgeführt werden können. Die Elution der gereinigten Proteine kann durch Erhöhung der Imidazolkonzentration oder durch Herabsetzung des pH-Wertes erfolgen. Eine Reinigung ist sowohl unter denaturierenden als auch unter nativen Bedingungen möglich. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben (Ni-NTA Spin Handbook, January 2000).

2.7 *In vitro*-Systeme

2.7.1 Watanabe Assay

Die funktionellen Zustände des Ribosoms (P_i , PRE, POST), vergleiche Abbildung 1.3, können mit dem *in vitro*-System nach Watanabe (Watanabe, 1972; Watanabe and Tanaka, 1973) mit einigen Modifikationen (Bommer et al., 1996) etabliert werden. Dieses System

ermöglicht die Untersuchung einzelner Teilschritte des Elongationszyklus, die stellenspezifische Bindung von tRNA in A-, P-, und E-Stelle, sowie die Translokation und den Peptidyltransfer.

Die stellenspezifische Bindung von tRNA an das Ribosom und deren Nachweis gliedert sich in vier Teilschritte (siehe Abbildung 2.3). Durch das modular aufgebaute Puffersystem können die Pufferbedingungen in allen Teilschritten konstant bei $H_{20}M_{4.5}N_{150}SH_4Spd_2Spm_{0.05}$ (Bindungspuffer) gehalten werden. Diese Ionenkonzentrationen liegen nahe den *in vivo* Verhältnissen (Neidhardt, 1987) und werden als *in vivo*-nahes Puffersystem bezeichnet. Der erste Schritt besteht aus der Programmierung des Ribosoms mit einer mRNA (Poly(U) oder heteropolymere mRNA) und der Besetzung der P-Stelle mit cognater deacyl-tRNA oder einer Initiator-tRNA (N-Formylmethionyl-tRNA  oder N-Acetylphenylalanyl-tRNA^{PHE} als Initiator-Analogen). Bei Verwendung der Initiator-tRNA im Programmierungsschritt erfolgt die Bildung des Initiationskomplexes (P_i ; i=Initiation).

Im zweiten Schritt kann nun die vakante A-Stelle durch die Bindung einer zweiten, cognaten tRNA besetzt werden. Die A-Stellenbesetzung kann enzymatisch durch den ternären Komplex Aminoacyl-tRNA*EF-Tu*GTP oder nicht-enzymatisch durch Aminoacyl-tRNA erfolgen.

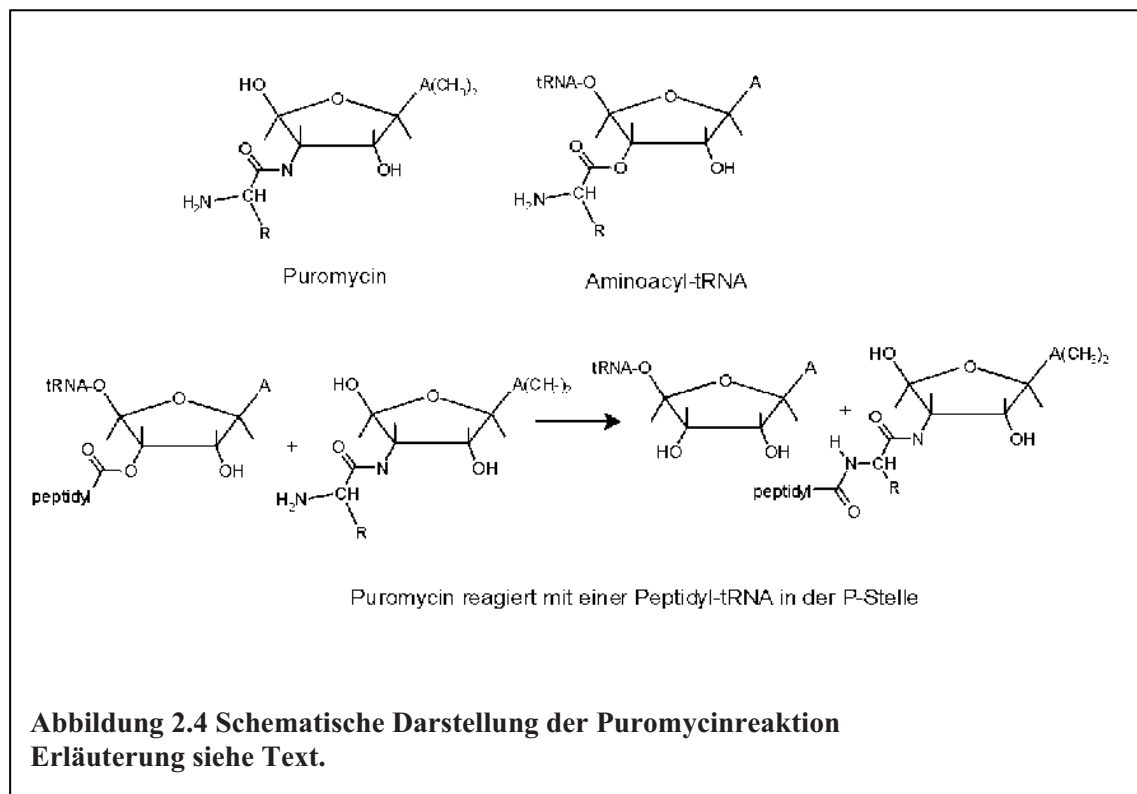
Die beiden ersten Schritte dienen der gezielten Herstellung der beiden ribosomalen Zustände P_i (Initiatorkomplex) oder PRE (prätranslokationaler Komplex). Dabei bestimmen die verwendete mRNA und die tRNA das Besetzungsmuster des Ribosoms.

Im dritten Schritt kann nach Zugabe von Elongationsfaktor G (EF-G) der posttranslokationale Zustand etabliert werden. Die Translokation der tRNA durch EF-G aus der P-Stelle in die E-Stelle und aus der A-Stelle in die E-Stelle wandelt den prätranslokationalen Zustand des Ribosoms in den posttranslokationalen Zustand um.

Der vierte Schritt des Assays dient dem Nachweis der funktionellen Zustände des Ribosoms und der Translokationseffizienz. Der Nachweis erfolgt durch Vergleich der Ergebnisse des Bindungstests mit dem Ergebnis der Puromycinreaktion.

Im Bindungstest erfolgt die Detektion der radioaktiven Aminosäure, die über tRNA an das Ribosom gebunden ist, durch Adsorption der Ribosomen an Nitrozellulosefiltern und anschließender Szintillationsmessung. In der Puromycinreaktion kann die Besetzung der A- bzw. P- Stelle des Ribosoms nachgewiesen werden und es wird der PRE- und POST-Zustand definiert. Puromycin ist ein Antibiotikum, welches den Akzeptorarm einer Aminoacyl-tRNA

nachahmt und somit ein A-Stellen Substrat ist. Die Peptidyltransferase kann, analog zur Peptidylübertragung im Elongationsschritt, die Peptidylgruppe der Peptidyl-tRNA (P-Stelle) auf Puromycin übertragen (Allen and Zamecnik, 1962), (siehe Abbildung 2.4). Dabei wird ein Peptidyl-Puromycinderivat gebildet, welches durch die fehlende tRNA-Haltefunktion schnell vom Ribosom dissoziiert. Hingegen kann eine A-Stellen tRNA nicht mit Puromycin reagieren (Traut and Monro, 1964). Somit sind P- und A- Stelle in Bezug auf ihre Reaktivität gegenüber Puromycin operational definiert. Ein Standardexperiment des Watanabe Assays besteht aus 11 Einzelansätzen: Jeweils zwei Ansätze werden für den Bindungstest vor und nach der Translokation eingesetzt, sechs Reaktionen werden für die Puromycinreaktion verwendet und ein Ansatz dient als Pipettierreserve. Zusätzlich zu den Standardansätzen werden drei Ansätze ohne Ribosomen mitgeführt, von denen zwei Ansätze als Negativkontrolle des Filtertests dienen.



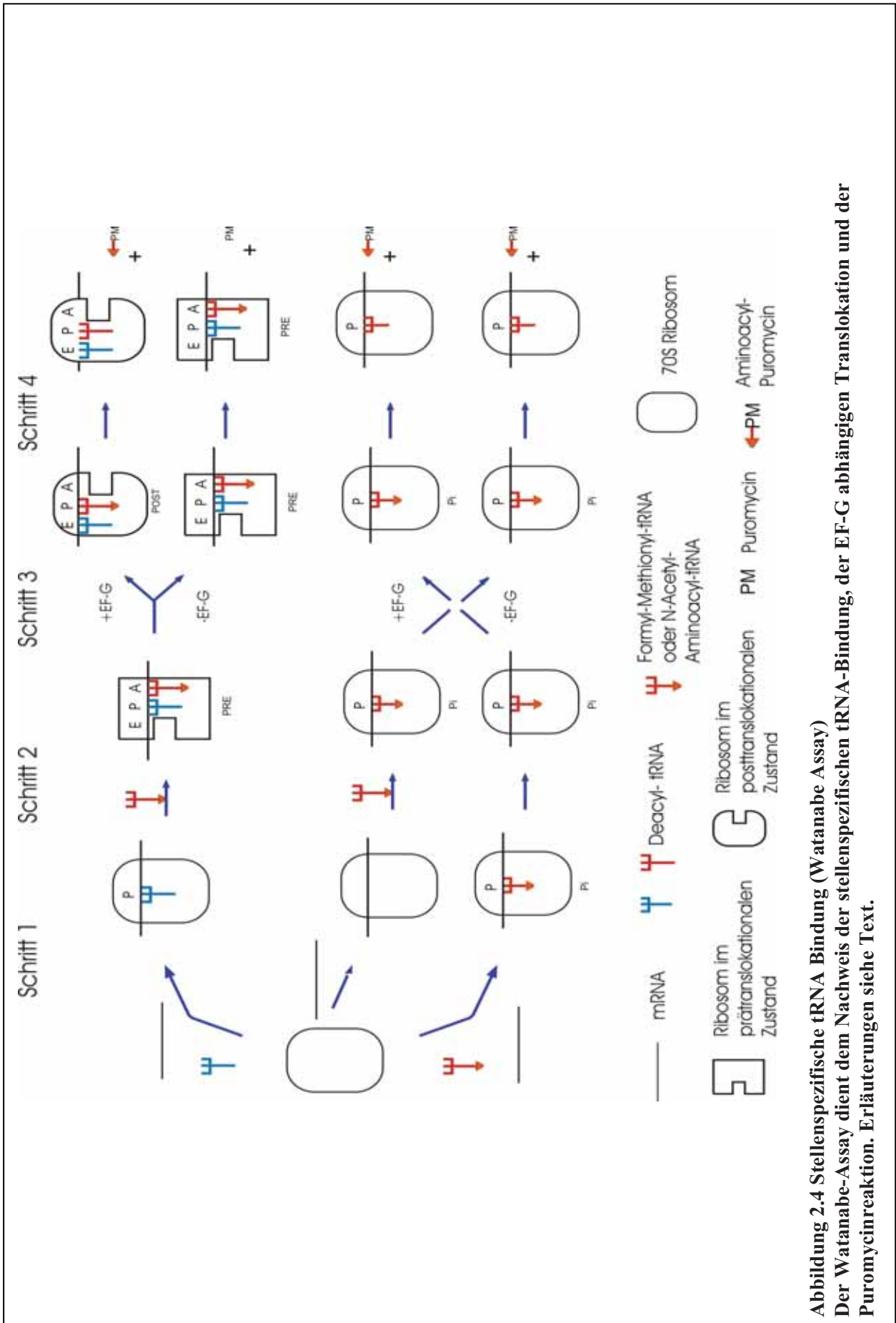


Abbildung 2.4 Stellenspezifische tRNA Bindung (Watanabe Assay)
 Der Watanabe-Assay dient dem Nachweis der stellenspezifischen tRNA-Bindung, der EF-G abhängigen Translokation und der Puromycinreaktion. Erläuterungen siehe Text.

Etablierung von PRE- und POST-Zuständen

1.Schritt (Prä-Inkubation: Programmierung und Besetzung der P-Stelle)

Für die 11 Standardreaktionen eines Watanabe Assay werden 55 pmol reassozierte 70S Ribosomen in 55 µl Ticopuffer eingesetzt. Bei geringer spezifischer Aktivität der Aminosäuren kann die Ribosomenmenge auf 110 pmol erhöht werden. Der 6-8 -fache molare Überschuss, bezogen auf 70S Ribosomen, an heteropolymerer mRNA oder 27,5 µl Polyuridin-mRNA (20µg/µl) werden mit einem 1,5-fachen molaren Überschuss, bezogen auf 70S Ribosomen, an cognater deacyl-tRNA zu 27,5 µl destilliertem Wasser gegeben. Mit 27,5 µl Watanabemix I werden die Pufferbedingungen eingestellt und die Mischung zu den 70S Ribosomen gegeben. Es erfolgt ein Inkubationsschritt für 15 Minuten bei 37°C. Zusätzlich werden 3 Ansätze, bei denen das Volumen der 70S Ribosomen durch Ticopuffer ersetzt ist, als Negativkontrolle pipettiert. Diese Ansätze werden ebenfalls 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.Schritt (A Stellenbesetzung)

Radioaktiv markierte N-Acetyl-Aminoacyl-tRNA (0,8 bis 2-facher Überschuss bezogen auf 70S) wird mit 55 µl Watanabe-Mix II und destilliertem Wasser auf ein Volumen von 137,5 µl gebracht und zum Reaktionsansatz (11 Standardreaktionen) aus Schritt 1 gegeben. Die Negativkontrolle enthält entsprechend der drei Einzelansätze 37,5 µl (0,8 bis 2-facher Überschuss N-Acetyl-Aminoacyl-tRNA + 15 µl Watanabe-Mix II + destilliertes Wasser). Es erfolgt eine Inkubation von 30 Minuten bei 37°C.

Schritt 3 (Translokation)

Dem Reaktionsansatz aus dem 2. Schritt wird ein frisch hergestellter GTP-Mix zugegeben.

Der GTP-Mix besteht aus 30 µl Watanabe-Mix III, 40 µl destilliertem Wasser und 30 µl 2,5 mM GTP. Für die 11 Standardreaktionen werden 55 µl verwendet, für die 3 Reaktionen der Negativkontrolle entsprechend 15 µl des GTP-Mix. Nach Zugabe des GTP-Mix erfolgt die Aufteilung der Reaktionen in 10 Einzelreaktionen und 2 Negativkontrollen á 30 µl für die Translokation, den Bindungstest und die Puromycinreaktion. 10 µl des verbleibenden Restes werden als 100% (Positiv) Kontrolle verwendet und direkt zur Szintillationsmessung verwendet. Zu 4 Einzelansätzen werden je 2,5 µl einer EF-G Lösung (0,1-0,3- fache der 70S Konzentration) zugegeben. Allen anderen Ansätzen werden zum Ausgleich je 2,5 µl HMK-Puffer zugesetzt Die Inkubation für die Translokation erfolgt für 10 Minuten bei 37°C.

Schritt 4 (Puromycinreaktion oder Filtertest)

Filtertest

Jeweils 30 μ l aus je 2 Reaktionsansätzen mit und ohne EF-G, sowie die beiden Negativkontrollen werden mit jeweils 2 ml Bindungspuffer versetzt und durch einen Nitrozellulosefilter filtriert. Die Filter werden zweimal mit je 2 ml Bindungspuffer gewaschen und anschließend in einem Szintillationsgefäß mit 5 ml Filtercount (Szintillationsflüssigkeit) versetzt. Die Messung erfolgt nach kräftiger Durchmischung nach ca. 2 Stunden im Szintillationszähler mit dem entsprechendem Zählprogramm und wird nach 24 Stunden wiederholt.

Puromycinreaktion

Die verbleibenden 6 Reaktionsansätze werden für die Puromycinreaktion eingesetzt. Zwei Ansätze dienen als Negativkontrolle (ohne Zugabe von Puromycin). Die anderen 4 Ansätze (2 mit und 2 ohne EF-G) werden mit 2,5 μ l einer frisch präparierten Puromycinlösung (5,8 mg/ml, pH=7,4 bei 0°C, eingestellt mit KOH) bei 0°C versetzt. Nach Inkubation für 5 Minuten bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 32,5 μ l mit MgSO₄-gesättigter 0,3 M Natriumacetatlösung (pH=5,5) gestoppt und das Puromycinderivat mit 1 ml Essigsäureethylester extrahiert (1 Minute kräftig gemischt). Die Phasentrennung erfolgt durch Inkubation von 10 Minuten bei 0°C und anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 10.000 x g. Von der organischen Phase werden 800 μ l abgenommen und mit 5 ml Filtercount (Szintillationsflüssigkeit) versetzt. Die Messung erfolgt nach kräftiger Durchmischung nach ca. 2 Stunden im Szintillationszähler mit dem entsprechendem Zählprogramm und wird nach 24 Stunden wiederholt.

Etablierung von P_i-Komplexen mit N-Acetyl-Phneylalanyl-tRNA^{PHE}

Zur Formierung von P_i-Komplexen erfolgt in der oben dargestellten Durchführung für PRE- und POST-Zustände keine Zugabe von deacylierter tRNA im ersten Schritt. Dadurch kann im zweiten Schritt, wie oben beschrieben, die N-Acetyl-Phneylalanyl-tRNA^{PHE} die P-Stelle besetzen und den P_i-Komplex bilden.

Etablierung von P_i-Komplexen mit Formyl-Methionyl-tRNA

Die Durchführung erfolgt wie oben beschrieben, allerdings mit der Abwandlung, dass im erster Schritt anstelle der Deacyl-tRNA ein 1,5 facher Überschuss an Formyl-Methionyl-tRNA zugegeben wird. Im zweiten Schritt wird keine N-Acetyl-Phneylalanyl-tRNA^{PHE} zugegeben.

2.7.2 Verwendete mRNA für Watanabe und Elongationssystem

Die folgenden mRNAs wurden im Watanabe oder in Experimenten zur Elongation mit heteropolymeren mRNA eingesetzt:

MF (Standard)

GGAAAACAAAACAAAACAAAC*AUGUUC*AAAACAAAACAAAACAAAC

MFStop

GGGAAAAGAAAAGAAAAGAAA*AUGUUCUAA*UAAAAGAAAAGAAAAGACAAGA
AAAAGGAGACAGAGCUACGGAAAUAUUCGG

MKVFSStop

GGGAAAAGAAAAGAAAAGAAA*AUGAAAGUAUUCUAA*UAAAAGAAAAGAAAAG
AAAAGAAAAGGAGACAGAGCUACGGAAAUAUUCGGAA

8CodonStop

GGCAA*AGGAGGT*ATTATTA*ATGTTCAAACGATCAATCTACGTATAA*TAAAAGAAA
AGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGGACATCACAGATTAACGAA

MVF

GGGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAUGUUCGUUAAAAGAAAAGAAAAGAA-
AU

12 (UUC)-RF2+SD (*pU+SD/RF2*)

*gguuc(uuc)*₁₁cguaugaaacugguucuuguuucuaggggguaucuuugacucugauucaaaaagggau

12 (UUC)-RF2-SD (*pU-SD/RF2*)

*gguuc(uuc)*₁₁cguaugaaacugguucuuguuucgcggcuaucuuugacucugauucaaaaagggau

Poly Uridin

Mix aus kurzen und langen Poly Uridinketten (20 -1000 U).

fraktioniertes Poly U

kurze Ketten (50nt)

lange Ketten (1400nt)

2.7.3 Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese

Die Elongationsfähigkeit der präparierten Ribosomen kann durch ein modifiziertes Poly(U)-abhängiges Poly(Phe)-Synthese System nach (Traub and Nomura, 1968) überprüft werden. Unter Standardbedingungen (15 µl Reaktionsmix) beträgt die finale Ionenkonzentration 20 mM HEPES-KOH pH 7.6 (0°C), 4,5 mM Magnesiumacetat, 150 mM Ammoniumacetat, 4 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM Spermidin und 0,05 mM Spermin. In der Bindungsreaktion (gesamt 7,5 µl) werden zunächst je Ansatz 5 pmol 70S Ribosomen durch Inkubation für 10 min bei 37°C faktorunabhängig an 40 µg Poly(U)-RNA gebunden. Die Beladungsreaktion (gesamt 10 µl) enthält eine Mischung aus kaltem und [¹⁴C]-markiertem Phenylalanin (je Ansatz ~10 dpm/pmol), 40 pmol tRNA Phe aus *E. coli*, einen Energiemix aus 3 mM ATP, 1,5 mM GTP und 5 mM Acetylphosphat, sowie eine optimierte Menge S100-Enzymfraktion, welche alle für die Proteinbiosynthese notwendigen löslichen Proteine, z.B. Translationsfaktoren und Aa-tRNA-Synthetasen, enthält. Die Beladungsreaktion wird zunächst 2 min bei 37°C präinkubiert bevor sie mit 5 µl der Bindungsreaktion vermischt wird (gesamt 15 µl Reaktionsmix, s.o.). Die Mischung wird für 60 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch schnelles Abkühlen in einem Eisbad gestoppt. Temperatur und Inkubationszeit können an dieser Stelle zur kinetischen Untersuchung der Ribosomen variiert werden. Das synthetisierte Poly-Phenylalanin fällt man quantitativ unter Zugabe von 3 Tropfen 1 % (s/v) BSA als Fällhilfe mit 2 ml 5 % TCA aus. Durch Erhitzen (15 Min. bei 90°C) wird [¹⁴C]-Phe-tRNA hydrolysiert, die sonst ebenfalls von dem Glasfaserfilter zurückgehalten werden würde. Nach dem Abkühlen der Proben im Eisbad werden sie über Glasfaserfilter (Schleicher & Schuell, 23 mm) filtriert. Die Filter werden zweimal mit 2 ml 5 % TCA gewaschen. Das Trocknen erfolgt mit ungefähr 3 ml Ether/Ethanolgemisch (1:1). Zum Zählen überführt man die Filter in

Szintillationsfläschchen, überschichtet sie mit 5 ml FilterCount und misst die Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler. Über die eingebaute Menge an radioaktivem Phenylalanin lässt sich die Ausbeute an synthetisiertem Polypeptid bestimmen.

2.7.4 Poly (U)-abhängige Poly(Phe/Leu)-Synthese

(Misinkorporationstest)

Die Poly(U)-abhängige Poly(Phe/Leu)-Synthese wird zum Testen der Häufigkeit von

Falscheinbauten während der Translation verwendet. Die experimentelle Vorgehensweise und Ionenkonzentration ist die Gleiche, wie in 2.7.1 beschrieben. Jedoch werden der Beladungsreaktion zusätzlich 200 pmol tRNA bulk, sowie 100 pmol [^3H]-Leucin (~ 3.000 dpm/pmol) hinzugefügt.

2.7.5 Elongationssystem für heteropolymere mRNA und EF-Tu

Aktivitätstest

Der Nachweis der Aktivität des EF-Tu kann durch direkten Vergleich der Synthese von Poly(Phe) in Gegenwart von EF-Tu bzw. der S100 Fraktion (enzymatische Fraktion des Zellaufschlusses) erfolgen. 2,5 pmol Ribosomen werden zur Bildung des Initiationskomplexes mit Poly(U) und 1,75 -fachen Überschuss an N-Acetyl- [^3H]-Phe-tRNA^{Phe} (Ac [^3H]-Phe-tRNA^{Phe}) programmiert. Anschließend erfolgte die Elongationsreaktion (10 Minuten) in Gegenwart eines 10-fachen Überschuss an [^{14}C]Phe-tRNA/70S, EF-Tu (2X/ Phe-tRNA), 0,5-fach EF-Ts/ EF-Tu und 60*EF-G/70S. Die Synthese des Poly(Phe) wurde durch Präzipitation mit Trichloressigsäure und Messung der filtergebundenen Radioaktivität bestimmt, Kapitel 2.7.5

2.7.6 *In vitro* (p)ppGpp Synthese durch RelA

Ein Ansatz (10 μl) bestehend aus 10 pmol 70S, 1,5 pmol RelA, 2 μg Poly(U), 30 pmol tRNA^{Phe} und jeweils 2 mM ATP und GTP (finale Ionenbedingungen $\text{H}_2\text{O}\text{M}_{4,5}\text{K}_{150}\text{SH}_4\text{Spd}_2\text{Spm}_{0,05}$) wird auf Eis pipettiert. Nach der Inkubation bei 37°C für 15 Minuten werden je 3 μL der Lösung entnommen, mit 0,6 μL wässriger TCA/HCOOH (10 % TCA / 50 % Ameisensäure) abgestoppt. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (2,5 min bei 4°C mit 15 000 rpm) werden die Nukleotide im Überstand mittels Dünnschichtchromatographie getrennt.

Dünnschichtchromatographie von (p)ppGpp

Für die Dünnschichtchromatographie werden 100.000 cpm γ - [^{32}P]-ATP oder γ - [^{32}P]-GTP pro Reaktionsansatz verwendet, damit die DC-platten mittels Autoradiographie analysiert werden können.

Die Dünnschichtchromatographie des (p)ppGpp's wird mit Polyethylenimin (PEI) beschichteten Zelluloseplatten (von Merck) und 1,5 M KH_2PO_4 (pH 4,5) als Laufmittel durchgeführt. Je 2-3 μl der Proben werden in 2 cm Abstand von den Rändern und mit

mindestens 1 cm Abstand zueinander entfernt auf die Platten aufgetragen. Nach dem Auftragen der Extrakte werden die Platte getrocknet (Pressluft oder kalt gefönt, da die Nukleotide in der Hitze zerfallen), mit technischem Methanol abgespült (erreicht dadurch eine bessere Auftrennung der Nukleotide) und erneut kalt getrocknet.

Nach Beendigung der Chromatographie wird die Platte getrocknet, in Klarsichtfolie gehüllt und auf einem PhosphorImager Screen exponiert. Die Quantifizierung erfolgt nach Auslesen des Screens rechnergesteuert mit Hilfe von ImageQuant (von Molecular Dynamics).

2.7.7 RTS 100 High Yield *E. coli* Kit (Roche)

Das RTS 100 System ist ein gekoppeltes Transkriptions- und Translationssystem für T7 Promotor basierende DNA Templates (Plasmide oder linearisierte DNA Fragmente). Es besteht aus sechs getrennt voneinander zu rekonstituierenden Lösungen, die *E. coli* Lysat, Energiekomponenten, Aminosäuren, Reaktionspuffer und Kontroll-DNA.

Die Rekonstitution erfolgte nach Herstellerangaben, siehe Tabelle.

1. <i>E. coli</i> Lysate	Das Lyophilisat in 0,36 ml Rekonstitution Puffer aufnehmen und vorsichtig mischen. Nicht vortexen.
2. Reaktions-Mix	Das Lyophilisat in 0,3 ml Rekonstitutions-Puffer aufnehmen und vorsichtig mischen. Nicht vortexen.
3. Aminosäuren	Das Lyophilisat in 0,36 ml Rekonstitutions-Puffer aufnehmen und vorsichtig mischen. Nicht vortexen.
4. Methionin	Das Lyophilisat in 0,33 ml Rekonstitutions-Puffer aufnehmen und vorsichtig mischen. Nicht vortexen.
5. Rekonstitutions-Puffer	1,6 ml Fertiglösung, bei -20°C lagern.
6. Kontrollvector GFP	Kurz zentrifugieren und das Lyophilisat in 50 µl lösen.

Der empfohlene Reaktionsansatz von 50 µl wurde auf 10 µl/ Reaktion reduziert.

Mastermix für 10 Reaktionsansätze:

24 µl	<i>E. coli</i> Lysate
20 µl	Reaktions-Mix
24 µl	Aminosäuren ohne Met
2 µl	Methionin
10 µl	Rekonstitutions-Puffer
5 µl	H ₂ O

10 Expressionsansätze zu je:

8,5 µl	Mastermix
1 µl	plasmid GFP-cyc3 (0,1 µg/µl)
0,5 µl	Milli Q oder Antibiotikum oder LepA

Die Reaktionszeit beträgt 6 Stunden bei 30°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 900 rpm. Anschließend erfolgt die Reifung des GFP bei 4°C für 16 Stunden.

Die Analyse der Gesamtmenge und der aktiven Menge an GFP erfolgt durch Elektrophorese auf SDS-Polyacrylamid und nativen Polyacrylamid Gelen.

2.8 Computergestützte Methoden

2.8.1 Sekundärstrukturanalyse von RNA

Die Analyse von Sekundärstrukturen von RNA und dem Minimum an freier Energie der Faltung kann mit dem von Zuker entwickelten Programm MFOLD Version 3.0 (Zuker, 2003) erfolgen, das Programm ist auf der Internetseite <http://mfold.burnet.edu.au/> zu nutzen.

2.8.2 Sequenzvergleiche von Genen aus verschiedenen Organismen

DNA-Sequenzen und Aminosäuresequenzen aus gleichen und verschiedenen Organismen können mit Hilfe des Programms Multalin verglichen werden, dieses ist auf der Internetseite www.toulouse.inra.fr/multalin.html zu nutzen.