

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das zentrale Dogma der Molekularbiologie.....	1
1.2 Transkription.....	1
1.3 Translation.....	2
1.3.1 Übersicht.....	2
1.3.2 Ribosomen.....	3
1.3.3 Aminoacylierung von Transfer-Ribonukleinsäure.....	3
1.3.4 Initiation.....	4
1.3.5 Elongation.....	7
1.3.6 Termination.....	9
1.4 Abbau von messenger RNA-Molekülen in <i>Escherichia coli</i>	11
1.4.1 Regulation der mRNA-Degradation.	11
1.4.2 Initiation der Degradation.....	12
1.4.3 Ribonukleasen und Degradosom.....	13
1.5 Translation <i>in vitro</i>	17
1.6 Zielsetzung	21
2. Material	22
2.1 Chemikalien, Biochemica.....	22
2.2 Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren, Kits.....	23
2.3 Geräte und Zubehör.....	24
2.4 Sonstiges.....	25
3. Methoden	26
3.1 Methoden zur Nukleinsäure-Aufreinigung und -Analytik.....	26
3.1.1 Ethanol- und Isopropanol-Präzipitation.....	26
3.1.2 Phenol-Extraktion.....	26
3.1.3 Gelfiltration.....	27
3.1.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	28
3.2 Gelelektrophorese.....	28
3.2.1 Native und denaturierende Agarosegel-Elektrophorese.....	28
3.2.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	30
3.3 Zellanzucht von <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	33
3.3.1 Zellanzucht in Flüssigkultur.....	33
3.3.2 Zellanzucht von Einzelkolonien.....	34
3.3.3 Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	34
3.4 Präparation von Plasmid-DNA.....	34
3.5 Nukleinsäure-modifizierende enzymatische Reaktionen.....	35
3.5.1 Behandlung von RNA-Präparationen mit Desoxyribonuklease I.....	35
3.5.2 Behandlung von Nukleinsäurelösungen mit Proteinase K.....	36
3.6 <i>In vitro</i> DNA-Rekombinationstechniken.....	37
3.6.1 Restriktionsenzymspaltung.....	37
3.6.2 Dephosphorylierung.....	37
3.6.3 Phosphorylierung.....	38
3.6.4 DNA-Ligation.....	38
3.6.5 Transformation von <i>Escherichia coli</i> JM109 Zellen.....	39
3.7 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion mit <i>Pwo</i> DNA-Polymerase	39
3.7.1 Standard PCR.....	40
3.7.2 Plasmid-Amplifikation und Mutagenese.....	41
3.8 DNA-Sequenzierung.....	42

3.9 <i>In vitro</i> Transkription.....	43
3.10 <i>In vitro</i> Proteinbiosynthese.....	44
3.11 Aminoacylierung von tRNA in der S100-Fraktion.....	46
3.12 TCA-Fällung von RNA und Protein.....	47
3.13 Detektion von β -Strahlung.....	48
3.14 Affinitätschromatographie mit Strep-tag II.....	49
3.15 Bestimmung der Ölsäurebindung an das Fettsäure Bindende Protein H-FABP.....	50
4. Ergebnisse	51
4.1 Einfluß der 5'-terminalen codierenden Sequenz auf die Synthese von H-FABP.....	52
4.1.1 Einfluß des zweiten Aminosäurecodons auf die Synthese von H-FABP.....	52
4.1.2 Einfluß <i>in vitro</i> transkribierter tRNA auf die Synthese der H-FABP- Mutanten	56
4.1.3 Einfluß der tRNA-Struktur auf die Synthese der H-FABP-Mutanten.....	57
4.1.4 Einfluß der Position des kritischen Codons GAG ₂ auf die Synthese von H-FABP.....	60
4.1.5 Korrelation zwischen mRNA-Struktur und Expression der H-FABP-Mutanten	61
4.1.6 Einfluß von Antisense-DNA-Oligomeren auf die Translation.....	63
4.2 Translationseffizienz von Fusionsproteinen aus H-FABP und DHFR.....	65
4.3 Translationseffizienz oligomerer Fusionsproteine.....	69
4.4 Limitierung der Proteinsynthese durch tRNA.....	73
4.4.1 Limitierung der DHFR-Synthese.....	73
4.4.2 Limitierung der NusA-Synthese.....	76
4.5 Einfluß des Translationsstopcodons auf die H-FABP-Synthese.....	78
4.6 Messenger RNA – Stabilität und Proteinsynthese.....	82
4.6.1 Messenger RNA Stabilität in der <i>in vitro</i> Proteinbiosynthese abhängig vom 3'-Terminus.....	82
4.6.2 Einfluß der Translation auf die mRNA-Stabilität.....	86
4.6.3 Einfluß von Translationsantibiotika auf Proteinbiosynthese und mRNA- Stabilität.....	91
4.7 Expressions – Polymerase – Kettenreaktion.....	97
4.7.1 Expressions-Polymerase-Kettenreaktion für die <i>in vitro</i> Proteinsynthese (E-PCR)	97
4.7.2 Minimierung der Primergröße.....	98
4.7.3 Expressions-PCR für die Synthese eines H-FABP-Sreptag-Fusionsproteins und Steigerung der Proteinausbeute.....	101
4.7.4 Einstufige Expressions-PCR mit vier Primern und Amplifikation aus kom- plexem DNA-Gemisch.....	104
4.7.5 Affinitätsreinigung von H-FABP-Strep-tag II exprimiert vom E-PCR- Produkt.....	107
4.7.6 Aktivitätstest des ausgehend vom E-PCR-Produkt exprimierten H-FABP.....	108
4.7.7 Stabilität des E-PCR-Produkts im zellfreien Proteinsynthesystem.....	109
4.8 Fehlerabschätzung bei der Ermittlung der Konzentration an synthetisiertem Protein.....	111
5. Diskussion	112
6. Zusammenfassung / Summary	119
7. Abkürzungen	121
8. Literaturverzeichnis	123
8.1 Literaturzitate.....	123
8.2 Eigene Publikationen.....	135
9. Anhang	136
10. Danksagung	138
11. Lebenslauf	139