

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Institut für Biotechnologie

Fachbereich Biochemie

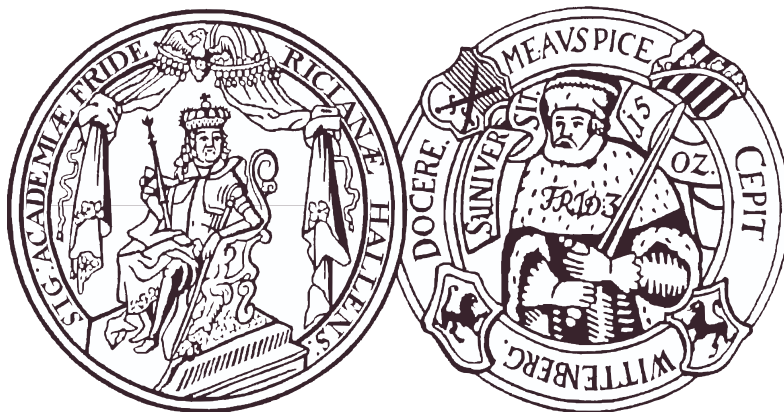
**Charakterisierung der rekombinanten Expression
von Wnt4 und Wnt6 in Escherichia coli**

Diplomarbeit

vorgelegt von

Ulf Winfried Liebal

geboren am 15.09.1981 in Magdeburg/Elbe



eingereicht am: 24.07.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2a	Zusammenfassung	2
2b	Summary	3
3	Einleitung	4
3.1	Transkription und Translation	5
3.2	Aggregation und Proteinstabilität	8
3.3	Die Modellproteine Wnt4 und Wnt6	10
3.4	Zielstellung der Arbeit	11
4	Materialien	12
4.1	Geräte	12
4.2	Chemikalien	13
4.3	Enzyme und Proteine	14
4.4	Stämme, Plasmide und Primer	15
4.5	Sonstige Materialien	16
4.6	Programme, Web-Ressourcen	16
4.7	Sonstige Einrichtungen	18
4.8	Medien, Lösungen, Puffer	18
5	Methoden	21
5.1	Gentechnische Methoden	21
5.1.1	Herstellung kompetenter Zellen	21
5.1.2	Transformation	21
5.1.3	Plasmidisolation	22
5.1.4	Trennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	22
5.1.5	Überprüfen der Plasmidgröße	22
5.1.6	Kultur-PCR	23
5.1.7	Test von Plasmiden auf <i>Insert</i> mittels PCR	24
5.1.8	<i>site directed</i> Mutagenesis	24
5.1.9	Sequenzierung von DNA	25
5.2	Zellanzucht und Proteinexpression	27
5.2.1	Wahl des Expressionssystems	27

5.2.2	Expressionsexperiment	27
5.2.2	Bestimmung der Protein-Halbwertzeit <i>in vivo</i>	28
5.3	Analyse der mRNA	29
5.3.1	Extraktion der Gesamt-RNA von RNA-Proben	29
5.3.2	RNA Quantifizierung mittels <i>Ribogreen</i>	29
5.3.3	Elektrophoretische Auftrennung von RNA-Proben	30
5.3.4	Digoxigeninmarkierung von Oligonukleotidsonden	30
5.3.5	<i>in vitro</i> Transkription	31
5.3.6	<i>Sandwich Hybridisation-Assay</i> mit extrahierter RNA	31
5.3.7	Vorbereitung des Zellrohextrakts für SH-Assay	34
5.3.8	<i>Sandwich Hybridisation-Assay</i> mit Zellrohextrakt	34
5.4	Protein-Analyse	35
5.4.1	Zellaufschluss	35
5.4.2	Proteinanalyse in der SDS-PAGE	36
5.4.3	Coomassie-Färbung	37
5.4.4	<i>Western Blot</i>	37
5.4.5	Ponceau-Färbung	38
5.5	Spektroskopische Analysen	38
5.5.3	Lichtstreu- und Absorptionsanalysen	38
5.5.2	Fluoreszenzmessungen	39
5.5.3	Massenspektroskopische Untersuchungen	39
5.6	<i>in silico</i> Betrachtungen und mathematische Aspekte	40
5.6.1	Simulation der Translation rekombinanter mRNA	40
5.6.2	Analyse der mRNA-Faltung	41
5.6.3	Daten-Auswertung	42
5.6.4	Bestimmung der Halbwertzeit	44
6	Ergebnisse	45
6.1	Optimierung der Translation	45
6.1.1	Optimierung der <i>wnt4</i> -mRNA – theoretische Analyse	45
6.1.2	Optimierung der <i>wnt4</i> -mRNA – <i>site directed</i> Mutagenese	46
6.1.3	Optimierung der <i>wnt6</i> -mRNA – theoretische Analyse	47
6.1.4	Optimierung der <i>wnt6</i> -mRNA – <i>site directed</i> Mutagenese	47
6.1.5	Sekundäre RBS in <i>wnt4</i>	48

6.1.6	Inaktivierung der sekundären RBS – site directed Mutagenese	49
6.1.7	Bioinformatische charakterisierung der <i>wnt4</i> -mRNA	50
6.1.8	Bioinformatische charakterisierung der <i>wnt6</i> -mRNA	51
6.1.9	Messung des <i>wnt4</i> -mRNA Gehalts	53
6.1.10	Messung des <i>wnt6</i> -mRNA Gehalts	58
6.2	Zellwachstum bei Expression	61
6.2.1	Expression von <i>wnt4</i>	61
6.2.2	Expression von <i>wnt6</i>	63
6.3	Expression rekombinanten Proteins in <i>E. coli</i>	64
6.3.1	Expression von Wnt4 in BL21	64
6.3.2	Expression von Wnt4 in Rosetta	66
6.3.3	Expression von Wnt4 bei 42 °C	68
6.3.4	Analyse der Proteinexpression für <i>wnt4</i> -SRBS	69
6.3.5	Expression von Wnt6 in BL21	71
6.3.6	Expression von Wnt6 in Rosetta und Expression bei 42 °C	72
6.3.7	Bestimmung der Protein-Halbwertzeit von Wnt4	73
7	Diskussion	76
7.1	Transkription	76
7.2	Translation	78
7.3	Zellglobaler Einfluss der heterologen Expression	81
7.4	Proteolyse und Aggregation	82
7.5	Vorschläge zur Optimierung der Expression	83
8	Literaturverzeichnis	86
9	Anhänge	I
9.1	Konstrukt- und Proteinsequenz – <i>wnt4</i> & <i>wnt6</i>	I
9.2	<i>wnt4</i> <i>in vitro</i> Standard	III
9.3	Berechnungen im SH-Assay	V
9.4	Elektrophoretische RNA-Auftrennung	IX
9.5	<i>wnt6</i> SH Zusatzinformationen	XIII
9.6	Berechnungen der Proteinhalbwertzeit	XV
9.7	Simulationsparameter	XVI

Abkürzungen

A	Adenin
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
ASD- Sequenz	Anti- Shine- Dalgarno- Sequenz
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
Cam	Chloramphenicol
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxynuklease
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
ECL	effektive Chemolumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
IB	<i>inclusion body</i>
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
kD	kilodalton
LB	Luria Bertani Medium
OD	optische Dichte
RBS	Ribosomenbindestelle
PBS	Phosphat gepuffertes System
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA- Polymerase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro min
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SD- Sequenz	Shine- Dalgarno- Sequenz
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese
SH	<i>Sandwich</i> -Hybridisation
SSC	Standard-Saline-Citrat
T	Thymin
TFA	Trifluoracetat
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	Uracil; Unit

In diesem Dokument wird der Punkt als Dezimaltrennzeichen benutzt und das Komma, wenn angebracht, als Tausendertrennzeichen.

2a Zusammenfassung

Wnt4 und Wnt6 sind extrazelluläre Signalmoleküle und gehören zur Klasse der Wnt-Proteine. Die Proteine wirken unter anderem während der Musterbildung im Embryo und auf die Entwicklung von Stammzellen im adulten Organismus. Einige Krankheiten sind mit Fehlfunktionen der Proteine verbunden, daher ist aus medizinischer Hinsicht eine biophysikalische und biochemische Charakterisierung wünschenswert. Bisher wurde jedoch die Charakterisierung durch eine unzureichende Expression im heterologen Wirt erschwert. In dieser Arbeit sollen Wnt-Proteine als IBs produziert und ihre Expression in *E. coli* analysiert werden. Dabei hat sich herausgestellt, dass die mRNAs von *wnt4* und *wnt6* in hoher Konzentration vorliegen und damit die Transkription nicht limitierend für die Expression der rekombinanten Gene ist. Über Mutagenesen wurde eine strukturoptimierte mRNA für *wnt4* und *wnt6* entworfen, die den Berechnungen zufolge die Assoziation der Ribosomen an die RBS erleichtern sollte. Da keine erhöhte Expression nachgewiesen werden konnte, kann eine auf den Annahmen basierende Limitierung der Expression durch Sekundärstrukturen ausgeschlossen werden. Auch seltene Codons haben nur einen geringen Einfluss auf die Translation, denn eine Expression der rekombinanten Gene in Rosetta-Zellen, die seltene tRNAs co-exprimieren, führt zu keinem Anstieg in der Proteinmenge. Eine sekundäre RBS in der *wnt4* mRNA hat einen translationshemmenden Effekt; wird dessen Komplementarität zur ASD-Sequenz reduziert, kann mehr Protein als im Fall der Wildtyp Sequenz nachgewiesen werden. Die vorliegenden Wnt-Proteine sind für die Zelle nicht toxisch, da das Wachstum der Zellen nach Induktion kaum beeinträchtigt ist. Für das Wnt4-Protein wurde die *in vivo* Stabilität bestimmt, die zwischen 62 und 82 Minuten liegt. Im allgemeinen werden Aggregate als stabile Proteinablagerungsformen angesehen. Daher wurde versucht die Aggregationsneigung der Wnt-Proteine durch Expressionen bei 42 °C zu erhöhen. Allerdings konnte auch bei diesen Versuchen kein erhöhtes Level an Wnt-Proteinen im Vergleich zu einer Expression bei 37 °C gemessen werden. Die schlechte Expression der Wnt-Proteine liegt wahrscheinlich an ihrer geringen zellulären Stabilität und weitere Optimierungen sollten diesen Zustand verbessern.

Dem Ziel der Arbeit folgend IBs von Wnt-Proteinen zu produzieren, wurde eine 10 l Fermentation von *wnt4* mit mutierter sekundärer RBS, das mehr Protein als die Wildtyp *wnt4* mRNA brachte, durchgeführt, so dass nun Protein für Rückfaltungsexperimente und folgende biochemische und biophysikalische Studien vorliegt.

2b Summary

Wnt4 and Wnt6 are extra cellular signal molecules and belong to the Wnt protein class. These proteins contribute actively in pattern formation in the embryo and development of stem cells in the adult organism. Various illnesses are connected with the malfunctioning of these proteins, therefore from a medical point of view a biophysical and biochemical characterisation would be desirable. However, the characterisation is impeded by the insufficient expression in the heterologous host. This work attempts to produce Wnt protein as IBs and to analyse the expression in *E. coli*. Thereby, it could be observed that the mRNAs of *wnt4* and *wnt6* are present at high concentrations and that therefore transcription is not among the factors that limit the expression of the recombinant gene.

Via site directed mutagenesis structure optimised versions of the *wnt4* and *wnt6* genes were constructed, that should, according to calculations, facilitate the association of ribosomes with the RBS. Since no elevated level of expression could be detected secondary structures that follow the assumptions of the aforementioned calculations are not limiting for the expression of the recombinant genes. Likewise, rare codons only have a minor influence on translation since an expression in *E. coli* Rosetta cells, that co-express rare tRNAs, does not lead to a rise in the product level. A secondary RBS could be found in the mRNA of *wnt4* that deteriorates the efficiency of translation, after reducing its complementary to the ASD sequence more protein could be detected with respect to the wild type sequence. The present Wnt4 and Wnt6 proteins seem not to be toxic to the cell because the cell growth is only marginally affected after induction. For the Wnt4 protein the *in vivo* stability was estimated to range between 62 to 82 min. Aggregations are generally considered as stable protein deposits. Therefore, it was attempted to raise the propensity of aggregation of the Wnt proteins by expression at 42 °C. However, there was no increased product level as compared to expression at 37 °C. The poor expression of the Wnt proteins most likely originates in the low cellular stability and further optimisation efforts should improve this condition.

Following the goal of the thesis to produce IBs of Wnt proteins a 10 l fermentation was performed with the *wnt4* variant that contained the mutated secondary RBS and yielded more product with respect to the wild type. Thus, Wnt4 protein is now available for refolding and subsequent biophysical and biochemical examinations.

3 Einleitung

Proteine gehören zu den fundamentalen Bausteinen des Lebens. Ihre Funktionalität ist entscheidend für den reibungslosen Ablauf der zellulären Reaktionen und Fehlfunktionen der Proteine führen nicht selten zu Krankheiten. Um Krankheiten zu verstehen und zu behandeln ist es daher nötig die mit ihnen verknüpften Proteine biochemisch und biophysikalisch zu charakterisieren. Für Eukaryoten ist es jedoch oftmals schwierig an ausreichende Mengen Protein für die Untersuchungen zu gelangen, wenn man auf umständliche Extraktion aus Gewebestücken beschränkt ist, um ein gering exprimiertes Protein zu gewinnen. Daher hat sich die rekombinante Produktion von Proteinen zu einem erfolgreichen Standardverfahren zur effizienten Herstellung vieler eukaryotischer Proteine entwickelt. Rekombinante Expression bezeichnet die Herstellung eines Proteins in einem Organismus, der erst durch gentechnologische Verfahren ein ihm fremdes Protein produziert. Das Protein kann in weiteren Verfahren extrahiert, gereinigt und zu weiteren wissenschaftlichen, therapeutischen oder industriellen Zwecken eingesetzt werden.

Das Gram-negative Bakterium *E. coli* wurde als Plattform der rekombinanten Expression entwickelt und ist oft das System der Wahl. Dafür spricht die Einfachheit des Bakteriums, wobei schon ein umfangreiches Wissen um dessen Genetik vorliegt. Es gibt verschiedene Vektorsysteme, die in unterschiedliche Stämme transformiert werden können und so Spielraum für Optimierung lassen. Es wird berichtet, dass die gängigen Laborstämme K12 und B apathogen sind und damit keine hohen Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden müssen (Chart et al. 2000, Sørensen & Mortensen 2005). Die Anzucht von *E. coli* kann sehr kostengünstig erfolgen und über Mineralsalzmedien können konstante Wachstumsbedingungen für reproduzierbare Ergebnisse garantiert werden. In der rekombinanten Expression kann sich das heterologe Protein auf bis zu 50 % der Gesamtproteinmenge anreichern (Baneyx 1999). Ebenso ist eine Produktion der heterologen Proteine im industriellen Maßstab ein routiniertes Verfahren, womit große Mengen an Protein erhalten werden kann (Makrides 1996, Baneyx 1999, Sørensen & Mortensen 2005). In den meisten Fällen wird das heterologe Protein in Aggregate und *inclusion bodies* (IBs) gelagert (Ventura 2005), damit vereinfacht sich die Proteinisolation und durch Rückfaltung kann das Protein in aktiver Form erhalten werden (Rudolph & Lilie 1996). Neben der Nutzung der Aggregate und IBs, die eine einfache Aufreinigung erlauben, jedoch eine komplexere Rückfaltungstechnik erfordern, ist es möglich heterologe Proteine in das Medium zu sekretieren (Zhang et al.

2006). Damit können intrazelluläre Proteineffekte, wie *heat-shock-like-response* oder Toxizität, umgangen werden und das Protein selbst kann leicht von den Mediumsbestandteilen abgetrennt werden.

Natürlich gibt es auch Nachteile bei der Nutzung dieses einfachen Prokaryoten. Da *E. coli* in seinem Zytoplasma ein reduzierendes Milieu aufrechterhält, können sich im Protein im allgemeinen keine Disulfidbrücken bilden, um die Faltung zu unterstützen. Rekombinante Proteine werden normalerweise nicht glykosyliert, doch auch Glykosylierung kann eine wichtige Rolle im Bezug auf die Energetik der Faltung spielen (Ruggiero et al. 2003, Baneyx & Mujacic 2004). Die hohe Expressionsgeschwindigkeit und die hohen Produktkonzentrationen können die Faltung von großen oder Komplexen Proteinen, die einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren haben oder viele Disulfidbrücken besitzen, zusätzlich erschweren oder verändern (Fahnert et al. 2004a). Die Belastung durch falschgefaltete Proteine führt zu einer *heat-shock-like-response*, in der Proteasen und Faltungshelfer synthetisiert werden, um abnormale Proteine abzubauen und falschgefaltete Proteine auf dem Faltungsweg zur regulären Struktur zu unterstützen (Schweder et al. 2002, Baneyx & Mujacic 2004). Schließlich können sich Aggregate und *inclusion bodies* (IBs) aus falschgefalteten Proteinen bilden, die relativ stabil in der Zelle vorliegen (Fahnert et al. 2004a).

Andere, häufig angewendete Expressionssysteme sind bei den Prokaryoten zum Beispiel *Staphylococcus carnosus*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Bacillus subtilis*. Als einfache eukaryotische Systeme werden *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis* benutzt. Auch höhere eukaryotische Zellen können eingesetzt werden zB. Insektenzellen, *Chinese-Hamster-ovary*-Zellen oder transgene Tiere und Pflanzen (Neubauer 2006). Vor allem die letztgenannten eignen sich gut zur Herstellung therapeutischer Proteine, die posttranslationelle Modifikationen erfordern (Andersen & Krummen 2002).

3.1 Transkription und Translation

Für die rekombinante Expression ist eine große Anzahl an Vektoren erhältlich, wobei meist die *E. coli*-RNAP zur Transkription der rekombinanten mRNA verwendet wird. In dieser Arbeit wurde das T7-Expressionssystem verwendet, in dem die T7-RNA-Polymerase vom T7-Phagen zur Transkription der rekombinanten mRNA genutzt wird (Studier & Moffat 1986). Dazu klonierte Studier (Studier & Moffat 1986) das Gen 1 des T7-Phagen, das für die T7-RNAP kodiert, in den Vektor D69 (Mizusawa & Ward 1982). Der Vektor D69

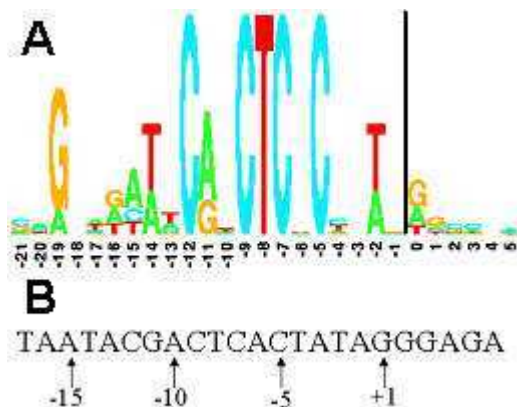


Abbildung 1: A) Der Sequenzlogos gibt die Nukleotide an, die für die Assoziation der T7-RNAP verantwortlich sind (Schneider & Stephens 1990). B) T7- RNAP Promotorsequenz im pET3a Plasmid. Transkription beginnt bei +1.

kennzeichnet die DNA des Lambda-Phagen 473 bei Hendrix (Hendrix et al. 1983), die Insertion des T7-Gen 1 erfolgt im Leseraster des *int*-Gens, sodass keine Integration der DNA mehr stattfinden kann. Über einen Hilfsphagen, der das *int*-Genprodukt zur Insertion liefert, wurde der D69-Vektor in das Genom von BL21 (Wood 1966) eingefügt. Der so konstruierte Stamm mit der Bezeichnung DE3 trägt das T7-Gen 1 hinter dem *lacUV5* Promoter und kann mit IPTG induziert werden (Studier & Moffat 1986). Die T7-RNAP hat

den Vorteil, dass die *E. coli*-RNAP keine Affinität zum Promotor der T7-RNAP besitzt. Die T7-RNAP ihrerseits ist hochspezifisch für ihren Promotor. Das rekombinante Gen ist die einzige Zielsequenz, die nach Induktion transkribiert wird. Die Geschwindigkeit der Transkription liegt bei ca. 230 Nukleotiden pro Sekunde (Kochetkov et al. 1989), womit eine große Anzahl von mRNA Molekülen in kurzer Zeit synthetisiert werden kann.

Der Vektor, der für die Klonierung des rekombinanten Gens benutzt wird, ist ein Plasmid für die Expression durch die T7-RNAP (pET Vektor). Hilfsplasmide, die zusätzlich die Expression unterstützen sollen, sind pLysS und pRARE. pLysS kodiert für das T7-Lysozym, das im nichtinduziertem Zustand einen Komplex mit der T7-RNAP bildet. In diesem Komplex hat die Polymerase eine geringere Geschwindigkeitskonstante für den Wechsel der Initiation zur Elongation der Transkription und häufig wird der Übergang vorzeitig abgebrochen. Dagegen wird die Transition von der Elongationsphase in die Terminationsphase gefördert, so dass die Transkription leicht vorzeitig abbricht (Studier 1991, Lyakhov et al. 1998). Im induzierten Zustand wird soviel T7-RNAP produziert, dass das T7-Lysozym schlicht austitriert wird (Studier et al. 1990).

Das Plasmid pRARE kodiert für 10 tRNA-Gene (vgl. Plasmid pRARE in 2.4), deren entsprechenden Codons in den *E. coli* Genen eine geringe Codonnutzung aufweisen. Eine geringe Codonnutzung korreliert mit einer geringen zellulären Konzentration der tRNA, (Ikemura 1981). Weiter korreliert die Konzentration einer tRNA mit der Translationsgeschwindigkeit, wenn angenommen wird, dass die Translationsreaktion linear zur Konzentration der tRNAs verläuft (Elf et al. 2003). Diese Korrelation konnte für einige tRNAs experimentell bewiesen werden (Curran & Yarus 1989, Sørensen & Pedersen 1991).

Mit der Überexpression an tRNAs soll die Translationsgeschwindigkeit der seltenen Codons erhöht werden, um „Ribosomenstaus“ zu verhindern, die möglicherweise Effekte wie *A-site cleavage* auslösen (Hayes & Sauer

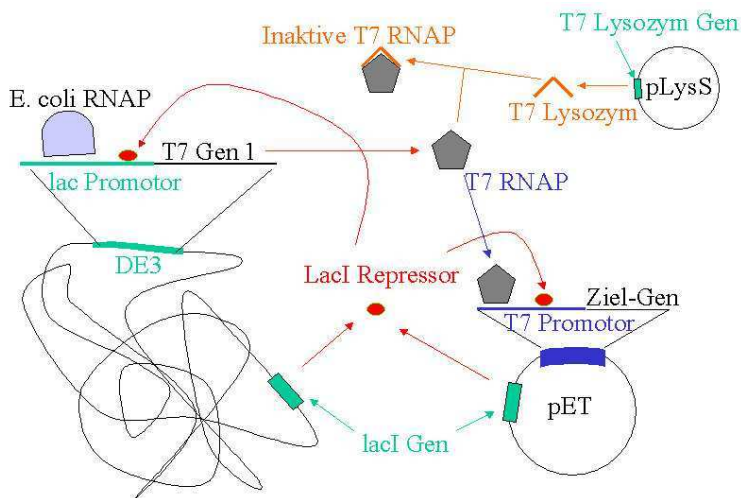


Abbildung 2: Funktionsprinzip des T7- Expressionssystems. *E. coli* Genom und Plasmid kodieren für das lacI Gen, dass zum Lac Repressor translatiert wird und die Transkription vom T7- Gen 1 und Ziel-Gen in pET unterdrückt. Das T7- Lysozym überführt die T7- RNAP in eine inaktive Form. Das zugegebene IPTG zur Induktion inaktiviert den Lac Repressor ermöglicht so die Transkription vom lac- und T7- Promotor.

2003) oder die Qualität der mRNA anderweitig minimieren (Deana & Belasco 2005).

Die Selektion erfolgt für pET mit Ampicilin. pLysS und pRARE werden mit Chloramphenicol selektiert und können daher nicht kombiniert werden.

Ein zentrales Element in der Proteinexpression ist die Translation, die einen erheblichen Beitrag zu einer differentiellen Expressionseffizienz von verschiedenen

Proteinen bildet. Die Translation ist einer der frühesten Punkte, die von den unterschiedlichen Sequenzen der rekombinanten Gene beeinflusst werden. Dabei ist die Translationsinitiation von herausragender Bedeutung und wird als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Translation angenommen (Arnold 2003). Einfluss auf die Rate der Translationsinitiation haben 1.) die Komplementarität der Shine-Dalgarno- (SD) Sequenz auf der mRNA zur Anti-Shine-Dalgarno- (ASD) Sequenz am 3'-Ende der 16S rRNA und 2.) die Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle (RBS) zur Assoziation mit Ribosomen.

Eine hohe Komplementarität von SD- zu ASD-Sequenz, wie es der Fall für das T7-Expressionssystem ist, resultiert in einer hohen Assoziationsrate für ein Ribosom zur RBS und führt damit zu einer höheren Expression (Weyens et al. 1988, Vind et al. 1993). In Analogie zu einer Enzymreaktion ist die Ausbildung von internen Sekundärstrukturen mit der Ribosomenbindestelle eine kompetitive Reaktion zur Anlagerung des Ribosoms, denn das Ribosom kann die RBS in einer Sekundärstruktur nicht erkennen und die Affinität des Ribosoms für RNA-Sekundärstrukturen ist geringer als für einen RNA-Einzelstrang, (Schlax & Worhunsky 2003, de Smit & van Duin 2003). Von besonderer Bedeutung ist die Region 15 Nukleotide vor und nach dem Startcodon AUG, denn dies entspricht dem Bereich, der von Ribosomen auf der mRNA überdeckt wird (Noller et al. 2001). De Smit und van Duin haben Untersuchungen am MS2 Hüll-Protein durchgeführt, um die quantitative Abhängigkeit der

Energie eines *Hairpins* in der RBS mit der Expressionseffizienz zu bestimmen. Die Untersuchungen zeigten, dass bei einer Sekundärstruktur, die stabiler als 6 kcal/mol ist, eine

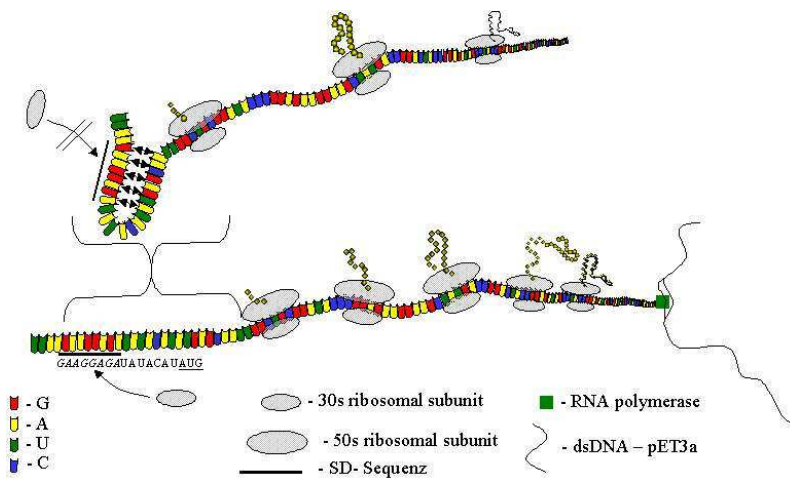


Abbildung 3: Einfluss der Sekundärstruktur auf die Translations-effizienz. Sekundärstrukturen reduzieren die Affinität des Ribosoms für die Shine-Dalgarno Sequenz (SD Sequenz) und vermindern so die Expressionseffizienz.

Korrelation zwischen der Energie der Sekundärstruktur und der Expressionseffizienz besteht (de Smit & van Duin 1990). Im T7-System gehört die 5'- vom RBS liegende Region zum konstanten Plasmidteil. Daher werden Unterschiede in der Energie der Sekundärstruktur um die RBS vor allem vom variablen Teil des T7-Expressionssystems, bestehend

aus der Sequenz des rekombinanten Gens 3'- vom Startcodon bestimmt.

Ebenso von Bedeutung für die Translation und Expressionseffizienz kann das Auftreten von internen oder sekundären RBS sein, die auch in dieser Arbeit eine Rolle spielen. Damit werden AG-reiche Sequenzabschnitte innerhalb des kodierenden Bereiches bezeichnet, die eine Homologie zur SD-Sequenz aufweisen. Damit sind diese Sequenzabschnitte in der Lage Ribosomen zu rekrutieren, die dann regulär translatierende Ribosomen aufhalten können. Der negative Effekt von sekundären RBS erhöht sich, je näher sie am Start Codon lokalisiert ist (Ivanov et al. 1992). Durch *site directed* Mutagenese kann die Komplementarität einer sekundären RBS zur ASD-Sequenz reduziert werden, wonach für das SAA4 Protein eine höhere Expression nachgewiesen werden konnte (Hrzenjak et al. 2001).

3.2 Aggregation und Proteinstabilität

Über die rekombinante Expression wird eine große Menge an Protein synthetisiert und in vielen Fällen kommt es zur Bildung von unlöslichen Aggregaten (Ventura 2005). Im Allgemeinen wird Aggregation durch hydrophobe Wechselwirkungen von ungefalteten Proteinabschnitten ausgelöst (Fahnert et al. 2004a), die besonders ausgeprägt bei hydrophoben Polypeptiden und Membranproteinen sind. Falschfaltung ist besonders prominent für Proteine mit einem hohen Anteil an Disulfidbrücken, denn die Verknüpfung zweier Cysteine ist oft die langsamste Reaktion der Proteinfaltung, daher auch ihr

geschwindigkeitsbestimmender Schritt. Da aber das Zytoplasma von *E. coli* reduktiv ist, können in der Regel keine Disulfidbrücken gebildet werden, womit die Faltung unvollständig bleibt und das Protein instabiler und leichter zugänglich für Aggregation ist (Fahnert et al. 2004a). Als *Inclusion bodies* (IBs) werden dichtgepackte, amorphe Proteinablagerungen im Zyto- oder Periplasma bezeichnet (Ventura 2005), die unter anderem von hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in β -Faltblättern zusammengehalten werden (Fahnert et al. 2004a, Fernandez-Escamilla et al. 2004). IBs besitzen durch ihre sterische Kompaktheit eine hohe Resistenz gegenüber Proteasen (Yang 1995b), die den proteolytischen Angriff nur an der Oberfläche erlaubt. Die Eigenschaften der IBs können daher genutzt werden, um proteolytisch sensitive Proteine zu stabilisieren und um die Isolation des Proteins als IBs zu erleichtern (Fahnert et al. 2004a).

Proteasen spielen eine wichtige Rolle für die zellulären Funktionen von *E. coli*, da 3 % aller enzymatischen Reaktionen in der Zelle proteolytischen Ursprungs sind (Rozkov 2001). So werden über proteolytische Prozessierung aus inaktiven Vorläuferproteinen aktive Proteine, und Proteasen kontrollieren die Konzentration von regulatorischen Proteinen. Daneben erfüllen sie auch die wichtige Funktion Proteine abzubauen, sei es um dadurch bei geringem Nährstoffangebot Ressourcen zu gewinnen oder um Proteine zu beseitigen, deren Funktion abkömmlich oder unter Umständen gar kontraproduktiv geworden ist. Auch beschädigte, fehlerhaft translatierte oder falschgefaltete Proteine werden von Proteasen entsorgt (Miller 1996). In der rekombinanten Biotechnologie kann ihre Aktivität jedoch nachteilig sein, denn gerade die heterologen Proteine sind oft ein bevorzugtes Substrat der Proteasen, da sie häufig falschgefaltet vorliegen (Baneyx & Mujacic 2004). Der Abbau rekombinanter Proteine wird im wesentlichen von ATP hydrolysierenden Proteasen durchgeführt (Miller 1996, Yang & Enfors 1995a). Die Lon Protease, mit einem Serin als aktive Gruppe, ist für den Verdau abnormaler Proteine verantwortlich, die bei *nonsense* oder *missense* Mutationen, falschen Einbau von Aminosäuren oder Denaturierung entstehen (Miller 1996, Rozkov 2001). Es werden Peptidfragmente von 5 bis 20 Aminosäuren gebildet, die dann weiter ATP unabhängig abgebaut werden. Die Lon Protease ist nicht essentiell für *E. coli*, zum Beispiel ist der verwendete Stamm BL21 eine Deletionsmutante (Studier et al. 1990). Die Expression von Lon ist hochreguliert beim Hitzeschock, und die Protease interagiert mit anderen Hitzeschockproteinen (DnaK, DnaJ, GrpE und GroEL), um von ihnen präsentierte Proteine abzubauen (Straus et al. 1988). Weitere Proteasen, die verantwortlich sind für den Abbau von Proteinen, sind die ClpAP- und HslUV-Protease, (Rozkov 2001).

Yang (Yang 1995b) fand eine Korrelation zwischen der Abbaurate und der Produktmenge des staphylococcalen Proteins A (SpA) und einem Fusionsprotein von SpA mit der β -Galaktosidase (SpA- β -Gal). SpA besitzt eine Abbaurate von 1.18 h^{-1} , demzufolge wird das Produkt kaum angereichert (Konzentration geringer als 0.89 % der Zelltrockenmasse). Im Gegensatz dazu ist das Fusionsprotein SpA- β -Gal stabil und konnte sich bis auf 13.8 % der Zelltrockenmasse anreichern. Ähnliche Beziehungen fand Yang auch bei ZZ Proteinen, die synthetische Abwandlungen des SpA-Proteins darstellen. Untersuchungen von Rozkov et al. (Rozkov et al. 2000) zeigten, dass die Abbaurate von SpA- und ZZT2- abhängig von der Wachstumsrate ist. Der Abbau folgt einer Reaktion erster Ordnung. Nur bei hohen Konzentrationen des ZZT2 Proteins folgt der Abbau einer Reaktion nullter Ordnung, was andeutet, dass die Reaktion proteaselimitiert abläuft.

3.3 Die Modellproteine *Wnt4* und *Wnt6*

Die Bezeichnung Wnt ist ein Fusionswort aus **Wg**, *wingless* und **int**, Integrationslokus. Das *wingless* Protein ist verantwortlich für die Musterbildung in der Embryonalentwicklung von *Drosophila*. Der *int*-Lokus in der Maus ist ein Genabschnitt mit hoher Frequenz der Integration des *Moloney murine leukemia* Virus. Beide Genabschnitte kodieren für homologe Proteine, weshalb die gemeinsame Bezeichnung eingeführt wurde. Neben Maus und Fruchtfliege sind die Wnt-Proteine sehr konserviert in den Genomen aller Vertebraten anzutreffen (Cadigan & Nusse 1997). Wnt-Proteine sind sekretierte, cysteinreiche Glykoproteine, die über Palmitoylierung von Cysteinen membranassoziiert vorliegen (Willert et al. 2003). Doch weder Palmitoylierung noch Glykosylierung ist für die biologische Aktivität notwendig (Fahner et al. 2004b).

Die Hauptaufgabe der Wnt-Proteine ist die Koordination der Zellentwicklung im Embryo sowie von Stammzellen im adulten Organismus (Wodarz & Nusse 1998). Außerdem gibt es Überschneidungen der Wnt-Reaktionskaskade mit Regulatoren der Zelladhäsion und Bewegung (Nelson & Nusse 2004). Die Bedeutung der Wnt-Proteine lässt sich an den Krankheiten, die mit ihren Fehlfunktionen verknüpft sind, ablesen. Wnt4 wirkt im Menschen als ein „Anti-Männlichkeits“-Faktor, der bei Überexpression zu einem XY intersex Phänotyp führt (Jordan et al. 2003). Wnt4-Mutanten in *Xenopus* führen zur beeinträchtigten Entwicklung der Augen (Maurus et al. 2005). Wnt4 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Niere und einige Nierenkrankheiten werden mit Fehlexpressionen von Wnt4

in Verbindung gebracht (Moon et al. 2004). Zu Wnt6 gibt es, soweit dem Autor bekannt, noch keine pathologischen Untersuchungen.

Eine genauere biophysikalische und biochemische Charakterisierung der Proteine ist für die Wnt-Proteinklasse jedoch noch nicht erfolgt, denn die Hürde ist die Isolation einer geeigneten Menge an Wnt-Protein. Produktion in eukaryotischen Zellkulturen führt häufig zur Ablagerung falschgefalteten Proteins im endoplasmatischen Retikulum. Durch ihren ausgeprägten hydrophoben Charakter und der Palmitoylierung bleiben die Proteine in enger Assoziation mit der Membran und reichern sich kaum im Medium an (Fahnert et al. 2004b). Die erstmalige Herstellung eines rekombinanten Wnt-Proteins gelang Fahnert et al. (Fahnert et al. 2004b), wobei die lösliche Proteinfraction auf biologische Aktivität in *Xenopus laevis* getestet wurde. Trotz des Durchbruchs, der Fahnert et al. (2004) mit der rekombinanten Herstellung von mWnt1 gelang, ist die mit dem beschriebenen Prozess erhaltene Ausbeute gering.

3.4 Zielstellung der Arbeit

Die medizinisch relevanten Proteine Wnt4 und Wnt6 können derzeit nicht in ausreichender Menge für biophysikalische und biochemische Analysen hergestellt werden. In dieser Arbeit soll die Ursache des suboptimalen Ertrags an Wnt-Protein analysiert werden, indem die Expression charakterisiert wird. Dazu werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welchen Einfluss haben interne Sekundärstrukturen der mRNA mit der RBS auf das Expressionslevel?
2. Wie groß ist die Wirkung der seltenen Codons auf die Expression?
3. Wie äußert sich das Vorkommen einer sekundären RBS in *wnt4* auf die Translation?
4. Kann das mRNA Level der rekombinanten Gene eine Ursache für die suboptimale Produktmenge sein?
5. Sind die Proteine Wnt4 und Wnt6 toxisch für *E. coli*?
6. Wie stabil ist das Wnt4 Protein in *E. coli*?
7. Kann durch Variationen in der Temperatur der Produktgehalt erhöht werden?

Aus den gewonnenen Erkenntnissen sollen Strategien abgeleitet werden, die eine zukünftige Expression von Wnt4 und Wnt6 im prokaryotischen System erleichtern sollen.

4 Geräte und Materialien

4.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Absorptionsspektrometer	Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience, Helsinki, Finnland
Autoklav	ND-1000, Nanodrop, USA
Blotting Membran	Finn-Aqua, Finnland
Brutschrank	Immobilion Transfer Membrane, Millipore, Espoo, Finnland
Einmalspitzen	Heraeus
	Sarstedt, Vantaa, Finnland
	(Filter Spitzen) Molecular Bio-Products, USA
Fluoreszenzspektrophotometer	Wallac Victor ² 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, USA
Gelelektrophoreseeinheiten	Agilent 2100 Bioanalyzer - Agilent Technologies, USA
	(Laufkammer) Bio-Rad, Espoo, Finnland
	(Kamera) Bio-Rad, Espoo, Finnland
Laminarflowbox	Biowizard Kojair, Kojair Tech. OY, Vilppula, Finnland
Magnetrüher	Heidolph, Deutschland
Magnet-Trennvorrichtung für Magnetkugeldispensionen, Magnasphere®	Promega, Finnland
Massenspektrometer	Voyager-DE STR Biospektrometry Workstation, AB- Applied Biosystems, MALDI-TOF
Mixer	(Vortexer) Scientific Industries, Espoo, Finnland
PCR-Thermocycler	PCR-express, Thermo Electron, Vantaa, Finnland
pH-Messgerät	Hanna Instruments, Großbritannien
Schüttelinkubatoren	Infors Multitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Spannungsquellen	Amersham Bioscience, Helsinki, Finnland
	Bio-Rad, USA
Thermomixer	Eppendorf, Dänemark
Waagen	Precision Weighting Balances, Großbritannien
	Mettler Toledo, Vantaa, Finnland
Wasserbad mit Ultraschall	Branson 3510
Western Blot Detektion	ECL Hyperfilm, Amersham Bioscience, Helsinki, Finnland
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5804R, Dänemark
	Eppendorf Zentrifuge 5415D, Dänemark
	Eppendorf Zentrifuge 5415R, Dänemark
	Microzentrifuge Modell 100VAC
96-Well Platten	Corning Inc., Helsinki, Finnland
	Greiner Bio-one, Helsinki, Finnland

4.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	J. T. Baker
Acrylamid/Bisacrylamid; 37.5:1 (Rothiphorese)	Roth
Agarose	ABgene
Agar	Biokar Diagnostics
Ammoniumacetat	Sigma
Ammoniumbicarbonat	Merk
Ammoniumcarbonat	Merk
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicilin Natriumsalz	MP Biomedicals
2'[2-Benzothiazoyl]6-hydroxy-benzothiazolphosphat (AttoPhos®)	Promega
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics
Bromphenolblau	BDH
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Chloramphenicol	MP Biomedicals
Chloroform	J. T. Baker
Coomassie blue G250	Bio-Rad
Dextransulfat Natriumsalz	Sigma
Diethylpyrocarbonat(DEPC)	Sigma
dNTP	Finnzymes
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Sigma
ECL™ Detektionslösungen 1&2	Amersham
Entwickler, Western Blot Filme	Kodak
Ethanol(ETAX A/B)	Altia Oyj
Ethidiumbromid	MP Biomedicals
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Ficoll400	Sigma
Fixierer, Western Blot Filme	Kodak
Formamid	J. T. Baker
Glycin	Sigma
Glycerol	BDH
Hefeextrakt	Biokar Diagnostics
Iodoacetamid	Sigma
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Duchefa Biochemie
Kaliumchlorid	Merk
Kaliumdihydrogenphosphat	J. T. Baker
Kalziumchlorid Hexahydrat	Fluka
Maleinsäure	Sigma
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Fluka
Methanol	J. T. Baker
Mineralöl	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumcitrat	Sigma
Natriumchlorid	Merk
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogenphosphat	Sigma
Natriumhydroxid	Merk

Phenol	Fluka
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Calbiochem
Polyoxyethylen sorbitan monolaurat (Tween20)	Sigma
Polyoxyethylen(23) lauryl ether (Brij 35)	Sigma
Ponceau S, 0.1 %, in 5 % Essigsäure	Sigma
Polyvinyl pyrrolidon	Sigma
Salzsäure (rauchend)	Sigma
Trifluoracetat (TFA)	Aldrich
Trockenmilch	Valio
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Temed)	Fluka
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris Ultrapure)	Duchefa Biochemie
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma

Weitere Chemikalien sind in genutzten Kit-Kollektionen enthalten. Für nähere Informationen schlage man in den Benutzerhandbüchern nach.

4.3 *Enzyme und Proteine*

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Anti Digoxigenin +AP Antikörper, Fab Fragement	Roche Diagnostics
Anti c-Myc Antikörper, monoklonal aus Maus	Sigma
Anti-mWnt4 Mab, Antikörper aus Ratte	R&D systems
Benzonase (25 U/ μ l)	Merk
DNase I (10 mg/ml)	Roche Diagnostics
<i>Dpn</i> I (2 U/ μ l)	Roche Diagnostics
DNA Polymerasen:	
<i>Pfu</i> Ultra 2.5 U/ μ l	Stratagene
<i>Pfu</i> Turbo 2.5 U/ μ l	Stratagene
DyNAzyme™ II 2 U/ μ l	Finnzymes
ECL™ Anti-rat IgG Horseradish Peroxidase Verbunden mit Antikörper aus Ziege	Amersham Bioscience
Lysozym (50 mg/ml)	Sigma
Porcines Trypsin (20 ng/ μ l)	Promega
Restriktionsenzyme + 10x Puffer	Finnzymes
Schaf Anti-Maus Antikörper, IgG horseradish peroxidase	Amersham Bioscience

4.4 Stämme, Plasmide und Primer

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> λ(DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	wie <i>E. coli</i> BL21(DE3) + pLysS(cm ^R)	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta(&1)	<i>lacY</i> λ(DE3) <i>lon ompT</i> + pRARE(cm ^R)	Novagen
<i>E. coli</i> TOP10F'	F'[lacI ^q Tn10(tet ^R)] <i>mcrA</i> <i>Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139</i> <i>Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R)</i> <i>endA1 λ⁻</i>	Invitrogen

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pET3a	Promotor: T7 Selektion: amp Ursprung: pBR322	Novagen
pET3a_wnt4-wt	Insertion von murinen (m)wnt4	Anu Mursula
pET3a_wnt4-mt	optimierte mwnt4 Sequenz	diese Arbeit
pET3a_wnt4-SRBS	optimierte mwnt4 Sequenz	diese Arbeit
pET3a_wnt6-wt	Insertion von murinen (m)wnt6	Anu Mursula
pET3a_wnt6-So	optimierte (m)wnt6 Sequenz	diese Arbeit
pLysS	Promotor: T5/lac Selektion: cam Ursprung: p15a enthält: T7 Lysozym	<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS
pRARE	Selektion: cam Ursprung: p15a enthält: <i>argU</i> (anticodon: ucu), <i>argW</i> (ccu), <i>glyT</i> (ucc), <i>ileX</i> (cau), <i>leuW</i> (uag), <i>metT</i> (cau), <i>proL</i> (ggg), <i>thrT</i> (ggg), <i>thrU</i> (ugu), und <i>tyrU</i> (gua)	<i>E. coli</i> Rosetta

Primer Sequenz

Primer für *site directed* Mutagenesen

4.1-cmut-r	5'gatatacatatgagcaa C tggctgtacctggcc 3'
4.1-cmut-l	3'ctatatgtatactcggt G accgacatggaccgg
4.2-TTmut-r	5'gagcaactggctgta T ct T gccaaagctgtcatcgg 3'
4.2-TTmut-l	3'ctcggtgaccgacat A ga A cggttcgacagtagcc 5'
w4-rbs2-up	5'caaaggcctgatccag CgT caggtgcagatgtgc 3'
w4-rbs2-do	3'gtttccggactaggtc GcA gtccacgtctacacg 5'
w6.1-str.opt.r	5'ggagatatacatatgct C tgggtgggcccgtgg 3'
w6.1-str.opt.l	3'cctctatatgtatacga G accacccggcacc 5'

Primer zum Sequenzieren und für Kontrol-PCR:

T7-Promoter 5'attatgctgagtgatatcc3'
w4 –258 5'ggcaccacggcgccact 3'
w6 –241 5'aacggaactggaactgac 3'

Sonden der SH:

wnt4:

Dig-Sonde: 5'ccagcctcgttggttgtaa 3'
Biotin-Sonde: 5'tgtgtcaagatggccttcct 3'
Hilfssonde: 5'gtgacacttgcaactccacc 3'

wnt6:

Dig-Sonde: 5'gcaccaatgcacggatat 3'
Biotin-Sonde: 5'gcctcgttggttgtaagt 3'
Hilfssonde 1: 5'acggccccgcttggtgct 3'
Hilfssonde 2: 5'gtgtgactccgcaccgc 3'

Die Primer wurden von der Firma Oligomer Oy, Finland bezogen.

4.5 Sonstige Materialien

Name	Hersteller
DIG Olinucleotide Tailing Kit, 2 nd generation	Roche Diagnostics
DNA loading Dye 6x	Fermentas
DYEnamic ET Terminator Cycle	Amersham Bioscience
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas
Magentkugeln mit Streptavidin (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles)	Promega
MAXIsript T7 <i>In Vitro</i> Transcription Kit	Ambion
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
Precision Plus Protein all blue standard	Bio-Rad
Ribogreen RNA Quantitation Kit	Molecular Probes
RNAguard – RNase Inhibitor	Amersham Bioscience
RNAlater	Ambion
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
Total RNA isolation kit	A&A Biotechnology

4.6 Programme – Web Ressourcen

Programm	Quelle	Funktion
ActivePerl	ActiveState Corp.	Ausführen von .pl Dateien
Agilent Bio Sizing V A.02.12	Agilent Technologies	Auswertung von RNA Gelen
Chromas, V1.6c	Technelysium Pty Ltd.	Analyse von Sequenzierdaten
Gentle	M. Manske	Restriktionskarten, Alignments, Klonierungshilfe, Genanalyse
Gimp	GNU	Graphikprogramm
laggin-strand2leading-strand.pl	U. W. Liebal	Spiegelung von Nukleotid- sequenzen

Microsoft Office	Microsoft	tabellarische Analyse, Textverarbeitung, Präsentationen
mrna-analysis.pl	U. W. Liebal	Analyse von mRNA
ProFound	Rockefeller University	Datenbank für Massenspektrometrie Fragmente
Quantity One, V4.2.1	Bio-Rad	Auswertung von Gelphotos
Sigma Plot 7.0	SPSS Inc.	Graphische Analysen
Vienna RNA package	biolinux.org, M. Zucker	Berechnung der RNA sek. Strukturen und Energien
Voyager System 4215	Voyager	Betriebssoftware für Massenspektroskopie
Wallace 1420 Manager, V2.00	Perkin Elmer Lifesciences	Betriebssoftware für Fluoreszenzmessgerät

Internetadresse	Inhalt
http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes	allg. Informationen zu <i>E. coli</i> Stämmen
http://www.embl-hamburg.de/~geerlof/webPP/straindb/bact_strains/bact_strain_index.html	<i>Escherichia coli</i> Stammcharakterisierung
http://www.embl-hamburg.de/~geerlof/webPP/vectordb/vector_index.html	Vektor Sammlung
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed	Literaturrecherche
http://www.merckbiosciences.com/g.asp?f=NVG/pETable.html	pET Vektor Übersicht
http://mathworld.wolfram.com/	Übersicht über Mathematik
http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/ehrmann/index.html	Sammlung von <i>E. coli</i> Proteasen
http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/CCDB/cgi-bin/STAT_NEW.cgi	<i>E. coli</i> Statistiken
http://bips.u-strasbg.fr/srs71bin/cgi-bin/wgetz?-page+srsq2+-noSession	<i>E. coli</i> Genome mit Protein Konnotation
http://www.kazusa.or.jp/codon/	Codonnutzung von <i>E. coli</i> B Codon Usage Database
http://gcua.schoedl.de/sequentialex.html	graphische Darstellung der Codonnutzung
http://www.chemicaland21.com/index.html	Chemikalienindex
http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html	DNA/RNA/Protein/Chemical Molecular Weight Calculator
http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/	Berechnungen von RNA sek. Strukturen
http://www.molecularworkshop.com/data/endonucleases.html	Restriktionsenzyme
http://www.med.unibs.it/~marchesi/wnts_andmore.html	wnt, bmps und smad
http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html	Die wnt homepage

4.7 Sonstige Einrichtungen

Abteilung für Biochemie,
Universität von Oulu

DNA Sequenzierung
Voyager-DE STR Biospektrometry Workstation
Massenspektrometer, MALDI-TOF

4.8 Medien, Lösungen, Puffer

Kulturanzucht:

Ampicilin:	Stammlösung: 100 mg/ml (in 1:1, Wasser:Ethanol) Gebrauchslösung: 100 µg/ml
Chloramphenicol:	Stammlösung: 35 mg/ml (in Ethanol) Gebrauchslösung: 35 µg/ml
IPTG:	400 mM Gebrauchskonz.: 1mM
Luria Bertani Medium (LB):	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7.5 (NaOH)
LB Agar +Amp:	LB Medium 100 µg/ml Ampicilin 15 g/l Agar
Superbroth:	35 g/l Trypton 20 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl pH 7.5 (NaOH)

Proteinanalyse:

PBS:	Natriumchlorid: 137 mM Kaliumchlorid: 2.7 mM Natriumhydrogenphosphat: 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat: 2 mM
10x Laemmli Buffer:	Tris: 0.25 M Glycerin: 1.92 M für 1x SDS-Laufpuffer SDS: 0.1 %
4x SDS Probenpuffer:	0.28 M SDS 0.15 mM Bromphenolblau 0.25 M Tris-HCl 0.72 M β-Mercaptoethanol 5.4 M Glycerol

	<u>Sammelgel 12.5 %</u>	<u>Trenngel</u>
Acrylamid/Bisacrylamid	3.1 ml	1 ml
3 M Tris-Cl pH 8.8	1 ml	1.26 ml
10 % SDS	76 µl	50 µl
dH ₂ O	3.26 ml	2.92 ml
10 % APS	36 µl	25 µl
Temed	5 µl	5 µl

SDS-PAGE Entfärber: 5.1 M Ethanol
1.7 M Essigsäure

Western Blot & Immunodetektion:

Blotting Puffer: 1x Laemmli
3.4 M Ethanol

TBST: 10 mM Tris-HCl pH 8.0
150 mM NaCl
0.5 % (v/v) Tween20

Sättigungspuffer: 3 % (w/v) Magermilch in TBST

Stripping Puffer: 100 mM β-Mercaptoethanol
70 mM SDS
62.5 mM Tris-HCl

RNA Isolation & Sandwich Hybridisation:

DEPC H₂O: 0.1 % (v/v) DEPC

Stop Lösung: 95:5, Ethanol:Phenol

20x TE: 200 mM Tris-HCl
20 mM EDTA
DEPC H₂O
pH 7.5

20x SSC: 3 M Natriumchlorid
0.3 M Natriumcitrat
DEPC H₂O
pH 7 (HCl)

100x Denhardts Reagenz: 1 % (w/v) Ficoll 400
1 % (w/v) Polyvinyl pyrrolidon
1 % (w/v) BSA

10x Blockierungsreagenz: 10% (w/v) Blockierungsreagenz
100 mM Maleinsäure
150 mM Natriumchlorid
pH 7.5 (NaOH)

SH-Lösung: 5x SSC
5 M Formamid
3 % (w/v) Dextransulfat
0.2 % (v/v) Tween20
1x Denhardts Reagenz
1x Blockierungsreagenz (DEPC H₂O für RNA Extrakt)
0.01 pmol/µl Hilfssonde 1
0.01 pmol/µl Hilfssonde 2 (falls vorhanden, sonst DEPC H₂O)

SH-Lösung: (Fortsetzung)	0.5 fmol/ μ l Dig-markierte Detektionssonde 0.05 pmol/ μ l Biotin markierte Sonde in DEPC H ₂ O
Wasch-Puffer:	1x SSC 0.14 M SDS
Enzym-Lösung:	1x SSC 0.1 % (v/v) Tween20 1:2000 verdünnt Anti Dig +AP Fab Fragmente

<u>Agarose Gele:</u> 20x TAE:	0.6 M Tris 0.7 M Natriumacetat 25.7 mM EDTA pH 7.4 (Essigsäure)
----------------------------------	--

<u>Herstellung kompetenter Zellen:</u> 15 % Glycerol-CaCl ₂ Lösung:	2 M Glycerol 100 mM CaCl ₂
---	--

<u>DNA Sequenzierung:</u> Natriumacetat/EDTA Lösung:	1.5 M Natriumacetat 0.5 M EDTA
---	-----------------------------------

<u>Massenspektrometrie:</u> Waschlösung:	40 % (v/v) Acetonitril 0.2 M Ammoniumbicarbonat
Alkylierungslösung:	25 % (v/v) Methanol 1 M Iodacetamid
Trypsin Lösung:	20 μ g/ml Porcines Trypsin 10 % (v/v) Acetonitril 40 mM Ammoniumcarbonat
Extraktionslsg 1(2,3):	1 % (0.3 %, 0.2 %) (v/v) TFA 5 % (30 %, 70 %) (v/v) Acetonitril
α -Matrix:	gesättigte α -Cyano-4-hydroxycinnamic Lösung 40 % (v/v) Acetonitril 0.1 % (v/v) TFA

5 Methoden

5.1 *Gentechnische Methoden*

5.1.1 Herstellung kompetenter Zellen:

Von einer Übernachtskultur, die bei 30 °C und 150 rpm gewachsen ist, wird 1 ml entnommen, in einen neuen Schüttelkolben mit 20 ml Medium (LB, Superbroth) und entsprechenden Antibiotikazusätzen transferiert und bei 37 °C, 200 rpm kultiviert. Bei einer $OD_{600} \leq 0.5$ werden 20 ml der Kultur entnommen und bei 4 °C für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird im gleichen Volumen 50 mM $CaCl_2$ resuspendiert und erneut unter den erwähnten Bedingungen zentrifugiert. Danach wird das Pellet mit 100 mM $CaCl_2$ im gleichem Volumen resuspendiert. Nach 1 bis 2 Stunden lagern auf Eis werden die Zellen unter gleichen Bedingungen wie vorhergehend pelletiert, resuspendiert mit 20 ml einer 15 % Glycerol- $CaCl_2$ Lösung und dann zu 100 µl in Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert. In flüssigem Stickstoff schockgefroren sind die Zellen bei -70 °C über längere Zeit haltbar.

Puffer und Lösungen:

LB-Medium / Superbroth, Antibiotika-Stammlösung, 50 mM $CaCl_2$, 100 mM $CaCl_2$, 15 % Glycerol- $CaCl_2$

5.1.2 Transformation:

Kompetente Zellen werden für ungefähr 10 min auf Eis leicht angetaut und 1-5 µl (1-60 ng/µl) DNA werden hinzu pipettiert, wobei die Lösung durch auf- und abpipettieren durchmischt wird. Das Reaktionsgefäß wird für weitere 10 min auf Eis belassen, um zu gewährleisten, dass sich die DNA an die Zellen anlagert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Danach wird die Lösung für 2 min auf Eis gekühlt und 450 µl Medium (LB, Superbroth) hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wird für eine Stunde bei 37 °C gut geschüttelt. Nach der Inkubation der Kulturen werden 100-250 µl der kompetenten Zellen auf vorgewärmte LB Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen pipettiert und für 12 Stunden bei 37 °C bebrütet. Einzelkolonien werden für 12 Stunden mit den nötigen Antibiotika kultiviert und 1:1 mit einer 80 % Glycerollösung vermischt, um bei -70 °C als Stammkultur aufbewahrt zu werden.

Puffer und Lösungen:

LB Medium / Superbroth, LB-Agar, Antibiotika Stammlösungen, 80 % Glycerollösung

5.1.3 Plasmidisolation:

Abhängig von der Zelldichte werden 3 bis 5 ml einer Übernachtskultur 1 min bei 11,000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird resuspendiert in einer Lösung, die RNasen zum Abbau von RNA und EDTA, zur Deaktivierung der DNasen enthält. Eine SDS enthaltende alkalische Lösung führt zur Zelllyse. Bei einem pH von 12-12.5 denaturiert chromosomale DNA, Plasmide bleiben jedoch intakt. Nach 5 min Inkubation wird die Reaktionslösung neutralisiert. Dabei fällt die genomische DNA unlöslich aus, indem sie ein hochmolekulares Netzwerk bildet, während Plasmide weiter in der Lösung bleiben. Die Plasmide werden auf einer Säule mit Silikagel aufgereinigt, mit ethanolischer Lösung gewaschen und mit 2x 50 µl eluiert. Näheres kann im Benutzerhandbuch des Kits, *NucleoSpin® Plasmid* von Macherey-Nagel nachgelesen werden.

Puffer und Lösungen:

Lösungen aus dem *NucleoSpin® Plasmid* Kit von Macherey-Nagel

5.1.4 Trennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese:

Es werden 1 % (w/v) Agarosegele hergestellt, indem die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE mit Hilfe einer Mikrowelle gelöst und bei ungefähr 50 °C 1:25,000 Volumen 10 mg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben wird. Den DNA Proben wird im geeigneten Volumen 6x DNA Ladepuffer zugesetzt. Das Endvolumen, das im Gel appliziert wird, liegt zwischen 10-25 µl. Vom DNA Standard, *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, werden 3-5 µl eingesetzt. Die Trennung erfolgt bei 100 V (Gellänge: 7 cm) für ungefähr 50 min

Puffer und Lösungen:

1x TAE, 6x DNA Ladepuffer, Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml), *GeneRuler* DNA Standardlösung

5.1.5 Überprüfen der Plasmidgröße

Durch den Einsatz von Restriktionsenzymen kann relativ schnell erkannt werden, ob ein Plasmid ein *Insert* mit dem rekombinanten Gen enthält. Die *Inserts* vergrößern das pET3a Plasmid um ungefähr 1000 Nukleotide auf rund 5600 Basen. Die Insertion von *wnt4* erfolgte am 5' Ende des Gens mit *NdeI*, am 3' Ende mit *BamHI*. *wnt6* wurde in das Plasmid mittels *NdeI* und *Bpu 1102 I* (*Cel II*, *Esp I*) kloniert. *Nde I* und *BamH I* können daher zur Linearisierung des Plasmids verwendet werden. Folgende Elemente werden dafür pipettiert:

8 µl Plasmid Lösung (10-60 ng/µl DNA)
1 µl 10x Puffer Enzymspezifisch
1 µl Restriktionsenzym
Gesamtvolumen: 10 µl

Die Inkubationszeit beträgt 1½ Stunden bei 37 °C. Anschließend wird die gesamte Probe mit 2 µl 6x DNA Ladepuffer gemischt und im Agarosegel getrennt (siehe 5.1.4).

Puffer und Lösungen:

Lösungen der Restriktionsenzyme und deren 10x Puffer

5.1.6 Kultur-PCR:

Um einen Stamm auf eine Insertion des rekombinanten Gens in pET3a zu überprüfen, werden 100 µl einer über Nacht bei 150 rpm und 30 °C gewachsenen Zellkultur 1 min bei 11.000 rpm pelletiert, und in 25 µl H₂O aufgenommen. Über mehrfache Gefrier- und Tauschritte sowie einer Inkubation für 5 min bei 95 °C werden die Zellen aufgebrochen und wieder 2 min bei höchster Drehzahl zentrifugiert. 10 µl des Überstandes werden für die PCR eingesetzt.

PCR:

2.5 µl 10x DyNAzyme Puffer
2.5 µl (2 mM) dNTP
1 µl (5 pmol/µl) Primer #1
1 µl (5 pmol/µl) Primer #2
10 µl Überstand
7.5 µl ddH₂O (steril)

0.5 µl 2 U/µl DyNAzyme™ II
Gesamtvolumen: 25 µl

PCR Laufprogramm:

Segment	Zyklen	Zeit	Temp.
1	1	2 min	95 °C
2	30	1 min	95 °C
		1 min	66 °C
		1 min	74 °C
3	1	5 min	74 °C

Zum Abbau der Ursprungs-DNA kann 1 µl (2 U/µl) *Dpn* I hinzugegeben werden, das methylierte DNA abbaut, wodurch nur PCR Produkte intakt zurückbleiben. Nun wird bei 37 °C für ein bis zwei Stunden inkubiert. Anschließend werden 15-20 µl mit einem entsprechenden Volumen 6x DNA Ladepuffer gemischt und in einem 1 % Agarosegel bei 100 V für 50 min getrennt (siehe 5.1.4).

5.1.7 Test von Plasmiden auf *Insert* mittels PCR:

Die Insertion des rekombinanten Gens im Plasmid kann ebenfalls mittels PCR nach einer Plasmidisolation überprüft werden. Dazu wird das Plasmid wie unter 5.1.3 beschrieben erhalten, worauf sich folgende PCR anschließt:

5 µl 10x DyNAzyme Puffer
 1 µl (2 mM) dNTP
 2 µl (5 pmol/µl) Primer #1
 2 µl (5 pmol/µl) Primer #2
 (1-5) µl zu prüfende Plasmidlösung (10-60 ng/µl DNA)
 (35-39) µl ddH₂O (steril)

1 µl 2 U/µl DyNAzyme™ II

Gesamtvolumen: 50 µl

Das PCR-Laufprogramm wie auch die folgenden Schritte zur Agarose Gelelektrophorese entsprechen denen in 5.1.6 und 5.1.4.

5.1.8 Site-Directed Mutagenesis:

Die PCR Technik erlaubt es einzelne Basen gezielt und einfach in einem DNA-Abschnitt auszutauschen. Zunächst werden Primer entwickelt, die einen Bereich von 25 bis zu 45 Nukleotiden über der auszutauschenden Base abdecken. Die gewünschten Mutationen sollten dabei mittig im Primer liegen. Die Schmelztemperatur der DNA sollte größer gleich 78 °C sein und lässt sich errechnen über:

$$T_m = 81.5 + 0.41 * (\%GC) - \left(\frac{675}{N - \%mismatch} \right)$$

T_m – DNA Schmelztemperatur

%GC – GC-Gehalt in %

N – Anzahl der Nukleotide im Primer

%mismatch – Anzahl der Fehlpaarungen von Primer und originärer DNA in %

Wenn das 5'- und 3'-Ende mit zwei oder mehr GC Basenpaaren endet, können bessere Ergebnisse erzielt werden, da dadurch die Hybridisierungsstabilität der Enden größer ist.

Primer wurden bei Oligomer Oy, Helsinki, in einer Konzentration von 100 µM bestellt (siehe 2.4 Primer)

Das Prinzip der Methode basiert auf der Wirkungsweise der PCR, dass sich die Primer an einen komplementären Bereich im Plasmid anlagern, und am 3'-Ende von einer DNA-Polymerase verlängert werden. Da nur die synthetischen Primer den Ausgangspunkt der

Kettenreaktion bilden, enthalten alle gebildeten DNA Fragmente die gewünschten Mutationen. Nach der PCR werden die maternalen Plasmide, die nicht die neue Mutation tragen, durch eine Behandlung mit *Dpn* I, welches methylierte DNA angreift, abgebaut. Dies ist möglich, da nur die maternalen Plasmide aus einem intakten *E. coli* stammen und dort von dem Enzym Dam methyliert wurden.

In dieser Arbeit wurde die *Pfu* DNA Polymerase verwendet, die eine Fehlerrate von $1.3 \cdot 10^{-6}$ pro Basenpaar und pro Verdoppelung aufweist. *Pfu* Ultra besitzt eine 3fach höhere Genauigkeit (Cline et al. 1996). Die Plasmidlänge ist 5660 bp für pET3a_wnt4 und 5696 bp für pET3a_wnt6. Folgende Parameter gelten für die PCR Reaktion:

5 µl 10x Puffer enzyspezifisch
 1 µl (2 mM) dNTP
 1 µl (10 µM) Primer #1
 1 µl (10 µM) Primer #2
 (0.5-4) µl (10-60 ng/µl) Plasmid DNA
 (38-41.5) µl ddH₂O (steril)
 Gesamtvolumen: 50 µl

1 µl 2.5 U/µl DNA Polymerase (*Pfu* Turbo, *Pfu* Ultra)

PCR Laufprogramm (wnt4):

Segment	Zyklen	Zeit	Temp.
1	1	30 s	95 °C
2	17	30 s	95 °C
		1 min	66 °C
		11 min	74 °C
3	1	11 min	74 °C

PCR Laufprogramm (wnt6):

Segment	Zyklen	Zeit	Temp.
1	1	30 s	95 °C
2	20	30 s	95 °C
		1 min	66 °C
		6 min	74 °C
3	1	6 min	74 °C

Im Anschluss an die PCR werden 1 µl (2 U/µl) *Dpn* I zum Reaktionsansatz hinzugegeben und für 2 Stunden die maternale DNA abgebaut. Der Erfolg der PCR kann dann mittels Trennung durch ein Agarosegel nachgeprüft werden, 5.1.4. Bei erfolgreichem Nachweis wird eine Transformation des PCR Produkts in *E. coli* Top10F' nach 5.1.2 durchgeführt.

5.1.9 Sequenzierung von DNA:

Sequenzierungen erfolgen generell nach dem Prinzip von Sanger et al. (Sanger et al. 1977), indem zu einer PCR Reaktion geringe Mengen an Didesoxynukleotiden (ddNTP) zugegeben werden. An ddNTPs kann keine weitere Kettenverlängerung stattfinden, da die wichtige 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Weil nur geringe Mengen an ddNTPs eingesetzt werden, wird nur ein geringer Bestandteil der wachsenden DNA inhibiert, so dass für alle Nukleotidpositionen eine gewisse Anzahl an Abbruchfragmenten entsteht. In der *DYEnamic ET Terminator Cycle Kit* Technologie werden die vier Didesoxy-Terminatoren mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern versehen, die eine eindeutige Zuweisung der Base nach Einstrahlung von Laserlicht erlauben. Die PCR Produkte werden gelelektrophoretisch aufgelöst, so dass die DNA-Fragmentlänge bestimmt werden kann. Aus der spezifischen Fluoreszenz ergibt sich die Identität der letzten Base im Fragment.

Zur Sequenzierung wird folgende PCR vorbereitet:

1 µl (5 pmol/µl) Primer

x µl (0.1-0.2 pmol) Plasmid DNA

x µl ddH₂O (steril)

4 µl Sequencing reagent premix

Gesamtvolumen: 10 µl

Aufgrund des äußerst geringen Volumens wird die Reaktionslösung mit 10 µl Mineralöl sorgsam überschichtet.

PCR Laufprogramm

Segment	Zyklen	Zeit	Temp.
1	25	20 s	95 °C
		15 s	50 °C
		60 s	60 °C

Im Anschluss an die PCR wird das Mineralöl entfernt, indem der untere wässrige Teil auf ein Stück Parafilm übertragen wird und man den Tropfen wandern lässt, bis keine Spuren von Mineralöl mehr erkenntlich sind. Nun wird das gereinigte Reaktionsgemisch in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt und zuerst 1 µl Natriumacetat/EDTA Lösung zugegeben, gefolgt von 34 µl absoluten Ethanol. Die Lösung wird gründlich mit einem Vortexer gemischt und für mindestens 15 min auf Eis belassen. Hierauf folgt eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 30 min mit ~14,000 rpm. Im nächsten Schritt wird der Überstand abgesaugt, das Pellet in ungefähr 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, 5 min bei 14,000 rpm zentrifugiert und der Überstand wird erneut abgesaugt. Das Pellet wird über Nacht getrocknet. Die Sequenzierung wurde in der Abteilung für Biochemie, Universität Oulu durchgeführt.

Eine Auswertung der Sequenz erfolgt mittels der *Chromas 1.6c Software* von Technelysium Pty Ltd.

Puffer und Lösungen:

Sequencing Reagent Premix, Natriumacetat/EDTA Lösung, abs./70 % Ethanol

5.2 Zellanzucht und Proteinexpression

5.2.1 Wahl des Expressionssystems:

Als Expressionssystem für die aus der Maus stammenden *wnt4*- und *wnt6*-Gene wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) gewählt. Zur Expression wurde das T7-System gewählt. Die Expression fand in BL21(DE3) pLysS statt (außer Bestimmung der Halbwertszeit), dieser Stamm mit Plasmid ist gemeint wenn von BL21 die Rede ist. Die Klonierungsarbeiten der *wnt*-Gene in pET3a wurden im Vorfeld von Dr. A. Mursula durchgeführt. Dazu wurde die Signalsequenz, die in der Maus die Expression zum endoplasmatischen Retikulum leitet, entfernt, während am 3'-Ende der kodierenden Sequenz ein c-Myc-tag zur Detektion angehängt wurde (Anhang 1: „Konstrukt und Proteinsequenz“).

5.2.2 Expressionsexperiment:

Am Vortag des Experimentes wird eine Übernachtskultur in 20 ml Medium (LB, Superbroth) im Schüttelkolben mit entsprechenden Antibiotikazusätzen angesetzt, wobei die anzuimpfende Kultur von einer Glycerolstammkultur stammt, die bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert ist. Die Anzucht über Nacht erfolgt bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 150 rpm. Das Hauptexperiment wird mit 50 ml Medium (LB, Superbroth) in 500 ml Schüttelkolben und entsprechenden Antibiotikazusätzen durchgeführt. Zum Animpfen wird 1 ml aus der Übernachtskultur zentrifugiert und in neuem Medium gelöst, um keine β -Lactamase aus dem alten Medium in das neue zu überführen. Wird eine Expression mit mehreren Kulturen durchgeführt, so werden die anzuimpfenden Volumina der Kulturen nach der kleinsten OD der Übernachtskultur angepasst, ein Beispiel ist in Tabelle d1 gegeben.

Tabelle d1: zeigt die Optische Dichten (OD ₆₀₀) von BL21 Übernachtskulturen mit <i>wnt4</i> und die Inokulationsvolumen für das Expressionsexperiment.		
Plasmid	OD ₆₀₀	Inokulationsvolumen in ml
-co	3.54	0.794
wt	2.81	1
mt	2.91	0.965

Die Expression erfolgt bei 37 °C mit 150 – 200 rpm, soweit nicht anders angegeben. Es wird zu bestimmten Zeitpunkten die OD₆₀₀ der Kulturen verfolgt und erreicht diese einen Wert zwischen 0.4-0.6 so wird mit einer Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM die rekombinante Expression gestartet. In definierten Zeitintervallen werden nun Proben für Protein und RNA Analysen gesammelt.

Entnahme der Proteinproben:

1.5 ml der Kultur werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 12,000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl PBS gelöst und bei –20 °C zur weiteren Verwertung aufbewahrt.

Entnahme der RNA-Proben:

Zweimal jeweils 1 ml der Kultur werden in auf Eis gelagerten Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, in denen sich 125 µl Stop-Lösung befindet. Die Proben werden bei 4 °C 1 min mit 12,000 rpm zentrifugiert und das Pellet wird in 100 µl *RNAlater* resuspendiert. Die Proben werden dann bei 4 °C aufbewahrt bis sie einer RNA Extraktion unterzogen oder für Zellrohextraktanalysen verwendet werden.

Puffer und Lösungen:

LB Medium/Superbroth, Antibiotika Stammlösungen, IPTG Stammlösung, PBS, Stop-Lösung, *RNAlater*

5.2.3 Bestimmung der Protein-Halbwertszeit *in vivo*:

Die Vorbereitungen zur Durchführung der Bestimmungen von Protein-Halbwertszeiten erfolgte analog zu Expressionsexperimenten in 5.2.2. Es wird jedoch ein Chloramphenicol sensibler Stamm gewählt, in diesem Fall *E. coli* BL21(DE3) ohne pLysS. Nach Induktion der Expression des rekombinanten Proteins lässt man die Produktion des rekombinanten Proteins für ein bis zwei Stunden fortlaufen, damit sich eine geeignete Menge an Protein für die Detektion ansammelt. Dann wird die Proteinsynthese durch Zugabe von Chloramphenicol in einer Endkonzentration im Medium von 140 µg/ml arretiert (Yang 1995b). Zur Kontrollreaktion wird ein entsprechendes Volumen Ethanol gegeben. Nun entnimmt man zu definierten Zeitpunkten Protein-Proben wie in 5.2.2 beschrieben. Die Proteinanalytik erfolgt nach 5.4 und die Berechnung der Protein Halbwertszeit nach 5.4.6.

Puffer und Lösungen:

Vgl.: 5.2.2, Chloramphenicol Stammlösung

5.3 Analyse der mRNA

5.3.1 Extraktion der Gesamt-RNA von RNA-Proben:

Zur RNA-Extraktion wurde ausschließlich das RNA-Extraktionskit der Firma A&A Biotechnology verwendet. Dazu wird die RNA-Probe in *RNAlater* 1 min bei 4 °C und 12,000 rpm zentrifugiert, zum Pellet werden 800 µl Phenozol hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren gelöst, so dass die Zellen aufbrechen. Die Lyse wird zusätzlich durch eine 5 Minuten Hitzebehandlung bei 50 °C vervollständigt. Die Phenollösung mit chaotropen Salzen dient ebenfalls zur Inhibierung von RNasen. Nun werden 200 µl Chloroform hinzugegeben und gründlich gemischt, um die RNA zu extrahieren. Zur Trennung der Phasen wird 10 min, bei 4 °C und 14,000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen, mit 250 µl Isopropanol vereinigt und intensiv gemischt. Isopropanol senkt die Löslichkeit der RNA und unterstützt im nächsten Schritt die Absorption der RNA auf das Silikagel einer Säule, auf die das gesamte Volumen aufgetragen wird. Es folgen mehrere Waschschrte, die Elution erfolgt mit zwei mal 100 µl DEPC H₂O. Die Proben werden bei –20 °C aufbewahrt.

Puffer und Lösungen:

Lösungen aus dem *Total RNA isolation* Kit von A&A Biotechnology

5.3.2 RNA Quantifizierung mittels *Ribogreen*

Die Quantifizierung von RNA im *Ribogreen*-Kit von Molecular Probes erfolgt mithilfe der interkalierenden Substanz *Ribogreen*. Diese Methode erlaubt eine präzise Messung der RNA, sogar in geringen Konzentrationsbereichen von 0.5 ng/ml. Durch das Verwenden von 96 *Well*-Platten können viele Proben gleichzeitig, selbst bei der Dreifachbestimmung bearbeitet werden.

Die RNA-Proben werden 1:1000 mit 1x TE Puffer verdünnt und 100 µl der Verdünnung werden mit 100 µl einer 1:200 Verdünnung des *Ribogreen*-Reagenz in der 96 *Well*-Platte vereinigt. Die Platte wird 3 Minuten leicht geschüttelt und die Fluoreszenz gemessen, indem bei 485 nm eingestrahlt wird und bei 530 nm das Signal im Wallac Victor² Fluoreszenzspektrophotometer abgelesen wird.

Puffer und Lösungen:

Lösungen aus dem *Ribogreen RNA Quantitation* Kit von Molecular Probes

5.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von RNA-Proben:

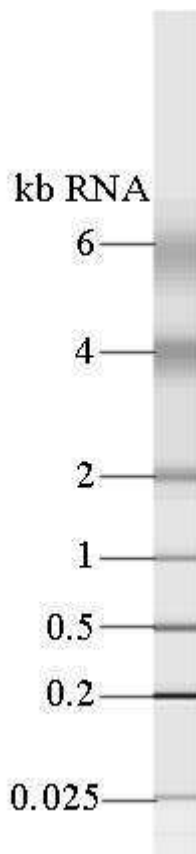


Abbildung 1: RNA 6000 Ladder, Ambion, für eine repräsentative RNA Auftrennung mit dem Agilent Bioanalyzer.

Einen Einblick in die Qualität der extrahierten RNA liefert das *Agilent 2100 Bioanalyzer System*. Der Wirkungsmechanismus beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von RNA, die in diesem Fall jedoch auf einen Chip reduziert ist. Über jede Probe wird ein Spannungsgradient angelegt, der die RNA zur Wanderung anregt und im Gel der Größe nach auftrennt. Der Nachweis der RNA erfolgt mit interkalierenden Substanzen durch Laser angeregte Fluoreszenz. Basierend auf der Annahme, dass der im Kit enthaltene Standard eine Konzentration von 150 ng/μl aufweist, wird für die Proben über einen Signalvergleich die Konzentration abgeschätzt. Zur Analyse wird 1 μl der unverdünnten RNA-Probe eingesetzt. Das Verhältnis von 23S rRNA zu 16S rRNA gibt Auskunft über die Qualität der RNA, vor allem über die RNA-Abbau. Ist das Verhältnis etwa 1.8 so ist die Qualität der RNA-Präparation gut, und kaum Abbau zu verzeichnen.

Die Flächen der Peaks wurden mit dem mitgelieferten Programm analysiert.

Puffer und Lösungen:

Lösungen aus dem *RNA 6000 Nano Kit* von Agilent Technologies

5.3.4 Digoxigenin Markierung von Oligonukleotid-Sonden:

Im *Sandwich Hybridization (SH) Assay* dient die Digoxigenin markierte Oligonukleotid-Sonde zur Rekrutierung des Anti-Digoxigenin-Antikörpers. Dieser Antikörper trägt die alkalische Phosphatase, die für den Umsatz des AttoPhos® Substrates verantwortlich ist und das Fluoreszenz-Signal liefert.

Folgender Reaktionsansatz wird auf Eis pipettiert:

- 9.5 μl (100 pmol) Detektionssonde in DEPC
- 4 μl 5x Reaktionspuffer
- 4 μl CoCl₂ Lösung
- 0.5 μl DIG-11-dUTP
- 0.5 μl dATP
- 0.5 μl Terminale Transferase (400 U/μl)

Der Ansatz wird gemischt, kurz abzentrifugiert und 60 min bei 37 °C inkubiert. Dann wird die Reaktion gestoppt, indem 2 µl einer 0.2 M EDTA-Lösung hinzugegeben werden. Anschließend wird die Sonde bei –20 °C aufbewahrt.

Puffer und Lösungen:

Lösungen aus dem *DIG Olinucleotide Tailing Kit, 2nd generation* von Roche Diagnostics, DEPC H₂O, 0.2 M EDTA

5.3.5 *in vitro* Transkription:

Für eine Quantifizierung im SH-Assay wird eine Standardkurve benötigt, deren RNA man mittels *in vitro* Transkription am pET3a Plasmid mit dem gewünschten rekombinanten Gen herstellt. Dabei wird die spezifische Erkennung der T7 RNAP für ihren Promoter ausgenutzt, so dass kein weiteres RNA Produkt außer dem rekombinanten entsteht.

12 µl DNA Template (Plasmid pET3a, 10-60 ng/µl DNA)

2 µl 10x Transkriptionspuffer

1 µl 10 mM ATP

1 µl 10 mM GTP

1 µl 10 mM CTP

1 µl 10 mM UTP

2 µl T7 Enzym Mix

Gesamtvolumen: 20 µl

Der Ansatz wird leicht vermischt, abzentrifugiert und 60 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wird die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 µl *DNase I* für 15 min bei 37 °C abgebaut. Es folgen Wasch- und Fällungsschritte mit 5 M Ammoniumacetat und Ethanol um die RNA aufzureinigen. Die Konzentration wird mit *Ribogreen* nach 5.3.2 gemessen und die Qualität der RNA nach 5.3.3 im Agilent *RNA 6000 Nano* Kit bestimmt.

Puffer und Lösungen:

Lösungen aus dem *MAXIscript T7 In Vitro Transcription Kit*, Ambion, 5 M Ammoniumacetat, Ethanol (99 % und 70 %)

5.3.6 *Sandwich Hybridization-Assay* mit extrahierter RNA:

Die *Sandwich Hybridization* (SH) ist eine wertvolle Methode um Konzentrationen an mRNA in einem RNA-Extrakt zu bestimmen. Der Vorteil zur *real time* PCR ist, dass eine SH schneller durchzuführen ist und eine exakte Quantifizierung der mRNA über den Standard möglich ist. Eine Unsicherheit der *real time* PCR, die bei der SH entfällt, ist der Amplifizierungsschritt, der von vielen Faktoren, die teilweise schwer zugänglich sind,

beeinflusst wird. Das Prinzip der SH beruht auf der Fähigkeit der Hybridisierung von komplementären DNA-RNA-Sequenzen. Zu einer mRNA werden mindestens drei spezifische DNA-Oligonukleotid-Sonden entwickelt, die komplementär zu bestimmten Bereichen der mRNA sind, eine Biotin markierte Sonde, eine Digoxigenin markierte Sonde und ein oder zwei Hilfssonden, die RNA-Sekundärstrukturen aufbrechen. Die Biotin markierte DNA-Oligonukleotid-Sonde bindet an die komplementären Bereiche der Ziel-mRNA und ist somit fest mit ihr verbunden. Die Ziel-mRNA kann nun mit Hilfe der Biotin-Sonde an Streptavidin beschichteten, paramagnetischen Partikeln immobilisiert werden. In Waschschritten kann so die Ziel-mRNA angereichert werden. Das Digoxigenin markierte DNA-Oligonukleotid kann über einen Anti-Digoxigenin-Antikörper nachgewiesen werden, der die alkalische Phosphatase trägt und das Substrat 2'[2-Benzothiazoyl]6-hydroxybenzothiazolphosphat (BBTP, AttoPhos®) umsetzt, indem das Phosphat hydrolysiert wird und stark fluoreszierendes BBT entsteht, welches fluorometrisch gemessen wird (Rautio et al. 2003, Leskela et al. 2005). Die DNA-Hilfssonden reduzieren die Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen und erleichtern somit die Anlagerung der Biotin- und Dig-Sonden und führen daher zu höheren Signalen (Barken et al. 2004). Die in der Arbeit genutzten Sonden wurden bereits in vorhergehenden Arbeiten von M. Krause und M. Zenker entwickelt und getestet (siehe 4.4 - Primer). Der Verlauf der SH und die Zusammensetzungen der Lösungen wurden von D. Thieme optimiert (Thieme).

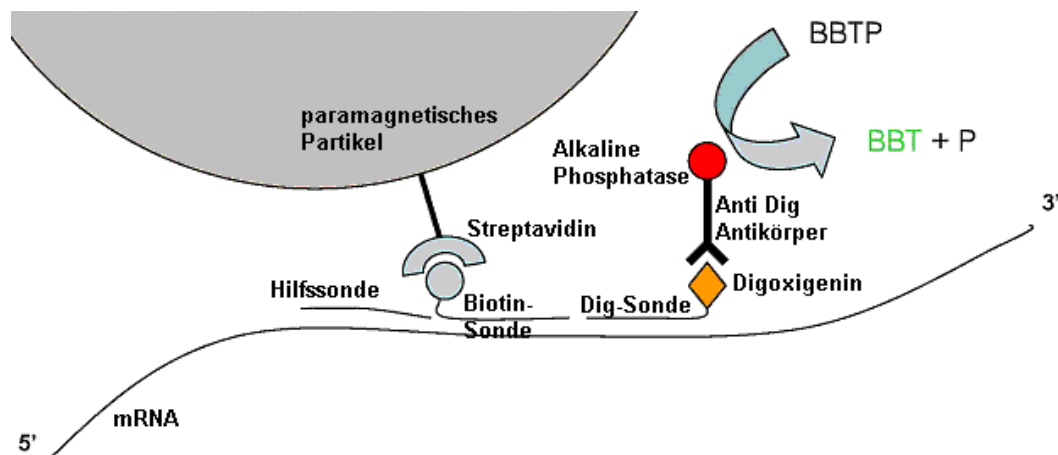


Abbildung 2: Funktionsprinzip der SH: die Hilfssonde reduziert die Sekundärstrukturen im Gebiet der Hybridisierung, die Biotinsonde immobilisiert die mRNA am paramagnetischen Partikel mittels der Affinität zu Streptavidin. Das Signal entsteht über den Anti-Dig-Antikörper, der an die Dig-Sonde bindet und über die alkalische Phosphatase eine fluoreszierende Substanz bildet.

Der Reaktionsansatz (SH-Lösung + Probe) für einen *Well* besteht aus:

25 µl 20x SSC
20 µl Formamid
15 µl 20 % Dextransulfat
2 µl 10 % Tween20
1 µl 100x Denhardts Reagenz
23 µl DEPC H₂O

1 µl 1 µM Hilfssonde 1
1 µl 1 µM Hilfssonde 2 (wenn nicht vorhanden, ersetzt durch DEPC H₂O)
1 µl 0.05 µM Dig-Sonde
1 µl 5 µM Biotin-Sonde
10 µl Probe
Gesamtvolumen: 100 µl

Eine nötige Negativkontrolle umfasst ein *Well*, in dem Ziel-mRNA enthalten ist, jedoch keine Biotin-Sonde. Für jede Probe erfolgt eine Dreifachbestimmung. 90 µl der SH-Lösung werden in die *Wells* einer 96 *Well*-Platte gegeben und 5 min bei 50 °C geschüttelt, um RNA-Sekundärstrukturen aufzubrechen. Folgend werden 10 µl Probe in die entsprechenden *Wells* pipettiert und die Platte wird 30 min bei 50 °C, 700 rpm inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzubrechen und die Hybridisierung der komplementären Bereiche zu erlauben. Nach Ablauf der Zeit werden pro *Well* 15 µl paramagnetische, Streptavidin beschichtete Partikel zugegeben, die vorher in 5x SSC gewaschen und gelöst wurden. Das Immobilisieren der Ziel-mRNA erfolgt 30 min bei 50 °C und 700 rpm. Es folgen drei Waschschrte mit Waschpuffer, die bei 25 °C und 700 rpm durchgeführt werden, wobei die Ziel-mRNA durch die paramagnetischen Partikel über Magnasphere® immobilisiert wird. Nun werden 100 µl der Enzymlösung pro *Well* appliziert, wobei die Anti-Dig-Antikörper für 30 min bei 25 °C und 450 rpm an das Digoxigenin der Dig-Sonde binden. Es folgen erneut Waschschrte, wobei nach dem dritten Waschschrte der gesamte Reaktionsansatz auf eine neue 96 *Well*-Platte übertragen wird, um Hintergrundsignale, herrührend von unspezifischer Bindung des Antikörpers an die *Well*-Platten, zu minimieren. Nach einem weiteren Waschschrte werden 100 µl des Substrates AttoPhos® pro *Well* hinzugegeben. Die Reaktion erfolgt für 20 min bei 37 °C und 700 rpm. Die magnetischen Partikel mit Ziel-mRNA werden immobilisiert und 90 µl der umgesetzten Substratlösung werden in eine schwarze 96 *Well* Platte zur Fluoreszenzmessung umpipettiert. Das Signal wird im Wallac-Victor²-Fluoreszenzspektrophotometer gemessen.

Das Ergebnis der SH ist die Angabe einer Stoffmenge an Ziel-mRNA in den 10 µl, die zur Analyse eingesetzt wurden. Dieser Wert muss auf die ursprüngliche Konzentration der Probe

rückgerechnet und durch Zellzahl oder RNA-Gehalt zur Vergleichbarkeit normiert werden (siehe 5.6.3).

Errechnen der Anzahl mRNA-Zielmoleküle pro Zelle:

$$nc = \frac{ng * Na}{Cn}$$

nc – Anzahl der mRNA-Zielmoleküle pro Zelle

ng – Molarität der Ziel-mRNA in mol/ml

Na – Avogadrokonstante $\equiv 6.022 * 10^{23}$ Partikel/mol

Cn – Zellzahl / ml, abgeleitet von der gemessenen OD zur Probenentnahme ($OD_{600} = 1$ entspricht 4×10^8 Zellen, ermittelt über mikroskopische Auszählung)

Normieren des mRNA-Gehaltes auf die extrahierte RNA-Gesamtmenge:

Mit *Ribogreen* nach Methode 5.3.2 wird für jede RNA-Probe der extrahierte RNA-Gehalt bestimmt. Auf diesen Wert kann nun das SH-Signal normiert werden, womit Unregelmäßigkeiten in der Extraktion herausgerechnet werden.

$$rr = \frac{np}{eg}$$

rr – relativer Ziel-mRNA-Gehalt normiert zum Gesamt RNA Gehalt einer Probe

np – Quantität der Ziel-mRNA in der genommenen RNA-Probe, in Gramm

eg – Quantität der extrahierten Gesamt-RNA, in Gramm

Puffer und Lösungen:

SH-Lösung, Wasch-Puffer, (20x, 5x, 1x) SSC, Enzym-Lösung,

5.3.7 Vorbereitung des Zellrohextrakts für SH-Assay:

RNA-Proben in *RNAlater* werden 2 min bei 4 °C, 12,000 rpm zentrifugiert und das Pellet wird in Abhängigkeit der OD in TE mit einem 1:1000 Zusatz *RNAguard* gelöst. Der Zellaufschluss erfolgt durch Zugabe von 1 µl Lysozym und Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min. Die Lösung wird 5 min bei 12,000 rpm zentrifugiert und 10 µl des Überstandes werden zur SH mit Rohextrakt verwendet.

Puffer und Lösungen:

TE, *RNAguard*, 50 mg/ml Lysozymlösung

5.3.8 Sandwich Hybridization-Assay mit Zellrohextrakt:

Die SH erlaubt ebenfalls eine Detektion der Ziel-mRNA im Zellrohextrakt. Die Vorbereitung der Probe erfolgte nach 5.3.7. Der SH Assay wurde durchgeführt wie unter 5.3.6 beschrieben.

Das in 5.3.6 eingesetzte Volumen pro *Well* von 23 μl DEPC H_2O wurde diesen *Assay* jedoch in 10 μl 10x Blockierungsreagenz und 13 μl DEPC H_2O aufgeteilt. Die mRNA-Standards für die Standardkurve werden nicht in DEPC H_2O , sondern im Extrakt der Negativkontrolle, die kein rekombinantes Geninsert trägt, gelöst.

Puffer und Lösungen:

10x Blockierungsreagenz

5.4 Protein-Analyse:

5.4.1 Zellaufschluss:

Der Zellaufschluss erfolgte generell durch die Zugabe von Lysozym, jedoch wurden verschiedene Strategien entwickelt was die Anwendung des Zellaufschlusses auf die Protein Proben betrifft.

In den ersten Experimenten wurde LB-Medium verwendet, das nur ein Wachstum bis OD_{600} von ungefähr 2 erlaubte. Daher ist es möglich den Aufschluss in den 100 μl Protein-Probe durchzuführen. Die Nuklease Benzoase baut Nukleinsäuren ab, wobei eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur erfolgt, Brij35 dient zum Lösen von Membranproteinen:

1 μl Lysozym (50 mg/ml)

0.5 μl Benzoase (25 U/ μl)

1 μl Brij35

Das Reaktionsprodukt kann bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden.

Im Verlauf der Arbeit wurde die Kultivierung auf Superbroth umgestellt, die auch bei früheren Expressionsstudien mit Wnt1 genutzt wurde (Fahnert et al. 2004b). Damit konnte bei Expressionsstudien eine OD_{600} von bis zu 6 erreicht werden. Um zu garantieren, dass der Zellaufschluss vollständig ist, werden 10 μl der 100 μl Protein-Probe in einem von der Zellzahl abhängigen Volumen PBS verdünnt. PMSF ist ein Inhibitor von Serinproteasen und soll die Stabilität der Proteine in der Probe erhöhen:

x μl Lysozym (50 mg/ml)

x μl DNase I (10 mg/ml)

1 μl Brij 35

1 μl PMSF (100 mM)

Die mit x bezeichneten Volumina werden wenn nötig dem Gesamtvolumen angepasst.

Zur Vergleichbarkeit werden Konzentrierungs- und Verdünnungsschritte relativ zur Konzentration in der Expressionskultur angegeben. Ist die gegebene Zahl größer als eins so

gibt diese die Konzentrierung an, dementsprechend gibt eine Zahl kleiner eins die Verdünnung an.

Trennung der Zellproteine in lösliche und unlösliche Fraktion:

Falls angemerkt erfolgte eine grobe Trennung der Proteinfractionen durch 10 min Zentrifugation des Zellaufschlusses bei 13.2 rpm und Raumtemperatur. Der Überstand wurde aufbewahrt, das Pellet wird in 100 µl PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet für weitere Analysen eingesetzt wurde.

Die Proben werden bei -20 °C gelagert.

Puffer und Lösungen:

PBS, 50 mg/ml Lysozymlösung, 10 mg/ml *DNase* I, 100 mM PMSF

5.4.2 Proteinanalyse in der SDS-PAGE:

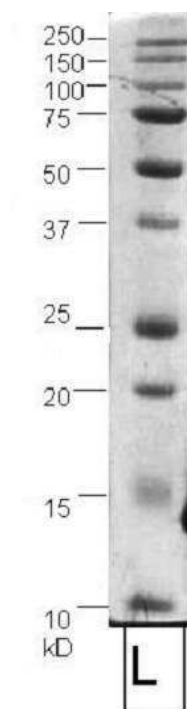


Abbildung 3:
Repräsentative
SDS-PAGE für
*Precision Plus
Protein all blue
standard*.

Die Proteinanalyse erfolgt über Trennung durch SDS Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE). In diesem Verfahren werden Proteine durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol und SDS denaturiert. Das SDS lagert sich in einem konstanten Verhältnis zum Molekulargewicht an das Protein und da SDS eine negative Ladung besitzt, werden die Proteine mit einer negativen Ladung markiert. Das Polyacrylamid-Gel bildet ein Molekularsieb, in dem sich die Proteine nach ihrer Größe auftrennen, wenn eine Spannung angelegt wird. Das Polyacrylamidgel entsteht durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und (N, N')-Methylenbisacrylamid nach Zugabe von 10 % (w/v) APS und Temed. Zu 10-15 µl der Proben wird eine entsprechende Menge an SDS-Probenpuffer gegeben und 10 min bei 95 °C erhitzt. Zu Beginn laufen die Proteine in einem 6 % Gel um dann in einem 12 % Gel weiterzuwandern. Dieser Übergang fokussiert die Banden. Die eingesetzte Spannung lag zwischen 190 und 200 V bei einem Elektronenfluss von 35-40 mA. Für eine gute Trennung benötigt man ungefähr 60 min. Ein vorgefärbter Größenstandard, *Precision Plus Protein all blue standard*, Bio-Rad, gibt Auskunft über die Molekulargewichtsverteilung im Gel.

Puffer und Lösungen:

Acrylamid/Bisacrylamid; 37.5:1, 10x Laemmli Buffer, 4x SDS Probenpuffer, 10 % APS, Temed, *Precision Plus Protein all blue standard*-Lösung von Bio-Rad

5.4.3 Coomassie Färbung:

Proteine können in der SDS-PAGE sichtbar gemacht werden, indem eine Coomassie Färbung durchgeführt wird. Das Gel wird drei mal 5 min in destilliertem Wasser gewaschen und für eine Stunde in einer Fertiglösung Coomassie *blue* G250 unter leichter Bewegung inkubiert. Danach werden die Proteinbanden durch Waschen in dH₂O sichtbar gemacht. Eine Verschärfung der Banden kann durch eine kurze Behandlung des Gels mit Entfärbelösung erreicht werden.

Puffer und Lösungen:

Coomassie *blue* G250 (Fertiglösung), Entfärbelösung

5.4.4 Western Blot:

Der *Western Blot*, auch Immunoblot genannt, bietet die Möglichkeit des spezifischen Nachweises von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern (Burnette 1981). Proteine werden durch ein senkrecht auf das Gel wirkendes elektrisches Feld von 80 V eluiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, auf der sie durch hydrophobe Wechselwirkungen haften bleiben. In der Arbeit wurde ein Tank-Blot verwendet, in dem alle Blotbestandteile submers im Blottingpuffer eingetaucht sind. Nach einer Stunde wurde der Blot aufgelöst und die Nitrozellulosemembran wurde entweder einer Ponceau-Färbung, 5.4.5 oder der Immunodetektion unterzogen.

Wnt4 und Wnt6 tragen eine C-terminale c-Myc-Fusion und sind so mit einem c-Myc-Antikörper spezifisch nachweisbar. Zusätzlich dazu ist ein Wnt4 spezifischer Antikörper genutzt worden. Gegen diese primären Antikörper sind sekundäre Antikörper erhältlich, die das detektierbare Signal liefern. Dazu wird die ECL- (effektive Chemilumineszenz) Technologie genutzt. Hierbei wird Luminol im alkalischen Milieu mit Phenolen von der Peroxidase aus dem Meerrettich oxidiert, wobei das Luminol in einen elektronisch angeregten Zustand übergeht. Unter Aussendung von Lichtsignalen kehrt es zum Grundzustand zurück (Chemolumineszenz). Die höchste Signalrate wird nach 5 bis 20 min erreicht.

Die Nitrozellulosemembran wird zunächst mit einem Sättigungspuffer, der aus einer 3% Trockenmilchlösung in TBST besteht und unspezifisch die Membran abdeckt, für eine Stunde behandelt. Nach einmal 15 min und zweimal 5 min waschen mit TBST wird die Membran mit 15 ml des primären Antikörpers, Anti-c-Myc-Antikörper (1:7000 neue Chargen, 1:300 alte Chargen) oder Anti-mWnt4-Antikörper (0.25 µg/ml) in TBST, überdeckt. Nach 45-60 min Inkubation mit leichter Agitation wird wie vorher in TBST gewaschen, wonach 15 ml des

sekundären Antikörpers, Schaf Anti-Maus gegen c-Myc-Antikörper (1:15,000) oder Ziege Anti-Ratte gegen Wnt4-Antikörper (1:10,000), eingesetzt werden und 60 min inkubiert wird. Nun wird wie vorhergehend gewaschen, jedoch statt der zwei Waschschritte erfolgen vier. Die ECL Detektionslösungen (1 & 2) werden vermischt und 0.125 mL/cm² werden auf die Membran gegeben. Im Dunkelraum wird ein lichtempfindliches Fotopapier für 10-300 s auf die Membran gelegt und in Entwickler- und Fixiererlösungen entwickelt.

Ein Antikörper kann mittels des *Stripping*-Puffers abgewaschen werden.

Puffer und Lösungen:

TBST, Sättigungspuffer, primärer und sekundärer Antikörper, ECL™ Detektionslösungen 1 & 2, Entwickler- und Fixiererlösung, *Stripping*-Puffer

5.4.5 Ponceau Färbung:

Die mit Protein beladene Nitrozellulosemembran wird kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und mit einer Menge an Ponceau S übergossen, so dass die Membran frei in der Lösung schwimmen kann. Nach 7 min wird die Färbelösung entfernt, und es wird mit destilliertem Wasser gewaschen bis die Banden klar sichtbar sind.

Die Färbung kann wieder rückgängig gemacht werden, indem die Nitrozellulose 10 min mit einer 0.1 M NaOH Lösung behandelt wird. Danach ist sie für eine erneute Immunodetektion wie in 5.4.4 zugänglich.

Puffer und Lösungen:

Ponceau S, 0.1 M NaOH

5.5 Spektroskopische Analysen:

5.5.1 Lichtstreu- und Absorptionsanalysen:

Während der Expressionsexperimente wurde die optische Dichte (OD) der Kulturen durch ihre Lichtstreuung bei 600 nm bestimmt. Über mikroskopische Zellzählung wurde ermittelt, dass $4 \cdot 10^8$ Zellen bei einer OD₆₀₀ in einem Milliliter der Lösung vorliegen.

DNA-Konzentrationen nach Plasmidisolationen wurden mit Nanodrop bestimmt. Das Instrument erfasst die Absorption einer Probe über den Wellenlängenbereich bei 220-350 nm und ermöglicht somit eine Aussage über die Reinheit der DNA-Lösung durch den Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm. Nukleinsäuren zeigen eine scharfe Absorption bei 260

nm, Proteine jedoch bei 280 nm. Ein Verhältnis 260/280 von 1.8 oder mehr gilt als reine DNA Lösung.

5.5.2 Fluoreszenzmessungen:

Für die *Ribogreen*-RNA-Bestimmung nach 5.3.2 und die Detektion des Signals der SH nach 5.3.6 wird die Fluoreszenz in einer schwarzen 96 *Well*-Platte gemessen. Ebenso erfolgt die Abbildung von DNA in Agarosegelen durch Fluoreszenzsignalen von Ethidiumbromid. Die Fluoreszenz basiert auf der Eigenschaft der Elektronenverteilung einiger Substanzen, dass sie bei Einstrahlung von elektromagnetischer Energie, oft in Form eines Lasers oder Ultravioletter Strahlung, in einen angeregten Zustand übergehen, einige Nanosekunden dort verbleiben und unter Abscheidung energetisch geringerer elektromagnetischer Strahlung in den Grundzustand zurückfallen.

5.5.3 Massenspektroskopische Untersuchungen:

Zur Identifizierung von Proteinen aus der SDS-PAGE wurden massenspektroskopische Untersuchungen über MALDI-TOF (Hillenkamp et al. 1991) an der Universität Oulu, Abteilung Biochemie durchgeführt. In der Technik des MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight*) werden Proteinfragmente, durch Trypsinverdau gebildet, von dem SDS-PAGE Gel extrahiert und mit einer Matrix, hier α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -Matrix), vermischt und co-kristallisiert. Das Einstrahlen von Laserlicht führt zur Ionisation und dem Ausbrechen der Proteinprobe aus dem Kristall. Abhängig vom Masse-Ladungsverhältnis entsteht ein charakteristisches Profil der Fragmentflugzeiten, die mit einer Datenbank, hier ProFound der Rockefeller Universität, abgeglichen werden kann, um die Identität der Probe aufzuklären. Das Trypsin dient zusätzlich als interner Standard zur Kalibration.

Zunächst wird die in Frage stehende Bande ausgeschnitten und durch waschen mit 180 μ l 0.2M Ammoniumcarbonatlösung in 40 % Acetonitril entfärbt. Zur Alkylierung des Proteins wird das Gelstück in 100 μ l Waschlösung gebracht, wozu 5 μ l 1 M DTT hinzugegeben werden und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wird. Nun werden 11 μ l Alkylierungslösung hinzu pipettiert und unter Lichtausschluss eine Stunde bei 37°C gelagert. Nach Ablauf der Zeit wird dreimal 5 min mit 200 μ l Waschlösung gewaschen. Die Waschlösung wird entfernt und das Gel wird dehydriert indem es für einige Minuten in 50 μ l Acetonitril inkubiert wird, danach wird das Acetonitril entfernt und das Gelstück im *speed Vac* getrocknet. Nun wird ein

Volumen einer 20 ng/μl Trypsin-Lösung zugegeben, die ausreicht das Gel zu rehydrieren. Der Verdau wird über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Peptid-Extraktion erfolgt durch Zugabe von 20 μl Extraktionslösung 1 für 10 min im Ultraschallbad, gefolgt von weiteren Extraktionen mit Extraktionslösung 2 & 3. Für jeden Extraktionsschritt wird die Flüssigkeit in ein gemeinsames Reaktionsgefäß überführt. 2 μl des Extrakts werden auf eine Massenspektrometrieplatte gegeben und mit 1 μl der α -Matrix gemischt. Nachdem die Kristallisation erfolgt ist, kann die Messung am MALDI-TOF MS beginnen (Miinalainen et al. 2003).

Puffer und Lösungen:

Waschlösung, 1 M DTT, Alkylierungslösung, Trypsin-Lösung, Extraktionslösung 1,2,3

5.6 in silico Betrachtungen und mathematische Aspekte

5.6.1 Simulation der Translation rekombinanter mRNA:

Um einen Überblick über die dynamische Bedeckung der mRNA mit Ribosomen zu erhalten, wurde ein Simulationsprogramm verwendet, in dem die Assoziation, die Wanderung und die Termination der Ribosomen von der mRNA modelliert wird. Bei der Berechnung für ein Ribosom werden auch direkt 3'-lokalisierte Ribosomen berücksichtigt, so dass Effekte wie Staus durch langsame Translation simuliert werden können. Die Simulation basiert auf dem Gillespie Algorithmus, der eine exakte numerische Berechnung der stochastischen Differentialgleichung (*master equation*) erlaubt, die das Reaktionssystem beschreibt. Dabei wird errechnet, welches die wahrscheinlichste nächste Reaktion ist, wenn alle Teilchenarten und Reaktionskanäle mit ihren Reaktionskonstanten bekannt sind. Die Sammlung der Datenpunkte erfolgt über eine Monte Carlo Simulation, um die statistische Absicherung zu garantieren (Gillespie 1977). Eine Studie über die Anwendung des Verfahrens im Bezug auf die Translation wird von Niemitalo et al. beschrieben (Niemitalo et al. 2005). Die Parameter für die Simulation werden in Anhang 7: „Simulationsparameter“ aufgeführt.

5.6.2 Analyse der RNA-Faltung:

Wie in der Einleitung beschrieben, hat die Zugänglichkeit der RBS einen erheblichen Einfluss auf die Effizienz der Initiation der Translation. Die Zugänglichkeit einer Sequenz der RNA kann quantitativ als die freie Energie der ungefalteten Sequenz erfasst werden. Die Energie der Strukturen von mRNAs ist errechenbar mit Hilfe des *Vienna Software Pakets* oder auf dem *mfold web Server* (Mathews et al. 1999, Zuker et al. 2003). Dabei kann die gesamte Energie einer eingegebenen Sequenz errechnet werden, wenn keine Einschränkungen in der RNA-Faltung vorgeschrieben sind. Außerdem kann die Energie einer Sequenz ermittelt werden wenn von einem bestimmten Bereich in der Sequenz, zum Beispiel der RBS, gefordert wird, dass der Bereich nur ungefaltet vorliegen darf. Die freie Energie der eingeschränkten Faltung im letzteren Fall ist immer höher, d.h. unvorteilhafter, als im Fall der beliebigen Faltung. Für eine bestimmte Region ist die Differenzenergie (ΔE) zwischen beiden Sekundärstrukturberechnungen ein Maß für die Stabilität der Struktur. In unserem Fall ist die Differenzenergie der Energiebetrag, der einer sich frei faltenden mRNA zugegeben werden muss, damit eine bestimmte Sequenz ungefaltet vorliegen kann. Eine hohe Differenzenergie ist Kennzeichen einer Sequenz, die stabile Sekundärstrukturen im bestimmten Gebiet aufweist; eine geringe Differenzenergie zeigt, dass eine ungefaltete Sequenz, die auch verfügbar für die Assoziation von Ribosomen ist, energetisch günstiger zu erreichen ist.

In der Boltzmannverteilung kann angegeben werden, wie viele Teilchen sich in einem bestimmten Zustand, normiert zu allen Zuständen, aufhalten werden. In unseren Fall, der Energie der Offenheit einer RNA, kann analog eine Verteilungsfunktion genutzt werden, die Aussage über die Besetzung einer bestimmten Struktur, hier das Fehlen einer Sekundärstruktur, treffen kann. Die so entstandene Variable kann als Grad der Offenheit bezeichnet werden.

$$\Delta E = E_g - E_i$$

ΔE – Differenzenergie

$E_{i,g}$ – Energiegehalt einer bestimmten Struktur (i), freie Wahl der Struktur (g)

$$Z = \frac{N_i}{N_g} = \frac{e^{-E_i/kT}}{e^{-E_g/kT}} = e^{\Delta E/kT}$$

Z – Grad der Offenheit

$N_{i,g}$ – Anzahl der Elemente in der Struktur i, oder einer beliebigen Struktur

kT – Produkt aus Boltzmannkonstante und Temperatur = 0.6163 kcal/mol

Angewendet auf die RBS impliziert ein hoher Grad der Offenheit eine gute Zugänglichkeit für Ribosomen, daraus folgend eine effektivere Initiation der Translation und daher mehr Produkt.

Zur Berechnung der Sekundärstrukturen wurden 300 Nukleotide eingesetzt, beginnend mit dem äußersten 5'-Ende. Den letzten zehn Nukleotiden wurden vorgegeben keine Sekundärstrukturen auszubilden, damit die simulierte Struktur einer Sequenz ähnelt, bei der folgende Sequenzabschnitte hinter Nukleotid 300 sterisch geschützt wirken. Die Region, für die die Ausbildung von Sekundärstrukturen verboten wurde, umfasst 19 Nukleotide. Der in der Arbeit benutzte pET Plasmid ist konstant für die RBS und entspricht der Sequenz: GAAGGAGATATACATATGN, wobei „N“ für eine beliebige Base im variablen Plasmidteil steht. Die Temperatur der Faltung beträgt 37 °C.

Die Berechnungen zur Energie der mRNA Sekundärstrukturen wurden von O. Niemitalo in der Biocomputing Gruppe von A. Juffer, Abteilung Biochemie, Universität Oulu, durchgeführt.

5.6.3 Daten-Auswertung:

In der *Sandwich Hybridization* wurden für jeden Zeitpunkt RNA-Doppelbestimmungen durchgeführt und für jede der Doppelprobe wurde dreifach die Konzentration in der SH quantifiziert. Für alle Werte wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Das kritische Level, auch Detektionslevel genannt, ist ein Mindestmaß, über dem ein Signal liegen muss, um als positives Signal gewertet werden zu können. Das Prinzip beruht auf der Annahme, dass ein positives Signal größer als ein bestimmtes Vielfaches der Standardabweichung des Nullwertes um den Nullwert herum sein muss. Einen genauen Vorgabewert für dieses „Vielfaches“ gibt es nicht, in dieser Arbeit wird dem Vorschlag von Currie gefolgt und das kritische Level wurde berechnet nach (Currie 1968):

$$Lc = 2.33 * s.d.(blank) + [blank]$$

Lc – Detektionslimit, kritische Level

s.d.(blank) – Standardabweichung des Nullwertes

[blank] – Mittelwert des Nullwertes

Um vom SH-Signal zur Konzentration der Ziel-mRNA in einem Milliliter der RNA-Probe zu gelangen wird folgender Algorithmus durchlaufen:

Es muss zu Beginn die Extraktionseffizienz für jede Probe berechnet werden, denn der extrahierte Gehalt an mRNA kann aufgrund der experimentellen Natur variieren. RNA-Proben aus späteren Zeitpunkten besitzen eine höhere Biomasse und damit kann mehr RNA extrahiert werden. Die extrahierte RNA muss daher um die relative Menge an Biomasse korrigiert werden, um der höheren RNA-Konzentration Rechnung zu tragen. Von den so angepassten RNA-Extraktionen wird die relative Extraktionseffizienz als Quotient der Extraktion zur höchsten Extraktion gebildet (siehe Anhang 3: „Berechnungen im SH-Assay“).

Die Analyse der SH beginnt mit der Umrechnung des Fluoreszenzsignals in eine molare Menge mithilfe der Standardgerade, die für jeden Versuch angelegt wird. Dann werden Verdünnungen und Konzentrationen einberechnet und der mRNA-Gehalt für 1 ml der RNA-Probe berechnet. Folgend wird entweder die Masse der Ziel-mRNA in Gramm pro Gramm extrahierter RNA berechnet oder die Anzahl der mRNA-Zielmoleküle pro Zelle.

Für die RNA bezogene Auswertung wird die molare Menge an Ziel-mRNA pro Milliliter RNA-Probe über das Molekulargewicht der mRNA in das Gewicht in Gramm umgerechnet. Der Quotient aus dem Gewicht der Ziel-mRNA in Gramm und der extrahierten RNA in Gramm gibt den relativen Gehalt der mRNA an der Gesamt-RNA an.

In der zellbezogenen Analyse muss der erhaltene Wert für die Molarität der 1 ml RNA-Probe um die Extraktionseffizienz korrigiert werden, wozu der Quotient aus der Molarität und der relativen Extraktionseffizienz gebildet wird. Über die Avogadro-Zahl kann nun die Anzahl der mRNA-Moleküle in der RNA-Probe erhalten werden. Da die OD mit der Zellzahl korreliert, kann für jeden Probenzeitpunkt auf die Zellzahl geschlossen werden. Die Division der Anzahl der Moleküle pro ml RNA-Probe durch die Anzahl der Zellen pro ml ergibt die Anzahl der mRNA-Moleküle pro Zelle (siehe Anhang 3: „Berechnungen im SH-Assay“).

5.6.4 Bestimmung der Halbwertszeit

Die zelluläre Konzentration von Wnt4 im Zytoplasma von *E. coli* kann beschrieben werden mit der Differentialgleichung (Yang 1995b):

Formel 1:

$$\frac{dP}{dt} = q_p - K_{Deg}P - \mu P$$

Darin gibt P die Produktkonzentration an, t steht für die Zeit, q_p gibt die Syntheserate des Produktes an, K_{Deg} ist die Degradationsrate des Proteins und der Faktor μ verringert die Produktkonzentration durch Zellwachstumsverdünnung. Wird die Proteinsynthese gestoppt, so entfällt aus Formel 1 die Produktsynthese q_p und da die Translation gestoppt ist, hört das Zellwachstum auf und der Verdünnungsterm entfällt ebenfalls. Die Produktkonzentration wird dann nur von der Abbaurrate beeinflusst:

Formel 2:

$$\frac{dP}{dt} = -K_{Deg}P$$

Die Integration ergibt:

Formel 3:

$$P = P_0 e^{-K_{Deg}t}$$

Mit P_0 als die Produktkonzentration zum Zeitpunkt, wenn die Translation gestoppt wird. Die lineare Auftragung der Produktmenge gegen die Zeit erfolgt über:

Formel 4:

$$\ln P = \ln P_0 - K_{Deg}t$$

Aus Formel 4 kann bei der Auftragung $\ln P$ gegen t die Abbaurrate über den Anstieg bestimmt werden. Für Wnt4 wird keine Produktkonzentration gemessen, sondern es wird die relative Signalstärke im Immunoblot bestimmt. Daher wurde die Halbwertszeit $t_{1/2}$ als konzentrationsunabhängige Größe zur Charakterisierung der Stabilität gewählt:

Formel 5:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_{Deg}}$$

6 Ergebnisse

6.1 Optimierung der Translation

6.1.1 Optimierung der *wnt4*-mRNA – theoretische Analyse

Die Sekundärstrukturberechnungen wurden nach 5.6.2 durchgeführt. Dazu wurden 300 Nukleotide aus der *wnt4*-mRNA, beginnend vom Transkriptionsstart +1 bis zum Nukleotid 237 der kodierenden Sequenz, eingesetzt. Mit dem großen Bereich von 300 Basen zur Berücksichtigung der Sekundärstruktur der RNA wurde der sehr schnellen Transkriptionsreaktion Rechnung getragen, die mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 230 Nukleotiden pro Sekunde abläuft (Kochetkov et al. 1998). Dadurch entstehen lange Bereiche unbedeckter RNA, die zur Faltung fähig sind. Von der RBS in der Eingabesequenz wurde gefordert, dass sie ungefaltet von -15 bis +4 relativ zum kodierenden Startnukleotid +1 vorliegt. O. Niemitälo hat einen Algorithmus entwickelt, der es erlaubt mit dem *mfold*-Programm (Mathews et al. 1999, Zuker et al. 2003) eine eingegebene Sequenz über stille Mutationen zu einem geringen RNA-Sekundärstrukturanteil hin zu optimieren (persönliche Mitteilung). Damit konnten die Basen identifiziert werden, bei denen ein Basenaustausch die größte destabilisierende Wirkung zeigt. Der kalkulierte Energieunterschied für eine sich frei faltende RBS und einer funktionellen, einzelsträngig vorliegenden RBS, beträgt für die *wnt4*-mRNA 3.85 kcal/mol. Diese Differenzenergie gibt die Energieinvestition an, die nötig ist, um die RBS zu entfalten. Aus der Differenzenergie ergibt sich der Grad der Offenheit (Z), der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die RBS ungefaltet vorliegt und für den *wnt4*-Wildtyp 0.0019 beträgt (dies entspricht dem Auftreten der offenen Struktur von 0.19 % als Anteil der Zeit oder der Gesamtstruktur).

Über den Optimierungsalgorithmus wurde berechnet, dass für die *wnt4*-mRNA drei Mutationen eingeführt werden können, die den Grad der Offenheit der RBS verdreifachen. Dabei wird die Base 9- Thymidin mit Cytidin (Codon 3: AAT – AAC), Base 18- Cytidin mit Thymidin (Codon 6: TAC – TAT) und Base 21- Guanidin mit Thymidin (Codon 7: CTG – CTT) ausgetauscht. Die Differenzenergie reduziert sich dabei auf 3.16 kcal/mol und der Grad der Offenheit steigt auf 0.0059 (Tabelle I). Die Effekte durch unterschiedliche Codonnutzung (Tabelle II) sind schwer abzuschätzen, die Codons gehören jedoch nicht zu den als kritisch betrachteten seltenen Codons.

Tabelle I: Vergleich der Differenzenergie (ΔE) und des Grades der Offenheit (Z) für Wildtyp (wt) und optimierte (mt) *wnt4*-mRNA

Sequenz	ΔE in kcal/mol	Z
wt <i>wnt4</i>	3.85	0.0019
mt <i>wnt4</i>	3.16	0.0059

Tabelle II: Codons in *wnt4*-mRNA, die für die stille Mutationen vorgeschlagen werden und ihre Codonnutzung im *E. coli* B-Stamm. Pos. – Codonposition; wt – Wildtyp; mt – optimierte Mutante; Cdntzg – Codonnutzung

Pos.	wt: Codon (Cdntzg in %)	mt: Codon (Cdntzg in %)
3	AAU(21.2)	AAC (15.9)
6	UAC (8.5)	UAU (18.6)
7	CUG (54.9)	CUU (12.7)

6.1.2 Optimierung der *wnt4*-mRNA – Site directed Mutagenese

Die Basenaustausche wurden durch *site directed* Mutagenese im pET3a-Plasmid mit *wnt4*-Insertion (pET3a_ *wnt4*-wt) vorgenommen. Dabei wurde zunächst eine Einzelmutation von Base 9 T zu C (Primer: 4.1-cmut-(r/l)), gefolgt von einer Doppelmutation auf den Positionen 18 C zu T und 21 G zu T (Primer: 4.2-TTmut-(r/l)) durchgeführt. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch eine Sequenzierung von Folge- und Leitstrang des Plasmids überprüft. Abbildung 2 verdeutlicht, dass die Mutationen im Leit- wie im Folgestrang etabliert werden

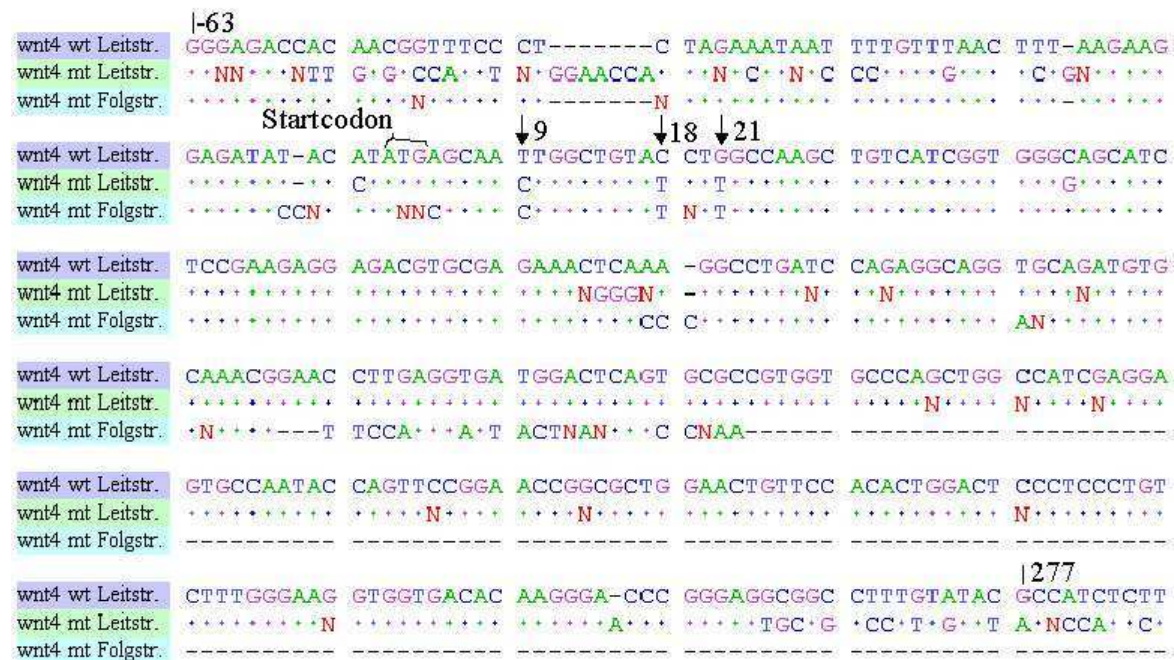


Abbildung 2: Sequenzierungsergebnis für die konstruierten Mutationen in *wnt4*. Gezeigt werden die ersten 286 Nukleotide der *wnt4*-mRNA, bezeichnet mit „wnt4 wt Leitstr.“. Das Adenin im Startcodon entspricht der Nummerierung +1. Die Mutationen sind mit Pfeilen markiert. Ein Punkt entspricht einer Sequenzübereinstimmung, ein Minus gibt an, dass ein Nukleotid fehlt.

konnten, und dass keine weiteren Mutationen in einem Bereich von über 250 Basen vorhanden sind. Das entstandene Plasmid wird mit pET3a_wnt4-mt bezeichnet.

6.1.3 Optimierung der *wnt6*-mRNA – theoretische Analyse

Für *wnt6* beträgt der berechnete Energieunterschied zwischen einer frei faltenden RBS und einer RBS, die ungefaltet vorliegt, 5.98 kcal/mol und der Grad der Offenheit ist $6.11 \cdot 10^{-5}$. Die Sekundärstrukturen mit der RBS sind im Vergleich zu *wnt4* stabiler und die Wahrscheinlichkeit in *wnt6* eine ungefaltete RBS anzutreffen ist 30 mal geringer als bei *wnt4*. Schon eine stille Mutation von Guanidin auf Nukleotidposition 6 hinter dem Startcodon zu Cytidin (Codon 2: CTG – CTC), die vom Optimierungsalgorithmus vorgeschlagen wurde, erhöht den Grad der Offenheit um das Fünffache auf 0.003 mit einer Differenzenergie von 3.58 kcal/mol (Tabelle III). Weitere Mutationen erhöhen den Grad der Offenheit nur noch gering (Daten nicht gezeigt). Der Codonaustausch erfolgt von einer höheren zu einer tieferen Codonnutzung. Wie schon für *wnt4* gehört das Zielcodon der Mutation aber nicht zu der als selten betrachteten Klasse an Codons, eine Wirkung dieses Codonwechsels ist schwer abzuschätzen.

Tabelle III: Vergleich der Differenzenergie (ΔE) und des Grades der Offenheit (Z) für Wildtyp (wt) und strukturoptimierte (So) <i>wnt6</i> mRNA		
Sequenz	ΔE in kcal/mol	Z
wt <i>wnt6</i>	5.98	$6.11 \cdot 10^{-5}$
So <i>wnt6</i>	3.58	$3 \cdot 10^{-3}$

Tabelle IV: Codon in der <i>wnt6</i>-mRNA, für die eine stille Mutation vorgeschlagen wurde und die Codonnutzung im <i>E. coli</i> B-Stamm. Pos. – Codonposition; wt – Wildtyp; So – strukturoptimierte Mutante; Cdntzg – Codonnutzung		
Pos.	wt: Codon (Cdntzg in %)	So: Codon (Cdntzg in %)
2	CUG (54.9)	CUC (14.1)

6.1.4 Optimierung der *wnt6*-mRNA – Site directed Mutagenese

Wie für *wnt4* wurde auch für *wnt6* eine *site directed* Mutagenese mit dem *wnt6*- tragenden Plasmid pET3a (Primer: w6.1-str.opt.(r/l)) durchgeführt. Im Anschluss wurde eine Sequenzierung durchgeführt, mit der die erfolgreiche Einführung der Mutation nachgewiesen wurde (Abbildung 3). Es zeigt sich außerdem, dass die Sequenz der Mutante für über 600

Nukleotide mit der *wnt6*-wt-Sequenz übereinstimmt (nicht gezeigt). Auf das Plasmid wird mit dem Namen pET3a_wnt6-So verwiesen.

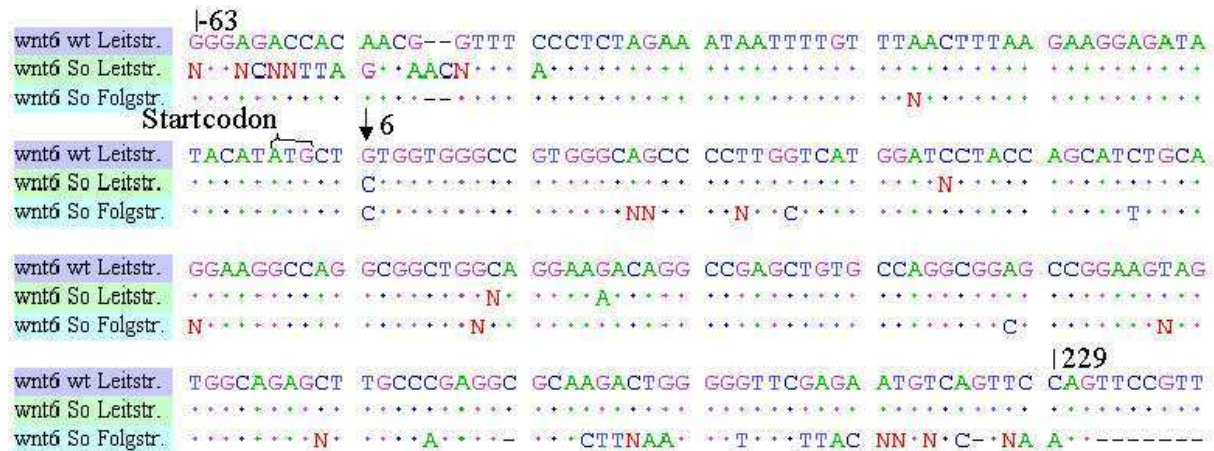


Abbildung 3: Sequenzierungsergebnis für die konstruierte Mutation in *wnt6*. Gezeigt werden die ersten 238 Nukleotide der *wnt6*-mRNA bezeichnet mit „wnt6 wt Leitstr.“. Das Adenin im Startcodon entspricht der Nummerierung +1. Die Mutation ist mit einem Pfeil markiert. Ein Punkt entspricht einer Sequenzübereinstimmung, ein Minus deutet an, dass ein Nukleotid fehlt.

6.1.5 Sekundäre RBS in *wnt4*

Eine Analyse der Sequenz der *wnt4*-mRNA zeigt, dass es innerhalb der kodierenden Sequenz eine interne, sekundäre RBS geben kann. Der GC-Gehalt von Base 79 bis 108, relativ zur ersten kodierenden Base, beträgt über 63 %, und von Position 91 bis 98 gibt es einen Bereich, der eine hohe Komplementarität mit dem 3'-Ende der 16S rRNA aufweist, die für die SD-ASD-Interaktion zuständig ist (Abbildung 4).

Output of *RNAfold*
by Dr. Stewart and Dr. Zuker

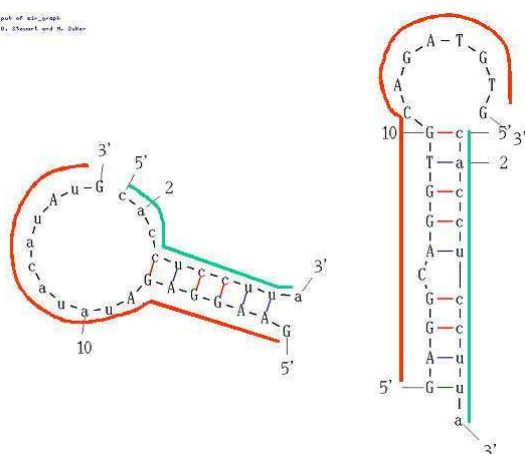


Abbildung 4: Es sind hypothetische Basenpaarungen zwischen der regulären RBS (links, rot) und der sekundären RBS (rechts rot) zur ASD-Sequenz (grün) gezeigt. Im RNA-Duplex gibt rot eine stabile Bindung an, blau eine schwächere.

Allein basierend auf einem Homologieaspekt kann die sekundäre RBS sogar mehr Wasserstoffbrückenbindungen mit der ASD-Sequenz ausbilden (Abbildung 4). Dabei werden aber sterische Faktoren im Ribosom und zusätzliche Sequenzeinflüsse, die eine große Rolle spielen, vernachlässigt.

6.1.7 Bioinformatische Charakterisierung der *wnt4*-mRNA

Die rekombinanten mRNAs von *wnt4* und *wnt6* wurden auf die Codonadaptation hin untersucht, um die Verteilung der seltenen Codons aufzuklären. Denn wenn viele seltene Codons in einem bestimmten Bereich lokalisiert sind, können Probleme in der Translation durch eine reduzierte Elongationsgeschwindigkeit und erhöhter Interaktion der Ribosomen ausgelöst werden (Rosenberg et al 1993, Deana & Belasco 2005). Die Translation wurde *in silico* simuliert, um Einblicke in die Bedeckung der mRNA mit Ribosomen zu erhalten (Niemitato et al. 2005).

Die *wnt4*-mRNA besteht aus 1198 Basen, wovon 1023 Nukleotide kodierend sind (341

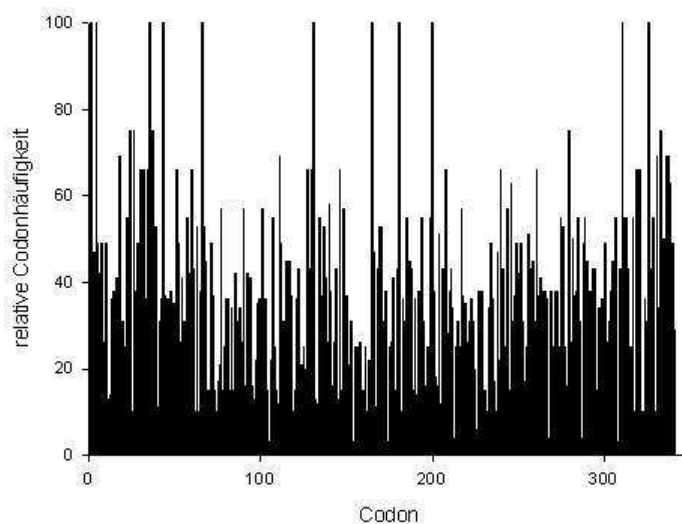


Abbildung 6: Gezeigt ist die relative Codonhäufigkeit für jede Codonposition in der *wnt4* mRNA. Berechnet bei <http://gcua.schoedl.de/sequentialex.html>.

Codons). Zu fast jedem Codon gibt es synonyme Codons, die für dieselbe Aminosäure kodieren, aber eine andere Frequenz der Codonnutzung aufweisen. Wie in der Einleitung beschrieben, können seltene Codons einen erheblichen Einfluss auf die Expressionseffizienz einer mRNA ausüben. Als seltene Codons werden in diesem Fall die Triplets AGG, AGA, AUA, CGA und CCC definiert, da diese sehr geringe Codonhäufigkeiten von unter 5 % besitzen. *wnt4* enthält

6 Codons (1.8 %) des seltenen Typs AGG, die jedoch gleichmäßig in der Sequenz verteilt sind (Codonpositionen: 31, 105, 154, 174, 271, 308 relativ zum Startcodon). Andere selten genutzte Codons treten in weit geringerem Maße auf.

Abbildung 6 gibt die Codonnutzung graphisch wieder. Ein hoher Wert entspricht dabei der Nutzung eines häufigen Codons. Bei einem Wert unter 20 wird ein eher seltenes Codon benutzt und ein Wert unter 10 zeigt das Auftreten von seltenen Codons. Es ist ersichtlich, dass zumeist häufige Codons genutzt werden, nur gelegentlich wird ein Wert von 10 unterschritten. Abbildung 7 zeigt die Bedeckung der *wnt4*-mRNA mit Ribosomen, die theoretisch mit einer Translationssimulation ermittelt wurde (siehe 5.6.1). Die Simulation berechnet, dass das 5'-Ende der kodierenden Sequenz zu 80 % (0.8 relativ unbedeckte Zeit) nicht von Ribosomen besetzt ist. Diese Situation würde der mRNA einen Spielraum bei der

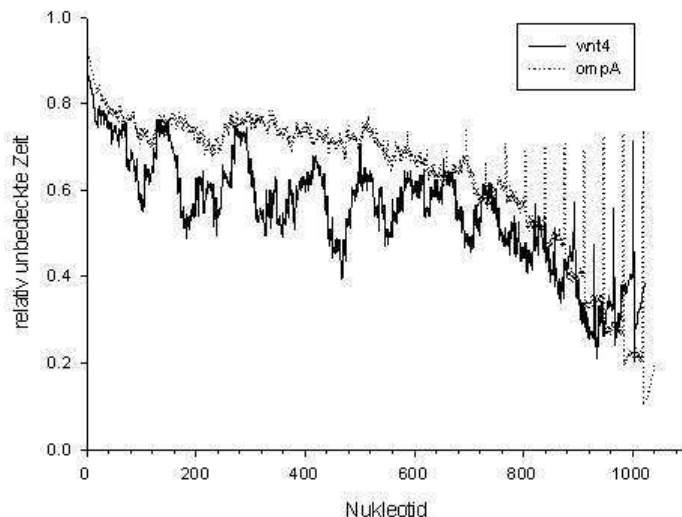


Abbildung 7: Simulation der Bedeckung der *wnt4*-RNA mit Ribosomen nach 5.6.1. Die Ordinate gibt die relative Zeit wieder, in der ein Nukleotid nicht mit Ribosomen bedeckt ist. Zum Vergleich ist die Bedeckung mit Ribosomen für die *ompA*-mRNA gezeigt (Punktlinie).

zu 3 % des zellulären Proteins bestehen aus OmpA (Lesnik et al. 2000). Die *ompA*-mRNA codiert fast ausschließlich für die häufigsten Codons und besitzt eine vergleichbare Länge wie die rekombinante *wnt4*-mRNA (Lesnik et al. 2000). Für die *ompA*-mRNA verläuft die simulierte Translation sehr ausgeglichen, es gibt keine großen Unterschiede in den Anstiegen für die Bedeckung mit Ribosomen. In Abbildung 11 wurde die zeitliche Entwicklung der Anzahl an gebundenen Ribosomen berechnet. Im Gleichgewichtszustand sind, der Simulation folgend, ungefähr 13 Ribosomen auf der mRNA lokalisiert. Der durchschnittliche Abstand eines Ribosoms zum Vorgänger beträgt damit ungefähr 45 Nukleotide.

6.1.8 Bioinformatische Charakterisierung der *wnt6* mRNA

Die *wnt6*-mRNA besteht aus 1077 Nukleotiden, wovon die kodierende Region 1059 Basen einnimmt. Eine Analyse für seltene Codons mit dem Programm *mRNA-analysis.pl* zeigt, dass es vier AGG Codons gibt, wobei zwei auf Codonposition 19 und 22 genutzt werden. AGA wird dreimal genutzt, eines taucht bei Codon 27 auf. CGA und CCC treten jeweils fünfmal auf, wobei ein CCC auf Codon 9 liegt. Diese Aufzählung zeigt, dass einige seltene und daher langsame Codons am 5'-Ende des kodierenden Bereiches liegen. So zeigt auch die Verteilung der relativen Codonhäufigkeiten in Abbildung 9, dass am 5' Ende der kodierenden Sequenz einige Codonpositionen unter eine relative Codonhäufigkeit von 10 fallen. Der globale Durchschnitt der relativen Codonhäufigkeit für die *wnt6*-mRNA liegt bei 35,4, für *wnt4* bei

Ausbildung von Sekundärstrukturen erlauben. In dem Graph können auch Effekte erkannt werden, die von sehr langsam translatierten Codons, vor allem also seltenen Codons, ausgelöst werden. So deutet ein stark negativer Anstieg auf eine steigende Ribosomenbedeckung und damit auf eine erhöhte Dichte der Ribosomen hin. Zum Vergleich ist die Simulation der Bedeckung der Nukleotide für die *ompA*-mRNA dargestellt. OmpA wurde gewählt, da es zur Klasse der hoch exprimierten Proteine gehört, bis

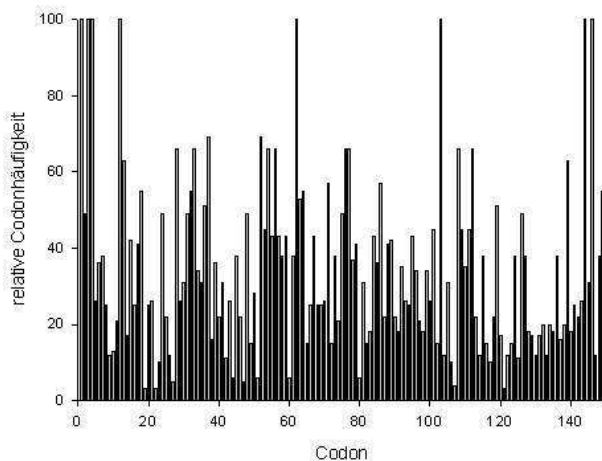


Abbildung 9: Codonhäufigkeiten für die ersten 150 Triplets der *wnt6*-mRNA. Eine relative Codonhäufigkeit unter 10 gibt die Nutzung eines seltenen Codons an.

ist nun auch, wie die Entwicklung der Anzahl der translatierenden Ribosomen auf der *wnt6*-mRNA simuliert wird (Abbildung 11). Hier werden weniger Ribosomen auf *wnt6* aufgeladen, obwohl die kodierende Sequenz länger ist als in *wnt4*. Die Gesamtbedeckung mit Ribosomen ist also geringer für *wnt6*, trotz gleicher Parameter für die Translationsinitiation. Daher beträgt der durchschnittliche Abstand von einem Ribosom zum Vorhergehenden 62 Nukleotide. Die Ursache hierfür ist im Modell wahrscheinlich die hohe Ribosomeninteraktion am 5' Ende der *wnt6*-mRNA. Diese senkt die tatsächliche Initiationsrate durch sterische Überlagerung mit der RBS, wodurch eine Anlagerung von Ribosomen reduziert wird.

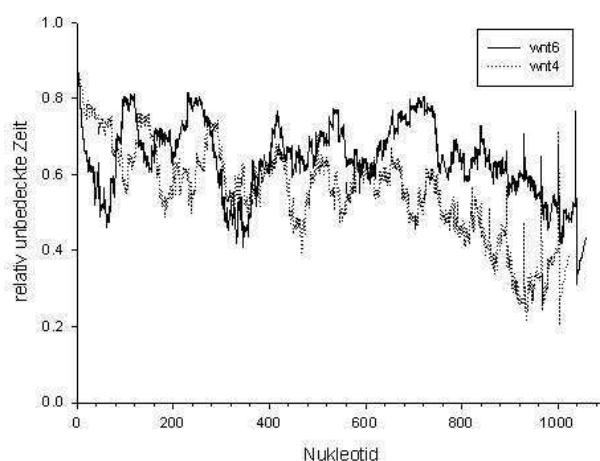


Abbildung 10: Simulation der Bedeckung der *wnt4/6*- (durchgezogen/gepunktet) mRNA mit Ribosomen. Die Ordinate gibt die relative Zeit oder die Wahrscheinlichkeit an, ein Nukleotid ohne Ribosom zu finden.

36.1 und für die sehr effiziente *ompA*-mRNA bei 42.1. Auch in der Simulation in Abbildung 10 zeigt sich der Einfluss der seltenen Codons, die das Ribosom kurz nach dem Start überwinden muss. Die relative unbedeckte Zeit der Nukleotide nimmt stark ab und impliziert damit eine wachsende Interaktion von Ribosomen in der Region. Hinter der Region mit langsamen Codons nimmt die relative Zeit, in der die Nukleotide nicht von Ribosomen bedeckt sind, wieder schnell zu. Interessant

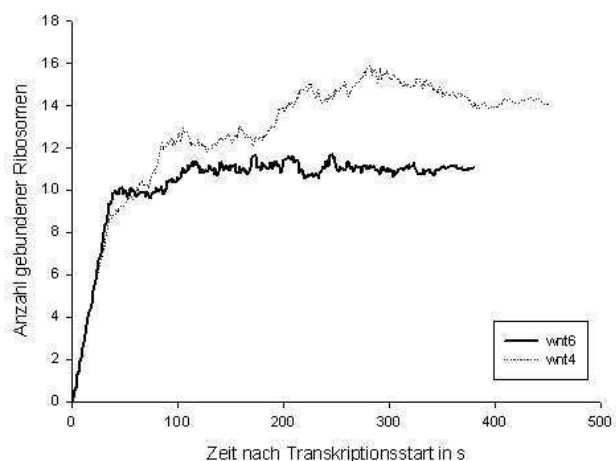


Abbildung 11: Anzahl der gebundenen Ribosomen auf *wnt6* (durchgezogene Linie) und *wnt4* (Punktlinie) nach dem Transkriptionsstart, simuliert wie unter 5.6.1 angegeben.

6.1.9 Messung des *wnt4*-mRNA Gehaltes

Um zu überprüfen, ob transkriptionelle Faktoren limitierend für die Expression der rekombinanten Gene sind, wird über den SH-Assay die Konzentration der *wnt4*-Wildtyp-mRNA über die Zeit verfolgt. Dafür wird zunächst ein *in vitro* Standard synthetisiert und mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der RNA im *Agilent 2100 Bioanalyzer System* die Qualität des Standards überprüft (Abbildung 12). Dabei entspricht der Hauptpeak mit einer Migrationszeit von 38.4 s einer Basenlänge von 1226. Die Messungenauigkeit liegt bei 58.7 Basen, so dass der Peak als *wnt4*-mRNA, die eine Länge von 1198 Basen besitzt, angenommen werden kann. RNA Peaks unterhalb des *wnt4*-Peaks sind schwach und sollten nur geringen Einfluss auf das Ergebnis der SH haben (Anhang 2: „*wnt4 in vitro* Standard“). Die SH von RNA-Proben einer Expressionsstudie von *wnt4*-wt in BL21 (Abbildung 13) zeigt, dass die relative Menge an *wnt4*-mRNA im RNA-Gesamtextrakt nach Induktion ansteigt.

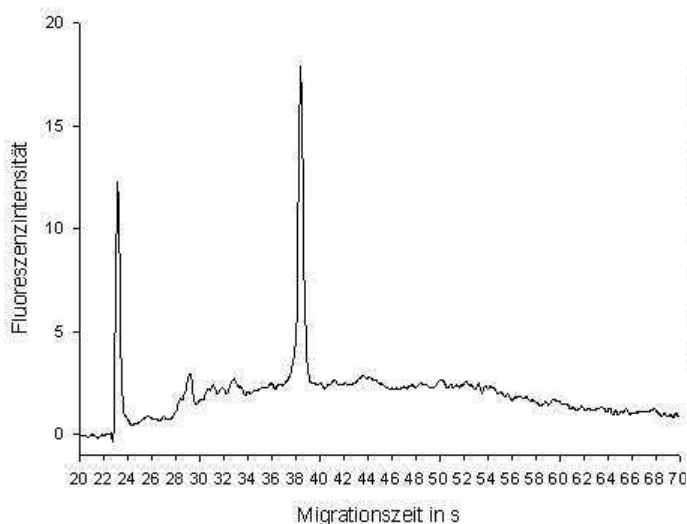


Abbildung 12: Elektrophoretische Auftrennung des *in vitro* Standards für die SH mit *wnt4*. Der Peak mit einer Migrationszeit von 23.2 s ist ein interner Standard mit 25 Basen zur Kalibrierung. Über den Größenstandard wurde für den Peak bei 38.4 s eine Länge von 1226 Basen errechnet (Anhang 2: „*wnt4 in vitro* Standard“).

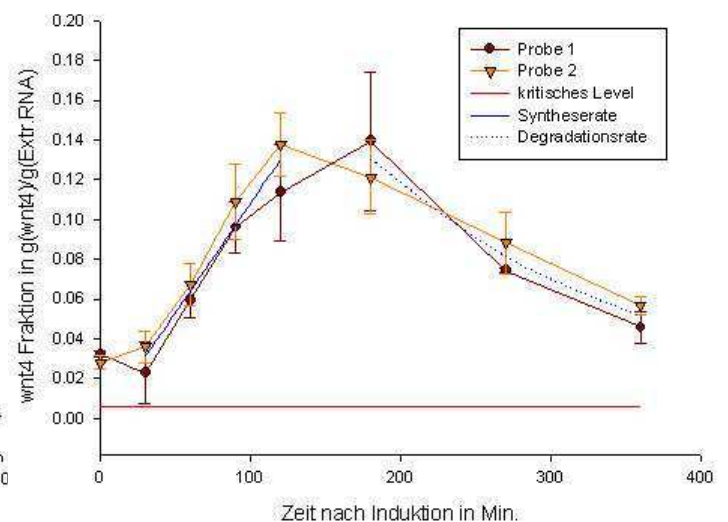


Abbildung 13: Gehalt an *wnt4*-wt-mRNA im BL21 RNA-Extrakt. RNA-Proben wurden wie in 5.2.1 Entnommen, nach 5.3.1 extrahiert und für die SH 5.3.6 folgend analysiert. Das kritische Level, Detektionslevel, beträgt 0.0057 g/g. Die Berechnungen können aus dem Anhang 3: „Berechnungen im SH- Assay“ entnommen werden. Syntheserate = 0.0011 (g/g)/min
Degradationsrate = 0.0052 (g/g)/min

Dabei ist schon zu Beginn der Induktion ein Grundlevel an rekombinanter mRNA vorhanden, das ungefähr 3 % der Gesamt-RNA beträgt. Das Maximum des Levels der *wnt4*-mRNA wird 120 Minuten nach Induktion erreicht, wobei 14 % der Gesamt-RNA aus rekombinantem *wnt4* besteht. Auf diesem hohem Niveau bleibt das *wnt4*-Level bis ungefähr 200 Minuten nach Induktion, gefolgt von einer Abnahme des *wnt4*-Gehaltes bis zum letzten Datenpunkt bei 360 Minuten auf ungefähr 178 % des Levels vor Induktion. Zu jedem Zeitpunkt wurden zwei

unabhängige Proben genommen, die mit „1.“ und „2.“ bezeichnet werden. Die Akkumulationsrate, die als Regressionsgerade über dem arithmetischen Mittel der zwei unabhängigen Proben pro Zeitpunkt von 20 bis 120 min errechnet wurde, beträgt 0.0011 (g/g) / min, wobei sich die Akkumulationsrate aus der mRNA-Synthese und -Abbau zusammensetzt. Die Abbaurrate, die aus den zwei unabhängigen Proben für die Zeitpunkte 180 bis 360 min über eine exponentielle Regression berechnet wurde, beträgt 0.0052 (g/g) / min.

Tabelle V: Relativer *wnt4*-Massegehalt und Molekülanzahl im RNA-Extrakt, s.d. gibt die prozentuale Standardabweichung an, „1.“, „2.“ bezeichnet zwei unabhängige, gleichzeitige Proben

Zeit nach Induktion in min	1. g(<i>wnt4</i>)/g(Extr.RNA)	1. fmol/ μ g (Extr.RNA)	1. s.d. in %	2. g(<i>wnt4</i>)/g(Extr.RNA)	2. fmol/ μ g (Extr.RNA)	2. s.d. in %
0	0.032	82.39	4.46	0.028	71.83	11.37
30	0.023	58.23	69.31	0.036	91.88	22.23
60	0.060	152.31	15.27	0.067	172.11	16.20
90	0.088	245.71	13.76	0.109	278.72	17.36
120	0.129	290.71	21.39	0.137	351.66	11.48
180	0.140	356.91	25.03	0.121	310.40	15.34
270	0.074	190.07	1.36	0.088	225.73	17.73
360	0.046	116.76	17.23	0.057	145.30	7.96

Mit dem RNA-Extrakt wurde ebenfalls eine gelelektrophoretische Analyse mit dem *Agilent 2100 Bioanalyzer System* durchgeführt, um die Qualität der Extraktion zu bestimmen. Dabei taucht ein Peak auf, der in der nichtinduzierten Probe fehlt, dessen Fläche jedoch mit der

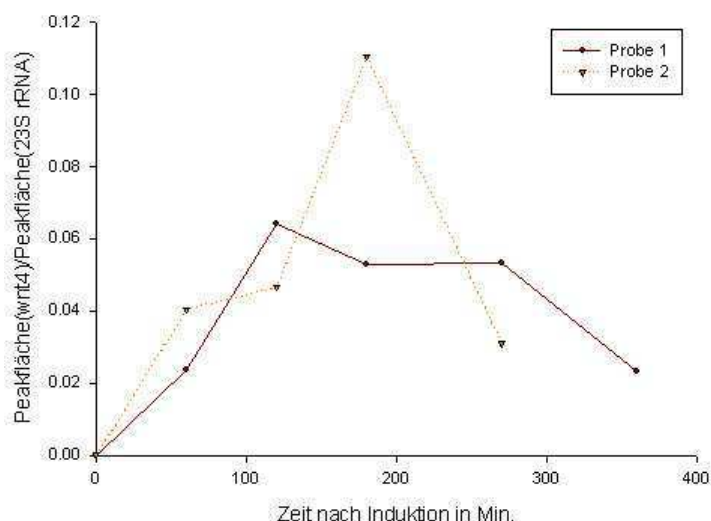


Abbildung 14: Zeitliche Entwicklung des, durch die 23S rRNA normierten, Wnt4-Signals nach Induktion. Nachgewiesen über eine elektrophoretische RNA-Auftrennung. Näheres in Anhang 4: „Elektrophoretische RNA-Auftrennung.“

Induktionszeit ansteigt, um nach einem Sattelpunkt wieder abzufallen (Abbildung 14). Zusätzlich besitzt der Peak eine ähnliche Migrationszeit wie der *wnt4 in vitro* Standard. Diese Beobachtungen implizieren, dass die zugehörige molekulare Spezies die *wnt4*-mRNA im RNA-Extrakt ist. Über die bekannte Konzentration des Standards, der bei der Analyse eingesetzt wurde, ist es möglich auch die *wnt4*-Fläche für die RNA-Proben in der

gelelektrophoretischen Auftrennung zu quantifizieren (Tabelle VI). Die erhaltenen Werte können auf die jeweilige extrahierte RNA-Menge bezogen werden, um Auskunft über den Anteil der rekombinanten mRNA an der Gesamt-RNA zu geben. Der erhaltene Höchstwert von ungefähr 0.09 g/g (*wnt4*/Extr. RNA) liegt etwas unterhalb der Werte, die mit Hilfe des SH-Assay bei 0.14 g/g (*wnt4*/Extr. RNA) bestimmt wurden, sind in der Größenordnung jedoch vergleichbar (Anhang 4: „Elektrophoretische RNA-Auftrennung“).

Die Quantifizierung im gelelektrophoretischen System, speziell dem vorliegenden der Firma

Tabelle VI: Anteil des vermutlichen *wnt4*-Signals an der Gesamt-RNA in der elektrophoretischen Auftrennung und Molarität pro Gewichtseinheit. w4-std bezeichnet den *wnt4* *in vitro* Standard und gibt die höchstmögliche Menge pro µg an.

Zeit nach Induktion in min	1		2	
	g(<i>wnt4</i>)/g(Extr.RNA)	fmol/µg	g(<i>wnt4</i>)/g(Extr.RNA)	fmol/µg
(w4-std)	1	2557.98		
0	-	-	-	-
60	0.033	83.36	0.054	138.00
120	0.077	196.59	0.045	114.19
180	0.067	171.24	0.086	220.71
270	0.074	189.29	0.034	87.46
360	0.025	63.87		

Agilent, ist schwierig selbst wenn ein identischer Standard benutzt wird. Im Vorfeld der Methode werden die Proben einer Hitzebehandlung von 70 °C für 2 Minuten ausgesetzt, um RNA-Sekundärstrukturen aufzubrechen. Bei den geringen Probenvolumen von 1.5 bis 2 µl kann es daher zu

Verfälschungen durch Verdunsten des Lösungsmittels kommen.

Auch in weiteren Experimenten konnten die gewonnenen Erkenntnisse reproduziert werden. So zeigt Abbildung 15 die Ergebnisse einer SH von Proben einer Expression von *wnt4* in BL21. Auch in diesem Fall liegt das Höchstsinal an *wnt4*-mRNA innerhalb von 120 bis 200 min. Der Anteil der rekombinanten mRNA an der Gesamt-RNA liegt um 0.13 g/g (*wnt4*/Extr. RNA) (Tabelle VII), vergleichbar mit dem rekombinanten mRNA Level von 0.14 g/g (*wnt4*/Extr. RNA) aus der vorherigen Berechnung.

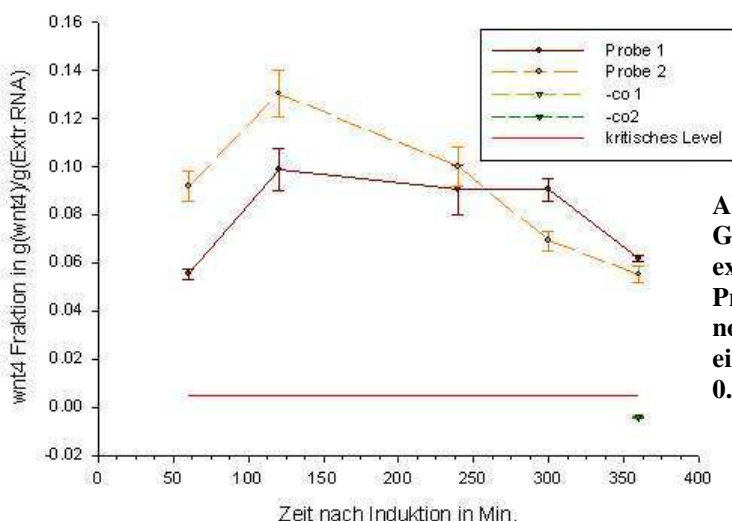


Abbildung 15: Relative *wnt4*-mRNA-Menge im Gesamtextrakt an RNA für ein Expressions-experiment in *E. coli* BL21(DE3). Für jeden Probenzeitpunkt wurden zwei Proben entnommen. Das kritische Level gibt das Limit für ein gesichertes positives Signal an und liegt bei 0.005 g/g (*wnt4*/Extr.RNA).

Tabelle VII: Relativer *wnt4*-Gehalt im RNA-Extrakt (A – in g/g(*wnt4*/Extr.RNA)) und Anzahl an Molekülen pro Gewichtseinheit extrahierter RNA (B) für Daten aus Abbildung 15; s.d. gibt die prozentuale Standardabweichung an.

Zeit nach Induktion in min	wnt4						-co					
	1			2			1			2		
	A in g/g	B in fmol/ μ g	s.d. in %	A in g/g	B in fmol/ μ g	s.d. in %	A in g/g	B in fmol/ μ g	s.d. in %	A in g/g	B in fmol/ μ g	s.d. in %
60	0.055	140.93	3.9	0.092	234.29	7.0						
120	0.099	252.11	8.9	0.130	332.94	7.4						
240	0.090	230.91	11.6	0.100	255.23	8.1						
300	0.090	230.64	5.0	0.069	176.45	5.6						
360	0.062	158.17	2.1	0.055	140.80	6.0	-0.004	-10.09	9.8	-0.004	-11.33	5.4

Es wurde eine elektrophoretische Auftrennung der RNA-Extraktionsproben durchgeführt und auch hier erscheint ein Signal auf gleicher Höhe wie der *wnt4 in vitro* Standard, was die Annahme, dass hinter dem Signal die rekombinante mRNA steht, weiter fundiert.

Ferner wurde eine SH im Zellrohextrakt ohne vorhergehende RNA-Extraktion durchgeführt. Das Expressionsexperiment wurde dafür in *E. coli* Rosetta mit pRARE durchgeführt. Der Vorteil der Messung im Zellrohextrakt ist, dass der Arbeitsschritt der RNA-Extraktion entfällt. Dies spart Zeit und hilft vor allem Verluste an RNA während der Extraktion zu reduzieren. Nachteilig ist, dass die Normierung des SH-Signals auf die extrahierte RNA-Menge entfällt, die eine gute Möglichkeit darstellt, externe Fehlerquellen in den Werten zu minimieren.

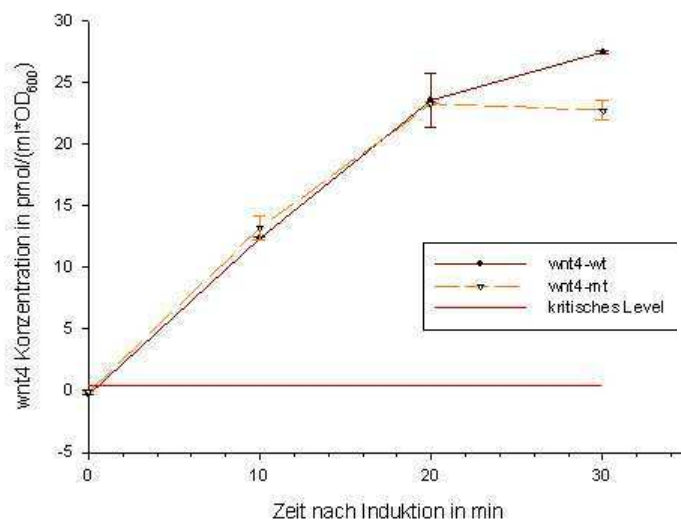


Abbildung 16: Reaktion der zellulären *wnt4*-Konzentration auf die Induktion, gemessen im Zellrohextrakt von Rosetta mit dem SH-Assay. Die gemessenen Konzentrationen im Zellextrakt werden auf die OD der Probenentnahme normiert, um Signalunterschiede durch unterschiedliche Zelldichten auszugleichen. Das kritische Level liegt bei 0.381 pmol/(ml*OD).

Werden die erhaltenen Konzentrationen nach der SH auf die optische Dichte bezogen, so ergibt sich eine zeitliche Entwicklung der Konzentrationen an *wnt4* wie in Abbildung 16. Nimmt man das kritische Level mit 0.381 pmol/(ml*OD) als Bezugspunkt für den Nullwert, so ergibt sich ein relativer Anstieg der Menge an *wnt4* nach einer halben Stunde um das 72-fache auf 27.5 pmol/(ml*OD) für den *wnt4*-Wildtyp (*wnt4*-wt). Um den Unterschied zwischen Wildtyp (wt) und Mutante (mt) zu bewerten, ist die Datenlage zu gering.

Über eine Neubauer-Zählkammer wurde bestimmt, dass 4×10^8 Zellen pro Milliliter bei einer OD₆₀₀ von 1 vorliegen. Wird die Anzahl der mRNA-Moleküle pro Zelle über die mikroskopisch ermittelte Zellzahl und der Konzentration der rekombinanten mRNA aus der SH berechnet, so ergeben sich nach 30 Minuten über 41,000 mRNAs pro Zelle. Auch in den vorhergehenden Versuchen von *wnt4* in BL21 werden über 41,000 *wnt4* mRNAs pro Zelle erhalten. Neidhardt und Umbarger geben an, dass in einer durchschnittlichen E. coli Zelle insgesamt 1380 verschiedene mRNA Moleküle vorliegen (Neidhardt & Umbarger 1996). Wird *lacZ* mit der Wildtyp-Sequenz in pBR322 exprimiert, so errechneten Vind et al. (Vind et al. 1993), dass ungefähr 65 *lacZ*-mRNAs pro Zelle vorhanden sein sollten. Elf et al. (Elf et al. 2003) rechneten für rekombinante mRNA aus *low copy*-Plasmiden mit 1250 Kopien pro Zelle und mit 2500 wenn das Plasmid zu einem *high copy*-Plasmid gehört. Allerdings berichteten schon Studier und Moffat bei den ersten Experimenten mit dem T7-System, dass die synthetisierte RNA im hohem Maße entsteht, so dass diese RNA im Gel zu sehen ist und dass sogar die Konzentrationen der ribosomalen RNAs reduziert wird (Studier & Moffat 1986).

Eine experimentelle Fehlerquelle für die Konzentrationsbestimmung im SH-Assay kann ihren Ursprung im *in vitro* Standard haben. Es muss die genaue Konzentration der intakten mRNA bekannt sein, da mRNA-Fragmente an die Sonden binden können und ihre Effektivität reduzieren. Dadurch wird das gemessene Signal gesenkt und die Standardgerade basiert auf einer zu hohen Konzentration, so dass die Werte in Wahrheit niedriger sind. Für *wnt4* (und *wnt6*) wurde die Qualität des *in vitro* Standards gelelektrophoretisch überprüft und beim *wnt4* *in vitro* Standard kann ein geringes Level an Abbaufragmenten bemerkt werden (Abbildung 12). Eine weitere informative Quantifizierung der rekombinanten mRNA kann im *Agilent 2100 Bioanalyzer System* relativ zu den Konzentrationen der ribosomalen RNA erfolgen. Dadurch kann auf die maximale Anzahl der Ribosomen pro mRNA geschlossen werden. In dieser Arbeit erfolgte diese Quantifizierung nicht, da kein Konzentrationsstandard für die rRNA-Peaks vorhanden war.

6.1.10 Messung des *wnt6*-mRNA Gehaltes

Auch der Gehalt an *wnt6*-mRNA vom Wildtyp (wt) und optimierten (So) Gen wurde mit dem SH-Assay über die Zeit nach der Expression verfolgt, um den Einfluss der Transkription zu bewerten. Die Abbildungen 17 und 18 zeigen die relativen Werte der Menge an *wnt6*-mRNA zur Menge der Gesamt-RNA nach Induktion. Abbildung 17 gibt die Expression vom *wnt6*-wt in Rosetta wieder, während Abbildung 18 die zeitliche Entwicklung der *wnt6*-Konzentration von wt und So in BL21 zeigt. Im gepunkteten Bereich in Abbildung 17 sind die Messwerte der SH zu weit über dem Standard, so dass ihre Wertung nur eingeschränkt möglich ist (Anhang 5: „*wnt6* SH Zusatzinformationen“).

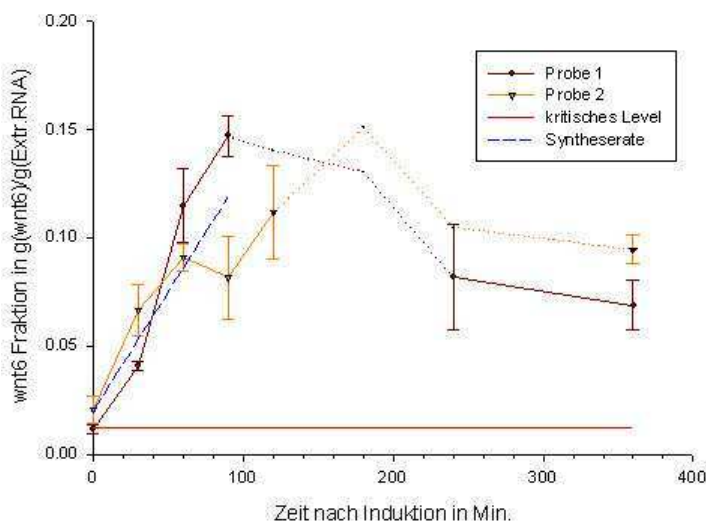


Abbildung 17: Ergebnisse der SH mit *wnt6*-Wildtyp in Rosetta, gezeigt ist die *wnt6*-Fraktion in g in der Gesamtmenge RNA in g im Zeitverlauf nach Induktion. Das kritische Level beträgt 0.012 g/g. Der gepunktete Abschnitt liegt außerhalb der Standardgerade, näheres dazu im Anhang 5 „*wnt6* SH Zusatzinformationen“. Syntheserate=0.0011 (g/g)/min

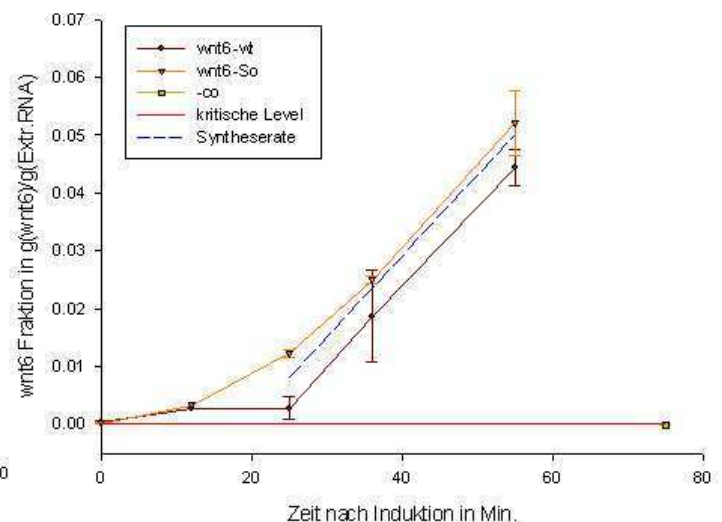


Abbildung 18: Relativer *wnt6*-Anteil in g an der Gesamtmenge RNA in g, gemessen im SH-Assay für ein Expressionsexperiment mit einem BL21-Stamm, der eine *wnt6*-Wildtyp- oder eine strukturoptimierte Genvariante besitzt. Das kritische Level beträgt $8,3 \cdot 10^{-5}$ g/g. Syntheserate = 0.0014 (g/g)/min

Bei der Expression in Rosetta steigt die Konzentration an *wnt6* in den ersten 90 Minuten um durchschnittlich 0.0011 (g/g)/min, berechnet über dem Mittelwert von Proben 1 & 2 vom Zeitpunkt null bis 90 min nach Induktion. Dabei steigt der Gehalt an *wnt6*-RNA um mehr als das 12-fache für Probe 1 vom kritischen Level 0.012 g/g (*wnt6*/Extr.RNA) auf 0.147 g/g nach 90 min (Tabelle VIII).

Bei der Expression von *wnt6* in BL21 akkumuliert sich die mRNA von Wildtyp und Strukturoptimierter Variante von 25 bis 55 min mit durchschnittlich 0.0014 (g/g)/min (Abbildung 18). Dabei steigt der Anteil der rekombinanten Moleküle pro Gesamt-RNA von 0.011 g/g (*wnt6*/Extr.RNA) für den *wnt6* Wildtyp (0.02 g/g, Strukturoptimiert (So)) auf

0.044 g/g (*wnt6*/Extr.RNA) (0.052 g/g (*wnt6*/Extr.RNA)) nach 55 min. Im induzierten Zustand nach 55 min ist die *wnt6*-Menge 126 Mal höher als vor Induktion (Tabelle IX).

Auch für *wnt6* konnte ein Signal der mRNA in der gelelektrophoretischen Auftrennung des RNA-Extrakts bemerkt werden. Wie im Fall von *wnt4* fehlt das Signal für die Probe vor Induktion und durchläuft ein Maximum zwischen 100 und 200 Minuten (Abbildung 19). Außerdem läuft der Peak auf gleicher Höhe wie der *wnt6 in vitro* Standard (Anhang 4: „Elektrophoretische RNA-Auftrennung“).

Tabelle VIII: Relativer *wnt6*-Wildtyp-Gehalt im RNA-Extrakt aus Rosetta und Anzahl an Molekülen pro Zelle, der s.d. gibt die prozentuale Standardabweichung an, 1. & 2. stehen für zwei unterschiedliche Probenentnahmen zu jeder Probenzeit

Zeit nach Induktion in min	1. g(<i>wnt6</i>)/ g(Extr.RNA)	1. fmol/ µg(Extr.RNA)	1. s.d. in %	2. g(<i>wnt6</i>)/ g(Extr.RNA)	2. fmol/ µg(Extr.RNA)	2. s.d. in %
0	0.011	29.45	19.6	0.020	53.47	29.5
30	0.041	106.62	5.3	0.066	173.31	17.4
60	0.115	299.33	14.7	0.091	237.38	6.8
90	0.147	382.84	6.5	0.081	212.54	23.5
120	-	-	-	0.112	291.23	19.4
240	0.081	212.61	29.8	-	-	-
360	0.069	179.17	16.9	0.094	246.14	7.0

Tabelle IX: Relativer *wnt6*-Gehalt für BL21 im RNA-Extrakt und Anzahl an Molekülen pro Zelle, der s.d. gibt die prozentuale Standardabweichung an, wt bezeichnet den *wnt6*-Wildtyp, So die strukturoptimierte Variante

Zeit nach Induktion in min	wt g(<i>wnt6</i>)/ g(Extr.RNA)	wt fmol/ µg(Extr.RNA)	wt s.d. in %	So g(<i>wnt6</i>)/ g(Extr.RNA)	So fmol/ µg(Extr.RNA)	So s.d. in %
0	0.0003	0.90	50.0	0.0002	0.53	27.1
12	0.0027	7.15	9.8	0.0033	8.71	10.1
25	0.0027	14.02	36.2	0.0122	31.88	6.1
36	0.0187	48.82	42.2	0.0250	65.16	2.9
55	0.0444	115.77	6.9	0.0521	136.02	10.7

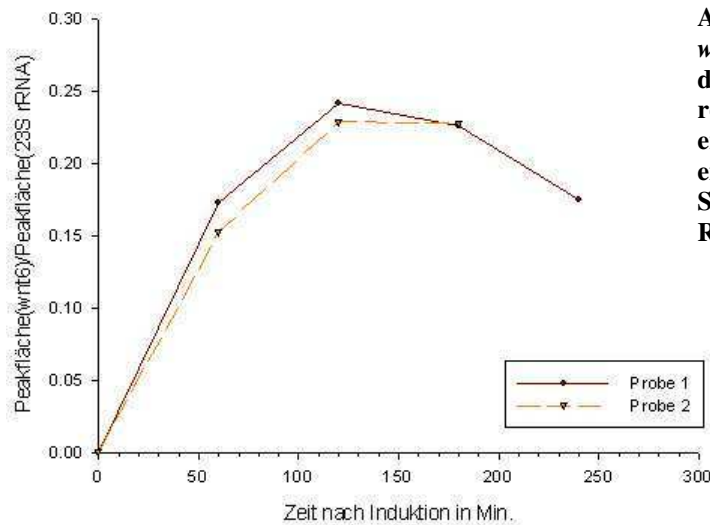


Abbildung 19: Abgebildet ist der Quotient der *wnt6*-Peakfläche des potentiellen *wnt6*-Signals durch die 23S rRNA aus einer elektrophoretischen Auftrennung für zwei gleichzeitig entnommene Proben in einem Expressions-experiment vom *wnt6*-Wildtyp in Rosetta. Siehe auch Anhang 4: „Elektrophoretische RNA-Auftrennung“.

Die Ergebnisse der SH-Assays zeigen, dass für beide rekombinanten Gene eine hohe zelluläre mRNA Konzentration vorliegt. Es erfolgt eine schnelle Akkumulation der mRNA nach Induktion und das mRNA Höchstlevel wird nach 120 bis 200 Minuten erreicht. Nach 360 min wird ein halbmaximales Level erreicht. Limitierende Faktoren auf der Transkriptionsebene können daher ausgeschlossen werden.

6.2 Zellwachstum bei Expression

6.2.1 Expression von *wnt4*

Die Plasmide wurden in *E. coli* BL21(DE3)- und Rosetta-Zellen transformiert und in LB-Medium oder Superbroth exprimiert. Dabei wurde die Zelldichte protokolliert, indem die Lichtstreuung der Kultur bei 600 nm gemessen wurde. Die spezifische Wachstumsrate, die über den Anstieg des Logarithmus der optischen Dichte gegen die Zeit ermittelt wurde, gestattet Aussagen über die Effekte der Induktion auf globale Zelleigenschaften, vor allem kann die Toxizität der Proteine bewertet werden.

In den Abbildungen 20-23 sind die Wachstumskurven für BL21 und Rosetta nach Induktion der Expression von *wnt4* gezeigt. Die spezifischen Wachstumsraten reichen von 0.4 h^{-1} für BL21 in Superbroth bis 0.87 h^{-1} für Rosetta in Superbroth. Die Ursache für die geringe Wachstumsgeschwindigkeit von BL21 in Superbroth ist wahrscheinlich das fortgeschrittene Alter der eingesetzten Kultur.

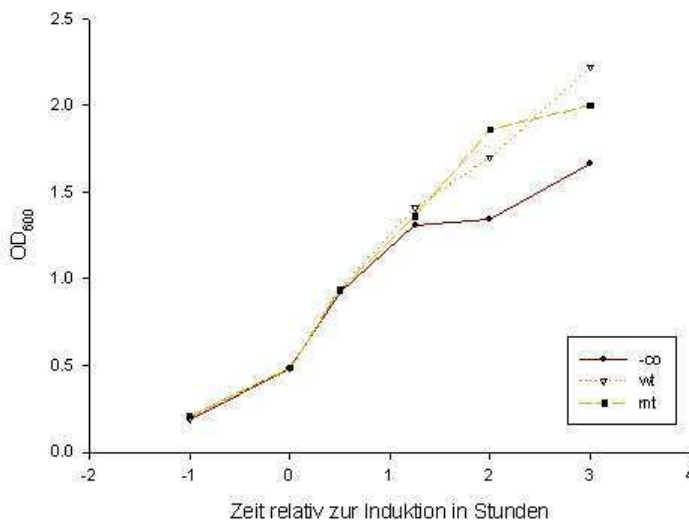


Abbildung 20: Expressionsexperiment von *wnt4* mit *E. coli* BL21(DE3) im LB- Medium. Die eingesetzten Plasmide sind pET3a (-co), pET3a_wnt4-wt (wt) und pET3a_wnt4-mt (mt). Die Induktion erfolgte zum Zeitpunkt null. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate beträgt 0.7 h^{-1} .

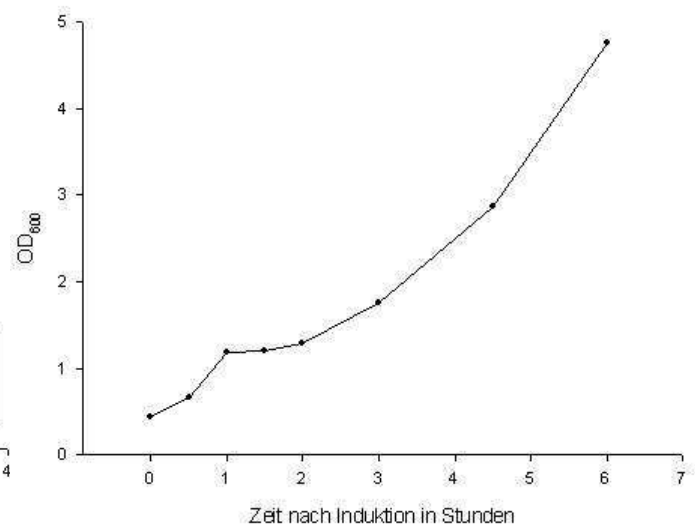


Abbildung 21: Expressionsstudie von *wnt4* mit *E. coli* BL21 (DE3) in Superbroth. Der genutzte Stamm trägt das Plasmid pET3a_wnt4-wt. Die Expression zum Zeitpunkt null erfolgte durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM. Die spezifische Wachstumsrate beträgt 0.4 h^{-1} .

Eine Anomalie im Wachstum ist sichtbar als Rückgang oder Verweilen der optischen Dichte in Abbildungen 21, 22 kurz nach Induktion der Expression von BL21 in Superbroth und Rosetta in LB-Medium. Diese Reaktion ist entweder ausgelöst durch den Messvorgang selbst, indem die Probenentnahme in zeitlich eng aufeinanderfolgender Reihe das Wachstum behinderte oder die rekombinante Produktion, mit dem dadurch ausgelösten Stress, hat die Wachstumseffizienz der Bakterien reduziert.

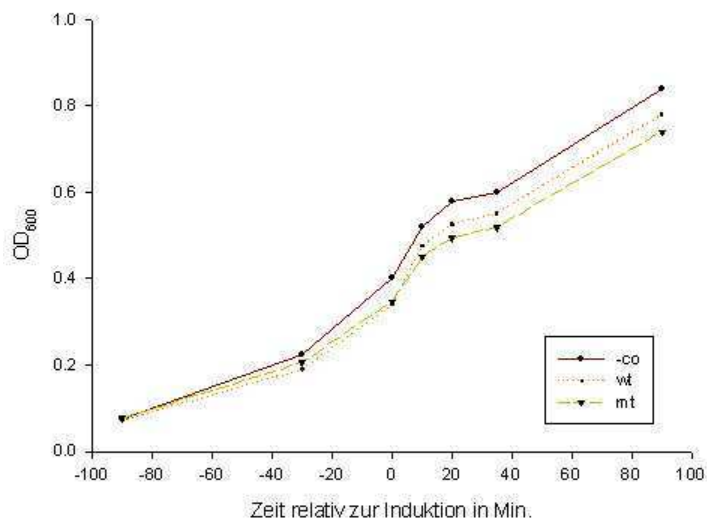


Abbildung 22: Wachstumskurve von *E. coli* Rosetta(DE3) im LB- Medium mit *wnt4*. Die eingesetzten Plasmide sind pET3a (-co), pET3a_wnt4-wt (wt) und pET3a_wnt4-mt (mt). Die Induktion erfolgte zum Zeitpunkt null. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate beträgt 0.8 h^{-1} .

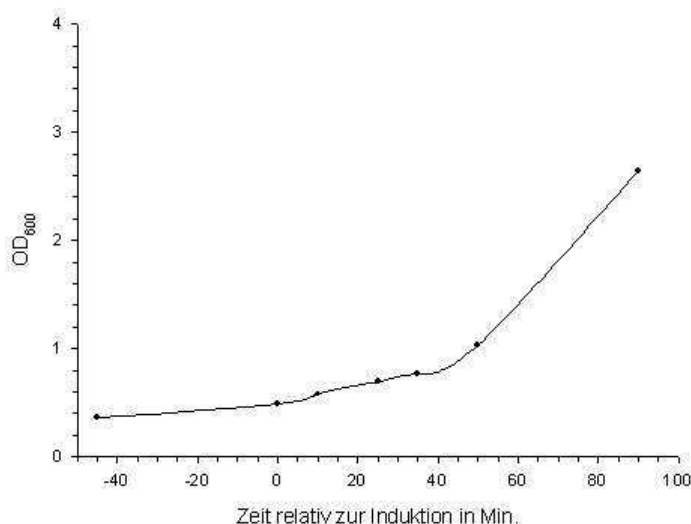


Abbildung 23: Wachstumskurve von *E. coli* Rosetta (DE3) in Superbroth, mit pET3a_wnt4-wt. Die spezifische Wachstumsrate beträgt 0.87 h^{-1} .

6.2.2 Expression von *wnt6*

Die Expression der Plasmide pET3a_wnt6-wt und pET3a_wnt6-So erfolgte in BL21 und Rosetta-Stämmen, allerdings nur im Superbroth-Medium. Bei den Expressionen wurde analog zu *wnt4* verfahren. In Abbildungen 24 und 25 sind zwei Experimente mit BL21 und Rosetta gezeigt. Rosetta wächst langsamer, unter Umständen weil die verwendete Kultur älter als die

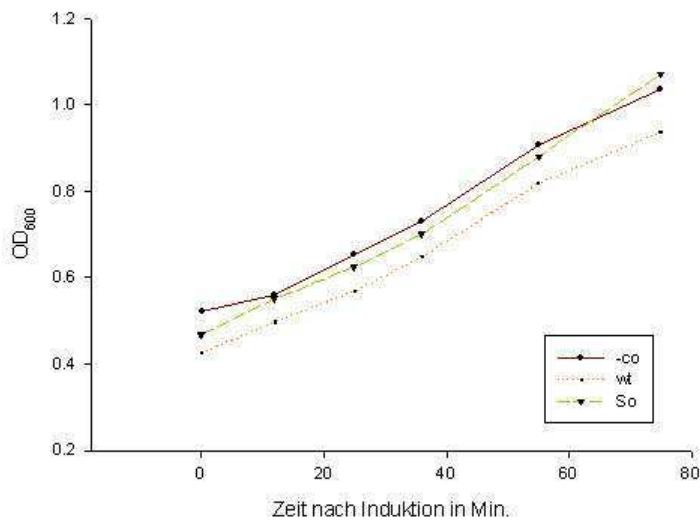


Abbildung 24: Expressionsexperiment von *wnt6* mit *E. coli* BL21 (DE3) in Superbroth. Die eingesetzten Plasmide sind pET3a (-co), pET3a_wnt4-wt (wt) und pET3a_wnt4-mt (mt). Die Induktion erfolgte zum Zeitpunkt null. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate beträgt 0.6 h^{-1} .

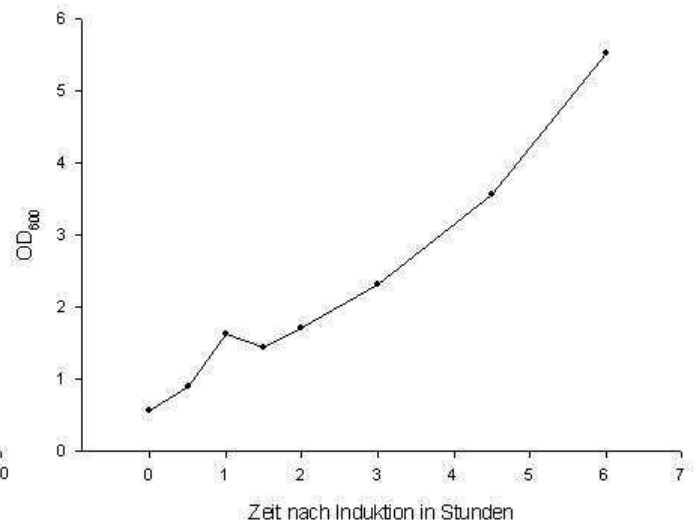


Abbildung 25: Wachstumskurve von *E. coli* Rosetta (DE3) in Superbroth mit *wnt6*. Das eingesetzte Plasmid ist pET3a_wnt6-wt (wt). Die spezifische Wachstumsrate beträgt 0.3 h^{-1} .

verwendete BL21 Kultur war. Der Abfall der optischen Dichte, wie er ähnlich auch bei *wnt4*-Expressionen auftritt, ereignet sich bei Rosetta nach 90 min, wohingegen in Abbildung 24 bei BL21 kein Abfall erkenntlich ist, obwohl viele Proben in kurzer Zeit entnommen wurden. Unter Umständen ist die Kultivierungszeit, die nur 75 min beträgt, zu gering um den Effekt zu beobachten. Die Wachstumsexperimente zeigen, dass die Expression des rekombinanten Proteins nicht toxisch für die Zellen sind, da das Wachstum kaum beeinträchtigt ist.

6.3 Expression rekombinanten Proteins in *E. coli*

6.3.1 Expression von Wnt4 Protein in BL21

Die Expression des Wnt4-Wildtyps und der -Mutante erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden pLysS und pET3a. In Abbildung 26 ist eine gelelektrophoretische Auftrennung vom Zellrohextrakt zu sehen, dessen applizierte Menge der optischen Dichte angepasst wurde. Die Signalintensitäten gleicher Proteine stimmt in den Bahnen gut überein, was zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden. Das Molekulargewicht des rekombinanten Wnt4-Proteins beträgt ungefähr 38 kD und die vermutliche Position ist in Abbildung 26 mit C markiert.

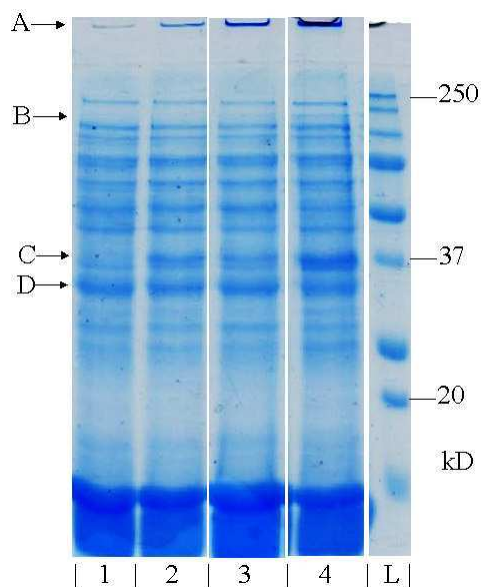


Tabelle X: Zeitpunkte der Probenentnahme nach Induktion und die Konzentrierung der aufgetragenen Proben im Gel im Vergleich zur Konzentration im Kulturmedium. Die Nummerierung entspricht derjenigen in Abbildung 26.

#	Zeit nach Induktion in min	Konzentrierungsfaktor (OD)
1	0	6.73 (0.432)
2	60	2.47 (1.18)
3	150	1.78 (1.64)
4	240	1.07 (2.73)
L	Protein Standard <i>Precision plus</i>	

Abbildung 26: Coomassie- Färbung einer gelelektrophoretischen Proteinauftrennung aus dem Zellextrakt eines Wnt4-Expressionsversuches in BL21 nach Verdünnung Tabelle X folgend. Markierung A bezeichnet die Auftragekammern, B zeigt die Position von LacZ, C deutet die Position von Wnt4 an, Markierung auf D entspricht OmpF.

Vor Induktion ist das Wnt4-Signal sehr gering, während es nach 240 min Induktion klar sichtbar ist. Zusätzlich wurde eine massenspektroskopische Untersuchung eines Gelfragments im Bereich um 37 kD durchgeführt und Wnt4 nachgewiesen. In den Auftragekammern (A) sammelt sich im Verlauf der Induktion eine Molekülspezies an, die nicht in das Gel eindringt. Ursachen dafür, dass ein Protein nicht in das Gel eindringt, kann sein, dass hochmolekulare Strukturen vorliegen, die nicht durch das Polyacrylamidgel wandern können, oder dass

hydrophobe unlösliche Proteine vorliegen. Bei höhermolekularen Strukturen sollte der Auftragepuffer, der β -Mercaptoethanol und SDS enthält, Aggregate auflösen. Das zu Wnt4 verwandte Wnt1 ist sehr hydrophob, wie Fahnert et al. nachweisen konnten (Fahnert et al. 2004b), daher könnte ein Teil des hydrophoben Wnt4 in den Auftrageaschen zurückgeblieben sein.

Sehr prominent ist auch die Proteinbande, die mit D bezeichnet ist. Auch in Immuno-dektionen mit dem c-Myc-Antikörper entsteht ein Signal und selbst der Wnt4-Antikörper bringt ein schwaches Signal für diese Bande. Eine massenspektroskopische Analyse eines Gelfragments dieser Größe identifizierte das Protein als OmpF. OmpF ist ein Protein, das in der äußeren Membran lokalisiert ist und für die Nährstoffaufnahme verantwortlich ist.

Im Gel taucht nach Induktion außerdem eine Bande bei der mit B bezeichneten Höhe von ungefähr 119 kD auf. Auch mit dieser Bande wurde zur Aufklärung eine massenspektroskopische Untersuchung durchgeführt, wobei das Protein als β -Galaktosidase erkannt wurde. Das Auftreten dieses Proteins ist verständlich, denn die Expression wurde mit IPTG gestartet, das ein Induktor des LAC-Promoters ist, der auch die Expression der β -Galaktosidase regelt. Auch Studier und Moffat bemerkten die Expression der β -Galaktosidase in ihren ersten Experimenten (Studier & Moffat 1986).

Abbildung 27 zeigt einen Immunoblot, in dem für eine Probe bei 85 min nach Induktion eine Verdünnungsreihe aufgestellt wurde, um Unterschiede im Expressionslevel vom Wildtyp und optimierten *wnt4* klarer hervorzuheben. In der Verdünnungsreihe ist kein Unterschied zwischen dem Wnt4-Wildtyp und dem optimierten Wnt4, der Mutante, sichtbar.

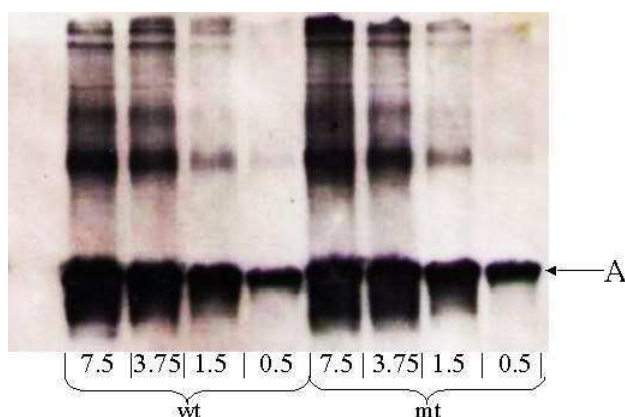


Abbildung 27: Immunodetektion vom c-Myc-tag einer Verdünnungsreihe für Wnt4-Wildtyp (wt) und Mutante (mt) für eine Expression in BL21, wobei die Proben 85 min nach Induktion entnommen wurden. Der wt besaß eine optische Dichte von 1.41, die mt von 1.36. Die angegebene Zahl gibt den Konzentrierungsfaktor zum Expressionsmedium an. A bezeichnet das Wnt4-Signal. Der untere Teil des Blottes wurde ausgelassen da in diesem Bereich keine Signale liegen. Belichtungszeit 60 s.

6.3.2 Expression von Wnt4 in Rosetta

Die Expression in Rosetta wurde gewählt, um mögliche Einflüsse von seltenen Codons auf die Expressionseffizienz zu überprüfen. Seltene Codons haben einen großen Einfluss auf die Bedeckung der mRNA mit Ribosomen, da sie sehr langsam translatiert werden. Bildet sich durch seltene Codons ein Stau von Ribosomen am 5' Ende der mRNA, so verhindert die Bedeckung die Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen. Das ist gleichbedeutend damit, dass in diesem Fall der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht mit der Sekundärstruktur der RBS zusammenhängt, sondern vom Fortschreiten der Ribosomen im hypothetischen „Stau“ abhängt. In *E. coli* Rosetta werden zehn seltene tRNAs, die für die Dekodierung der zehn seltensten Codons verantwortlich sind, co-exprimiert. Damit sollte die Translationsgeschwindigkeit der seltenen Codons erhöht werden, wodurch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Translationsinitiation wieder auf die Sekundärstrukturbildung der RBS zurückfallen kann.

Daneben hat sich gezeigt, dass unabhängig von der Initiation der Translation der Produktgehalt erhöht werden kann, wenn die tRNAs seltener Codons co-exprimiert werden, wie zum Beispiel für die Erdnuss-Allergene Ara h1, Ara h2 und Ara h6 (Kleber-Janke & Becker 2000).

Abbildung 28 zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Expression von Wnt4 in Rosetta.

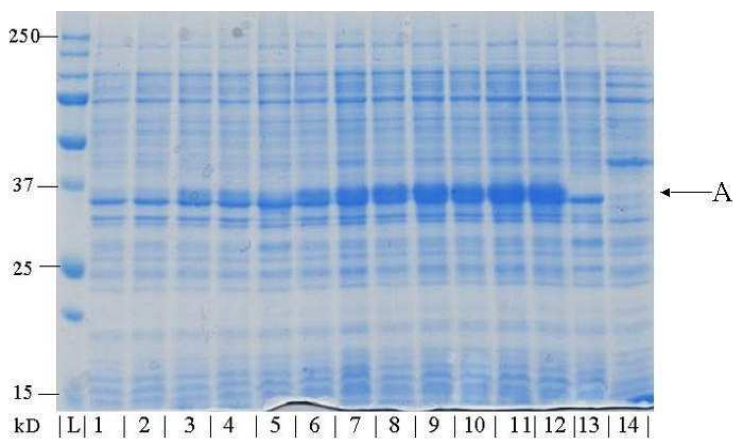


Abbildung 28: Coomassie-Färbung einer gelelektrophoretischen Auftrennung von Wnt4 aus Rosetta. Nummern 1-13 sind Pellets hergestellt nach dem Zentrifugationsschritt in 5.4.1, 13 ist eine Negativkontrolle bestehend aus Rosetta mit pET3a-Plasmid. Nummernzuordnung siehe Tabelle XII. „A“ bezeichnet die Position von Wnt4. Die Proteinleiter ist *Precision plus*.

Tabelle XII: Aufgetragene Proben aus Abbildung 28. Der Konzentrierungsfaktor gibt den relativen Unterschied zum Kulturmedium an. (p) steht für eine pelletierte Zellfraktion hergestellt nach 5.4.1, (s) steht für den Überstand aus dem ersten Zentrifugationsschritt, 10 µl der Konzentrierung wurden für das Gel eingesetzt.

#	wnt4 Variante	Zeit in min	Konz.-Faktor (OD)
1	wt-(p)	0	13.8 (0.543)
2	mt-(p)	0	15 (0.502)
3	wt-(p)	10	12.9 (0.582)
4	mt-(p)	10	13.3 (0.566)
5	wt-(p)	20	13.1 (0.58)
6	mt-(p)	20	12.8 (0.59)
7	wt-(p)	30	12.5 (0.601)
8	mt-(p)	30	12.2 (0.617)
9	wt-(p)	45	11.6 (0.651)
10	mt-(p)	45	10.4 (0.723)
11	wt-(p)	70	10.6 (0.708)
12	mt-(p)	70	10.1 (0.75)
13	-co-(p)	70	5.9 (1.288)
14	wt-(s)	70	10.1 (0.708)
L	Protein Standard <i>Precision blue</i>		

Dabei wurde eine grobe Fraktionierung der Proteine in eine lösliche und unlösliche Fraktion nach 5.4.1 durchgeführt. Dass diese Fraktionierung nur oberflächlich ist, erkennt man aus Bahn 14 in Abbildung 28. Darin wurde der Überstand, also die lösliche Fraktion, aufgetragen, während in Bahn 11 das Pellet derselben Proteinprobe aufgetragen wurde. Beide Bahnen besitzen die gleiche Erscheinung, nur in Bahn 14 ist das Signal für Wnt4 und OmpF, direkt unter Wnt4, stark reduziert. Das deutet darauf hin, dass Wnt4 Aggregate bildet, die durch die Zentrifugation vom Proteinrest abgetrennt werden können. Schon nach 10 min ist ein klares Signal für Wnt4 zu erkennen und 30 min nach Induktion ist die Wnt4-Bande die deutlichste im Gel.

Abbildung 29 zeigt, dass auch in Rosetta die optimierte Variante von *wnt4* nicht verstärkt exprimiert wird, da die Signale mit dem mutierten *wnt4*, Bahnen 2, 4 und 6, nicht stärker sind als die Wildtyp-Signale, Bahnen 1, 3 und 5. Auf Bahnen 7+8 sind die Proben einer halbstündigen Induktion von Wnt4 in BL21 zu sehen. Es wurde die gleiche Verdünnung wie für Bahnen 3 bis 6 gewählt, obwohl die optische Dichte etwas höher ist. Die Bahnen 7 und 8, die für vergleichbare Zeiten exprimiert wurden, zeigt, dass das Expressionslevel in *E. coli* Rosetta nicht höher ist als in BL21. Daher können Einschränkungen der Translationseffizienz, hervorgerufen durch die co-exprimierten seltene Codons, als limitierend für die Expression ausgeschlossen werden.

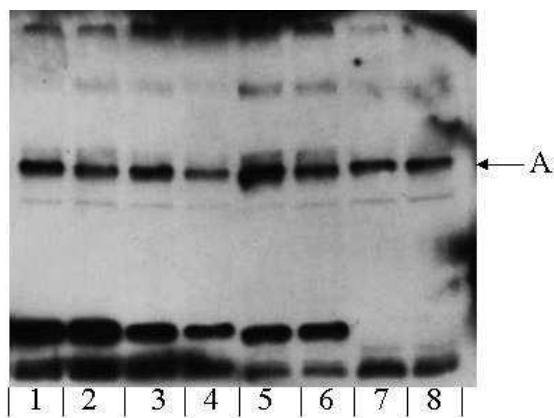


Tabelle XIII: Beschreibung der aufgeladenen Proben für Abbildung 29. Das im Gel eingesetzte Volumen beträgt 10 µl.			
#	wnt4 Variante	Induktionszeit in min	Verd.-Faktor (OD)
1	wt(Ros)	20	0.59 (0.526)
2	mt(Ros)	20	0.59 (0.494)
3	wt(Ros)	35	0.29 (0.551)
4	mt(Ros)	35	0.29 (0.519)
5	wt(Ros)	90	0.29 (0.78)
6	mt(Ros)	90	0.29 (0.74)
7	wt(BL21)	30	0.29 (0.945)
8	mt(BL21)	30	0.29 (0.934)

Abbildung 29: Immunoblot des c-Myc- tags in einem Expressionsexperiment in Rosetta (Bahnen 1 bis 6) und BL21 (Bahnen 7+8). Die Höhe des Wnt4- Signals ist mit A gekennzeichnet. Belichtungszeit 60 s.

6.3.3 Expression von Wnt4 bei 42 °C

Die Expression des rekombinanten Proteins wurde bei erhöhter Temperatur von 42 °C durchgeführt, um zu testen ob unter diesen Bedingungen mehr Wnt4 in den Zellen vorliegt. Auslöser für diesen Versuch ist die sehr kurze Halbwertszeit von Wnt4 in Zytoplasma von *E. coli* (vgl. 6.3.7). Eine Möglichkeit ein Protein vor Proteasen zu schützen ist, die Ablagerung der Proteine in Aggregate zu unterstützen. In Aggregaten sind die Proteine, wie in der Einleitung beschrieben, vor der Aktivität von Proteasen geschützt. Der Effekt der erhöhten thermischen Energie besteht darin, dass zum Einem Reaktionen schneller ablaufen. So wird unter anderem die Transkription und die Translation beschleunigt, gleichfalls aber auch die Reaktionen der Proteasen. Zum anderem löst die höhere Energie Falschfaltung, vor allem beim rekombinanten Protein aus. Eine höhere Proteinsynthese und ein größerer Anteil an falsch gefaltetem Proteinen sind Komponenten, die eine Aggregationsbildung unterstützen (King et al. 1996).

Abbildung 30 zeigt, dass das Level an Wnt4 bei einer Induktion bei 42 °C nicht erhöht vorliegt, sondern sogar vermindert. Eine Quantifizierung ist nicht möglich, da ein interner Standard zur Normierung fehlt. Auffällig ist in Bahn 1, dass schon vor Induktion ein Grundlevel an Wnt4-Protein in der Zelle vorliegt.

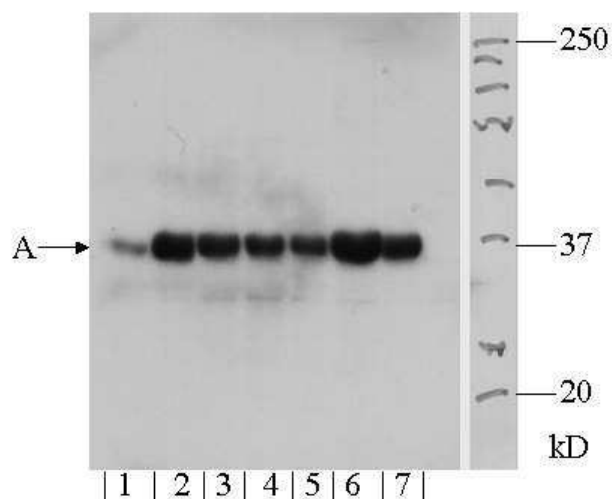


Tabelle XIV: Proteinproben für ein Vergleichsexperiment bei 37 und 42 °C. Die Konzentrierung wurde der OD angepasst. Aufgetragen sind 13 µl Probe.

#	Temp. in °C	Induktions- zeit in min	Konz.-Faktor (OD)
1	37	0	6.7 (0.432)
2	37	60	2.5 (1.18)
3	42	60	2.8 (1.04)
4	37	150	1.8 (1.64)
5	42	150	1.5 (1.96)
6	37	240	1.1 (2.73)
7	42	240	1 (2.99)

Abbildung 30: Expression des Wnt4-Wildtyps in BL21(DE3) pLysS bei 37 und 42 °C. Der Proteinnachweis erfolgt über den c-Myc-tag. Beschriftungslegende siehe Tabelle XIV. „A“ Kennzeichnet die Wnt4-Banden. Der Protein Standard ist *Precision plus*. Belichtungszeit 10 s.

6.3.4 Analyse der Proteinexpression für *wnt4*-SRBS

Das Plasmid mit der *wnt4*-SRBS-Variante mit der mutierten sekundären RBS wurde in *E. coli* Rosetta transformiert und in Superbroth kultiviert. Abbildung 31 gibt eine Immunodetektion gegen den rekombinanten c-Myc-tag zu angegebenen Zeitpunkten nach Induktion wieder (Tabelle XV). Darin bezeichnet A die Höhe, in der das Wnt4-Protein läuft, B und C bezeichnen unspezifische Bindungserscheinungen. Man erkennt wie sich das rekombinante Protein auf Höhe A im Verlauf des Expressionsexperiments anreichert.

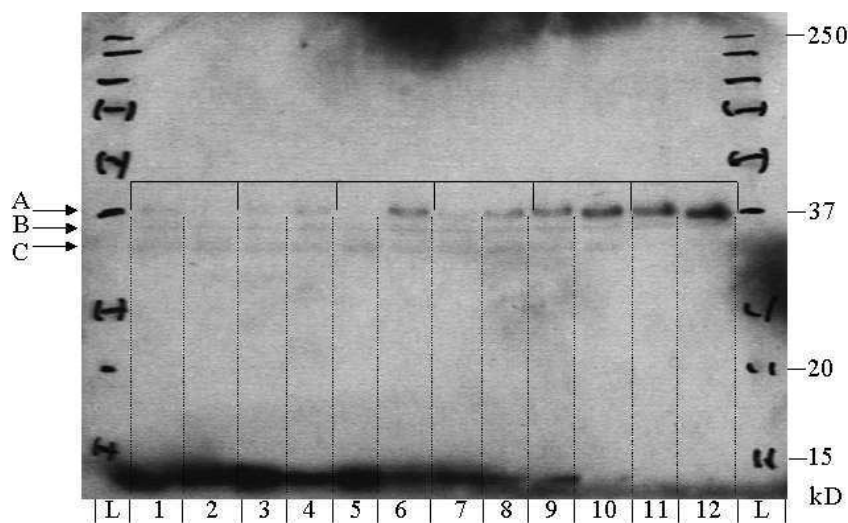


Abbildung 31: Immunoblot- Detektion des c-Myc- tags in Proteinproben der Expression von *wnt4*-Wildtyp (WT) und SRBS die zu unterschiedlichen Expressionszeiten entnommen wurden. A kennzeichnet das Wnt4, B und C sind unspezifische Bindungen. Eingesetzt wurde das Gesamtzellextrakt. Der Proteinstandard (L) ist *Precision plus*. Belichtungszeit ist 75 s.

Tabelle XV: Proben die für Abbildung 31 eingesetzt wurden. Der Konzentrierungsfaktor bezieht sich auf die Konzentration im Kulturmedium. Das verwendete Volumen für die Verdünnungen beträgt 8 µl.

#	<i>wnt4</i> Variante	Probenzeit in min	Konz.-/Verd. -Faktor (OD)	#	<i>wnt4</i> Variante	Probenzeit in min	Konz.-/Verd. -Faktor (OD)
1	wt	0	1.5 (0.488)	7	wt	35	0.96 (0.76)
2	SRBS	0	1.33 (0.553)	8	SRBS	35	0.85 (0.865)
3	wt	10	1.27 (0.578)	9	wt	50	0.71 (1.034)
4	SRBS	10	1.15 (0.638)	10	SRBS	50	0.66(1.104)
5	wt	25	1.06 (0.689)	11	wt	90	0.28 (2.64)
6	SRBS	25	0.97 (0.758)	12	SRBS	90	0.23 (3.71)

Zugleich bleibt die Intensität des unspezifischen Signals auf Höhe B, C annähernd konstant, was zeigt, dass gleiche Mengen Biomasse aufgetragen wurde. Ab 35 min nach Induktion, Bahnen 7&8, reichert sich Wnt4 in der Zelle an, wobei mehr Protein im Stamm mit der

inaktivierten sekundären RBS vorhanden ist. Bis zum Ende der Expression ist der Proteingehalt in *wnt4*-SRBS höher als im Wildtyp. Daher scheint die sekundäre RBS tatsächlich einen Produktvermindernden Einfluss auf die Expression zu haben. In den letzten beiden Proteinproben sind die unspezifischen Signale, vor allem auf Höhe C, reduziert. Die Ursache kann darin liegen, dass bei Induktion die Proteinsynthese hauptsächlich für die Produktion von rekombinantem Protein erfolgt, so dass Verdünnungseffekte für homologe Proteine durch Zellwachstum nicht mehr proportional ausgeglichen werden können. Zusätzlich wird durch die heterologe Expression eine Stressantwort ausgelöst, bei der die Aktivität der Proteasen erhöht wird und sich somit der Abbau aller Proteine beschleunigt.

6.3.5 Expression von Wnt6 in BL21

Verglichen mit Wnt4 ist die zelluläre Konzentration an Wnt6 deutlich geringer, wie Abbildung 32 zeigt. Darin wurde für Wnt4 auf Bahn 1 4 µl einer 1:5 verdünnten Zellprobe eingesetzt, während für Wnt6 16 µl einer 15:1 Konzentrierung der Zellprobe angewendet wurde. Die Abbildung zeigt ebenfalls, dass nach 75 min kein Unterschied in der Expressionseffizienz der *wnt6*-Varianten besteht.

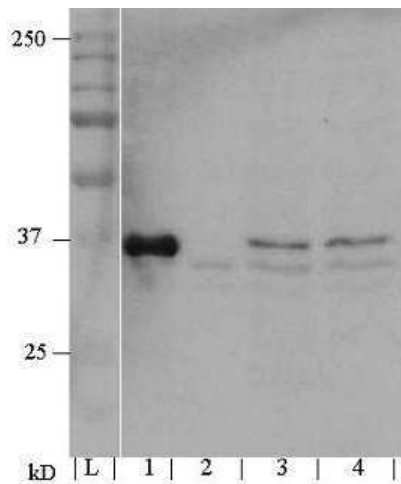


Tabelle XVI: zeigt die Identität der in Abbildung 32 aufgetragenen Proben, ihre Konzentrierung bzw. Verdünnungen und die OD der Kultur

#	Protein/ Stamm	Induktions- zeit, min	Konz.-/Verd. -Faktor (OD)
1	Wnt4/Ros	70	0.2 (0.708)
2	Rosetta, -co (pET3a)	70	
3	Wnt6(wt)/BL21	75	15 (1.036)
4	Wnt6(So)/BL21	75	15 (0.937)

Abbildung 32: Immunoblot von c-Myc-tag mit Zellextrakt von Rosetta mit Wnt4 (1), Rosetta- Negativkontrolle (2), Wnt6- Wildtyp (3) und Wnt6 So (4) in BL21. Das eingesetzte Volumen für Wnt4 beträgt 4 µl, Volumen von Wnt6 ist 16 µl. Verdünnungen sind in Tabelle XVI aufgeführt. Belichtungszeit 30s. Der Proteinstandard (L) ist *Precision plus*.

Auch in Abbildung 33 wird deutlich, dass das Level von Wnt6 sehr gering ist. Wnt6 wurde in BL21(DE3) ohne pLysS exprimiert und nach Induktion für 2 ½ Stunden exprimiert. Dann erst wurden während 3 ½ Stunden Proben genommen. Für den Immunoblot in Abbildung 33 erfolgte eine Belichtung für 5 min, wobei intensive unspezifische Bindungen der Antikörper Fremdsignale hervorrufen. Die spezifische Bindung des c-Myc-Antikörpers reicht nicht aus, um das Wnt6-Protein auf der Höhe B klar hervortreten zu lassen. Wnt6 ist in Coomassie gefärbten SDS-PAGEs nicht zu sehen (nicht gezeigt). Außer der Größe deutet das Fehlen des Signals vor Induktion auf Bahn 1 darauf hin, dass die Bande zu Wnt6 zuzuordnen ist. Die Markierung A zeigt die durch Induktion ausgelöste Synthese von LacZ.

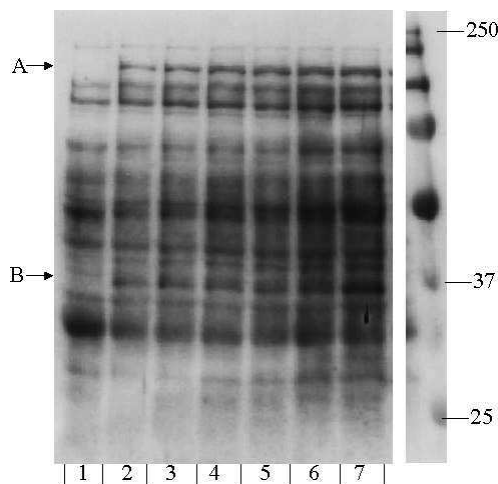


Abbildung 33: Immunodetektion des c-Myc-tags in BL21(DE3). Die eingesetzten Proben können aus Tabelle XVII entnommen werden. A bezeichnet die LacZ-Bande, B zeigt die Position von Wnt-Protein. Die Belichtungszeit beträgt 5 min.

Tabelle XVII: Eingesetzte Proben aus Abbild 33. Das eingesetzte Volumen beträgt 12 µl.		
#	Zeit nach Induktion in min	Konz.-/Verd.-Faktor (OD)
1	0	6.52 (0.596)
2	150	1.24 (3.14)
3	180	1.14 (3.4)
4	210	1.14 (3.4)
5	240	1 (3.89)
6	300	0.93 (4.18)
7	360	0.78 (5.03)

6.3.6 Expression von Wnt6 in Rosetta und Expression bei 42 °C

Abbildung 34 zeigt eine Immunodetektion des c-Myc-tags aus einem Versuch der Wnt6-Expression bei 37 und 42 °C. Bahn 2 beinhaltet auf Höhe A eine Wnt4-Positivkontrolle, Wnt6 läuft auf gleicher Höhe. Jedoch ist in der Abbildung kein Wnt6-Signal zweifelsfrei auszumachen. Dass der Stamm dennoch *wnt6*-mRNA expremierte, konnte über den SH-Assay und gelelektrophoretische Auftrennung der RNA bewiesen werden. 14 % der Gesamt-RNA besteht aus der rekombinanten mRNA.

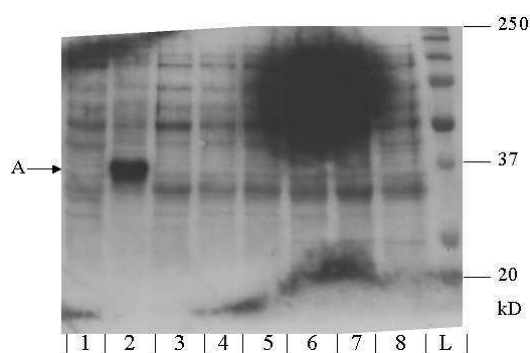


Abbildung 34: Immunoblot gegen den c-Myc-tag von einer Expression von Wnt6 in Rosetta- Zellen. Aufgetragen sind Verdünnungen der Gesamtprotein- Probe. A gibt die zu erwartende Höhe des rekombinanten Proteins an. Belichtungszeit 3 ½ min.

Tabelle XVIII: Charakterisierung der Proben aus Abbildung 34. Das eingesetzte Volumen beträgt 15 µl.			
#	Prot.-Temp. °C	Probenzeit in min	Konz.-/Verd.-Faktor (OD)
1	Wnt6-37	0	8.1 (0.557)
2	Wnt4-37	240	0.33 (6.14)
3	Wnt6-37	60	2.8 (1.62)
4	Wnt6-42	60	3.75 (1.53)
5	Wnt6-37	150	1.5 (1.81)
6	Wnt6-42	150	3.75 (1.5)
7	Wnt6-37	270	1.1 (4.08)
8	Wnt6-42	270	1.6 (2.78)

6.3.7 Bestimmung der Protein-Halbwertzeit von Wnt4

Abbildung 35 zeigt einen Immunoblot in dem die Halbwertzeit von Wnt4 in BL21(DE3) bestimmt wurde. In der Nullprobe vor Induktion auf Bahn 1 ist kaum ein Signal für Wnt4 auf Höhe A erkennbar, wogegen sich eine Stunde nach Induktion (Bahn 2) eine große Menge an Wnt4 angesammelt hat und bis 5 Stunden nach Induktion (Bahn 7) weiter akkumuliert. Das unspezifische Signal auf Höhe B nimmt mit der Zeit ab, wahrscheinlich ausgelöst durch Verdünnungseffekte des Zellwachstums. Interessant ist das Auftreten einer kleinen Molekülspezies auf Höhe von C, besonders nach 120 min, die mit einer hohen Konzentration von rekombinanten Wnt4 in Verbindung zu stehen scheint. Die Bahnen 8-13 repräsentieren das Verhalten der Proteine auf das Aussetzen der Proteinsynthese. Die Abnahme der Wnt4-

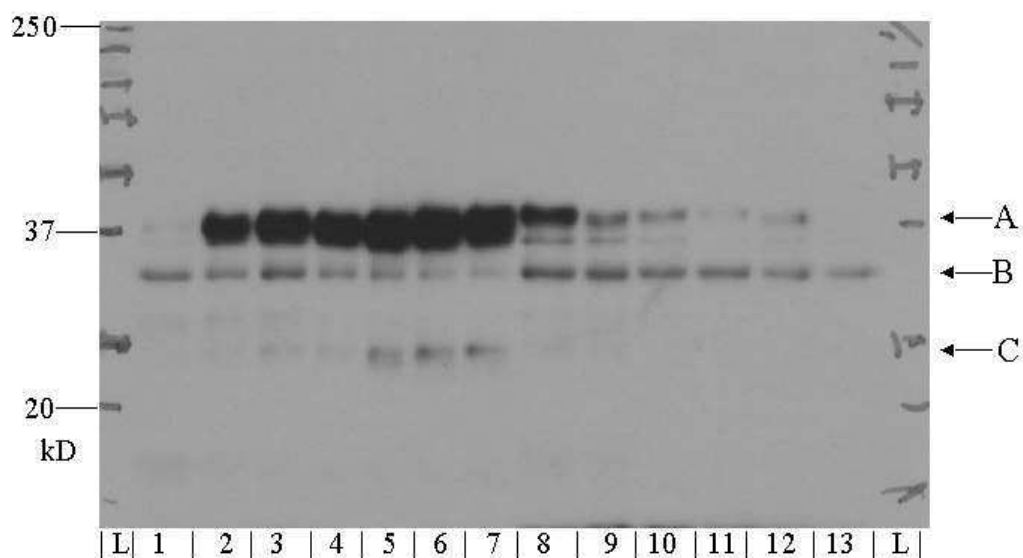


Abbildung 35: Immunodetektion gegen Wnt4-Protein aus BL21-Zellen. Bahnen 2-7 zeigen die normale Akkumulation von Wnt4-Protein in den Zellen. Bahnen 8 bis 13 zeigen den Abbau von Wnt4 nach Zugabe von Chloramphenicol (Cam). A kennzeichnet Wnt4, B repräsentiert eine unspezifische Bindung, C zeigt ein wahrscheinlich zu Wnt4 gehöriges Fragment. Belichtungszeit 4 min.

Tabelle XIX: Zuordnung der Nummerierung in Abbildung 35 für die Halbwertzeitbestimmung von Wnt4 in BL21. Der Konzentrationsfaktor zeigt die relative Konzentration zur und wurde der OD angepasst. Das eingesetzte Probenvolumen für das Gel betrug 10 µl.							
#	Cam Zugabe	Probenzeit in min nach Cam Zugabe	Konz.-Faktor (OD)	#	Cam Zugabe	Probenzeit in min	Konz.-Faktor (OD)
1		vor Induktion	5 (0.438)				
2	-	0 (60 min nach Ind.)	1.5 (1.438)	8	-	0 (60 min nach Ind.)	1.5 (1.368)
3	-	30	0.75 (2.81)	9	+	30	0.91 (2.35)
4	-	60	0.56 (3.74)	10	+	60	0.91 (2.31)
5	-	120	0.45 (4.47)	11	+	120	0.91 (2.32)
6	-	180	0.38 (5.38)	12	+	180	1 (2.09)
7	-	240	0.33 (6.14)	13	+	240	1.07 (1.85)

Menge ist deutlich sichtbar und eine densitometrische Analyse der Signalstärke ist in Abbildung 36 dargestellt. Tabelle XIX zeigt die verwendeten Proben und die optischen Dichten der Kulturen. Nach Chloramphenicol (Cam) Zugabe stoppt das Wachstum, so dass keine Proteinverdünnung stattfindet.

Für die Analyse der Halbwertszeit wurde die Abbaurrate für zwei Fälle berechnet. In Abbildung

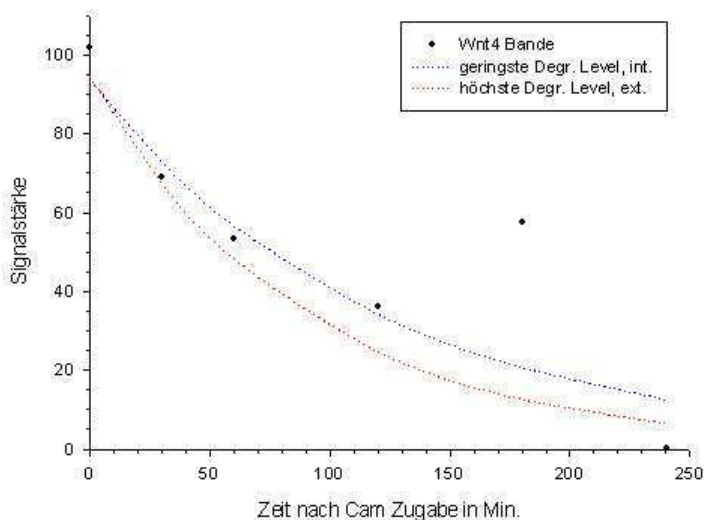


Abbildung 36: Densitometrische Analyse der Bandensignalstärke von Wnt4 aus Abbildung 35. Das Wnt4 Signal auf Höhe A wurde dabei Normiert durch die Signalstärke des jeweiligen unspezifischen Signals, das mit B markiert ist. Die unterbrochene Linie zeigt die theoretische Degradation.

35 ist ersichtlich, dass die Stärke des Signals B auf den Bahnen 8-13 ebenfalls abnimmt. Die Ursache ist entweder äußerlich, d.h. künstlich eingeführt, durch Zelltod, Pipettierfehler oder falsche Berechnungen oder der Effekt ist proteinbezogen, d.h. zellintern, durch eine Degradation des Proteins entstanden. Die Auswertung kann daher auf zwei Wegen erfolgen.

A.) Wird die erste Ursache ausgeschlossen und angenommen, dass der Mengenabfall des Signals in B zellinternen Ursprungs ist und

die aufgetragenen Proteinmengen gleich bleiben, so rechnet man mit den densitometrischen Ergebnissen der Bandenanalyse von Wnt4 um zur Halbwertszeit zu gelangen ($t_{1/2}(A)$).

Ist diese Annahme falsch und der Fehler tatsächlich durch externe Ungenauigkeiten ausgelöst, so gibt der errechnete Wert die Mindesthalbwertszeit an, da die Wnt4-Protein Menge im Blot durch äußere Umstände verringert wurde.

B.) Wird angenommen, dass äußere Umstände für die Abnahme der Signalstärke auf Höhe B in Abbildung 35 verantwortlich sind, so muss man das Wnt4-Signal intern normieren, um die äußeren Einflüsse zu minimieren und das Wnt4-Signal wieder auf die Zellmasse zu beziehen. Das kann erreicht werden indem angenommen wird, dass die zelluläre Konzentration für das Protein bei B über die Zeit konstant bleibt und Signalunterschiede nur durch äußere Einflüsse ausgelöst werden.

Ist die Annahme falsch, dass die zelluläre Menge an dem Molekül bei B konstant bleibt, das heißt, dass das Molekül B einem signifikanten Abbau im Untersuchungszeitraum ausgesetzt

ist, so wird das Wnt4 Signal aufgrund einer falschen Annahme erhöht, wodurch eine zu lange Halbwertszeit errechnet wird.

Aus diesen Betrachtungen ergibt sich, dass die wahre Halbwertszeit von den Lösungsstrategien A) und B) umrahmt wird.

Nach A) erhält man eine Wnt4-Halbwertszeit von ungefähr 62 min während für B) eine Halbwertszeit von 82 min berechnet wurde (Anhang 6: „Berechnungen der Proteinhalbwertszeit“).

7 Diskussion

Das Ziel der Diplomarbeit war die Optimierung der Produktmenge der Wnt4- und Wnt6-Proteine und die Charakterisierung ihrer Expression, um daraus weitere Verbesserungsvorschläge für die rekombinante Synthese zu entwickeln.

Die Beschreibung der Expression für die mRNA beruht auf der Messung des rekombinanten Transkriptlevels und auf dem Vergleich der Expression in BL21 mit der Expression des tRNA co-exprimierenden Rosetta-Stamms. Der globale Einfluss der Expression auf die Zellen wurde durch Analyse des Zellwachstums bewertet. Die Eigenschaften des Proteins wurden durch Expression bei unterschiedlichen Temperaturen und Quantifizierung der Halbwertszeit charakterisiert. Die Optimierungen, die ebenfalls zur Charakterisierung beitragen, zielten auf die Erhöhung der Assoziationsrate von Ribosomen an die RBS und auf die Reduktion der Komplementarität einer sekundären RBS zur ASD-Sequenz in *wnt4*.

Im folgendem sollen die einzelnen Schritte der Expression, beginnend bei der Transkription über die Translation, zellglobalen Einflüssen der Expression und Proteinbezogene Eigenschaften von Wnt4 und Wnt6 diskutiert werden.

7.1 Transkription

Die Expression der *wnt*-Gene erfolgte über das Plasmid pET3a, das eine Variante des Plasmids pBR322 (ori-Gruppe: pMB1) darstellt. Damit sind ungefähr 15 bis 20 Plasmidkopien in der Zelle zu erwarten (Lee et al. 2006), auf denen die Transkription mit der T7-RNAP ablaufen kann. Die T7-RNAP hat eine ähnliche Initiationsrate wie die *E. coli*-RNAP, die um eine Initiation pro Sekunde liegt (Fahnert et al. 2004a). Die Elongationsgeschwindigkeit der T7-RNAP ist aber fast fünfmal schneller als bei der *E. coli*-RNAP und führt so zu einer hohen Akkumulation an rekombinanter mRNA (Baneyx 1999). In den SH-Assays und bei der gelelektrophoretischen RNA-Auftrennung mit dem *Agilent 2100 Bioanalyzer System* konnten auch für die *wnt*-Gene hohe Konzentrationen an mRNA gemessen werden. Widersprüchlich ist das hohe Grundlevel, das in einigen Experimenten gemessen wurde. So wurde für *wnt4* in BL21(DE3) pLysS ein Grundlevel der mRNA vor Induktion von ungefähr 0.03 g/g (*wnt4* / Extr. RNA) gemessen, wodurch das Höchstlevel an mRNA nach Induktion nur auf das ungefähr Fünffache, auf 0.14 g/g (*wnt4* / Extr. RNA), ansteigt (Tabelle V in 6.1.9.). Für die SH-Messung von *wnt4* im Rosetta-Zellrohextrakt ergibt sich ein Steigerung des Signals um das 72-fache, was mit berichteten Werten von einer 50-fachen Steigerung im mRNA-Level nach Induktion vergleichbar ist (Blight et al. 1995).

Das mRNA Grundlevel für *wnt6* in Rosetta ist mit 0.01 bis 0.02 g/g (*wnt6* / Extr. RNA) sehr hoch und auch hier erfolgt eine Akkumulation der mRNA nur auf das 12-fache, auf ungefähr 0.14 g/g (*wnt6* / Extr. RNA). Für die Expression von *wnt6* in BL21(DE3) ergibt sich eine Steigerung des mRNA-Levels um das 140-fache, von 0.0003 g/g (*wnt6* / Extr. RNA) auf 0.0444 g/g (*wnt6* / Extr. RNA) nach 55 min. Grundsätzlich sollte die nichtinduzierte Expression auf einem sehr niedrigen Niveau stattfinden, wie für das Beispiel von *wnt6* in BL21(DE3). Den Hinweis darauf erhält man über Expressionen von toxischen Proteinen, wie der ODCase aus *P. falciparum* in BL21(DE3) pLysS. Die Zellen wachsen ohne Induktion mit einer Verdopplungszeit von 40 min, was zeigt, dass kaum ODCase in der Zelle vorliegt, wobei nach Induktion der Expression das Wachstum inhibiert ist (Cinquin et al. 2001).

Dagegen ist die Rate der Akkumulation der mRNAs in allen Fällen sehr vergleichbar. Sie beträgt 0.0011 (g/g)/min für *wnt4* in BL21 wie auch für *wnt6* in Rosetta und 0.0014 (g/g)/min für *wnt6* in BL21. Die Synthese der mRNA wird in allen Fällen vom T7-Expressionssystem kontrolliert. Dabei arbeitet die T7-RNAP unabhängig von der Sequenz des rekombinanten Gens auf einem sehr hohen Level und produziert hohe Anteile an mRNA, in diesem Fall bis zu 0.14 g/g (*wnt* / Extr. RNA) für *wnt4* und *wnt6*, gemessen über den SH-Assay. Die T7-RNAP kann effektiv mit der *E. coli*-RNAP konkurrieren und schon Studier und Moffat (Studier & Moffat 1986) stellten fest, dass die Synthese der rRNAs nach Induktion der T7-RNAP reduziert ist, denn ein Großteil der Ressourcen zur Transkription wird zur Synthese der rekombinanten mRNA umgeleitet.

Die rekombinanten Transkripte konnten auch mittels einer elektrophoretische Auftrennung sichtbar gemacht werden. Für *wnt4* beträgt die berechnete zelluläre Konzentration an mRNA 0.086 g/g (*wnt4* / Extr. RNA). Da das Signal erst nach Induktion auftaucht und akkumuliert, sollte die zugehörige mRNA mit der rekombinanten Expression in Verbindung stehen. Damit entfällt die *ompF*-mRNA, die zwar eine ähnliche mRNA-Länge von 1089 Nukleotiden besitzt, aber das Protein reagiert nicht auf Induktion. Zwei weitere Proteine werden nach Zugabe von IPTG erhöht transkribiert und könnten daher als Signalgeber in Betracht gezogen werden. Zum einen ist es die T7-RNAP, kontrolliert vom *lacUV5*-Promotor, jedoch besteht diese aus 883 Aminosäuren und damit ist die mRNA zu groß. Selbiges trifft für *lacZ* zu, dessen mRNA eine Größe von 3075 Nukleotiden hat.

Der gemessene Höchstwert für den rekombinanten mRNA Anteil an der Gesamt-RNA beträgt ungefähr 0.14 g/g (rekombinante RNA/Extr. RNA). Für *lacZ*-mRNA, die über den *lacUV5*-Promotor von der *E. coli*-RNAP synthetisiert wurde, beträgt der Anteil der mRNA 0.007 g/g (*lacZ*/Extr. RNA)(Sandén et al. 2003). Die von der T7-RNAP transkribierte mRNA ist damit

20-fach höher konzentriert als die *lacZ*-mRNA. Das zeigt, dass die T7-RNAP effektiv arbeitet und keine limitierenden Faktoren auf der Transkriptionsebene vorliegen.

Als Wu et al. (Wu et al. 2004) das histonartige Protein Ssh10 in *E.coli* BL21(DE3) pLysS exprimierten, stellten sie fest, dass deutlich weniger rekombinantes Protein synthetisiert wurde als in *E. coli* BL21(DE3) ohne pLysS. Dieses Ergebnis zeigt, dass das T7-Lysozym eine effektive Proteinsynthese auch reduzieren kann. In dieser Arbeit wurde neben dem BL21(DE3) pLysS-Stamm auch der *E. coli* Rosetta-Stamm verwendet, der kein T7-Lysozym enthält. Für *wnt4* und *wnt6* konnte kein Unterschied im Expressionslevel der Proteine in Rosetta oder BL21 festgestellt werden, so dass ein Einfluss des T7-Lysozyms auf die Synthese der *wnt*-mRNA nicht anzunehmen ist.

7.2 Translation

Ein zentraler Bestandteil der Arbeit war die Klärung der Frage, ob Sekundärstrukturen am 5'-Ende der *wnt*-mRNAs Einfluss auf die Expressionseffizienz haben. Dass ein solcher Einfluss nicht nur real ist sondern sogar als Regulationselement für zelluläre Reaktionen dient, zeigt sich am Beispiel der *rpoH* mRNA, die den Hitzeschock Sigma Faktor σ^{32} kodiert. Die *rpoH* mRNA besitzt Sekundärstrukturen um die RBS, die nur eine geringe Anlagerung der 30S ribosomalen Untereinheit bei 30 °C erlaubt. Steigt die Temperatur jedoch auf 42 °C an, so verschiebt die thermische Energie die Gleichgewichtsverteilung der Sekundärstrukturen mit dem Resultat, dass sich die Affinität der 30S ribosomalen Untereinheit an der mRNA erhöht und die Translation und damit die Expression des σ^{32} Faktors gesteigert wird. (Schlax & Worhunsky 2003)

Paulus et al. (Paulus et al. 2004) setzten Nukleotidschleifen in unterschiedlicher Größe und mit unterschiedlichem Abstand hinter das Startcodon AUG, bestimmten die Expressionseffizienz und konnten so ermitteln, welcher Energiegehalt und Abstand der Schleife zum Startcodon die effizienteste Expression unterstützt. Als Begründung für die Expressionssteigerung wurde aufgeführt, dass die eingefügte Schleife Interaktionen zwischen 3'-kodierenden Bereichen und der 5'-liegenden RBS unterdrückt und damit die Sekundärstrukturen um die RBS minimiert. Der Einfluss der mRNA-Sekundärstrukturen auf die Translation kann größer sein als der Einfluss von seltenen Codons, wie Griswold et al. (Griswold et al. 2003) mit der Cutinase aus *Fusarium solani* nachweisen konnten. Es wurde die Codonnutzung der mRNA optimiert, indem seltene Codons gegen häufige *E. coli* Codons

austauscht wurden. Interessanterweise wurde dadurch jedoch das Expressionslevel reduziert. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Sekundärstrukturen am 5'-Ende der mRNA die Effizienz der Expression bestimmten (Griswold et al. 2003).

Ein ähnlicher Ansatz wie in den beschriebenen Veröffentlichungen wurde auch für diese Arbeit verwendet. Die *wnt4* mRNA wurde dergestalt optimiert, dass die ungefaltete Sequenz dreimal wahrscheinlicher sein sollte als im Wildtyp. Für *wnt6* steigt die Wahrscheinlichkeit für die ungefaltete Sequenz für die optimierte Variante sogar um das 50-fache. Eine verbesserte Expression konnte in beiden Fällen nicht beobachtet werden. Die Ursache könnte sein, dass die Ausgangshypothesen falsch sind. Für die Berechnungen der Sekundärstrukturen um die RBS wurden 300 Nukleotide eingesetzt, denen *in silico* die Möglichkeit zur Interaktion mit der RBS gegeben wurde. Der ungefaltete geforderte Bereich in der RBS umfasste 19 Nukleotide. Beide Werte sind willkürlich gewählt, wobei die 19 Nukleotide für die RBS genutzt wurde, aufgrund der Zugänglichkeit der SD-Sequenz zur ASD-Sequenz und der Verfügbarkeit des Startcodons AUG für Interaktion mit der Start-tRNA. Die 300 Nukleotide, die eine Möglichkeit zur Sekundärstrukturbildung bekommen haben, wurden auf der Annahme gewählt, dass 1.) die Transkriptionsreaktion so schnell verläuft, dass sich ein freier mRNA-Bereich von 300 Nukleotiden bildet, in dem sich vor Ribosomenbindung ein Gleichgewichtszustand der Sekundärstrukturen einstellt und 2.) dass die Konzentration der Ribosomen in der Zelle limitierend ist und durch die große Menge an rekombinanter mRNA weiter reduziert wird, so dass sich lange Abschnitte der mRNA in einer Gleichgewichtssituation der Sekundärstrukturen befinden.

Die berechnete Energiedifferenz zwischen einer offenen RBS-Struktur und der Gleichgewichtsstruktur beträgt für *wnt4* 3.85 kcal/mol und für *wnt6* 5.98 kcal/mol. Damit ein Effekt in der Translationseffizienz nachgewiesen werden kann, muss der Energiegewinn einer Sekundärstruktur größer als -6 kcal/mol sein (de Smit & van Duin 1990, Paulus et al. 2004). Die Energie der Gleichgewichtsstrukturen für *wnt4* und *wnt6* liegen unterhalb dieses Wertes, so dass auf dieser Basis auch kein Unterschied im Expressionlevel zu erwarten wäre.

Da die Optimierung der Sekundärstrukturen am 5'-Ende der mRNA nicht erfolgreich war und da die Energie der Sekundärstrukturen geringer als 6 kcal/mol ist könnte geschlussfolgert werden, dass Sekundärstrukturen nicht Expressionslimitierend sind. Für weitere Tests können kurze Sequenzbereiche 3'- vom Startcodon gesetzt werden, um Sekundärstrukturbildungen zu unterbrechen. Dieser Ansatz wurde bereits durchgeführt, indem ein His-tag vor die kodierenden Sequenzen der rekombinanten mRNAs gesetzt wurde, Vergleichsexperimente mit dem Wildtyp stehen aber noch aus.

Seltene Codons können oftmals ein Auslöser für eine suboptimale Expression sein. Die Ursache liegt in der Korrelation der Codonnutzung mit den zellulären tRNA-Konzentrationen und den Geschwindigkeiten der Translation. Liegen viele mRNA-Kopien in der Zelle vor, wie es auch in dieser Arbeit der Fall ist, so kann es im äußersten Fall passieren, dass mehr Ribosomen mit der Translation einer seltenen tRNA beschäftigt sind, als Moleküle der tRNA in der Zelle vorliegen. Dadurch würde die zelluläre Konzentration der damit verbundenen seltenen tRNA austitriert werden (Rosenberg et al. 1993). Dass seltene Codons für die Expression von *wnt4* und *wnt6* keine maßgebliche Rolle spielen, wurde durch die Experimente in *E. coli* Rosetta nachgewiesen, da sich das Wnt-Produktlevel kaum vom Level in BL21(DE3)-Expressionen unterscheidet.

An interne oder sekundäre RBS in der mRNA können Ribosomen binden und für den Zeitraum der Bindung können keine regulär translatierenden Ribosomen auf der mRNA die sekundäre RBS passieren, womit die Translationseffizienz gesenkt wird. Der Effekt nimmt mit Nähe zum 5'-Ende zu (Ivanov et al. 1992). Wenn ein AUG-Codon im geeignetem Abstand zur RBS liegt, kann sogar eine zweite, verkürzte Proteinvariante hergestellt werden, wie es bei der *safA*-mRNA nachgewiesen werden konnte, die auf einem Transkript zwei wichtige Proteine für die Sporulation kodiert (Ozin et al. 2001). Hrzenjak et al. fanden eine sekundäre RBS in der mRNA des humanen SAA4, die das Expressionslevel reduzierte (Hrzenjak et al. 2001). Nachdem die Komplementarität der sekundären RBS zur ASD-Sequenz in der SAA4 mRNA durch stille Mutagenese reduziert wurde, konnte eine höhere zelluläre Proteinmenge nachgewiesen werden (Hrzenjak et al. 2001). Auch für die *wnt4*-mRNA wurde eine Sequenz mit hoher Komplementarität zur ASD-Sequenz gefunden. Für einen Stamm mit einer *wnt4*-mRNA, in der die Komplementarität der sekundären RBS zur ASD-Sequenz reduziert wurde, konnte eine erhöhte Proteinmenge als im Wildtyp nachgewiesen werden (Abbildung 31 in 6.3.4). Dabei kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass der Effekt durch ein verändertes Gleichgewicht der Sekundärstrukturen ausgelöst wurde. Zwischen dem Einfluss von Sekundärstrukturen und Ribosomenassoziation an der sekundären RBS auf die Translationseffektivität kann unterschieden werden, indem die Assoziationsraten der Ribosomen an die unterschiedlichen sekundären RBS der *wnt4*-Varianten gemessen werden. Eine Untersuchung zu Sekundärstrukturen kann mit RNase III erfolgen, die nur doppelsträngige RNA schneidet. Unterscheiden sich die Schnittmuster der *wnt4*-Varianten, so kann davon ausgegangen werden, dass die RNA-Sekundärstruktur für den optimierten Fall nachhaltig verändert wurde.

Für die so erhaltene optimierte *wnt4*-Variante konnte bereits erfolgreich eine Fermentation durchgeführt werden (Abbildung 1) und die erhaltenen Wnt4-Aggregate können nun für biophysikalische und biochemische Charakterisierungen eingesetzt werden.

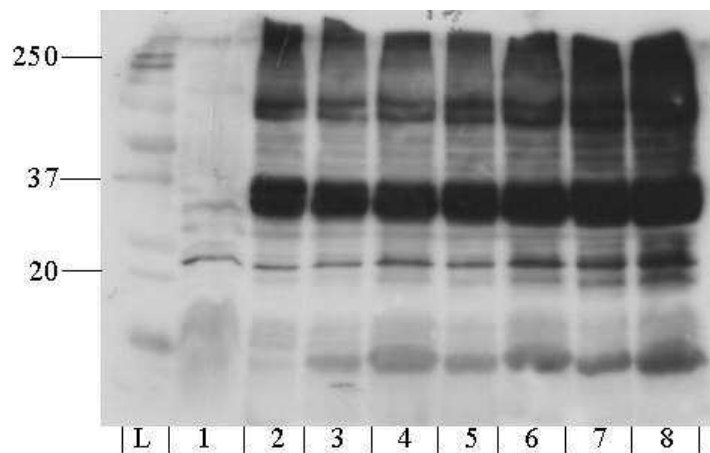


Abbildung 1: Fermentation von *wnt4*_SRBS. Bahn 1 ist eine Negativkontrolle, Bahn 2 ist eine Wnt4-Expression in Rosetta im Schüttelkolben, 3+4 sind Proben eine Stunde nach Induktion im Fermentor, 5+6 sind Proben zwei Stunden nach Induktion im Fermentor, 7+8 sind Proben nach vier Stunden Fermentation. L ist die Proteinleiter Precision blue. (Fermentation und Blot von A. Mursula, J. Sandquist)

7.3 Zellglobaler Einfluss der heterologen Expression

Viele Berichte zeigen, dass die Ribosomenkonzentration in der Zelle geringer ist, als es Bedarf durch die mRNAs an sie gibt (Jensen & Pedersen 1990, Vind et al. 1993, Mehra & Hatzimanikatis 2006). Dadurch bildet sich eine Konkurrenz um die Bindung an Ribosomen. Vind et al. haben gezeigt, dass bei der Überexpression von *lacZ* die Gesamtproteinsynthese konstant bleibt und dass Ribosomen nur zur Expression von *lacZ* umgeleitet werden (Vind et al. 1993). Der hier verwendete pET3a-Vektor besitzt die sehr effektive RBS vom T7-Gen 10, so dass bevorzugt Ribosomen gebunden werden sollten. Um zu testen ob Ribosomenkonkurrenz eine Rolle bei der Expression der *wnt*-mRNA spielt, kann die Anzahl der endogenen mRNAs durch den Einsatz geringer Mengen an Rifampicin, einem Inhibitor der *E. coli*-RNAP, reduziert werden (Kuderoova et al. 1999). Eine weitere Möglichkeit den Einfluss der Ribosomenkonkurrenz zu bewerten und gegebenenfalls zu minimieren ist, dass Ribosomen maßgeschneidert werden, so dass sie nur noch eine bestimmte, synthetische SD-Sequenz erkennen. Ein solches Ribosom wurde von Hui & de Boer (Hui & de Boer 1987) produziert, und erfolgreich von Leipold & Dhurjati (Leipold & Dhurjati 1993) biotechnologisch genutzt.

Die Wnt-Proteine sind nicht toxisch, denn nach Induktion wird das Zellwachstum nicht inhibiert wie bei dem Effekt der typisch toxischen ODCase (Cinquin et al. 2001). Zwar tritt in einigen Fällen (Abbildungen 21, 22, 25 in 6.2) eine kurze Retardierung auf, doch ist der Effekt nur gering und nicht durchgängig anzutreffen. Dass kein Überwachsen von pET3a-

Plasmid freien Zellen für den Anstieg der OD verantwortlich ist, kann aus den Anstiegen der mRNA Konzentrationen ersehen werden, die auf sehr hohem Niveau bis 200 min nach Induktion liegen, was zeigt, dass hauptsächlich plasmidtragende Zellen im Medium vorliegen. Die gemessenen Wachstumsraten für die durchgeführten Wnt-Expressionen liegen zwischen 0.4 und 0.8 h^{-1} . Diese Werte stimmen mit bekannten Wachstumsraten von *E. coli* BL21 überein. Gombert & Kilikian (Gombert & Kilikian 1997) berichtet von einer maximalen Wachstumsrate für BL21(DE3)pLysS von 0.8 h^{-1} . *E. coli* LMG194 wächst bei rekombinanter Expression mit einer Wachstumsrate von 0.7 h^{-1} (Chen et al. 2003).

7.4 Proteolyse und Aggregation

Die Wnt-Proteine sind glykosylierte, cysteinreiche, hydrophobe Proteine und haben deshalb eine Neigung zur Aggregation, was Experimente für Wnt4 untermauern und wie auch Fahnert et al. für Wnt1 berichteten (Fahnert et al. 2004b).

A. Mursula konnte zeigen, dass Wnt6 hauptsächlich in der löslichen Fraktion vorkommt und daher nur geringe Neigung zur Aggregation hat (A. Mursula, persönliche Kommunikation). Die Ursache hierfür ist sehr wahrscheinlich das geringe Expressionslevel. Die zelluläre Wnt6-Konzentration ist so gering, dass Hitzeschockproteine die Aggregation von Wnt6 reduzieren können.

Die intrazelluläre Stabilität der Proteine ist ein wichtiger Faktor, der die Menge an gewinnbarem Zielprotein bestimmt. Studien von Rozkov und Yang (Rozkov 2001, Yang 1995b) zeigen, dass die Akkumulation von Protein in der Zelle direkt mit der Halbwertszeit des Proteins zusammenhängt. Daher wurde eine Analyse der Halbwertszeit, wie sie von Rozkov und Yang durchgeführt wurde, auch auf Wnt4 angewendet. Dabei wurde für das rekombinante Protein eine *in vivo* Halbwertszeit von 62-82 min gemessen. Zum Vergleich hat lösliches, rekombinant produziertes, humanes Hämoglobin eine Halbwertszeit von elf Stunden in *E. coli* (Weickert & Curry 1997). Rekombinant hergestelltes Preproinsulin besitzt nur eine Halbwertszeit von 2 min in *E. coli* (Talmadge & Gilbert 1982). Das instabile staphylococcale Protein A hat eine Halbwertszeit von 15-30 min und akkumuliert sich daher nur zu 14.7 mg/g in der Zelle an (Rozkov et al 2000).

Aggregate und IBs werden als proteolytisch stabil angesehen (Yang 1995b, Fahnert et al. 2004a). Da die Aggregation *in vivo* eine Gleichgewichtsreaktion ist (Carrió & Villaverde 2001), liegt zu jedem Zeitpunkt ein Anteil des rekombinanten Proteins als Einzelkomponente vor, die dann durch Proteasen abgebaut werden kann. Die Sensitivität von Proteinen

gegenüber Proteasen hängt eng mit ihrer thermodynamischen Stabilität zusammen (Parsell & Sauer 1989). Ebenso beeinflusst die thermodynamische Stabilität der Proteine deren Neigung zur Ausbildung von Aggregaten (King et al. 1996). In der Arbeit wurde versucht die Aggregatbildung durch eine Induktion bei 42 °C zu fördern. Jedoch konnte keine erhöhte Konzentration an rekombinantem Protein nachgewiesen werden, eher ging diese noch zurück (Abbildung 30, 6.3.3.). Die Ursache mag sein, dass die Translation nicht im selben Maß anstieg wie die Aktivität der Proteasen. Daneben vergrößert die erhöhte Temperatur den Anteil an falschgefaltetem Wnt-Protein, das so ein gutes Substrat für Proteasen darstellt.

Die Expression der Proteine Wnt4 und Wnt6 wurde von A. Mursula ebenfalls bei 30 °C durchgeführt. Die Intention dabei war, dass eine tiefere Temperatur den Anteil an falsch gefaltetem Protein vermindert, wodurch die Stressantwort und die Proteaseaktivität gesenkt wird. Allerdings konnte auch dieser Ansatz die Menge an gewinnbarem Protein nicht steigern (A. Mursula, persönliche Kommunikation). Der Grund könnte sein, dass die thermodynamische Stabilität der Wnt-Proteine auch bei 30 °C noch gering ist und sie damit leicht proteolytisch abgebaut werden können.

7.5 *Vorschläge zur Optimierung der Expression*

Eine Optimierung kann für mehrere Ansatzpunkte erfolgen. In der Arbeit wurde versucht die Initiation der Translation durch Optimierung der Sekundärstrukturen der mRNA zu verbessern. Ebenso wurde der Effekt von seltenen Codons untersucht. Da dies zu keiner Erhöhung im Proteinlevel führte, können spätere Ereignisse eine wirksamere Kontrolle auf den Produktertrag ausüben.

Ein einfacher Test, ob eine Konkurrenz der rekombinanten mRNA mit endogenen Transkripten um die Ribosomen eine Rolle spielt, wäre ein Expressionsversuch mit einer geringen Menge an Rifampicin, wodurch die Konzentration der endogenen mRNAs reduziert wird (Kuderova et al. 1999).

Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, die Stabilität der Wnt-Proteine in der Zelle zu erhöhen:

1.) Der proteolytische Abbau kann verringert werden, indem das rekombinante Protein aus dem Reaktionsgleichgewicht mit den Proteasen entfernt wird. Ein wichtiger Parameter, der die Sensitivität der Proteine zu Proteasen beschreibt, ist die thermodynamische Stabilität des Proteins. Die Wnt-Proteine sind extrazelluläre Signalmoleküle, die mit Membranproteinen interagieren, um die Zellentwicklung zu beeinflussen. Nach der *induced fit* Hypothese (Koshland 1958), kommt es bei der Protein-Protein-Interaktion zu strukturellen

Angeleichungen, was eine Stabilisierung der beteiligten Proteine bewirkt. So fanden Weickert und Curry (Weickert & Curry 1997), dass die proteolytische Stabilität des Hämoglobins als Gesamtmolekül, bestehend aus α und β Ketten, größer ist, als die Stabilität der einzelnen Ketten in *E. coli*. Eine weitere Reduktion der Stabilität erfolgt, wenn kein Häm in die Ketten eingebaut wird. Ein Interaktionspartner der Wnt-Proteine ist *Frizzled*. Die gemeinsame Expression der Wnt-Protein mit dem *Frizzled*-Protein könnte folglich die Stabilität der Wnt-Proteine steigen. *Frizzled* ist jedoch ein Membranprotein, so dass die Synthese des Gesamtproteins in *E. coli* schwierig sein dürfte.

N-und C-Terminus haben Einfluss auf die proteolytische Stabilität von Proteinen (Tobias et al. 1991, Keiler et al. 1995). Terminale Peptidfusionen können daher die Stabilität der Proteine beeinflussen (Uhlen & Moks 1990). Die hier eingesetzten Wnt-Proteine tragen bereits einen C-terminalen c-Myc-tag, der als Fusionspeptid weit verbreitet ist. Zusätzlich kann ein N-terminaler tag eingebaut werden. Dieser Ansatz wurde bereits begonnen, indem *wnt4* und *wnt6* im pET14b System hinter einem N-terminalen His-tag kloniert wurden. Vergleichsexperimente für eine unterschiedliche Expression gegenüber den His-tag freien Varianten stehen aber noch aus.

Der proteolytische Abbau kann verringert werden, indem die Bildung von Aggregaten und IBs verstärkt wird. Ford et al. (Ford et al. 1991) berichten, dass Proteinfusionen mit TrpE oder LacZ mehr Protein in IBs leiten.

Die Hitzeschockproteine sind eng mit der Regulation von Aggregaten und falschgefalteten Proteinen verknüpft. Daher können sie auch benutzt werden, um die Aggregation und Stabilität rekombinanter Proteine zu beeinflussen. So fanden Carrió und Villaverde, dass eine Deletion von DnaK die Ablagerung des Proteins VP1LAC in IBs um das 2 ½ -fache erhöhte (Carrió & Villaverde 2003). Die ClpP-Protease ist eine der Hauptproteasen, die verantwortlich ist für den Abbau falschgefalteter Proteine und Aggregationen (Miller 1996, Vera et al. 2005). ClpP bildet Komplexe mit den Chaperonen ClpA und/oder ClpX, die dann der Protease falschgefaltetes Protein präsentieren (Ortega et al. 2004). In einer ClpP-Deletionsmutante blieben 50 % der Aggregate stabil, während in einer Lon-Deletion nur 35 % stabil blieben, wie Vera et al. (Vera et al. 2005) zeigen konnten. Allerdings führte eine ClpP-Deletionsmutante bei Rozkov et al. (Rozkov et al. 2000) zu einer Inhibition des Zellwachstums bei Induktion. Dabei ist die Proteinmenge pro Zelle jedoch deutlich gestiegen. Eine Überexpression der kleinen Hitzeschockproteine hat positiven Einfluss auf die rekombinante Proteinmenge, indem sie die Bindung von falschgefaltetem Protein an DnaK

reduzieren und dadurch Proteolyse und Stressreaktion minimieren (Han et al. 2004, LeThanh et al. 2005).

2.) Die Stabilität des rekombinanten Proteins wird erhöht wenn die Aktivität der Proteasen reduziert wird.

Wenn bekannt ist welche Proteasen für den Abbau der Wnt-Proteine verantwortlich sind, kann der Einsatz von entsprechenden proteasedefizienten Stämmen in Betracht gezogen werden (Gottesman 1990). Erste Schritte in diese Richtung wurden bereits unternommen, indem nach Proteasemutanten in der *Keio collection* gesucht wurde, die dann für Expressionsstudien verwendet werden können. Da keine Information über den Ursprung der proteolytischen Aktivität in *E. coli* vorliegt, ist es möglich, dass der Abbau von einer Gemeinschaft an Proteasen ausgelöst wird. Dann wäre es arbeitsaufwendig, mehrere Deletionsmutanten aufzustellen. Da einige Proteasemutanten nicht lebensfähig sind, kann unter diesen Umständen kein Einfluss auf die Proteasen genommen werden.

3.) Wechsel zu einem neuen Expressionssystem

Ein Ausweg für die Probleme der Expression in *E. coli* wäre ein Wechsel zu einem anderen Expressionssystem, das ähnliche Vorteile bietet. Es wird daher eine Expression in *Pseudoalteromonas haloplanktis* geplant. *P. haloplanktis* ist ein psychrophiles, Gram-negatives Bakterium, das in der Antarktis isoliert wurde und daher auch bei tiefen Temperaturen von 14 °C eine hohe Wachstumsrate aufweist (Duilio et al. 2004). Die rekombinante Expression bei tiefen Temperaturen reduziert die Translationsgeschwindigkeit. Dadurch entsteht weniger falschgefaltetes Protein, so dass die Stresssituation in der Zelle vermindert wird. Ebenso reduziert eine geringere Temperatur die thermische Denaturierung, so dass der Anteil nativer Proteine, die weniger anfällig für Abbau sind, größer ist.

8 Literaturverzeichnis

- Andersen DC, Krummen L. (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol.*; 13(2):117-23
- Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J, MacKenzie R. (2005) Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev.*; 24(4):501-19
- Arnold, Sabine. (2003) Kinetic Modelling of Gene Expression. Dissertation, Fakultät Maschinenbau, Institut für Bioverfahrenstechnik, Stuttgart
- Baneyx F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.*; 10(5):411-21
- Baneyx F, Mujacic M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.*; 22(11):1399-408
- Barken KB, Gabig-Ciminska M, Holmgren A, Molin S. (2004) Effect of unlabeled helper probes on detection of an RNA target by bead-based Sandwich Hybridization. *Biotechniques.*; 36(1):124-32
- Blight MA, Menichi B, Holland IB. (1995) Evidence for post-transcriptional regulation of the synthesis of the *Escherichia coli* HlyB haemolysin translocator and production of polyclonal anti-HlyB antibody. *Mol Gen Genet.*; 247(1):73-85.
- Burnette WN. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.*; 112(2):195-203
- Cadigan KM, Nusse R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.*; 11(24):3286-305
- Carrió MM, Villaverde A. (2001) Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Lett.*; 489(1):29-33
- Carrió MM, Villaverde A. (2003) Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Lett.*; 537(1-3):215-21
- Chart H, Smith HR, La Ragione RM, Woodward MJ. (2000) An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. *J Appl Microbiol.*; 89(6):1048-58
- Chen Y, Song J, Sui SF, Wang DN. (2003) DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.*; 32(2):221-31
- Cinquin O, Christopherson RI, Menz RI. (2001) A hybrid plasmid for expression of toxic malarial proteins in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol.*; 117(2):245-7
- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. (1996) PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*; 24(18):3546-51
- Curran JF, Yarus M. (1989) Rates of aminoacyl-tRNA selection at 29 sense codons in vivo. *J Mol Biol.*; 209(1):65-77

- Currie LA. (1968) Limits of Qualitative Detection and Quantitative Determination: Applications to Radiochemistry. *Analytical Chemistry* 40, 586-593
- Deana A, Belasco JG. (2005) Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev.*; 19(21):2526-33
- de Smit MH, van Duin J. (1990) Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 87(19):7668-72
- de Smit MH, van Duin J. (2003) Translational standby sites: how ribosomes may deal with the rapid folding kinetics of mRNA. *J Mol Biol.*; 331(4):737-43
- Duilio A, Tutino ML, Marino G. (2004) Recombinant protein production in Antarctic Gram-negative bacteria. *Methods Mol Biol.*; 267:225-37
- Elf J, Nilsson D, Tenson T, Ehrenberg M. (2003) Selective charging of tRNA isoacceptors explains patterns of codon usage. *Science.*; 300(5626):1718-22
- Fahnert B, Lilie H, Neubauer P. (2004a) Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*; 89:93-142
- Fahnert B, Veijola J, Roel G, Karkkainen MK, Railo A, Destree O, Vainio S, Neubauer P. (2004b) Murine Wnt-1 with an internal c-myc tag recombinantly produced in *Escherichia coli* can induce intracellular signaling of the canonical Wnt pathway in eukaryotic cells. *J Biol Chem.*; 279(46):47520-7
- Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L. (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol.*; 22(10):1302-6
- Ford CF, Suominen I, Glatz CE. (1991) Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.*; 2(2-3):95-107
- Gillespie D.T. (1977) Exact Stochastic Simulation of Coupled Chemical Reactions. *J. Phys. Chem.*; 81:2340-2361
- Gombert AK, Kilikian BV. (1997) A simple way of achieving a high cell concentration in recombinant *Escherichia coli* cultivation. *Braz. J. Chem. Eng.* vol. 14 no. 2 São Paulo
- Gottesman S. (1990) Minimizing proteolysis in *Escherichia coli*: genetic solutions. *Methods Enzymol.*; 185:119-29.
- Griswold KE, Mahmood NA, Iverson BL, Georgiou G. (2003) Effects of codon usage versus putative 5'-mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Protein Expr Purif.*; 27(1):134-42.
- Han MJ, Park SJ, Park TJ, Lee SY. (2004) Roles and applications of small heat shock proteins in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.*; 88(4):426-36
- Hayes CS, Sauer RT. (2003) Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translational quality control. *Mol Cell.*; 12(4):903-11
- Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW, Weisberg RA. (1983) Editors of *Lamda II*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour N.Y.

- Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. (1991) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem.*; 63(24):1193A-1203A
- Hrzenjak A, Artl A, Knipping G, Kostner G, Sattler W, Malle E. (2001) Silent mutations in secondary Shine-Dalgarno sequences in the cDNA of human serum amyloid A4 promotes expression of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein Eng.*; 14(12):949-52
- Hui A, de Boer HA. (1987) Specialized ribosome system: preferential translation of a single mRNA species by a subpopulation of mutated ribosomes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 84(14):4762-6
- Ikemura T. (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J Mol Biol.* Feb 15; 146(1):1-21
- Ivanov I, Alexandrova R, Dragulev B, Saraffova A, AbouHaidar MG. (1992) Effect of tandemly repeated AGG triplets on the translation of CAT-mRNA in *E. coli*. *FEBS Lett.*; 307(2):173-6
- Jensen KF, Pedersen S. (1990) Metabolic growth rate control in *Escherichia coli* may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components. *Microbiol Rev.*; 54(2):89-100
- Jordan BK, Shen JH, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. (2003) Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(19):10866-71
- Keiler KC, Silber KR, Downard KM, Papayannopoulos IA, Biemann K, Sauer RT. (1995) C-terminal specific protein degradation: activity and substrate specificity of the Tsp protease. *Protein Sci.*; 4(8):1507-15
- King J, Haase-Pettingell C, Robinson AS, Speed M, Mitraki A. (1996) Thermolabile folding intermediates: inclusion body precursors and chaperonin substrates. *FASEB J.*; 10(1):57-66
- Kleber-Janke T, Becker WM. (2000) Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr Purif.*; 19(3):419-24
- Kochetkov SN, Rusakova EE, Tunitskaya VL. (1998) Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. *FEBS Lett.*; 440(3):264-7
- Koshland, D.E. (1958) Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44, 98-104
- Kudero A, Nanak E, Truksa M, Brzobohaty B. (1999) Use of rifampicin in T7 RNA polymerase-driven expression of a plant enzyme: rifampicin improves yield and assembly. *Protein Expr Purif.*; 16(3):405-9
- Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S. (2006) Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.*; 123(3):273-80.
- Lee PS, Shaw LB, Choe LH, Mehra A, Hatzimanikatis V, Lee KH. (2003) Insights into the relation between mrna and protein expression patterns: II. Experimental observations in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.*; 84(7):834-41

- Leipold RJ, Dhurjati P. (1993) Construction and characterization of a specialized ribosome system for the overproduction of proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.*; 9(4):345-54
- Leskela T, Tilsala-Timisjarvi A, Kusnetsov J, Neubauer P, Breitenstein A. (2005) Sensitive genus-specific detection of *Legionella* by a 16S rRNA based Sandwich Hybridization Assay. *J Microbiol Methods.*; 62(2):167-79
- Lesnik T, Solomovici J, Deana A, Ehrlich R, Reiss C. (2000) Ribosome traffic in *E. coli* and regulation of gene expression. *J Theor Biol.*; 202(2):175-85
- LeThanh H, Neubauer P, Hoffmann F. (2005) The small heat-shock proteins IbpA and IbpB reduce the stress load of recombinant *Escherichia coli* and delay degradation of inclusion bodies. *Microb Cell Fact.*; 4(1):6
- Lyakhov DL, He B, Zhang X, Studier FW, Dunn JJ, McAllister WT. (1998) Pausing and termination by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol.*; 280(2):201-13
- Makrides SC. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.*; 60(3):512-38
- Mathews DH, Sabina J, Zuker M & Turner DH. (1999) Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. *J. Mol. Biol.* 288, 911-940
- Maurus D, Heligon C, Burger-Schwarzler A, Brandli AW, Kuhl M. (2005) Noncanonical Wnt-4 signaling and EAF2 are required for eye development in *Xenopus laevis*. *EMBO J.*; 24(6):1181-91
- Mehra A, Hatzimanikatis V. (2006) An algorithmic framework for genome-wide modeling and analysis of translation networks. *Biophys J.*; 90(4):1136-46
- Miller C. G. (1996) Protein degradation and proteolytic modification. Pp. 938-954 in *Escherichia coli* and *Salmonella*, 2nd Ed., F. Neidhardt, R. Curtiss III, E.C.C. Lin, J. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (eds.), Washington, D.C.: ASM Press.
- Miller JN, Miller JC (2000) Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Prentice Hall, 4th Ed.
- Miinalainen IJ, Chen ZJ, Torkko JM, Pirila PL, Sormunen RT, Bergmann U, Qin YM, Hiltunen JK. (2003) Characterization of 2-enoyl thioester reductase from mammals. An ortholog of YBR026p/MRF1'p of the yeast mitochondrial fatty acid synthesis type II. *J Biol Chem.*; 278(22):20154-61
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.*; 5(9):691-701.
- Mizusawa S, Ward DF. (1982) A bacteriophage lambda vector for cloning with *Bam*HI and *Sau*3A. *Gene.*; 20(3):317-22.
- Neidhardt FC, Umbarger HE. (1996) Chemical Composition of *Escherichia coli*. Pp. 13-16 in *Escherichia coli* and *Salmonella*, 2nd Ed., F. Neidhardt, R. Curtiss III, E.C.C. Lin, J. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (eds.), Washington, D.C.: ASM Press

- Nelson WJ, Nusse R. (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*; 303(5663):1483-7
- Neubauer A. (2006) Expression and analysis of recombinant human collagen prolyl 4-hydroxylase in *E. coli* and optimization of expression, Dept. of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Oulu
- Niemitalo O, Neubauer A, Liebal U, Myllyharju J, Juffer AH, Neubauer P. (2005) Modelling of translation of human protein disulfide isomerase in *Escherichia coli*-A case study of gene optimisation. *J Biotechnol.*; 120(1):11-24
- Noller HF, Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Lancaster L, Dallas A, Fredrick K, Earnest TN, Cate JH. (2001) Structure of the ribosome at 5.5 Å resolution and its interactions with functional ligands. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*; 66:57-66
- Ortega J, Lee HS, Maurizi MR, Steven AC. (2004) ClpA and ClpX ATPases bind simultaneously to opposite ends of ClpP peptidase to form active hybrid complexes. *J Struct Biol.*; 146(1-2):217-26
- Ozin AJ, Costa T, Henriques AO, Moran CP Jr. (2001) Alternative translation initiation produces a short form of a spore coat protein in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*; 183(6):2032-40
- Parsell DA, Sauer RT. (1989) The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*; 264(13):7590-5
- Paulus M, Haslbeck M, Watzele M. (2004) RNA stem-loop enhanced expression of previously non-expressible genes. *Nucleic Acids Res.*; 32(9):e78.)
- Rautio J, Barken KB, Lahdenpera J, Breitenstein A, Molin S, Neubauer P. (2003) Sandwich hybridisation Assay for quantitative detection of yeast RNAs in crude cell lysates. *Microb Cell Fact.*; 2(1):4
- Rosenberg AH, Goldman E, Dunn JJ, Studier FW, Zubay G. (1993) Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J Bacteriol.*; 175(3):716-22
- Rozkov A, Schweder T, Veide A, Enfors S. (2000) Dynamics of proteolysis and its influence on the accumulation of intracellular recombinant proteins. *Enzyme Microb Technol.*; 27(10):743-748
- Rozkov A. (2001) Control of Proteolysis of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*, in Dept. Biotechnology., Kungl. Tekniska Högskolan: Stockholm
- Rudolph R, Lilie H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.*; 10(1):49-56.
- Ruggiero P, Flati S, Di Cioccio V, Maurizi G, Macchia G, Facchin A, Anacardio R, Maras A, Lucarelli M, Boraschi D. (2003) Glycosylation enhances functional stability of the chemotactic cytokine CCL2. *Eur Cytokine Netw.*; 14(2):91-6
- Sandén AM, Prytz I, Tubulekas I, Förberg C, Le H, Hektor A, Neubauer P, Pragai Z, Harwood C, Ward A, Picon A, de Mattos JT, Postma P, Farewell A, Nyström T, Reeh S, Pedersen S, Larsson G. (2003) Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng.*; 81(2): 158-66

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*.; 74(12):5463-7

Schlx PJ, Worhunsky DJ. (2003) Translational repression mechanisms in prokaryotes. *Mol Microbiol.*; 48(5):1157-69

Schneider TD, Stephens RM. (1990) Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.*; 18(20):6097-100.

Schweder T, Lin HY, Jurgen B, Breitenstein A, Riemschneider S, Khalameyzer V, Gupta A, Buttner K, Neubauer P. (2002) Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.*; 58(3):330-7.

Straus DB, Walter WA, Gross CA. *Escherichia coli* heat shock gene mutants are defective in proteolysis. *Genes Dev.* 1988 Dec; 2(12B):1851-8

Studier FW. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol.*; 219(1):37-44

Studier FW, Moffatt BA. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.*; 189(1):113-30

Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*; 185:60-89.

Sørensen HP, Mortensen KK. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.*; 115(2):113-28

Sørensen MA, Pedersen S. (1991) Absolute in vivo translation rates of individual codons in *Escherichia coli*. The two glutamic acid codons GAA and GAG are translated with a threefold difference in rate. *J Mol Biol.*; 222(2):265-80

Talmadge K, Gilbert W. (1982) Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*.; 79(6):1830-3

Thieme D, Publikation in Vorbereitung

Tobias JW, Shrader TE, Rocap G, Varshavsky A. (1991) The N-end rule in bacteria. *Science*.; 254(5036):1374-7

Uhlen M, Moks T. (1990) Gene fusions for purpose of expression: an introduction. *Methods Enzymol.*; 185:129-43

Ventura S. (2005) Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. *Microb Cell Fact.*; 4(1):11

Vera A, Aris A, Carrió M, Gonzalez-Montalban N, Villaverde A. (2005) Lon and ClpP proteases participate in the physiological disintegration of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol.*; 119(2):163-71

Vind J, Sorensen MA, Rasmussen MD, Pedersen S. (1993) Synthesis of proteins in *Escherichia coli* is limited by the concentration of free ribosomes. Expression from reporter genes does not always reflect functional mRNA levels. *J Mol Biol.*; 231(3):678-88

- Weickert MJ, Curry SR. (1997) Turnover of recombinant human hemoglobin in *Escherichia coli* occurs rapidly for insoluble and slowly for soluble globin. *Arch Biochem Biophys.*; 348(2):337-46
- Weyens G, Charlier D, Roovers M, Pierard A, Glansdorff N. (1988) On the role of the Shine-Dalgarno sequence in determining the efficiency of translation initiation at a weak start codon in the car operon of *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol.*; 204(4):1045-8
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*; 423(6938):448-52
- Wodarz A, Nusse R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.*; 14:59-88
- Wood WB. (1966) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J Mol Biol.*; 16(1):118-33.
- Wu X, Jornvall H, Berndt KD, Oppermann U. (2004) Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. *Biochem Biophys Res Commun.*; 313(1):89-96
- Yang S, Enfors SO. (1995a) The influence of energy sources on the proteolysis of a recombinant staphylococcal protein A in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.*; 233(3): 969-75
- Yang, S. (1995b) Influence of Proteolysis on Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*, in Dept. Biotechnology., Kungl. Tekniska Högskolan: Stockholm
- Zhang G, Brokx S, Weiner JH. (2006) Extracellular accumulation of recombinant proteins fused to the carrier protein YebF in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.*; 24(1):100-4.
- Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3406-15,

Anhang 1: Konstrukt- und Proteinsequenz – *wnt4*

5' **TAATACGACTCACTATAG**GGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTA
 ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGCAATTGGCTGTACCTGGCCAAGCTGTCATCGGT
 GGGCAGCATCTCCGAAGAGGAGACGTGCGAGAACTCAAAGGCCTGATCCAGAGGCAGGT
 GCAGATGTGCAAACGGAACCTTGAGGTGATGGACTCAGTGCGCCGTGGTGCCAGCTGGC
 CATCGAGGAGTGCCAATACCAGTTCCGGAACCGGCGCTGGAAGTGTTCACACTGGACTC
 CCTCCCTGTCTTTGGGAAGGTGGTGACACAAGGGACCCGGGAGGCGGCCTTTGTATACGC
 CATCTCTTCAGCAGGTGTGGCCTTTGCAGTGACAAGGGCATGCAGCAGTGGAGAAGTGA
 GAAGTGTGGCTGTGACCGGACAGTGACAGGGGTGAGCCACAGGGCTTCCAGTGGTCAGG
 ATGCTCGGACAACATCGCCTATGGCGTAGCCTTCTCACAGTCCTTTGTGGACGTCCGGGA
 GAGGAGCAAGGGGGCCTCCTCCAGCCGGGCACTCATGAATCTTCACAACAACGAGGCTGG
 CAGGAAGGCCATCTTGACACACATGCGGGTGGAGTGCAAGTGTACAGGGGTGTCGGGCTC
 CTGCGAGGTAAAGACGTGCTGGCGTGCTGTACCGCCCTTCCGCCAGGTTGGCCACGCGCT
 AAAGGAGAAGTTTGACGGTGCCACGGAGGTGGAGCCACGACGCGTAGGCTCCTCCCGGGC
 GCTGGTGCCTCGGAATGCACAGTTCAAGCCACATACAGATGAGGACCTGGTATACCTGGA
 GCCTAGCCCGGACTTCTGTGAGCAGGACATCCGCAGTGGCGTGCTAGGCACGAGGGGGCCG
 CACGTGCAACAAGACATCTAAAGCCATTGACGGCTGCGAGCTACTGTGCTGTGGCCGCGG
 CTTCCACACAGCGCAAGTGGAGCTGGCCGAGCGCTGTGGCTGCAGGTTCCACTGGTGCTG
 CTTCGTCAAGTGCCGGCAGTGCCAGCGGCTCGTGGAGATGCACACGTGCCGG**GAACAAA**
ACTTATTTCTGAAGAAGATCTGTGAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTG
 AGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAA**CCCCTTGGGGCCTCTAAACGGG**
TCTTGAGGGGTTTTTTG 3'

wnt4 Sequenz in pET3a (Ausschnitt): kursiv und schwarz fettgedruckt sind T7-Promotor und T7-Terminator, die RBS ist unterstrichen, die kodierende Sequenz ist rot gedruckt und der C-myc-tag am Ende der kodierenden Sequenz ist fettgedruckt. Die Länge der synthetisierten mRNA ist 1198 Basen und beginnt mit dem letzten G im T7-Promotor und endet mit dem letzten G im T7-Terminator.

MSNWLYLAKLSSVGSISEEETCEKLKGLIQRQVQMCKRNLEVMDSVRRGAQLAIEECQYQFR
 NRRWNCSTLDSLPLVFGKVVTQGTREAAFVYAISSAGVAFVTRACSSGELEKCGCDRTVHGV
 SPQGFQWSGCSDNIAYGVAFSQSFVDVRERSKGASSSRALMNLHNNEAGRKAILTHMRVECK
 CHGVSGSCEVKTWCRAVPPFRQVGHALKEKFDGATEVEPRRVGSSRALVPRNAQFKPHTDED
 LVYLEPSPDFCEQDIRSGVLGTRGRTCNKTSKAIDGCELLCCGRGFHTAQVELAERCGCRFH
 WCCFVKCRQCQRLVEMHTCR**EQKLISEEDL**

Aminosäuresequenz für das Wnt4 Protein bestehend aus 340 Aminosäuren, der C-myc-tag ist fettgedruckt. Das Molekulargewicht beträgt ungefähr 38 kD.

Anhang 1: Konstrukt- und Proteinsequenz *wnt6*

5' **TAATACGACTCACTATAG**GGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTA
 ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCTGTGGTGGGCGTGGGCAGCCCCCTTGGTCATGGA
 TCCTACCAGCATCTGCAGGAAGGCCAGGCGGCTGGCAGGAAGACAGGCCGAGCTGTGCCA
 GGCGGAGCCGGAAGTAGTGGCAGAGCTTGCCCGAGGCGCAAGACTGGGGGTTCGAGAATG
 TCAGTTCCAGTTCCGTTTCCGACGCTGGAAGTGTCCAGCCACAGCAAGGCCTTTGGGCG
 CGTCCTGCAGCAGGACATCCGAGAGACAGCTTTCGTGTTTGCAATCACCGCAGCTGGTGC
 CAGCCACGCGGTCACTCAAGCCTGTTCCATGGGAGAGCTCCTACAGTGTGGTTGTCAGGC
 ACCCGCGGGCGGGCACC GCCTAGGCCCTCCGGCCTTCTGGGCACTCCTGGACCTCCAGG
 ACCAACTGGCTCTCCAGATGCTAGCGCAGCCTGGGAGTGGGAGGCTGCGGAGACGATGT
 GGACTTCGGGGATGAGAACTCAAGACTCTTTATGGATGCGCAGCACAAGCGGGGCCGTGG
 AGATATCCGTGCATTGGTGCAACTGCACAACAACGAGGCGGGCAGGCTGGCGGTGCGGAG
 TCACACGCGCACCGAGTGTAAGTGCCATGGGCTTTCGGGTTCTGCGCTCTCAGCACCTG
 CTGGCAGAAAGCTGCCTCCGTTCCGCGAGGTGGGCGCACGGCTGCTGGAGCGCTTCCACGG
 CGCCTCGCGCGTCATGGGCACCAACGACGGCAAAGCTCTGCTGCCTGCGGTCCGCACACT
 CAAGCCTCCCGGACGAGCGGATCTCCTCTACGCAGCCGATTACCCGACTTCTGCGCCCC
 TAACCGGCGCACGGGTTGCGCGGGCACGCGCGGACGCGCCTGCAACAGCAGTGCCCCGGA
 CCTCAGCGGCTGCGACCTGTTGTGCTGCGGTGCGGGCACCGCCAGGAGAGCGTACAGCT
 CGAGGAGAACTGTCTGTGCCGCTTCCACTGGTGCTGCGTGGTGCAATGCCACCGCTGCCG
 GGTGCGCAAGGAACTCAGCCTGTGCCTC**GAACAAAACCTATTTCTGAAGAAGATCTGTG**
AGCAATAACTAGCATAA**CCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG** 3'

wnt6 Sequenz in pET3a (Ausschnitt): kursiv und schwarz fettgedruckt sind T7-Promotor und T7-Terminator, die RBS ist unterstrichen, die kodierende Sequenz ist rot gedruckt und der C-myc-tag am Ende der kodierenden Sequenz ist fettgedruckt. Die Länge der synthetisierten mRNA ist 1177 Basen und beginnt mit dem letzten G im T7-Promotor und endet mit dem letzten G im T7-Terminator.

MLWWAVGSPLVMDPTSICRKARRLAGRQAELEPEVVAELARGARLGVRECQFQFRFRRW
 NCSSHSKAFGRVLQQDIRETAFVFAITAAGASHAVTQACSMGELLQCGCQAPRGRAPPRPSG
 LLGTPGPPGPTGSPDASAAWEWGCGDDVDFGDEKSRLFMDAQHKRGRGDIRALVQLHNNEA
 GRLAVRSHRTECKCHGLSGSCALSTCWQKLPPFREVGARLLERFHGASRVMGTNDGKALLP
 AVRTLKPPGRADLLYAADSPDFCAPNRRTGSPGTRGRACNSSAPDLSGCDLLCCGRGHRQES
 VQLEENCLCRFHWCCVVQCHRCRVRKELSLCL**EQKLISEEDL**

Aminosäuresequenz für das Wnt6 Protein bestehend aus 352 Aminosäuren, der C-myc-tag ist fettgedruckt. Das Molekulargewicht beträgt ungefähr 38.5 kD.

Anhang 2: *wnt4* in vitro Standard

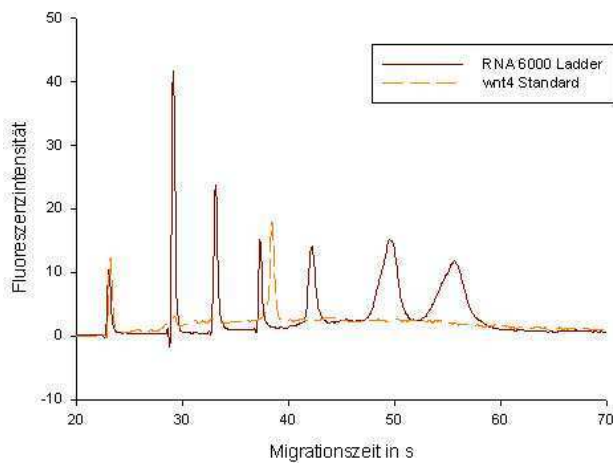


Abbildung 1: *wnt4* in vitro Standard 2 Monate nach der Synthese mit RNA 6000 Ladder, Ambion. Gelelektrophoretische Auftrennung mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer System.

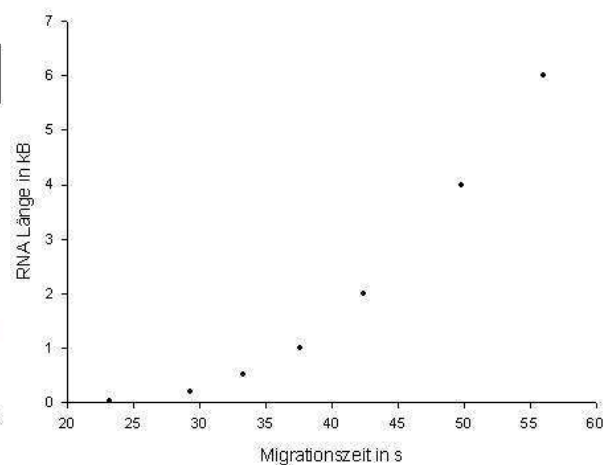


Abbildung 2: Verhältnis zwischen RNA Länge in kilobasen (kB) und der Migrationszeit in Sekunden im Agilent 2100 Bioanalyzer System aus Abbildung 1.

Tabelle I: Eigenschaften der RNA 6000 Ladder

Migrationszeit in s	RNA Länge in Basen
23.2	25
29.3	200
33.3	500
37.55	1000
42.45	2000
49.8	4000
56	6000

Parameter der Regressionskurve

$$y = ax^2 + bx + c$$

$$a = 6$$

$$b = -290.9$$

$$c = 3549.1$$

$$r^2 = 0.9995$$

Tabelle II: Erfasste Peaks und ihre Migrationszeit

Peak	Migrationszeit in s
1	23.2
6	38.4

(Auswahl)

Berechnung der Ungenauigkeit in der Berechnung der Basenlänge (Miller & Miller):

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

y_i – Basenlänge

\hat{y}_i – Basenlänge ermittelt über Regressionskurve

n – Probenumfang

$$s_{y/x} = 58.7 \text{ Basen}$$

Abbildungen 1 zeigt die Analyse mit dem dem Agilent 2100 Bioanalyzer System vom *in vitro wnt4*-Standard. Über die Regressionskurve des Standards aus Abbildung 2 wurde die Länge der RNA für den Peak des *wnt4* in vitro Standards bestimmt. Der Hauptpeak erscheint bei 38.4 s, was einer Länge von 1226 Basen entspricht. Der gemessene Wert und der tatsächliche

Wert von 1198 Basen liegen innerhalb der Messungenauigkeit, der Peak kann daher als von *wnt4* herrührend angenommen werden. Die Analyse wurde zwei Monate nach der *in vitro* Transkription durchgeführt, dennoch ist die Qualität des *wnt4* Standards gut, es sind kaum Abbaubanden vorhanden.

Nach *in vitro* Transkription betrug die *wnt4* RNA Konzentration 200 ng/μl (511 fmol/μl). Nach zwei Monaten, wonach auch die gezeigte elektrophoretische Geltrennung erfolgte, betrug die Konzentration 155 ng/μl (397 fmol/μl).

Anhang 3: Berechnungen im SH-Assay

Als Beispielrechnung zur Lösung der Information im SH-Assay sollen die wichtigen Parameter für die RNA-Proben in einem Experiment (BL21(DE3) pLysS, Superbroth) für *wnt4* hergeleitet werden:

Es wurden jeweils zwei (1 & 2) RNA-Proben zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

{0, 30, 60, 90, 120, 180, 270, 360} Minuten

Zunächst erhält man eine Matrix mit drei Signaleinträgen für jede RNA-Probe:

Zeit nach Induktion in min	1 SH-Signal			2 SH-Signal		
0	48674	52186	48096	48019	58510	48659
30	71021	84254	11778	67351	106222	89622
60	125070	169966	146274	132937	181590	147600
90	187527	230856	179998	249293	270391	190982
120	219187	149112	225260	298278	285509	238532
180	409899	253357	300026	293380	216017	249378
270	124658	121863	121694	167584	148476	209178
360	74536	88777	105367	87568	80222	94119

Für jede Probe wird aus dem Signal das arithmetische Mittel und die Standardabweichung in Prozent ermittelt. Im Folgenden wird mit den Werten vom Zeitpunkt null fortgefahren, mit den übrigen Werten wird analog verfahren:

Zeit in min	Mittel 1	s.d.1 in %	Mittel 2	s.d.2 in %
0	49652.00	4.46	51729.33	11.37

Über die Parameter der Standardgerade kann nun auf die Menge in fmol an *wnt4* mRNA im Well geschlossen werden, dazu muss überprüft werden ob alle Daten innerhalb der Standardgeraden liegen, Abbildung 1 zeigt dies für den vorliegenden Fall:

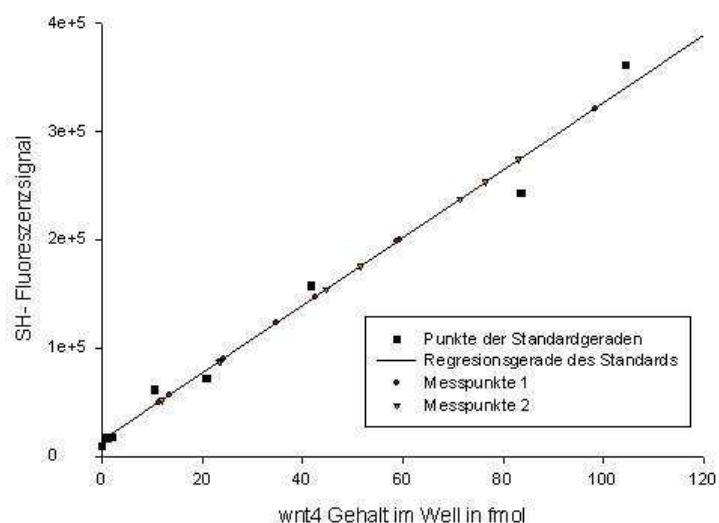


Abbildung 1: Verteilung des Signale der SH-Proben in der Standardkurve.

Parameter der
Regressionsgeraden

$$y = ax + b$$

$$a = 3125$$

$$b = 14065$$

$$r^2 = 0.983$$

wnt4 mRNA-Gehalt in 10 µl die für
SH eingesetzt wurden:

	1	2
Zeit in min	fmol/10 µl	fmol/10 µl
0	11.39	12.05

Die RNA Proben aus der Extraktion wurden für die SH 1:10 verdünnt, der Messwert muss also um den **Faktor 10 erhöht** werden. Dann wird die Gesamtmenge an *wnt4* mRNA berechnet, die im RNA Extrakt, also im extrahierten Volumen von 200 µl vorliegt. Dazu wird der *wnt4* mRNA Gehalt aus 10 µl auf 200 µl durch **Multiplikation mit 20** hochgerechnet.

wnt4 fmol/10µl zu *wnt4* fmol/(200µl):

	1	2
Zeit in min	fmol	fmol
0	2277.65	2410.60

1. Berechnung des Masseverhältnisses *wnt4*/Gesamt-RNA

Mit der molaren Quantität an *wnt4* mRNA kann das Gewicht der mRNA im Extrakt über ihre molare Masse erhalten werden.

$$Mw(wnt4) = 390933 \text{ g/mol}$$

wnt4 fmol zu *wnt4* µg:

	1	2
Zeit in min	<i>wnt4</i> in µg	<i>wnt4</i> in µg
0	0.89	0.94

Über eine *Ribogreen*-Messung der RNA-Konzentration wurde die Gesamtmenge an RNA im Extrakt gemessen. Der Quotient aus *wnt4*-Menge und RNA-Gesamtmenge ergibt den Bruchteil von *wnt4* am Gesamtextrakt. Zu Beginn wurde die prozentuale Standardabweichung berechnet, die nun wieder auf das Endergebnis angewendet werden kann (als nominale Abweichung).

RNA-Gesamtgehalt im extrahierten Volumen (200 μ l):

	1	2
Zeit in min	μ g RNA	μ g RNA
0	27.65	33.56

*Masseverhältnis *wnt4* mRNA/ Gesamt-RNA:*

	1		2	
Zeit in min	g(<i>wnt4</i>)/g(Extr.RNA)	s.d.	g(<i>wnt4</i>)/g(Extr.RNA)	s.d.
0	0.032	0.001	0.028	0.003

2. Berechnung der *wnt4* Moleküle pro Zelle

Es muss die Extraktionseffizienz berechnet werden um mögliche Verluste während des Extraktionsverfahrens zu minimieren. Die extrahierte Menge an RNA ist eine Funktion der Zellmenge, die zur Extraktion eingesetzt wurde. Daher wird die theoretische RNA-Ausbeute berechnet, wenn alle Proben von einer identischen Zellmenge genommen wurden. Dazu wird durch die relative OD₆₀₀ geteilt. Für die Proben 1 & 2 zum Zeitpunkt null beträgt die relative OD 0.09 und die Menge an extrahierter Gesamt-RNA wird durch diesen Wert geteilt. theoretische RNA-Ausbeute:

	1	2
Zeit in min	μ g RNA	μ g RNA
0	304.6	369.8

Die Extraktionseffizienz wird bestimmt, indem alle theoretischen RNA-Ausbeuten einer Extraktion durch den höchsten Wert der theoretischen RNA-Ausbeute geteilt wird. In diesem Fall war der höchste Wert der theoretischen RNA-Ausbeute derjenige für Probe 2 zum Zeitpunkt null.

Extraktionseffizienz:

	1	2
Zeit in min	rel. Extraktion	rel. Extraktion
0	0.82	1

Die im SH-Assay gemessene *wnt4*-Menge muss nun durch die Extraktionseffizienz durch Division korrigiert werden:

	1	2
Zeit in min	fmol	fmol
0	2764.74	2410.60

Aus der Molarität der *wnt4* Molekülen in fmol, kann über die Avogadro-Zahl die Anzahl der Moleküle errechnet werden:

$$N_A = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ Moleküle/mol}$$

wnt4-fmol zu *wnt4*-Moleküle:

	1	2
Zeit in min	Moleküle	Moleküle
0	1.66E+12	1.45E+12

Über mikroskopische Zellzählung wurde die Anzahl der Zellen für eine OD₆₀₀ von 1 mit 4×10^8 pro Milliliter bestimmt. Nun kann die Anzahl der Moleküle mit der Anzahl der Zellen kombiniert werden um Auskunft über die Anzahl Moleküle pro Zelle zu liefern, die Standardabweichung wird hinzugerechnet:

	1		2	
Zeit in min	Moleküle/Zelle	s.d.	Moleküle/Zelle	s.d.
0	9635	430	8401	955

3. Berechnung des kritischen Levels

Nach der Formel in 5.6.3 wird das kritische Level bestimmt.

$$L_c = 2.33 \cdot \text{s.d.}(\text{blank}) + [\text{blank}]$$

$$[\text{blank}] = 9362.5 \text{ (Fluoreszenzsignal)}$$

$$\text{s.d.}(\text{blank}) = 109.6$$

$$L_c = 9617.9$$

– Mittelwert der Nullprobe

– Standardabweichung des Signals der Nullprobe

Im hier beschriebenen Experiment wurde keine Negativkontrolle verwendet, somit können keine Umrechnungen bezogen auf die Extrahierte RNA durchgeführt werden. Um dennoch das Detektionslimit für die relative *wnt4* Fraktion in der Extrahierten RNA zu erhalten, wurde der prozentuale Anteil des Detektionslimits am Mittelwert der Probensignale zum Zeitpunkt Null nach Induktion bestimmt:

[x] – Mittelwert der Probensignale zum Zeitpunkt null

$$[x] = [48674, 52186, 48096, 48019, 58510, 48659] = 50690.7$$

$$\text{rel.Lc} = L_c/[x] = 0.19 \text{ (relativ zu den ersten Probenmesswerten)}$$

Nachdem Operationen, wie Division durch extrahierten RNA-Gehalt, auf den Probensignalen ausgeführt wurden, wird das relative Detektionslevel, rel.Lc, wieder auf den Mittelwert der prozessierten Probensignale angewendet, um das tatsächliche Detektionslimit zu erhalten.

$$L_c = \text{rel.Lc} \cdot [x']$$

$$L_c = 0.19 \cdot 0.3 = \mathbf{0.0057 \text{ g/g}}$$

[x'] – prozessierte Probensignale (hier das Masseverhältnis *wnt4* mRNA/ Gesamt-RNA)

$$[x'] = [0.032, 0.028] = 0.3 \text{ g/g}$$

Beim Vorhandensein einer Negativkontrolle wird mit dem Detektionslimit, welches über die Negativkontrolle errechnet wird, verfahren wie mit den Probensignalen.

Anhang 4: Elektrophoretische RNA-Auftrennung

Mittels der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA-Extraktionsproben erscheint ein Peak in Proben nach Induktion, der auf einer vergleichbaren Höhe wie der jeweilige *in vitro* Standard läuft, nicht jedoch in den Vorinduktionsproben auftritt. Daher ist es naheliegend diesen Peak als den Peak der rekombinanten mRNA anzusehen. Eine interne Normierung der Fläche des rekombinanten Peaks mit der Fläche der 23S rRNA minimiert den Einfluss von externen Fehlerquellen. Die 23S rRNA wurde gewählt, da dies ein scharfer, gut ausgeprägter Peak ist und nicht wie die 16S rRNA einen Doppelppeakcharakter besitzt.

Elektrophoretische Auftrennung von *wnt4* RNA-Proben:

Die Peakfläche des vermutlichen *wnt4* Signals wurde über einen Vergleich mit der bekannten Konzentration der Peakfläche des *wnt4 in vitro* Standards, der schon in Anhang 2: „*wnt4 in vitro* Standard“ beschrieben wurde, berechnet. Probe 1 und Probe 2 bezeichnen die zwei unterschiedlichen Proben, die zu gleichen Zeitpunkten genommen wurden.

Tabelle I: Signalcharakteristika des vermutlichen *wnt4* mRNA Signals.

w4-std – *wnt4 in vitro* Standard

Zeit nach Induktion in min	Probe 1				Probe 2			
	#	Migrations- zeit in s	Peakfläche	fmol/μl	#	Migrations- zeit in s	Peakfläche	fmol/μl
w4-std	1	38.4	21.35	66.08				
0*	2	-	-	-	3	-	-	-
60	4	38.7	6.16	19.07	5	38.7	11.44	35.41
120	6	38.7	12.85	39.77	7	38.65	8.73	27.02
180	8	38.55	15.23	47.14	9	38.5	17.56	54.35
270	10	38.55	11.19	34.63	11	38.5	6.45	19.96
360**	12	43.4	4.27	13.22				

*Zum Zeitpunkt null ist kein detektierbares Signal vorhanden

**Für die Probe bei 360 min kam es zu einer Verschiebung des Signals zu späteren Migrationszeiten. Siehe auch Gel in Abbildung 1.

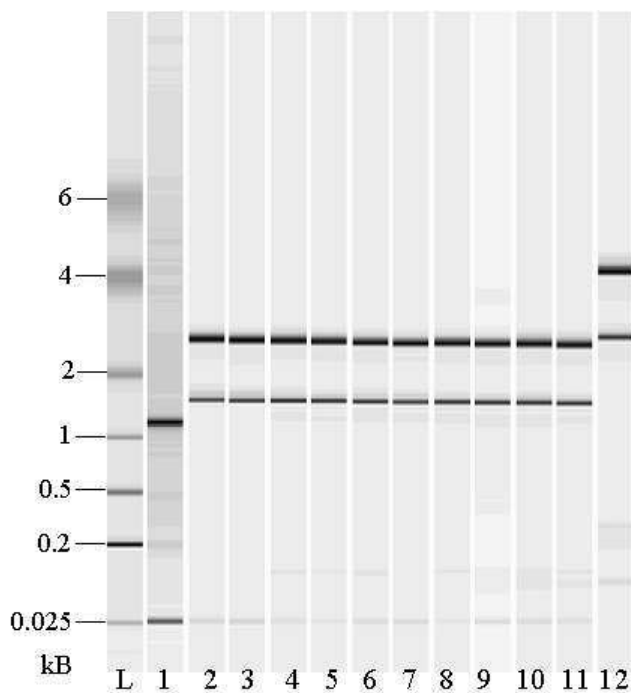


Abbildung 1: Gelabbildung der elektrophoretischen Auftrennung von RNA-Extraktionen aus einem *wnt4* Expressionsversuch. L- RNA 6000 Ladder. Die mit 12 gekennzeichnete Bande ist zu höheren Molekulargewichten verschoben. „A“ kennzeichnet die 23S rRNA, „B“ die 16S rRNA und „C“ die Position des vermutlichen *wnt4* mRNA Signals. Die Nummerierung entspricht den fettgedruckten Zahlen in Tabelle I.

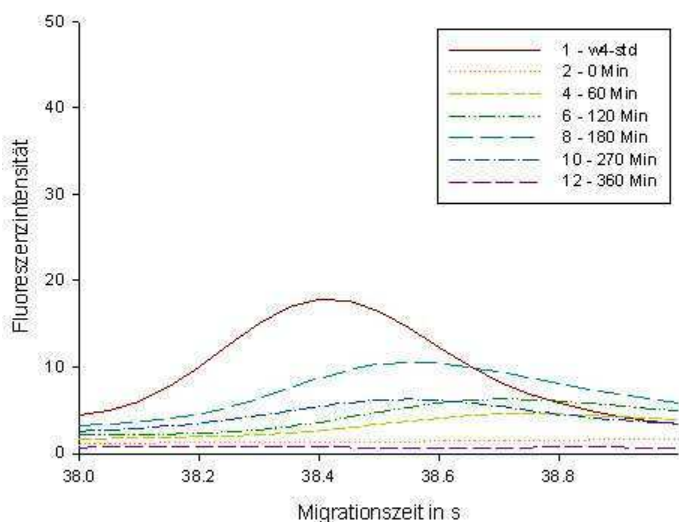


Abbildung 2: Abbildung der Fluoreszenzintensitäten über die Migrationszeit. Die erste Nummer im Kasten entspricht der fettgedruckten Nummerierung in Tabelle I. „w4-std“ steht für den *wnt4* in vitro Standard der schon im Anhang 2: „*wnt4* in vitro Standard“ beschrieben wurde. Für Ziffern 2 bis 12 gibt die zweite Zahl den Zeitpunkt der Probenentnahme nach Induktion an.

In Abbildung 2 ist ein Ausschnitt aus dem Elektroferrogramm vom RNA-Extrakt im Zeitintervall der Migrationszeit von 38 bis 39 s zu sehen. Die durchgezogene Linie, die mit 1 bezeichnet ist entspricht dem *wnt4* in vitro Standard, die gepunktete Linie, bezeichnet als 2, ist die Probe vor Induktion und zeigt keinerlei Fluoreszenzintensität im Gebiet des *wnt4* Standards. Probe 12 ist zu höheren Molekulargewichten verschoben.

26S rRNA Daten zur internen Normierung:

Tabelle II zeigt die Werte für die 23S rRNA in der elektrophoretischen Auftrennung der RNA-Extraktionsproben.

Tabelle II: Eigenschaften der 23S rRNA:

23S rRNA	Probe 1		Probe 2	
Zeit nach Induktion in Min.	Migrationszeit in s	Peakfläche	Migrationszeit in s	Peakfläche
0	44.85	138.42	44.75	123.84
60	44.7	262.78	44.65	283.22
120	44.55	200.84	44.45	187.66
180	44.5	288.48	44.45	159.23
270	44.45	210.68	44.35	208.46
360*	50.05	184.84		

*Für die Probe bei 360 min kam es zu einer Verschiebung des Signals zu späteren Migrationszeiten. Siehe auch Gel in Abbildung 1.

Für Abbildung 14 im Ergebnisteil 6.1.9 wurden die Peakfläche des vermutlichen *wnt4* Signals durch die Peakfläche der dazugehörigen 23S rRNA geteilt:

Tabelle III: relative wnt4 Signale Normiert zur 23S rRNA:

	1	2
Zeit nach Induktion in Min.	relative Fläche	relative Fläche
0	0	0
60	0.023	0.040
120	0.064	0.047
180	0.053	0.110
270	0.053	0.031
360	0.023	

Elektrophoretische Auftrennung von *wnt6* RNA-Proben:

Abbildung 3 zeigt den Bereich in dem der *wnt6 in vitro* Standard gelaufen ist, (durchgezogene Linie) und die Fluoreszenzsignale für verschiedene Zeitpunkte der Probe 1. Die Peakflächen

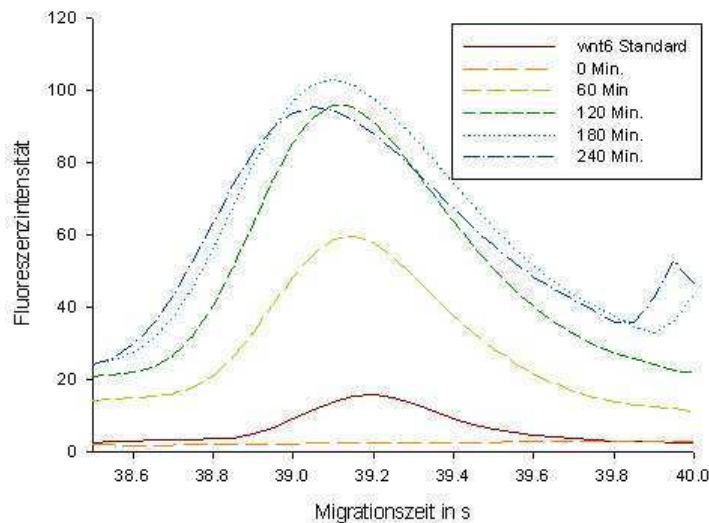


Abbildung 3: Fluoreszenzpeaks bei der elektrophoretischen Auftrennung von extrahierter RNA eines Expressionsversuches mit *wnt6*-wt in Rosetta Zellen.

liegen nahezu identisch übereinander, jedoch gibt es kein Signal für den Zeitpunkt vor Induktion.

Zur internen Normierung wurde die Peakfläche des *wnt6* Signals durch die Peakfläche der jeweiligen 23S rRNA geteilt, das Ergebnis bildet die Grundlage der Abbildung 19 im Ergebnisteil 6.1.10, und ist in Tabelle IV wiedergegeben.

Tabelle IV: Signalcharakteristika für RNA-Extraktionsproben einer Expression von *wnt6* in Rosetta. „A“ gibt die relative Peakfläche von *wnt6* an, wenn diese durch die entsprechende Fläche der 23S rRNA geteilt wird.

Zeit nach Induktion in min	Probe 1		Probe 2	
	Migrationszeit in s	A	Migrationszeit in s	A
wnt6-Standard	39.20			
0	-	-	-	-
60	39.15	0.17	39.10	0.15
120	39.15	0.24	39.05	0.23
180	39.10	0.23	39.05	0.23
240	39.05	0.17		

Anhang 5: wnt6 SH Zusatzinformationen

Abbildung 1 zeigt den *in vitro* Standard von *wnt6*, der für die SH im Rosetta Expressionsversuch benutzt wurde. Die verwendete Standardlösung scheint fast ausschließlich aus einer RNA-Spezies zu bestehen. Tabelle I gibt Einzelheiten der *RNA 6000 Ladder* und des *wnt6*

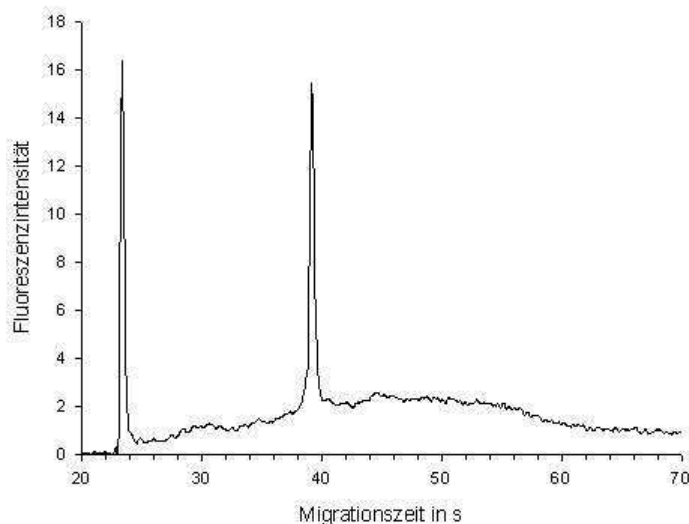


Abbildung 1: Elektrophoretische Auftrennung des *wnt6 in vitro* Standards für den Sandwich Hybridisations Assay.

Standards wieder. Eine Migrationszeit von 39.2 s für den Hauptpeak in Abbildung 1 entspricht nach der Regressionskurve einer RNA-Länge von 1242 Basen mit einer Ungenauigkeit von 73.9 Basen. Daher wurde angenommen, dass der Peak der *wnt6* mRNA, die eine Länge von 1177 Basen hat, entspricht. Die Konzentrationsmessung über *Ribogreen* ergab 103 ng/μl (269 fmol/μl).

Tabelle I: Eigenschaften der RNA 6000 Ladder

Migrationszeit in s	RNA Länge in kB	Parameter der Regressionskurve
23.4	0.025	$y = ax^2 + bx + c$
29.6	0.2	$a = 0.0063$
33.7	0.5	$b = -0.318$
38.05	1	$c = 4.019$
42.95	2	$r^2 = 0.9994$
49.95	4	
56	6	

Tabelle 2: Erfasste Peaks und ihre Migrationszeit aus Abb.1

Peak	Migrationszeit in s
1	23.4
2	39.2

Berechnung der Ungenauigkeit in der Berechnung der Basenlänge, &Miller:
(siehe Anhang: *wnt4 in vitro* Standard)

$$s_{y/x} = 73.9 \text{ Basen}$$

Bei der SH von *wnt6* in Rosetta liegen einigen Punkte der Proben deutlich über dem letzten Wert der Standardkurve (Abbildung 2). Zwar ist in der Standardgeraden keine Abweichung vom linearen Trend bis zu 60 fmol zu erkennen (Abbildung 3) dennoch müssen wenigstens die letzten vier Datenpunkte in Abbildung 2 aus der Analyse herausgenommen werden. Für Probe 1 sind es die Zeitpunkte 120 und 180 min nach Induktion, für Probe 2 sind es 180 und 240 min. In Abbildung 17 im Ergebnisteil 6.1.10 liegt die Konzentration der betroffenen Proben zum Teil unter den Werten der anderen Proben, da das hohe Signal durch eine große Menge an extrahierter RNA geteilt wird.

Bei hohen Konzentrationen gehen Standardkurven oft in einen parabolischen Bereich über, dadurch würden Punkte oberhalb der Standardkurve unterbestimmt werden. Die gezeigten Punkte in Abbildung 17 in 6.1.10 geben also die Mindestwerte in dem betroffenen Bereich an.

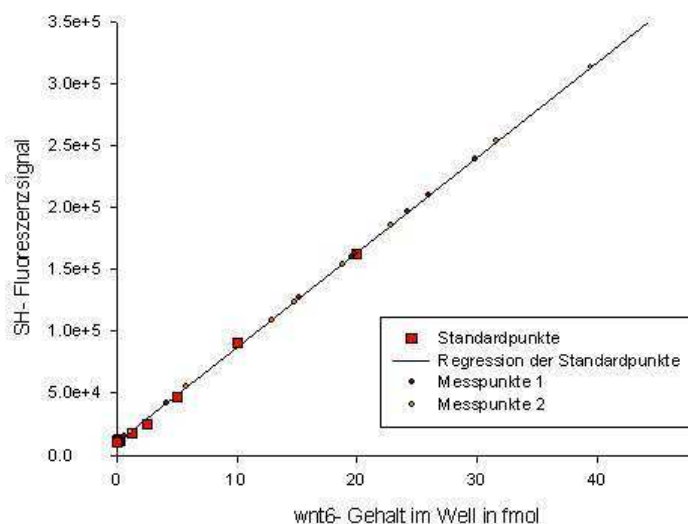


Abbildung 2: Standardgerade für die SH von *wnt6* in Rosetta und die Verteilung der Messpunkte in den Wells. Für die letzten vier Datenpunkte kann die Linearität der Regressionsgeraden nicht mehr garantiert werden.

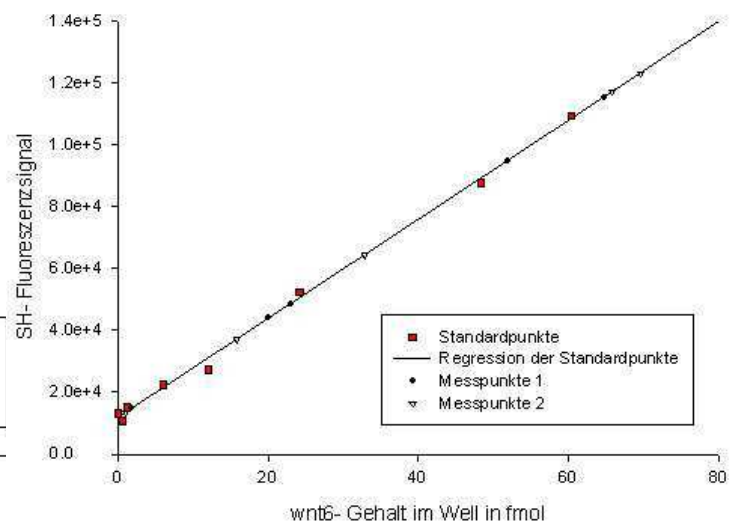


Abbildung 3: Standardgerade für die SH mit *wnt6* in BL21 und die Verteilung der Messpunkte in den Wells.

Anhang 6: Berechnungen der Proteinhalbwertzeit

Zur Bestimmung der Halbwertzeit wurde die densitometrische Stärke der Signale in der Immunodetektion in Abbildung 35 in 6.3.7 quantifiziert. Untersucht wurden die Wnt4 Signale auf Höhe A und die unspezifischen Signale auf Höhe B, siehe Tabelle I. Tabelle II gibt die Parameter der Regressionsgeraden bei Korrelation des Logarithmus der Signalstärke aus Spalten C) und G) in Tabelle I an. Die Analysen nach A) und B) in 6.3.7 geben dabei jeweils den Mindest- und den Höchstwert der Halbwertszeit von Wnt4 an.

Tabelle I: A): Probenzeit in min; B)-Wnt4-Signalstärke; C): Logarithmus von B); D): Signalstärke von Protein auf Höhe B in Abb. k1 Ergebnisteil; E): relative Signalstärken von Protein B; F): um D) korrigierte Signalstärken von Wnt4; G): Logarithmus von F)						
A) in Min.	B)	C)	D)	E)	F)	G)
0	102	4.62	93.6	1	102	4.62
30	65	4.17	88	0.9401709	69.1	4.24
60	42.2	3.74	74	0.7905983	53.4	3.98
120	26.2	3.27	68.1	0.7275641	36	3.58
180	39.5	-	64.3	0.6869658	57.5	-
240	-	-	64.6	0.6901709	-	-

Tabelle II: Ermitteln der Regressionsparameter für die Abhängigkeit vom Logarithmus des Proteinsignals gegen die Zeit. Analysen nach A) und B) erfolgen wie in 6.3.7 geschildert.		
	Analyse nach A)	Analyse nach B)
Degradationsrate /min	-1.12E-02	-8.43E-03
ln(P ₀)	4.54	4.55
r ²	0.97	0.97
t _{1/2} in Min.	62	82

Anhang 7: Simulationsparameter

Für die Simulation im Translationsmodell wurden folgenden Parameter eingesetzt:

Ribosomen-Binderate	0.4	1/s
Ribosomen-Terminationsrate	0.5	1/s
Ribosomen-Translokationsrate	100000	1/s
RNase-Aktivitätsrate	4.00E-03	1/s
RNase 5'-Ende Assoziationsrate	1.00E-04	1/s
Überlebenswahrscheinlichkeit	0.001	
Transkriptionsrate	43	1/s
erste vom Ribosom bedeckte Position	-17	Nukleotid
letzte vom Ribosom bedeckte Position	17	Nukleotid
erste von der RNase bedeckte Position	-12	Nukleotid
letzte von der RNase bedeckte Position	12	Nukleotid
Simulationszeit	1000	s
Simulationswiederholungen	15	
virtuelle RNase-Aktivität	ja	

Danksagung

Vielen herzlichen Dank meinem Betreuer Prof. Dr. Peter Neubauer, dass ich in seinem Labor an diesem interessanten Thema arbeiten durfte, und für die hervorragende Betreuung im Labor sowie auch außerhalb davon.

Weiterhin danke ich Dr. habil. Hauke Lilie für die Möglichkeit meine Diplomarbeit in Oulu anzufertigen und dennoch nicht auf seine geduldige Betreuung und wohlmeinenden Rat verzichten musste.

Besonderen Dank schulde ich Dr. Anu Mursula für ihre rücksichtsvolle und andauernde Unterweisung und Hilfe im Labor.

Unschätzbare Dienste hat Olli Niemitalo für das Entwerfen des Optimieralgorithmus und den Berechnungen um die mRNA Sekundärstrukturen geleistet. Zusammen mit Dr. André Juffer konnten vor allem zu Beginn der Arbeit viele aufschlussreiche Diskussionen geführt werden. Dr. Ullrich Bergmann verdient Erkenntlichkeit für seine Einweisung in die Funktionsweise des MALDI-TOF-Verfahrens. Anerkennung zolle ich Liisa Myllykoski für ihre souveräne und reibungslose Organisation der bürokratischen Aspekte des Aufenthalts in Oulu. Allen Beteiligten, die diese Arbeit korrigierten verdienen höchste Achtung, besonders gedankt werden soll Mirja Krause, für ihr grandioses Sprachgefühl, Sandra Grötsch sowie Wiebke Chemnitz für das wohl schwierige und zeitraubende Lesen. Es war eine Wonne, wenn Sanna Sillankorva mit ihrer Sonne auch die trübsten Tage erhellte, und großartig waren die Fachgespräche mit Daniel Thieme in der Sauna. Jeder Einzelne im BPEL-Team verdient Erwähnung und Dank für die schöne, gemeinsame Zeit.

Tausend Dank an meine Verwandten in Oulu, die mir ein wunderbares, zweites Heim geworden sind. Vor allem möchte ich meiner Familie danken für den andauernden Beistand und ganz besonders meiner Mutter, die mir ein Vorbild ist, für ihre Unterstützung und Erziehung, ohne die ich die Arbeit nicht hätte durchführen können.

Die Diplomarbeit wurde hauptsächlich an der Universität Oulu, Fachbereich *Process and Environmental Engineering*, Institut für Bioverfahrenstechnik durchgeführt und wurde finanziell unterstützt durch das TEKES Neobio Programm (Projekt: „*Platform for control and optimization of recombinant protein production in different cell factories*“-CORF).

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlich und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift