

## 5. Diskussion

Die zellfreie Translation von siebzehn mRNA-Varianten mit verschiedenen zweiten Codons in der H-FABP-codierenden Sequenz (Fettsäure Bindendes Protein) wurde untersucht und ein bis zu zehnfacher Unterschied in der Proteinsyntheseeffizienz gefunden. Dieser Unterschied tritt auch bei mRNAs mit verschiedenen Codons für die selbe Aminosäure auf. Die beobachtete Variation der Expressionseffizienz ist also unabhängig von der in das Protein eingebauten Aminosäure. Als denkbare Ursachen für die großen Unterschiede in der Proteinsyntheseleistung konnten tRNA-Effekte für einige Beispiele als unwahrscheinlich eingestuft werden. Die Proteinausbeute ausgehend von gering exprimierten mRNA-Varianten konnte weder auf einen Mangel an zur Verfügung stehender tRNA noch auf die Aminoacylierungseffizienz zurückgeführt werden. Eine Hypothese, nach der aus einer Gruppe isoakzeptierender tRNAs bestimmte tRNA-Strukturen für das Ablesen des zweiten Codons bevorzugt sein könnten, konnte nicht bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde eine mit Serin beladbare, Lysincodons erkennende chimäre tRNA hergestellt. Diese zeigt hohe Translationsaktivität, jedoch keinen Einfluß auf die schwache Expression der mRNA-Mutante mit Lysincodon an zweiter Position. Dagegen wurde eine tendenzielle Bestätigung für eine Hypothese gefunden, nach der langsam translatierte Codons limitierend auf die Translation wirken können, wenn diese im Anfangsbereich der codierenden Sequenz lokalisiert sind, und zwar um so mehr, je geringer der Abstand zum Startcodon ist (Chen & Inouye, 1990). Die Verschiebung eines solchen kritischen Codons um elf Positionen stromabwärts führt zu einer Steigerung der H-FABP-Synthese auf das Niveau der stark exprimierten Mutanten. Der Einfluß einer theoretisch vorhergesagten Sekundärstruktur im äußeren 5'-Ende der H-FABP-codierenden Sequenz abhängig vom zweiten Codon wurde untersucht. Eine gewisse Korrelation zwischen Translationseffizienz und lokaler mRNA-Struktur bzw. Faltungsentnergie im Translationsinitiationsbereich konnte aufgezeigt werden. Diese Korrelation konnte tendenziell durch einen experimentellen Ansatz zur Manipulation der mRNA-Sekundärstruktur durch Hybridisierung mit Antisense-DNA-Oligomeren unterstrichen werden. Daher muß möglicherweise neben der bekannten Limitierung der Translationsinitiationseffizienz durch Sekundärstrukturen um die Ribosomenbindungstelle (de Smit & van Duin, 1994) auch eine Limitierung bedingt durch Sekundärstrukturen am äußeren 5'-Ende der Protein-codierenden Sequenz berücksichtigt werden.

Eine Hypothese wurde untersucht, nach der ein schwach exprimiertes Gen durch Ersetzen bzw. Ergänzen der randständigen Protein-codierenden Sequenzen der mRNA durch die entsprechenden Abschnitte eines stark exprimierten Gens verbessert werden kann. Tatsächlich konnte die Anzahl der pro Zeiteinheit verknüpften Peptidbindungen der Dehydrofolatreduktase (DHFR) durch Insertion des Gens in den Leserahmen des H-FABP-Gens gesteigert werden. Die Vermutung, nach der die Zunahme der Proteingröße im entstandenen Fusionsproteins dessen Ausbeute limitiert, konnte nicht bestätigt werden. Tatsächlich führten alle vorgenommenen Deletionen im H-FABP-codierenden Anteil des Fusionsproteins zu einer uner-

wartet reduzierten Translationseffizienz. Die letzteren Ergebnisse sprechen eindeutig gegen die Hypothese, nach der die Synthese eines ineffizient translatierten Proteins allein dadurch verbessert werden kann, indem man die codierenden Randsequenzen der entsprechenden mRNA durch analoge Sequenzen aus effizient translatierten mRNAs ersetzt bzw. ergänzt. Der Grund für die verringerte Ausbeute der Deletionsmutanten bleibt unbekannt. Prinzipiell ist hier allerdings eine Limitierung der Proteinsynthese, durch die Translation der N- und C-terminalen Sequenzen als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Translation, in Frage zu stellen. Möglicherweise führten die Deletionen zu einer bezüglich der Translationseffizienz ungünstigen mRNA-Struktur bzw. verzerrten Proteinfaltung.

Die Frage, ob die Protein-codierenden Randsequenzen für DHFR und H-FABP limitierend für dessen Syntheseausbeute, insbesondere für die Translationsinitiation und/oder -termination sein könnten, wurde näher untersucht. Dazu wurde die Expressionseffizienz von großen und kleinen Proteinen verglichen. Eine Arbeitshypothese wurde aufgestellt, nach der bei einer Limitierung durch Initiation bzw. Termination größere Proteine in größerer Masseausbeute synthetisiert werden sollten als kleine, da für größere Proteine weniger Initiations- bzw. Terminationsschritte notwendig sind. Zur besseren Vergleichbarkeit von großen und kleinen Proteinen wurden oligomere Fusionsproteine hergestellt. Es konnte gezeigt werden, daß die Masseausbeute zwar abhängig vom Proteintyp ist, aber nur geringfügig von der Größe der oligomeren Proteine beinflusst wird. Dieses Ergebnis stellt, anders als im Fall der Mutation des zweiten Codons der H-FABP-Sequenz (s.o.), ein weiteres Indiz gegen die Limitierung der Proteinsynthese durch die Protein-codierenden Randsequenzen bzw. durch die Translationsinitiation im allgemeinen dar.

Es wurde geprüft ob die Konzentration bestimmter tRNAs im Translationssystem ein begrenzender Parameter für die Proteinsynthese ist. Dazu wurde für die Synthese von DHFR unmodifizierte tRNA tArgU als *in vitro* Transkript für die Decodierung der seltenen Arginin-Codons AGA und AGG eingesetzt und eine Verdreifachung der DHFR-Synthese beobachtet. Da diese unmodifizierte tRNA einfach herzustellen ist, stellt sie eine ökonomische Komponente zur Steigerung der Expression von Proteinen mit hoher Konzentration an kritischen Arginin-Codons dar. Die endogene Lysyl-tRNA bzw. die Lysyl-tRNA-Synthetase wurde ebenfalls als möglicher limitierender Faktor für die Synthese eines Proteins (NusA) identifiziert, da die mit Serin beladbare, Lysincodons erkennende chimäre tRNA (s.o.) effektiv mit der endogenen Lysyl-tRNA konkurriert und die NusA-Synthese auf bis 230 % steigert. Dabei sind die beobachteten tRNA-Effekte im Vergleich zu den Erwartungen, die aus Untersuchungen *in vivo* resultierten, ungewöhnlich stark. Der zusätzlich zur Ausbeute erhöhte Anteil an vollständigem Translationsprodukt könnte das Ergebnis einer Inhibition der unerwünschten Bindung von initierenden Ribosomen an interne Bereiche der mRNA sein. Letztere könnten aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Arginin- und Lysincodons mit der Ribosomenbindungsstelle in Wechselwirkung mit der mRNA treten (Atkins et al., 1990). Bei stärkerer Proteinsynthese

würden dann translatierende Ribosomen initiiierende Ribosomen verdrängen und dadurch das Auftreten von verkürzten Translationsprodukten möglicherweise unterdrücken.

Der Einfluß der Translationsstopcodon-Struktur auf die Synthese von H-FABP wurde untersucht und nur geringe absolute Unterschiede in der Terminationseffizienz des Systems gefunden. Translationsprodukte mit größerem als dem erwarteten Molekulargewicht konnten mit großer Wahrscheinlichkeit auf Leserasterverschiebungen am UGA(C)-Stopcon vom ersten in den zweiten und dritten Leserahmen sowie am UAA(U)-Stopcodon in den zweiten Leserahmen und eine Termination am nächsten stromabwärts liegenden Stopcodon zurückgeführt werden.

Der Einfluß der Länge und der Sekundärstruktur der 3'-UTR (3'-nicht-translatierte Sequenz) der H-FABP-codierenden mRNA auf die Proteinausbeute und die Halbwertzeit der mRNA wurde untersucht. Eine geringfügige Stabilisierung resultiert aus der Anwesenheit einer ca. 150 Nukleotide langen 3'-UTR ohne besondere Struktur. Dagegen bewirkt eine starke Sekundärstruktur am 3'-Terminus eine enorm erhöhte Proteinsyntheseleistung sowie eine bis zu dreizehnfach erhöhte Halbwertzeit der mRNA im Translationssystem. Die Translation von Stopcodon-loser mRNA sollte nicht terminationsfähig, am 3'-Ende festsitzende Ribosomen zur Folge haben. Eine dadurch denkbare Stabilisierung der mRNA gegenüber exonukleolytischer Degradation wurde jedoch nicht beobachtet.

Außer dem Schutz gegen 3'-Exonukleaseaktivität wurde untersucht welchen Einfluß die Translationseffizienz auf die Halbwertzeit einer mRNA hat. Dazu wurde die Halbwertzeit der für H-FABP codierenden mRNA bei minimaler, partieller und vollständiger Translation untersucht. Eine partielle Translation wurde durch vorzeitige Termination mit *amber* Stopcodons (UAG) an den Codonpositionen 3 und 88 der 133 Codons umfassenden Sequenz herbeigeführt. Zusätzlich wurde die vollständige Translation mit Hilfe einer *amber* Suppressor-tRNA wiederhergestellt. Ein kausaler Zusammenhang zwischen Translationseffizienz und mRNA-Stabilität konnte als sehr wahrscheinlich eingestuft werden. Je häufiger eine mRNA translatiert wird und je größer der translatierte Bereich, um so größer ist ihre Halbwertzeit. Da die Translation selbst die Halbwertzeit der mRNA beeinflusst, wird postuliert, daß der auf der mRNA wandernde Translationsapparat die mRNA vor endonukleolytisch initiiierter Degradation schützt. Demnach müßte eine mRNA nicht per se gegen endonukleolytischen Abbau stabil sein, um hohe Translationsraten erzielen zu können. Vielmehr scheint eine effizient translatierte mRNA durch die Translation selbst stabilisiert zu werden. Die dadurch erhöhte Halbwertzeit könnte dann in synergetischer Weise wiederum eine verbesserte Proteinsynthese zur Folge haben.

Mit Hilfe von Antibiotika wurde der Einfluß einzelner Schritte der Translation auf die mRNA-Stabilität untersucht. Eine Hemmung der Proteinsynthese wurde durch Eliminierung der Ribosomenbindungstelle und durch die Wirkung verschiedener Translationsantibiotika für die Initiation (Aurintricarbonsäure) und Elongation (Chloramphenicol und Puromycin) herbeigeführt und nach einer Korrelation zu der resultierenden Stabilität einer mRNA gesucht.

Interessanterweise zeigen sowohl Aurintrinricarbonsäure als auch Chloramphenicol translationsunabhängige stabilisierende Wirkung auf translatierbare und nicht translatierbare mRNA. Für diesen ebenfalls *in vivo* beobachteten Effekt von Chloramphenicol wurde eine Titrierung der begrenzten Anzahl an Ribonukleasen aufgrund eines durch Chloramphenicol indirekt induzierten Überschusses an ribosomaler RNA postuliert (Lopez et al., 1998). Da aus dem zellfreien Translationsystem chromosomale DNA jedoch weitgehend entfernt und darüberhinaus die unter der Kontrolle von *E. coli* RNA-Polymerase stehende Transkription von rRNA durch den Einsatz des Antibiotikums Rifampicin blockiert wurde, kann weder eine gesteigerte rRNA-Synthese noch eine früher vorgeschlagene instabile Komponente des Degradosoms, welche eine fortlaufende Proteinsynthese erforderte (Brawerman, 1993) verantwortlich für die translationsunabhängige mRNA-Stabilisierung sein. Hier zeigt sich der Vorteil des hier verwendeten zellfreien Translationsystems gegenüber zellulären Systemen, da in dem offenen System Effekte, die sich auf DNA-Replikations- oder Transkriptionsebene abspielen und nur indirekten Einfluß auf die Translationseffizienz und die mRNA-Stabilität haben, können hier nicht das Ergebnis nicht verfälschen.

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen in bezug auf die Expressionsrate und die Stabilität des Templats wurde die Methodik der Expressions-PCR (E-PCR) optimiert, bei der mit geringem Zeitaufwand kleinste Mengen von Gensequenzen amplifiziert und gleichzeitig mit Regulationselementen für die zellfreie *E. coli* Proteinbiosynthese versehen werden können. Für eine effektive Transkription zeigte sich eine zusätzliche Sequenz von fünf Basenpaaren stromaufwärts des Promoters als ausreichend. Entgegen den Erwartungen, die sich aus früheren Untersuchungen *in vivo* ergaben (Olins et al., 1988; Olins & Rangwala, 1989), findet in Abwesenheit der 5'-terminalen Sekundärstruktur des T7 Pagenens 10 keine effiziente H-FABP-Synthese statt. Der Grund hierfür liegt vermutlich in einer enorm reduzierten Stabilität der entsprechenden mRNA gegen Endoribonukleasen. Durch die Anwesenheit der 3'-terminalen Sekundärstruktur des T7 Transkriptionsterminators kann die Proteinsynthese auf 280%, höchstwahrscheinlich aufgrund einer Stabilisierung der mRNA gegen 3'-Exonukleasen, gesteigert werden. Obwohl der direkt auf die für H-FABP codierende Sequenz folgende Terminator diesen positiven Effekt auf die Translation ausübt, konnte die Proteinausbeute durch die Positionierung eines 22 Nukleotide umfassenden "spacers" (Abstandhalter) zwischen Translationstopcodon und Terminator nochmals 2.2-fach erhöht werden. Da die Ausdehnung des spacers etwa der eines ribosomenbedeckten mRNA-Segments entspricht (Moazed et al., 1986), könnte es sein, daß die unmittelbare Nachbarschaft der starken Sekundärstruktur des Terminators zur translatierten Region mit einem aktiven Translationsapparat interferiert. Oder eine Denaturierung der 3'-terminalen Sekundärstruktur durch translatierende Ribosomen könnte in Abwesenheit des spacers zu einer Destabilisierung der mRNA gegen 3'-Exonukleasen führen. Aus ökonomischen Gründen und um Zeit zu sparen wurde die E-PCR mit vier Primern, zwei genspezifischen Adapterprimern und zwei universell einsetzbaren Verlängerungsprimern in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Amplifikation

des Zielgens verläuft dabei auch in Gegenwart eines fünf Millionen-fachen Überschuß von komplexer Kompetitor-DNA noch hochspezifisch und mit großer Ausbeute. Das nicht aufgereinigte E-PCR-Produkt kann direkt für die Proteinsynthese eingesetzt werden, und es kann eine nahezu ebenso hohe Syntheserate erzielt werden, wie mit einem bereits optimierten Plasmidtemplat. Ein über die E-PCR-Primer eingefürter und am C-Terminus des H-FABP exprimierter Affinitäts-tag wurde zur effektiven und sauberen Abtrennung des Translationsprodukts eingesetzt. Die Bindungsaktivität von H-FABP zu Ölsäure ist, unabhängig davon ob vom Plasmid oder vom PCR-Produkt synthetisiert, nahezu identisch. Daher sind während der PCR möglicherweise auftretende Mutationen, welche zu falschen Translationsprodukten führen könnten, sehr wahrscheinlich vernachlässigbar. Die verfeinerte Methodik der E-PCR scheint prinzipiell für die sehr schnelle und effiziente Amplifikation einer gering konzentrierten Gensequenz aus einem komplexen DNA-Gemisch wie z.B. einer cDNA-Bibliothek oder Intron-losem Genom geeignet zu sein. Damit könnte die Konvertierung dieser Sequenz in ein effizientes Templat für die Proteinsynthese, sowie die Aufreinigung des synthetisierten Proteins deutlich beschleunigt werden.

Die Halbwertszeit des PCR-Produkts im Proteinsynthesystem und der Zeitpunkt an dem die H-FABP-Synthese zur Sättigung kommt liegen eng beieinander. Die Stabilität des PCR-Produkts könnte daher ein limitierender Faktor für die Proteinausbeute sein. Die enorm verbesserte Syntheseleistung von "Proteinbioreaktoren", bei denen dem Syntheseansatz Reaktionskomponenten kontinuierlich zugeführt und verbrauchte Komponenten entfernt werden, geht mit enorm verlängerten Zeitperioden für die Proteinsynthese einher (Spirin et al., 1988; Kim et al., 1996; Yao et al., 1997; Kim & Choi, 1996; Stiege & Erdmann, 1995; Nakano et al., 1999). Zukünftige Experimente werden zeigen, ob E-PCR-Produkte über längere Inkubationszeiträume gegen Degradation resistent sind, oder ob Modifikationen zur Stabilisierung in die PCR-Produkte eingeführt werden müssen. Dessenungeachtet wird für dieses System zusammen mit den zukünftigen Verbesserungen der zellfreien Expression die Ermöglichung der beschleunigten Synthese von Proteinen im Milligrammbereich je Milliliter Reaktionslösung mit relativ geringem Aufwand vorhergesagt. Dadurch würden in Zukunft schneller komplexere Analysen von Proteinen wie z.B. die Strukturbestimmung durch Kernmagnetische Resonanzspektroskopie oder Röntgenstrukturanalyse ermöglicht werden. Aber auch die Synthese größerer Mengen von Proteinen, die sich der Synthese in zellulären Systemen entziehen, wäre deutlich erleichtert. Dabei stellt die hier vorgestellte Methode eine vollständige *in vitro* Technik dar. Letzlich können damit auch Limitierungen bezüglich gesetzlicher Beschränkungen und Sicherheitsbestimmungen beim Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen deutlich verringert werden.

## Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene Funktionselemente einer mRNA in ihrem Einfluß auf die zellfreie Proteinbiosynthese untersucht. Dies diente in erster Linie dazu, einen Überblick über limitierenden Parameter einer mRNA im Hinblick auf die besonderen Bedingungen eines *in vitro* Translationssystems zu bekommen. Aufgrund der enormen Komplexität des Systems konnten manche Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit nur angerissen werden. Die erhaltenen Ergebnisse dienen als Anknüpfungspunkt für tiefergehende Untersuchungen. Es wurden jedoch einige Besonderheiten des *in vitro* Systems wie eine im Gegensatz zu lebenden Systemen praktisch nicht stattfindende Limitierung der Proteinsynthese durch die Translationsinitiation bzw. -termination eines stark translatierten Gens aufgedeckt. Des Weiteren wurden Methoden zur Steigerung der Proteinausbeute entwickelt bzw. verfeinert, die speziell bei der *in vitro* Translation Anwendung finden.

Fernziel ist es, anhand der Primärstruktur einer mRNA eine Vorhersage über die Translationseffizienz treffen zu können. Zusätzlich ist eine Vorhersage, wie das Translationssystem modifiziert werden kann, um den Bedürfnissen einer individuellen mRNA gerecht zu werden, wünschenswert.

Die hier vorgestellte Verwendung von *in vitro* transkribierter Wildtyp-tRNA sowie einer chimären tRNA stellt ein interessantes Werkzeug zur Aufdeckung der Limitierung der Translation durch die Konzentration einer endogenen Aminoacyl-tRNA dar. Im nächsten Schritt muß ermittelt werden, ob dieses System zur Identifizierung von weiteren möglicherweise limitierenden Aminoacyl-tRNAs universell anwendbar ist. Schließlich müßten dann gezielt entsprechende Aminoacyl-tRNA-Synthetasen analysiert werden, ob diese die Proteinsyntheseleistung begrenzen. Durch entsprechende Modifikationen des Translationssystems könnte dann möglicherweise die große Variabilität in der Expressionseffizienz verschiedener Gene mit unterschiedlich ausgeprägtem Codongebrauch langfristig eingeschränkt und eine definierte Syntheseleistung auf höherem Niveau vorhergesagt werden. Eine auf diesem Wege verbesserte Translation ist für aufwendigere Anwendungen der zellfreien Proteinsynthese unerlässlich wie der Darstellung von Proteinen mit isotope markierten Aminosäuren oder dem gezielten Einbau von unnatürlichen Aminosäuren an bestimmten Position mit Hilfe der Suppression der Translationstermination. Denn die Herstellung von isotope markierten Aminosäuren und die teilweise auf chemischem Wege ablaufende Generierung von tRNAs, die mit unnatürlichen Aminosäuren beladen sind, stellen bedeutsame Kosten- und Zeitfaktoren dar. Aus ökonomischer Sicht ist die Ermöglichung einer zuverlässig hohen Einbauraten für diese Komponenten eine enorme Verbesserung.

Für eine dynamische Verbesserung von computergestützten Vorhersagen höherer RNA-Strukturen und deren Einfluß auf die Proteinsynthese müssen in möglichst kurzen Zeiträumen zahlreiche empirische Daten für die Syntheseleistung in Abhängigkeit solcher Strukturen generiert werden können. Das *in vitro* Translationssystem sollte sich hierfür aufgrund der Mög-

lichkeit zu extrem schnellen Analysen besonders gut eignen. In dem offenen System können Reaktionsparameter relativ einfach verändert werden. So stellt die Hybridisierung von Antisense-Nukleinsäureoligomeren gegen mRNA zur Simulation von Sekundärstrukturen sicherlich ein interessantes Werkzeug zur Untersuchung der Abhängigkeit der Translationseffizienz von der höher geordneten Struktur der mRNA dar. Um diesbezüglich harte Aussagen machen zu können, müssen Reihenuntersuchungen folgen, um Einflüsse der Oligomergröße, -zusammensetzung und der Position der Hybridisierung bestimmen zu können.

Aufgrund in der Arbeit ermittelten relativ großen Stabilität der untersuchten mRNA scheinen die hier verwendeten Sequenzelemente des T7 Phagengens 10 zum Schutz der mRNA gegen enzymatischen Abbau bereits weitgehend optimiert. Zukünftig sollten mit diesem System mit Hilfe der *in vitro* Proteinbiosynthese in einigen Fragestellungen genauere Untersuchungen zur mRNA-Degradation gemacht werden können als dies mit Hilfe lebender Zellen bisher möglich ist, da unerwünschte Nebeneffekte z.B. auf Transkriptionsebene oder bedingt durch ko-exprimierte Faktoren ausgeschlossen werden können. Darüberhinaus könnte der Einsatz von synthetischen mRNAs, die an bestimmten Positionen mit nicht hydrolysierbaren Nukleotidanaloga modifiziert sind, weitere Einblicke in die Regulation der mRNA-Degradation liefern.

Die Charakterisierung der Expressionsprodukte der enorm großen und ständig wachsenden Anzahl von neu gefundenen Genen, von denen nur die Nukleotidsequenz, jedoch keine Funktion bekannt ist, stellt eine große Herausforderung dar. Die Methode der Expressions-PCR dient der deutlichen Vereinfachung und Beschleunigung der Herstellung der Geneprodukte in größeren Ausbeuten. Zunächst muß geklärt werden, ob die Stabilität eines PCR-Produkts ein begrenzender Faktor für die Expressionseffizienz bei Langzeitinkubationen ist. Durch die Verwendung von modifizierten, nicht hydrolysierbaren PCR-Primern könnte eine eventuell vorliegende, die Proteinsynthese limitierende exonukleolytische Degradation des PCR-Produkts minimiert werden. Zusammen mit apparativen und weiteren Verbesserungen des Systems bezüglich dessen Biochemie sollte es in näherer Zukunft möglich sein unter Umgehung langwieriger gentechnischer Methoden Proteine im zellfreien System im Milligrammbereich je Milliliter Reaktionslösung synthetisieren zu können. Im nächsten Schritt müßte die Breite der Anwendbarkeit der Methode z.B. für die Amplifikation und Umwandlung von Genen aus cDNA-Bibliotheken in eine exprimierbare Form ermittelt werden. In Zukunft könnten möglicherweise für eine weitere Beschleunigung der Analytik aber auch zur gezielten Selektion von Genen mit bestimmten Eigenschaften degenerierte PCR-Primer eingesetzt werden um z.B. ein bestimmtes Spektrum von Genen parallel zu isolieren und deren Produkte im zellfreien Proteinsynthesystem koexprimieren zu können. Schließlich ist es auch prinzipiell denkbar durch Verwendung von randomisierten Primern in Kombination mit der sogenannten "ribosome display" Technik auf bezüglich der Proteinsyntheseleistung optimale 5'-nicht translatierte Sequenzen hin zu selektieren oder diese sogar zu evolvieren.