

## 4. Ergebnisse

Die zellfreie Proteinbiosynthese erfolgte im sogenannten S30-Zellextrakt basierend auf dem *Escherichia coli* Stamm D10 unter den im Labor von Dr. Stiege optimierten Reaktionsbedingungen. Als Matrizen für die Proteinsynthese wurden sowohl gereinigte messenger RNAs als auch zirkuläre Plasmid-DNA sowie linearisierte Plasmid-DNA und PCR-Produkte eingesetzt. mRNAs und Plasmide werden mit vorangestelltem “m“ bzw. “p“ (z.B. mHMFA, pHMFA) gekennzeichnet. Zur Identifizierung von Matrizen gleicher Herkunft wird das zur Linearisierung des Plasmids bzw. zur Definierung des 3'-Endes verwendete Restriktionsenzym in Klammern gesetzt (z.B. mHMFA(EcoRV)). Informationen über Plasmid- und mRNA-Sequenzen sind im Anhang (Kapitel 8) beschrieben. Teilweise wird zugunsten einer besseren Übersicht eine vereinfachte Nomenklatur für tRNAs verwendet. Im Falle einer eindeutigen tRNA wird mit “t“ und der zu beladenden Aminosäure sowie dem tiefgestellten Anticodon abgekürzt (z.B. tLys<sub>UUU</sub>). Anstelle des deutschen Begriffs “Starter-Oligonukleotid“ wird der im deutschen Sprachraum übliche Begriff “Primer“ und in Ahnlehnung an den englischen Begriff “template“ der Begriff “Templat“ anstelle von “Matrize“ verwendet.

In den ersten Kapiteln (4.1.-4.5) werden Ergebnisse zu Untersuchungen der zellfreien Translationsinitiation, -elongation und -termination in Abhängigkeit der auf der mRNA gespeicherten Information dargestellt. Es folgen dann Ergebnisse zu Untersuchungen der messenger RNA-Stabilität (4.6). Kapitel 4.7 beschreibt die anwendungsorientierte Generierung von PCR-Produkten und deren Einsatz in der zellfreien Proteinbiosynthese. In Kapitel 5. folgt eine zusammenfassende Diskussion der in den einzelnen Kapiteln bereits detailliert diskutierten Ergebnisse.

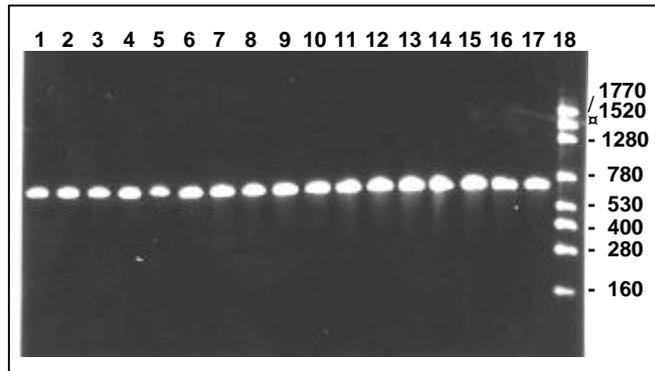
## 4.1 Einfluß der 5'-terminalen codierenden Sequenz auf die Synthese von H-FABP

### 4.1.1 Einfluß des zweiten Aminosäurecodons auf die Synthese von H-FABP

Für in *Escherichia coli* exprimierte mRNA wurde ein beträchtlicher Einfluß des zweiten, dem Starttriplett AUG folgenden Aminosäurecodons auf die Proteinsynthese *in vivo* beschrieben (Hui et al. 1984, Looman et al., 1987; Cantrell et al., 1991). Hier wird die Hypothese untersucht, nach der sich das zweite Codon im zellfreien Translationssystem andersartig auf die Proteinsynthese auswirken könnte als *in vivo*, da hier deutlich veränderte Reaktionsbedingungen zugrunde liegen. Der Einfluß des zweiten Codons auf die zellfreie Proteinsynthese wurde exemplarisch am Beispiel der Synthese des Fettsäure Bindenden Proteins aus Rinderherz (bovine heart fatty acid binding protein) H-FABP (Billich et al., 1988) untersucht.

Es wurden ausgehend vom Plasmid pHMFA (Merk et al., in Bearbeitung), codierend für H-FABP, insgesamt 17 Plasmid-Mutanten und entsprechende *in vitro* transkribierte mRNAs hergestellt (Abb. 2), welche sich im zweiten Aminosäurecodon unterscheiden. Dazu wurden die ersten beiden Nukleotide des zweiten Aminosäurecodons mutiert. Zusätzlich wurde eine Mutante mit dem zweiten Codon AAA, codierend für Lysin, hergestellt (Abb. 3).

Abb. 2



*Kontrolle der 17 in vitro transkribierten mRNAs*  
Die Mutanten von mHMFA(EcoRV) wurden über *in vitro* Transkription unter der Kontrolle von T7 RNA-Polymerase ausgehend vom Plasmid pHMFA hergestellt. Das Plasmid wurde zur Generierung von run-off Transkripten zuvor mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten. Die Integrität der aufgereinigten Transkripte wurde im 1,5% denaturierenden Agarosegel überprüft (Spuren 1-17). In Spur 18 sind RNA Größenstandards aufgetragen und die Größe der Fragmente in Kilobasen angegeben.

Abb. 3

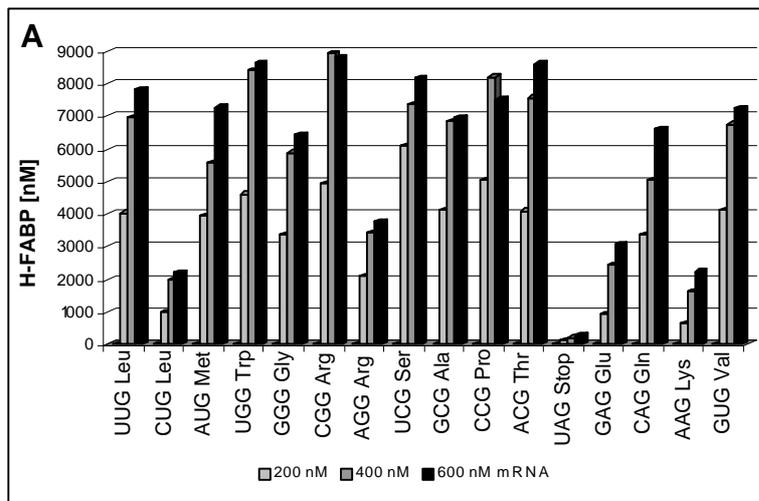
Codon-Nr.:	1	2	3
Standard-Mutanten	AUG, <b>NNG</b> , GAC		
Lysin-Mutante	AUG, <b>AAA</b> , GAC		

*Ausschnitt aus codierendem Translationsinitiationsbereich von mHMFA und Mutanten*

Alle 16 möglichen Varianten an den Positionen N (fettgedruckt) wurden mit den vier Nukleotiden A, C, G und U realisiert.

Die Messenger RNAs wurden als Templat für die zellfreie Proteinsynthese unter unseren Standardbedingungen eingesetzt. Die Ausbeuten an H-FABP wurden anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Material (Abb. 4<sub>A</sub>) und die Homogenität der Produkte über ein Autoradiogramm nach SDS-PAGE bestimmt (Abb. 4<sub>B</sub>).

Abb. 4



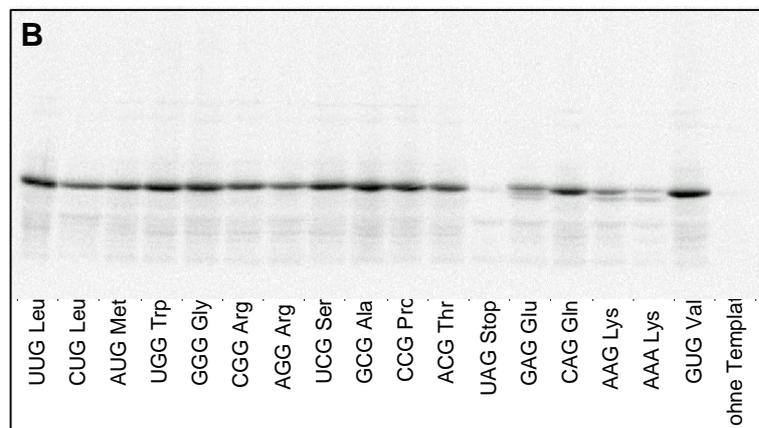
#### Expression von H-FABP abhängig vom zweiten Codon: Ausbeute und Produktthomogenität

Die Mutanten von mHMFA(EcoRV) wurden jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen von 200, 400 und 600 nM für die zellfreie Proteinsynthese eingesetzt. Nach 120 min Inkubationszeit wurden aus Aliquots der Reaktionsansätze

**A** der Anteil an TCA-fällbarer Radioaktivität bestimmt und daraus die molare Menge an synthetisiertem Protein im Reaktionsansatz berechnet und

**B** Aceton-gefälltes Gesamtprotein mittels SDS-PAGE (15% Polyacrylamid) getrennt und ein Autoradiogramm des Gels erstellt. Hierfür wurden Reaktionsansätze mit 200 nM mRNA eingesetzt.

Es sind jeweils das zweite Codon und die entsprechend eingebaute Aminosäure der jeweiligen Mutanten angegeben.



Der Pfeil gibt die Position des synthetisierten H-FABP im Gel an. Die für GAG, AAG und AAA direkt darunter liegende deutlich sichtbare Nebenproduktbande wurde identifiziert (C).



#### Identifizierung der stärksten Nebenproduktbande bei der Synthese von H-FABP

Die für die Aminosäuren 9-10 codierende mHMFA-Sequenz: TGG AAG weist große Ähnlichkeit mit der Ribosomenbindungstelle auf. In geringem Abstand dazu folgt das Codon 12 GUG(Val). Zusammen bilden die beiden Elemente ein Translationsinitiationssignal. Daher wurde am Beispiel der Lysyl-Mutante mit AAG an zweiter Codonposition eine stille Mutation in Codon 12 zum nicht-Initiationscodon GUU eingeführt. Nach Synthese der beiden Mutanten H-FABP<sub>AAG2,GUG12</sub> (Spur 1) und H-FABP<sub>AAG2,GUU12</sub> (Spur 2) wurden die radioaktiv markierten Produkte im Autoradiogramm nach SDS-PAGE analysiert. Die Mutation im zwölften Codon hat ein Verschwinden des Nebenprodukts (untere der beiden Banden in Spur 1) zur Folge und dabei aber keinen Einfluß auf die Ausbeute des Hauptprodukts. Das Nebenprodukt ist also eine verkürzte Variante von H-FABP mit Initiation am Codon 12 GUG.

Die Translationseffizienz von H-FABP ist sehr stark abhängig vom zweiten Aminosäurecodon. Ein bis zu zehnfacher Unterschied in der Expressionseffizienz von vollständigem Produkt wurde gefunden. Dabei tritt dieser Effekt in einigen Fällen beim Austausch nur einer einzelnen Base auf. Die meisten Mutanten weisen ähnliche, hohe Translationsraten auf. Dagegen findet geringe Expression bei den Mutanten mit CUG(Leu), AGG(Arg), GAG(Glu), AAG(Lys) und AAA(Lys) statt. Im Falle der untersuchten Codons für Leucin und Arginin UUG(Leu) und CGG(Arg) findet hohe Expression, dagegen für CUG(Leu) und AGG(Arg) nur geringe Expression statt. Diese Unterschiede in der Expression sind also unabhängig von der in das Protein eingebauten Aminosäure.

Die Codons AAA und CUG treten in Protein-codierenden Sequenzen des *E. coli* Genoms in stark translatierten Genen und an der zweiten Codonposition mit hoher Frequenz auf (Gold et al., 1981; Gren et al., 1984). AAA wurde *in vivo* mit hohen Translationsraten in Verbindung gebracht (Looman et al., 1987). Im Gegensatz dazu werden die entsprechenden H-FABP-Mutanten in diesem System mit sehr geringer Ausbeute synthetisiert. Bei extrem geringer Expression (Glu, Lys) nimmt darüberhinaus der Anteil an vollständig synthetisiertem Produkt im Vergleich zum gesamten Translationsprodukt sehr stark ab (Abb. 4B).

Es ist bekannt, daß bei Anwesenheit von mehr als einem Translationsstartcodon in passendem Abstand zur Ribosomenbindungstelle diese auch parallel als Initiationscodons verwendet werden. Es wurde auch gezeigt, daß aufgrund der Anwesenheit eines zusätzlichen, weniger effizienten Startcodons die Translation inhibiert werden kann (Munson et al., 1984; Singer et al., 1981; Wulff et al., 1984). Neben den effektiven klassischen Startcodons AUG, GUG und UUG wurden auch die Codons AUA, AUU und CUG als schwache Startcodons beschrieben (Hartz et al., 1991; Munson et al., 1984; Stormo et al., 1982; Shinedling et al., 1987). Daher ist nicht auszuschließen, daß die geringe Translationsrate der Mutante H-FABP<sub>Leu2(CUG)</sub> auf eine Translationsinitiation am zweiten Codon CUG zurückzuführen ist, womit die Gesamttranslation vermindert wird..

Es wäre auch denkbar, daß die unterschiedlichen Expressionsraten der H-FABP-Mutanten auf tRNA-Effekte zurückführbar sind. Die in diesem Fall in Frage kommenden limitierenden Faktoren für die Proteinsynthese wären 1. die Konzentration der tRNA im Translationssystem für das entsprechende zweite Codon bzw. 2. die Aminoacylierungseffizienz bezüglich dieser tRNA (Kapitel 4.1.2) und 3. die tRNA-Struktur (Kapitel 4.1.3). Für den ersteren Fall ist zwar eine hohe tRNA-Konzentration in *E. coli* für die tRNAs tLeu1 und tLys (Decodierung von CUG und AAA bzw. AAG) beschrieben worden (Ikemura et al., 1981), die tatsächliche Konzentration der tRNAs nach der Präparierung des zellfreien Translationssystems ist jedoch nicht bekannt. Für den letzteren Fall wäre eine Präferenz für bestimmte tRNAs aus einer Gruppe isoakzeptierender tRNAs (Beladung mit der selben Aminosäure) für die Decodierung des zweiten Codons denkbar. Eine solche bevorzugte tRNA könnte z.B. an der A-Stelle des Ribosoms die geringste sterische Hinderung in Nachbarschaft zur Initiator-tRNA an der P-Stelle aufweisen.

Es wurde auch schon die Hypothese aufgestellt, daß die in *E. coli* selten vorkommenden Codons im Anfangsbereich der codierenden Sequenz limitierend auf die Translation wirken könnten, und zwar um so mehr, je geringer der Abstand zum Startcodon ist (Chen & Inouye, 1990). GAG wurde als langsam translatiertes Codon beschrieben (Sorensen & Pedersen, 1991). Daher wurde untersucht, ob ein Verschieben des Codons GAG von Position 2 nach Position 13 zu einer gesteigerten Proteinsynthese führt (Kapitel 4.1.4).

Der Einfluß der lokalen Faltungsstruktur der mRNA um den Translationsinitiationsbereich ist ein weiterer möglicher limitierender Faktor für die H-FABP-Expression (Kapitel 4.1.5). Tatsächlich wurden Korrelationen zwischen der Stärke einer lokalen mRNA-Sekundärstruktur

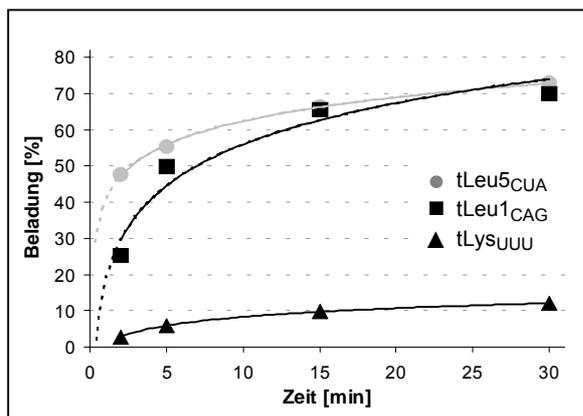
um die Ribosomenbindungstelle und der Proteinsyntheseeffizienz für *E. coli* beschrieben (de Smit & van Duin, 1994 und zugehörige Referenzen). Hier wurde der Einfluß einer theoretisch vorhergesagten Sekundärstruktur im äußeren 5'-Ende der Protein-codierenden Sequenz untersucht (Kapitel 4.1.5 und 4.1.6).

#### 4.1.2 Einfluß *in vitro* transkribierter tRNA auf die Synthese der H-FABP-Mutanten

Die in Kapitel 4.1.1 aufgestellte Vermutung, nach der die Abhängigkeit der H-FABP-Syntheserate vom zweiten Aminosäurecodon durch eine entsprechend limitierte tRNA- bzw. Aminoacyl-tRNA-Konzentration bedingt sein könnte, wurde überprüft. Dazu wurden *in vitro* Transkripte der Wildtyp *E. coli* tRNAs tLeu<sub>1CAG</sub> (Anticodon CAG, korespondierendes Codon CUG) tLys<sub>UUU</sub> (Anticodon UUU, korespondierendes Codon AAA) und tArg<sub>U</sub> (Anticodon UCU, korespondierende Codons AGA, AGG) hergestellt (Abb. 5<sub>B</sub>) und für die Synthese von H-FABP<sub>Leu2</sub>, H-FABP<sub>Lys2</sub> und H-FAB<sub>Arg2</sub> mit den Codons CUG, AAA bzw. AGG an zweiter Codonposition eingesetzt.

Die Aminoacylierbarkeit der tRNAs tLeu<sub>1CAG</sub> und tLys<sub>UUU</sub> wurde in der S100 Fraktion des Translationssystems untersucht (Abb. 5<sub>A</sub>). Da tArg<sub>U</sub> ist eine hohe Translationsaktivität zeigte, wurde hier eine ausreichende Aminoacylierbarkeit vorausgesetzt (s. Kapitel 4.4.1.).

Abb. 5



#### A Aminoacylierungskinetik von tLeu<sub>1CAG</sub> und tLys<sub>UUU</sub> in S100-Fraktion

10 µM tRNA tLeu<sub>1CAG</sub>, tLys<sub>UUU</sub> und die Kontroll-tRNA tLeu<sub>5CUA</sub> mit bekannter schneller Aminoacylierungskinetik (Gerrits et al., 2001) wurden in der S100-Fraktion des Translationssystems (2 µg/ml Proteinkonzentration) inkubiert. Das System wurde mit 30 µM <sup>14</sup>C-Lysin mit einer molaren Aktivität von 400 dpm/pmol bzw. mit 120 µM <sup>14</sup>C-Leucin (100 dpm/pmol) komplementiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden den Reaktionen Aliquots entnommen, die TCA-fällbare Radioaktivität gemessen und daraus die prozentuale Beladung der tRNAs mit der korrespondierenden Aminosäure berechnet.

#### B Herstellung der tRNA-codierenden Plasmide und *in vitro* Transkription

Für die Herstellung des tLeu<sub>1</sub>-codierenden Plasmids wurde das synthetisch hergestellte DNA-Oligomer 5'-TTC TAATACGACTCACTATAGCGAAGGTGGCGGAATTGGTAGACGCGCTAGCTTCAGGTGTTAGTGCC TTACGGACGTGGGGGTTCAAGTCCCCCCCCCTCGCACCAGGTGATCCATCCGGATC-3' über PCR mit den Primern F: 5'-CCGGAATTCTAATACGACTCACTATA-3' und R: 5'-CGCGGATCCGGATGGATCACC TGG-3' in Doppelstrang-DNA überführt und amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde dann über Ligation stumpfer Enden in das Plasmid pSP64 inseriert, das zuvor mit dem Restriktionsenzym SmaI linearisiert und anschließend an den 5'-Enden dephosphoryliert wurde.

Das tLys-codierende Plasmid wurde durch Einführung von Punktmutationen in der Anticodonsequenz aus der Ambersuppressorvariante des Plasmids ptLys (Gerrits et al., 2001) hergestellt.

Die neuen Plasmide wurden zur Generierung von run-off Transkripten mit dem 3'-Ende CCA vor der Transkription mit dem Restriktionsenzym BstNI verdaut. Die Nukleotidzusammensetzung und -konzentration, sowie die Magnesiumkonzentration waren abweichend von den Standardbedingungen im Transkriptionsansatz: 3 mM jeweils von ATP, CTP, GTP und UTP; 6.5 mM GMP und zusätzlich 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Nach Transkription und anschließender Aufreinigung unter unseren Standardbedingungen wurden die Transkripte für eine Minute bei 80°C denaturiert und eine Neufaltung der tRNA durch Abkühlen auf 30°C über einen Zeitraum von 20 Minuten ermöglicht.

tLeu<sub>1CAG</sub> zeigt eine in der Größenordnung ebenso hohe Aminoacylierungsrate wie die Kontroll-tRNA. tLys<sub>UUU</sub> zeigt eine vergleichsweise geringe Aktivität. Sie könnte somit einen limitierenden Faktor für die Synthese von H-FABP<sub>Lys2(AAA)</sub> darstellen. Allerdings wurde hier unmodifiziertes *in vitro* Transkript eingesetzt. Daher könnte dessen Aminoacylierungsrate auch durch die Geschwindigkeit einer posttranskriptionalen Modifikation limitiert sein.

Die Translationsreaktionen von H-FABP<sub>Leu2(CUG)</sub>, H-FABP<sub>Lys2(AAA)</sub> und H-FABP<sub>Arg2(AGG)</sub> wurden mit verschiedenen Konzentrationen der *in vitro* transkribierten tRNAs tLeu1<sub>CAG</sub>, tLys<sub>UUU</sub>, tArgU und der Kontroll-tRNA tLeu5<sub>CUA</sub> komplementiert. In keinem der untersuchten Fälle zeigten diese tRNAs jedoch einen Effekt auf die Syntheseausbeute der H-FABP-Mutanten (nicht dargestellt).

Um auszuschließen, daß vor allem für tLys<sub>UUU</sub> die Aminoacylierungsrate den limitierenden Faktor für die Proteinsynthese darstellt, wurden dieselben tRNAs außer tArgU im präparativen Maßstab aminoacyliert, aufgereinigt und, wie bereits für die unbeladenen tRNAs beschrieben, für Translationsreaktionen eingesetzt (nicht dargestellt). Hierfür wurde die Inkubationszeit für die Proteinsynthese von 90 min auf 10 min herabgesetzt, um die Möglichkeit einer Limitierung durch eine ungenügende Reacylierung der tRNAs zu vermeiden. Auch in diesen Fällen konnte jedoch keine Auswirkung auf die Syntheseausbeute der H-FABP-Mutanten beobachtet werden.

#### 4.1.3. Einfluß der tRNA-Struktur auf die Synthese der H-FABP-Mutanten

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, ist die vom zweiten Codon abhängige, reduzierte H-FABP-Synthese für drei untersuchte Beispiele nicht auf einen Mangel an entsprechender tRNA im Translationssystem und für mindestens ein Beispiel auch nicht auf unzureichende Aminoacylierungseffizienz dieser tRNAs zurückführbar.

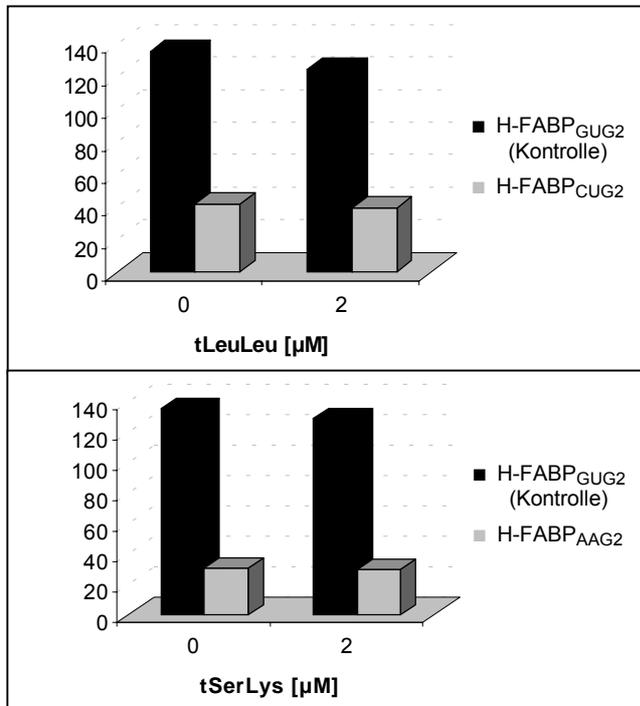
Die Hypothese der strukturellen Präferenz für die Decodierung des zweiten Aminosäurecodons wurde überprüft. Dazu wurden die Anticodons von zwei tRNAs, die keine Limitierung in der Translation zeigen derart mutiert, daß eine Entzifferung der kritischen zweiten Codons CUG und AAG durch diese chimären tRNAs möglich sein sollte. Eine gesteigerte Proteinsynthese der entsprechenden gering exprimierten H-FABP-Mutanten in Gegenwart dieser chimären tRNAs wäre dann ein starkes Indiz für eine strukturelle Präferenz bestimmter tRNAs für das zweite Codon.

Die tRNAs tLeu3<sub>CAA</sub> (Decodierung von UUG, Leu) und tSer1<sub>CGA</sub> (Decodierung von UCG, Ser) wurden zur Generierung der Varianten tLeu3<sub>CAG</sub> (tLeuLeu) und tSer1<sub>CUU</sub> (tSerLys) im Anticodon mutiert. Die neuen tRNAs sollten dabei mit Leucin bzw. Serin beladen werden und unter anderem die kritischen Codons CUG(Leu)<sub>2</sub> bzw. AAG(Lys)<sub>2</sub>, decodieren. Zur Herstellung der tRNA-Varianten wurden die Plasmide der entsprechenden Ambersuppressorvarianten psu+6 und psu+1 (Gerrits et al., 2001) in der Anticodonsequenz mutiert.

Eine hohe Translationsaktivität mit den chimären tRNAs kann durchaus erwartet werden, da 1. die Mutanten H-FABP<sub>Leu2(UUG)</sub> und H-FABP<sub>Ser2(UCG)</sub> im Gegensatz zu H-FABP<sub>Leu2(CUG)</sub> und H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub> in hoher Ausbeute synthetisiert wurden und 2. die entsprechenden *amber*-Suppressorvarianten tsu+6 und tsu+1 sehr gute Suppressionseigenschaften aufweisen (Gerrits et al., 2001).

Es wurde untersucht, ob in Gegenwart dieser neuen tRNAs die Ausbeute der gering exprimierten Mutanten H-FABP<sub>Leu2(CUG)</sub> und H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub> gesteigert werden kann (Abb. 6).

Abb. 6



#### *Einfluß der tRNA-Struktur auf die Synthese der H-FABP-Mutanten*

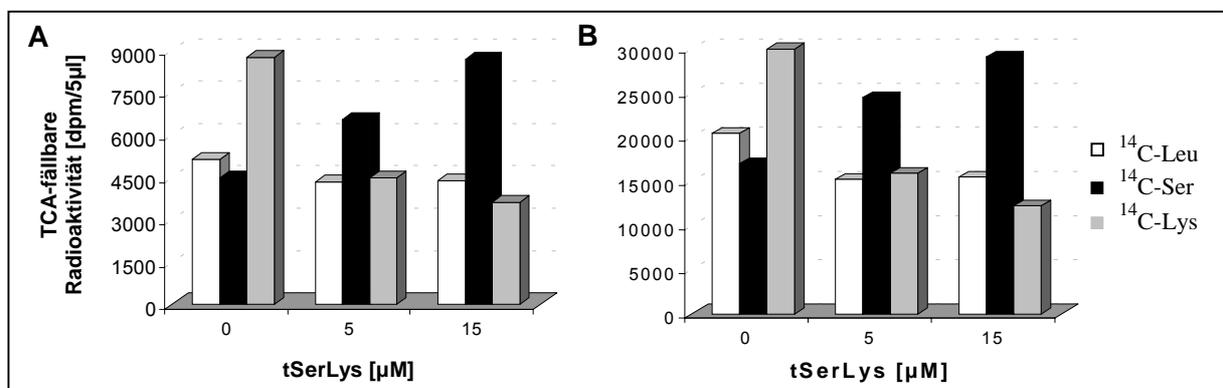
Die chimären tRNAs tLeuLeu und tSerLys wurden *in vitro* unter der Kontrolle von T7 RNA-Polymerase transkribiert. Die bereits beschriebene Aminoacylierbarkeit der tRNAs in der S100-Fraktion des Translationssystems liegt im Vergleich zur translationsaktiven tArgU in der selben Größenordnung (nicht dargestellt).

Die mRNAs, codierend für H-FABP<sub>Leu2(CUG)</sub> und H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub> sowie für H-FABP<sub>Val2(GUG)</sub> (Kontrolle) wurden in An- und Abwesenheit von 2 μM tLeuLeu bzw. tSerLys als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt. Die Syntheseausbeuten wurden anhand des Einbaus von <sup>14</sup>C-Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt bestimmt.

Keine der beiden chimären tRNAs zeigt einen signifikanten Einfluß auf die Syntheseausbeute der untersuchten H-FABP-Mutanten. Eine bevorzugte tRNA-Struktur für die Decodierung des zweiten Codons ist damit für die untersuchten Fälle unwahrscheinlich.

Die Syntheseausbeuten von H-FABP<sub>Leu2(CUG)</sub> und H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub> bleiben von der Anwesenheit der modifizierten tRNAs unbeeinflusst. Um einen Verlust der Translationsaktivität der künstlichen tRNAs aufgrund der eingeführten Modifikation auszuschließen, wurde am Beispiel von tSerLys dessen Fähigkeit untersucht, mit der Wildtyp tRNA tLys<sub>CUU</sub> um AAG-Codons der mRNAs für H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub> und H-FABP<sub>Val2(GUG)</sub> zu konkurrieren. (Abb. 7)

Abb. 7



*Funktionstest von tSerLys*

Die mRNAs für H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub> und H-FABP<sub>Val2(GUG)</sub> (Kontrolle) wurden mit verschiedenen Konzentrationen an tSerLys im Translationssystem inkubiert und jeweils ein Ansatz mit <sup>14</sup>C-Leucin, <sup>14</sup>C-Serin bzw. <sup>14</sup>C-Lysin versetzt. Dabei dient der Einbau von <sup>14</sup>C-Leucin als Maß für den Einfluß von tSerLys auf die Syntheseausbeute der H-FABP-Mutanten. Der Einbau von <sup>14</sup>C-Serin und <sup>14</sup>C-Lysin spiegelt in gegenseitiger Kontrolle die Aktivität von tSerLys wieder, den Konkurrenten um das Lysincodon AAG, die Wildtyp tRNA t<sub>Lys</sub><sup>CUU</sup>, zu verdrängen.

tSerLys hat für beide Mutanten einen leicht inhibierenden Einfluß auf die Syntheseausbeute. Dagegen ist die Aktivität in der Verdrängung des Einbaus von Lysin über t<sub>Lys</sub><sup>CUU</sup> zugunsten des Einbaus von Serin durch tSerLys sehr hoch. Bei 15 µM tSerLys wird etwa die Hälfte der Lysinreste in H-FABP durch Serin ersetzt. tSerLys ist also vergleichsweise sehr translationsaktiv.

Die künstliche tRNA tSerLys ist in der Translation von H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub> und H-FABP<sub>Val2(GUG)</sub> sehr aktiv. Etwa 50% der Lysinreste in H-FABP werden in Anwesenheit von 15 µM tSerLys durch Serinreste ersetzt. Dennoch läßt sich die Ausbeute an H-FABP<sub>(AAG,Lys)2</sub> in Gegenwart dieser tRNA nicht steigern.

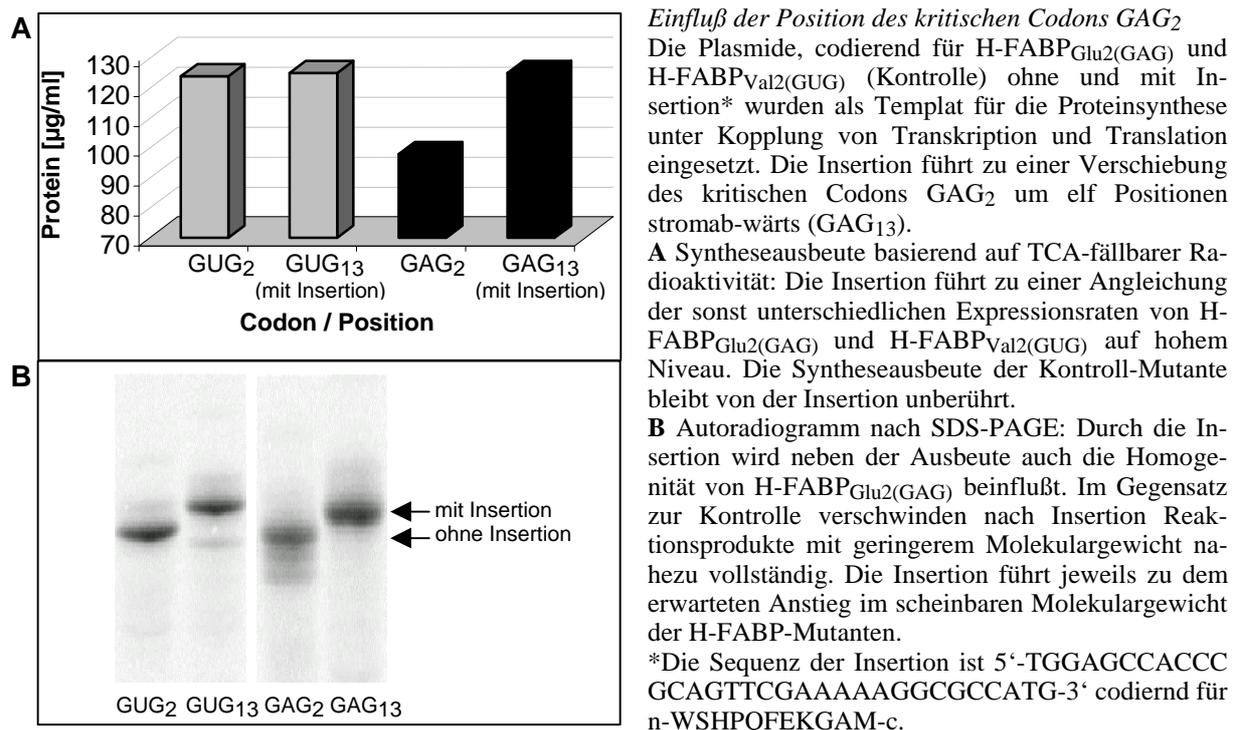
Die Abhängigkeit der H-FABP-Expressionsrate vom zweiten Aminosäurecodon ist für die untersuchten Fälle nicht auf tRNA-Effekte zurückführbar. Die in Frage kommenden limitierenden Faktoren für die Proteinsynthese: 1. tRNA-Konzentration 2. Aminoacyl-tRNA-Konzentration und 3. tRNA-Struktur konnten für einige Beispiele als sehr unwahrscheinlich eingestuft werden. Trotz des Einsatzes einer hohen tRNA-Konzentration, hohen Aminoacylierungsraten und nachgewiesener hoher Aktivität in der Translation von mindestens zwei tRNAs, ist kein positiver Einfluß dieser tRNAs auf die Translation der Mutanten mit geringer Expressionsrate nachweisbar. Außerdem wurde zuvor für zwei Beispiele gezeigt, daß auch die jeweils eingebaute Aminosäure selbst nicht für die große Variation der Expressionsraten verantwortlich ist.

#### 4.1.4 Einfluß der Position des kritischen Codons GAG<sub>2</sub> auf die Synthese von H-FABP

Es wurde die Annahme untersucht, nach der bestimmte Codons nur dann kritisch für die Expressionsrate eines Proteins sind, wenn sie im äußersten 5'-Bereich einer codierenden Sequenz lokalisiert sind (Chen & Inouye, 1990). Diese Hypothese wurde am Beispiel von H-FABP<sub>Glu2(GAG)</sub> überprüft. Dazu wurde durch Insertion einer kurzen codierenden Sequenz, die 11 Aminosäuren entspricht, zwischen dem Startcodon AUG und dem kritischen zweiten Codon GAG(Glu) letzteres Codon um elf Positionen stromabwärts verschoben. Die Plasmide pHMFA<sub>Glu2(GAG)</sub> und pHMFA<sub>Val2(GUG)</sub> (Kontrolle) wurden am Startcodon mit dem Restriktionsenzym NcoI linearisiert und ein Hybrid aus zwei synthetischen DNA-Oligomeren durch Ligation über die NcoI-Schnittstelle inseriert.

Die resultierenden Plasmide ohne und mit Insertion wurden als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt und die Translationseffizienz anhand des Einbaus von <sup>14</sup>C-Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt bestimmt (Abb. 8<sub>A</sub>). Die Integrität der Syntheseprodukte wurde anhand des Autoradiogramms nach SDS-PAGE überprüft (Abb. 8<sub>B</sub>).

Abb. 8



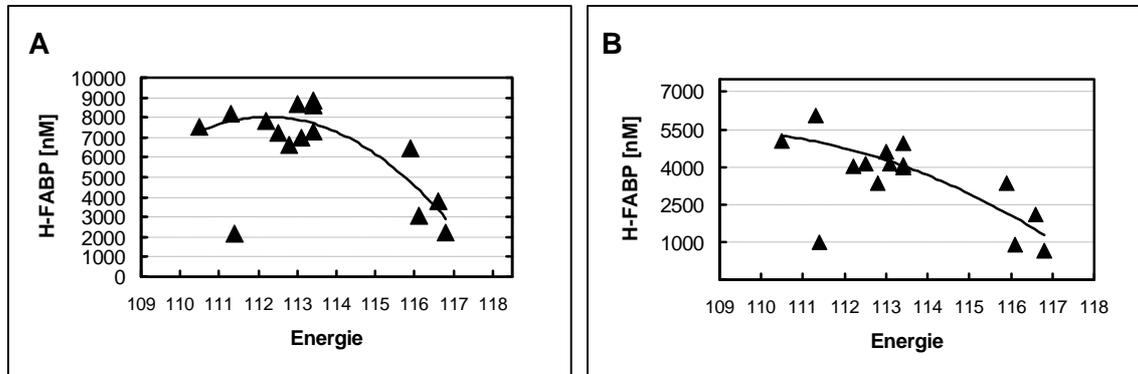
Die ursprünglich sehr unterschiedlich stark exprimierten H-FABP<sub>Val2(GUG)</sub> und H-FABP<sub>Glu2(GAG)</sub> werden aufgrund der Insertion mit gleicher, hoher Ausbeute synthetisiert. Auch die Homogenität der synthetisierten Proteine gleicht sich an. Offenbar trifft für dieses Beispiel die Hypothese zu, nach der kritische Codons um so mehr limitierend für die Expressionsrate eines Proteins sind, je geringer der Abstand zum Startcodon ist. Eine Verschiebung des kritischen Codons um elf Positionen stromabwärts führt zur Wiederherstellung des Normalzustands, der durch die meisten anderen, auf gleichem hohem Niveau exprimierten Mutanten definiert ist.

#### 4.1.5 Korrelation zwischen mRNA-Struktur und Expression der H-FABP-Mutanten

Da für einige gering exprimierte H-FABP-Mutanten als limitierendere Faktoren für die Proteinsynthese tRNA-abhängige Effekte aber auch die an zweiter Position eingebaute Aminosäure selbst ausgeschlossen werden konnten, wurde die Struktur der mRNA näher untersucht. Insbesondere ist von Interesse, ob eine Korrelation zwischen mRNA-Faltungsstruktur bzw. -energie und der Ausbeute an synthetisiertem H-FABP besteht.

Mit Hilfe der Computersoftware "RNAstructure 2.5" (Jaeger et al., 1989; Mathews et al., 1988; Walter et al., 1994; Zuker, 1989) wurden die Faltungsenergien der mRNAs für H-FABP<sub>NNG2</sub> berechnet. Die jeweils niedrigsten Energiewerte aus einer Auswahl von 20 alternativen Werten wurden grafisch gegen die Proteinausbeuten aufgetragen (Abb. 9).

Abb. 9



Energieplot

Die Faltungsenergien der mRNA-Mutanten für H-FABP wurden mit Hilfe des Computers berechnet. Die Syntheseausbeuten für H-FABP aus Reaktionsansätzen mit **A** 600 nM mRNA und **B** 150 nM mRNA wurden grafisch gegen die Faltungsenergie aufgetragen. Eine mögliche Tendenz für die Korrelation zwischen Proteinsynthese und Faltungsenergie ist jeweils durch eine Trendlinie angegeben.

Eine gewisse Korrelation zwischen Faltungsenergie und Proteinausbeute zeigt sich für alle bis auf eine Mutante mit dem Codon CUG,Leu2. Ein sehr ähnliches Bild ergibt sich auch bei der Anwendung der Software "RNAdraw 1.1" (Hofacker et al., 1994; Zuker & Stiegler, 1981; McCaskill, 1990; Turner et al., 1988; Freier et al., 1986; Jaeger et al., 1989; Brucoleri & Heinrich, 1988; He, 1991).

Mit "RNAstructure" lassen sich alternative Strukturen für eine RNA berechnen. Alle zwanzig Alternativstrukturen der jeweiligen mRNA-Mutante für H-FABP sagen die gleichen Basenpaarungen im Translationsinitiationsbereich vorher. Außerdem unterscheiden sich die berechneten Sekundärstrukturen aller untersuchten Mutanten untereinander nur im

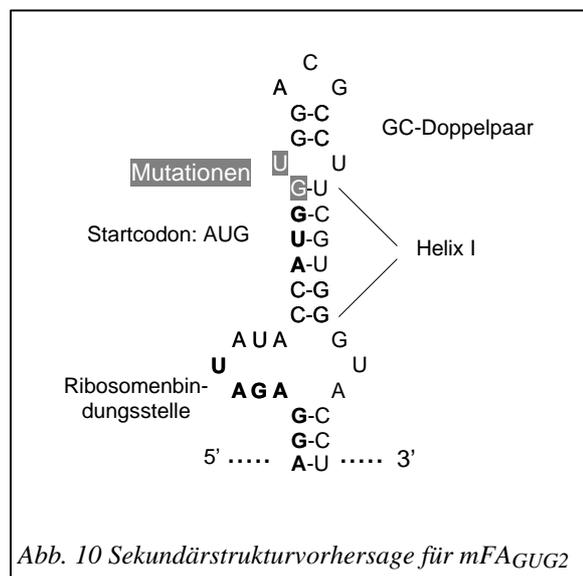


Abb. 10 Sekundärstrukturvorhersage für mFAGUG2

Bereich der zwei mutierten Basen. Exemplarisch ist in Abbildung 10 die vorhergesagte Sekundärstruktur um den Translationsinitiationsbereich der Mutante mFA<sub>GUG2</sub> abgebildet.

Gemeinsam ist allen Strukturen eine nur schwach von Sekundärstruktur betroffene Ribosomenbindungstelle. Es lassen sich prinzipiell nur drei Strukturklassen unterscheiden: 1. Keine der beiden mutierten Basen ist gepaart: 2. Eine der beiden mutierten Basen ist gepaart. 3. Beide mutierte Basen sind gepaart. Im dritten Fall entsteht eine durchgehende Helix, bestehend aus Helix I, zwei Basenpaaren unter Beteiligung der mutierten Nucleotide und dem direkt darauf folgenden GC-Doppelpaar (Abb. 10). Daher können Mutationen, die zu einer durchgehenden Helix führen auch als eine Art Schalter für die Generierung der durchgehenden Helix verstanden werden.

Interessanterweise weisen alle untersuchten mRNA-Mutanten mit einer solchen durchgehenden Helix (AAG2, AGG2 und GAG2) sehr geringe Translationsraten auf. Es liegt hier also eine Korrelation von zunehmender Ausprägung der Sekundärstruktur und abnehmender Translationseffizienz vor.

Die im Computer generierten Daten für Faltungsenergie und Sekundärstruktur werden hier lediglich als Hinweis für die tatsächlichen Verhältnisse verstanden, da sich die entsprechenden Programme noch im Entwicklungsstadium befinden. Auf eine experimentelle Bestätigung der erhaltenen Daten mußte aufgrund eines unverhältnismäßig großen Aufwands verzichtet werden. Dennoch ist die gefundene Tendenz zwischen Faltungsenergie und Proteinsynthese sowie zwischen Sekundärstruktur und Proteinsynthese zu berücksichtigen und sollte mit zukünftiger, höher entwickelter Software kontrolliert werden.

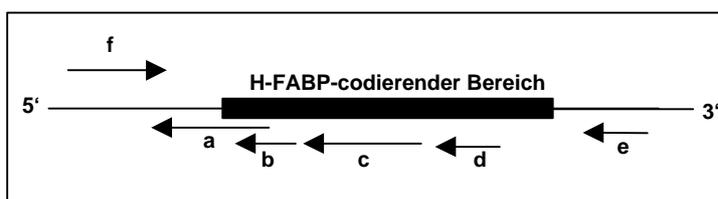
Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß der bis zu zehnfache Unterschied in der Expression der H-FABP-Mutanten, abhängig vom zweiten Aminosäurecodon, weder auf die eingebaute Aminosäure noch auf die Aktivität oder Struktur der decodierenden tRNA zurückzuführen ist. Stattdessen konnten Korrelationen zwischen Translationseffizienz und lokaler mRNA-Struktur bzw. Faltungsenergie im Translationsinitiationsbereich aufgezeigt werden. Daher sind möglicherweise für die Effizienz der Translation mit Bezug auf die Initiation nicht nur Sekundärstrukturen um die Ribosomenbindungstelle (de Smit & van Duin, 1994) sondern auch am äußeren 5'-Ende lokalisierte Sekundärstrukturen der Protein-codierenden Sequenz zu beachten. Diese Hypothese wurde auch früher schon aufgestellt (Liebhaber et al., 1992 und zugehörige Referenzen).

#### 4.1.6 Einfluß von Antisense-DNA-Oligomeren auf die Translation

Es wurde untersucht ob der Einfluß einer mRNA-Sekundärstruktur auf die zellfreie Translation durch Hybridisierung von Antisense-DNA-Oligomeren gegen die mRNA simuliert werden kann. Dabei ist auch von Interesse, ob durch eine derartige Manipulation die Wirkung der hypothetischen, translationsinhibierenden mRNA-Struktur am Start der H-FABP-codierenden Sequenz (siehe Kapitel 4.1.5) beeinflusst werden kann.

Einzelsträngige, synthetisch hergestellte Antisense DNA-Oligomere unterschiedlicher Größe wurden an verschiedene Bereiche von mHMFA hybridisiert (Abb. 11) und der Einfluß auf die Translationsausbeute untersucht (Abb. 12).

Abb. 11



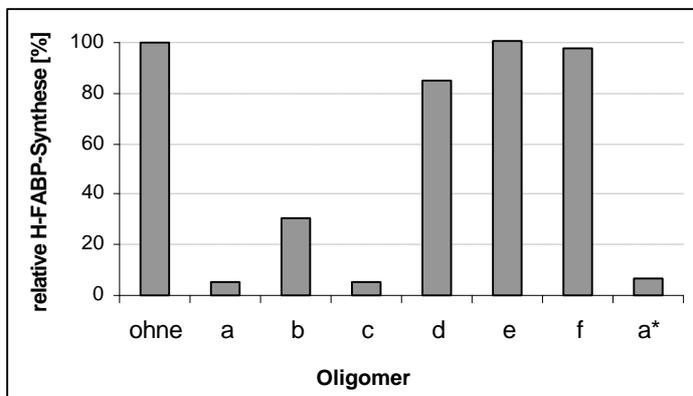
Schematische Darstellung der mRNA-Antisense-Oligomer-Hybride

Die einzelsträngigen DNA-Oligomere sind komplementär zu den Nukleotiden: (a) 45-75 mit Ribosomenbindungsstelle und Startcodon, (b) 66-81 am Beginn der codierenden Sequenz, (c und d) 83-113 bzw. 133-149

im codierenden Bereich und (e) 640-656 im 3'-nichttranslatierten Bereich der 746 Nukleotide umfassenden mHMFA. Außerdem wurde das Oligomer f ohne nennenswerte Komplementarität zur mRNA eingesetzt (Oligomersequenzen im Anhang).

Die Hybridisierung von 40 pmol mHMFA und 160 pmol Oligomer erfolgte durch Denaturierung für 30 Sekunden bei 90°C und Renaturierung für 60 Sekunden bei 50°C, 30 Sekunden bei 30°C und 120 Sekunden bei 4°C.

Abb. 12



Translationseffizienz von mRNA-Antisense-Oligomer-Hybriden

Die Hybridisierungsansätze gemäß Abbildung 11 wurden für die zellfreie Translation eingesetzt (400 nM mRNA). Zusätzlich wurde mHMFA mit Oligomer a ohne Hybridisierung eingesetzt (\*). Die H-FABP-Synthese wurde anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt bestimmt.

Die meisten der an die mRNA hybridisierten Oligomere zeigen starke Auswirkungen auf die Translationseffizienz. Oligomer a unterdrückt die Translation nahezu vollständig, sehr wahrscheinlich aufgrund einer ausblei-

benden Wechselwirkung der Ribosomenbindungsstelle mit der ribosomalen 16S-RNA. Dieser Effekt tritt unabhängig von den Hybridisierungsbedingungen auf (a\*). Das größte der im Protein-codierenden Bereich hybridisierenden Oligomere c inhibiert die Proteinsynthese ebenfalls nahezu vollständig, während die kleineren Oligomere b und d weniger inhibieren. Interessanterweise ist die Inhibition bei Oligomer b stärker als bei Oligomer d. Dies könnte auf eine größere Empfindlichkeit des Systems für Doppelstrangstrukturen am Start der Protein-codierenden Region hindeuten. Das im 3'-nichttranslatierten Bereich hybridisierende Oligomer e und das Oligomer f ohne nennenswerte Komplementarität zu mHMFA zeigen praktisch keine Inhibition im Vergleich zum Ansatz ohne Oligomer aber mit Hybridisierungsprozedur.

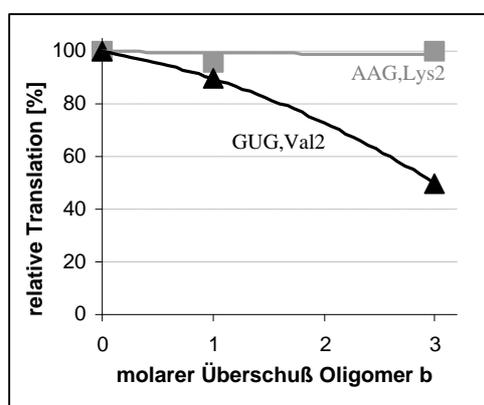
Dabei konnte für das Hybrid mit Oligomer e keine beschleunigte Degradation nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde über die Messung der Degradation von radioaktiv markierter mRNA (wie in Kapitel 4.6 beschrieben) mit und ohne hybridisiertem Oligomer erhalten (nicht dargestellt). Eine Degradationsbeschleunigung hätte von endogener RNase H-Aktivität ausgehen und zu unspezifischer Reduktion der Proteinsynthese aufgrund des Verlusts der schützenden 3'-terminalen Sekundärstruktur führen können (siehe Kapitel 4.6.1).

Alle Oligomere, die gegen den Translationsinitiations- oder den Protein-codierenden Bereich hybridisiert wurden, inhibieren die H-FABP-Synthese. Die Inhibition ist bei den größten Oligomeren am stärksten ausgeprägt und möglicherweise auf eine Behinderung des Translations-

apparates am Erkennen der einzelnen Funktionsbereiche zurückzuführen. Eine denkbare Beschleunigung der mRNA-Degradation im Hybrid mit einem Oligomer aufgrund endogener RNase H-Aktivität konnte für ein Beispiel ausgeschlossen werden (Abb. 12).

Das Oligomer b wurde für die Hybridisierung mit den mHMFA-Mutanten mHMFA<sub>Leu2(GUG)</sub> und mHMFA<sub>Lys2(AAG)</sub> eingesetzt. Wie im vorangegangenen Kapitel ausgeführt, ist die unterschiedliche Translationseffizienz dieser RNAs möglicherweise auf unterschiedlich stark ausgeprägte Sekundärstrukturen im Translationsinitiationsbereich zurückzuführen. Durch Hybridisierung von Oligomer b sollten diese Strukturen manipuliert und einander ähnlicher gemacht werden können. Dies könnte sich dann in einem geringeren Unterschied der Translationseffizienz beider mRNAs widerspiegeln (Abb. 13).

Abb. 13



*Einfluß des Antisense-Oligomers b auf die Translation von H-FABP<sub>Val2(GUG)</sub> und H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub>*

Das Antisense-Oligomer b, wurde an die Startsequenz der H-FABP-codierenden Sequenz der Mutanten mHMFA<sub>GUG,Leu2</sub> und mHMFA<sub>AAG,Lys2</sub> mit vorhergesagter unterschiedlich stark ausgeprägter Sekundärstruktur im Translationsinitiationsbereich hybridisiert, und die von den Hybriden ausgehenden Translationsausbeuten anhand des Einbaus von <sup>14</sup>C-Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt bestimmt.

In Abwesenheit des Oligomers wird H-FABP<sub>Val2(GUG)</sub> gegenüber H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub> mit etwa dreieinhalbfacher Ausbeute synthetisiert (400 nM mRNA). Dargestellt ist die relative Translation der Mutanten in Abhängigkeit des molaren Überschusses des hybridisierten Oligomers b. Mit zunehmendem molarem Über-

schuß des Oligomers gegenüber der mRNA nimmt die Ausbeute von H-FABP<sub>Val2(GUG)</sub> stark ab. Dagegen bleibt die Ausbeute von H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub> konstant. Zwar hybridisiert Oligomer b im Bereich des zweiten Codons, in dem sich die beiden Mutanten um zwei Nukleotide unterscheiden. Daher ist die Hybridbildung für beide Mutanten nicht exakt vergleichbar. Trotzdem kann dieses Ergebnis als Tendenz für die Bestätigung der aufgestellten Hypothese betrachtet werden, nach der sich die hybridisierten mRNA-Mutanten im Translationsinitiationsbereich strukturell ähnlicher sind als in nicht hybridisierter Form. Eine in diesem Fall denkbare Angleichung der Translationsausbeuten findet statt. Während H-FABP<sub>Val2(GUG)</sub> in Abwesenheit des Oligomers gegenüber H-FABP<sub>Lys2(AAG)</sub> mit 350 % Ausbeute synthetisiert wird beträgt die Ausbeute bei dreifach molarem Überschuss des Oligomers nur noch etwa 180 %.

Der große Unterschied in der Expression zwischen den Mutanten mHMFA<sub>Val2(GUG)</sub> und mHMFA<sub>Lys2(AAG)</sub> verringert sich nach Hybridisierung der mRNAs mit dem Antisense-Oligomer b enorm. Zwar liegen hier keine exakt vergleichbare Bedingungen vor, da sich die Mutanten im Hybridisierungsbereich um zwei Nukleotide unterscheiden. Trotzdem kann dieses Ergebnis tendenziell als Bestätigung für die aufgestellte Hypothese betrachtet werden. Demnach könnte eine strukturelle Angleichung der beiden mRNAs nach Hybridisierung stattgefunden haben, die sich dann in der Angleichung der Translationseffizienz bemerkbar machte.

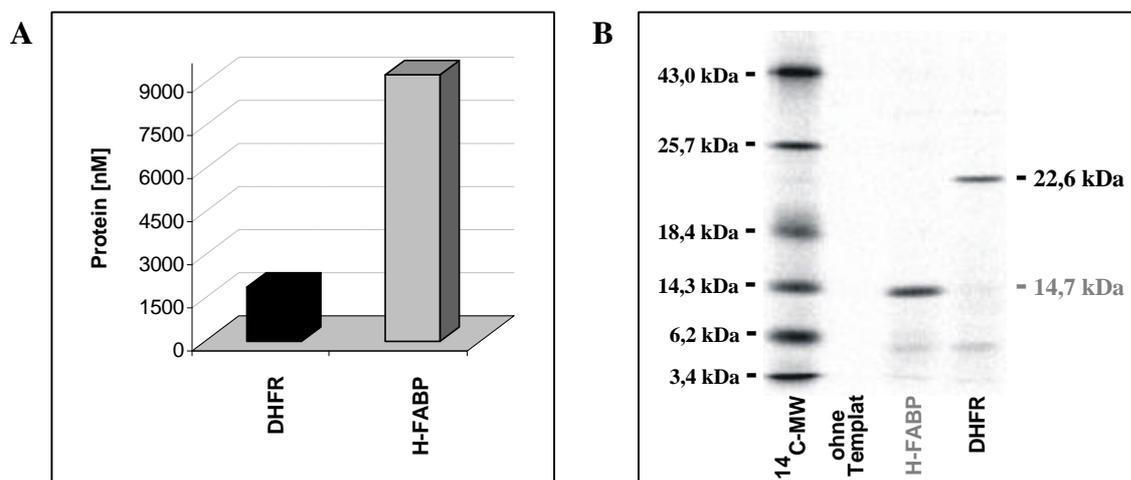
Die hier erhaltenen Ergebnisse stellen Indizien für eine Limitierung der mFA-Mutanten durch Ausbildung unterschiedlich stark ausgeprägter Sekundärstrukturen im Translationsinitiationsbereich dar. Tatsächlich müßten für weitergehende Aussagen Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Oligomeren folgen. Das hier verwendete System scheint jedenfalls vielversprechend, um mRNA-Sekundärstrukturen mit Hilfe von Antisense-Oligomeren manipulieren und deren Wirkung auf die Translationseffizienz näher untersuchen zu können.

## 4.2 Translationseffizienz von Fusionsproteinen aus H-FABP und DHFR

Es wurde untersucht, ob die Synthese von gering exprimierten Proteinen durch Veränderung der randständigen Sequenzen des Protein-codierenden Anteils der mRNA verbessert werden kann. Exemplarisch wurden dazu die für N- und C-terminale Aminosäuren codierenden mRNA-Abschnitte des schwach exprimierten DHFR-Gens durch entsprechende Abschnitte aus dem effizient translatierten H-FABP-Gen ersetzt beziehungsweise ergänzt. Dabei sollte die DHFR-Syntheseausbeute von den neuen Randsequenzen profitieren. Nur Protein-codierende Sequenzen nicht aber untranslatierte Bereiche wurden dazu verändert.

H-FABP und DHFR werden *in vitro* mit unterschiedlichen Ausbeuten synthetisiert. Außerdem erscheinen beide Proteine als homogene Banden im Autoradiogramm nach SDS-PAGE (Abb. 14<sub>A-B</sub>) und eignen sich daher gut als Modellsubstanzen.

Abb. 14



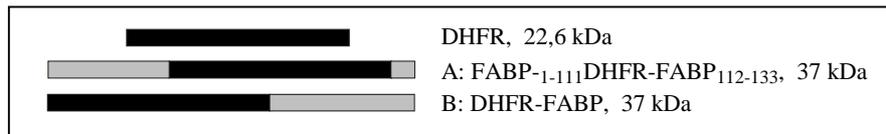
### Translation von DHFR und H-FABP

DHFR und H-FABP wurden unter Standardbedingungen ausgehend von den Plasmiden pHMDHFR (siehe unten) und pHMFA in Gegenwart von  $^{14}\text{C}$ -Leucin synthetisiert. **A** Die Ausbeute an translatiertem Protein wurde über TCA-fällbare Radioaktivität ermittelt. H-FABP wird mit ca. fünfmal höherer molarer Ausbeute exprimiert. **B** Nach der Reaktion wurden Aliquots mittels SDS-PAGE getrennt und ein Autoradiogramm des Gels erstellt. Beide Syntheseprodukte erscheinen als weitgehend homogene Banden mit erwartetem Molekulargewicht.

Das Plasmid pHMDHFR wurde aus pHMFA durch Ersetzen des H-FABP-Gens gegen das Maus-DHFR-Gen mittels molekularbiologischer Standardmethoden hergestellt. Dazu wurde zunächst eine, das H-FABP-Gen enthaltende Sequenz mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI aus pHMFA ausgeschnitten und durch die Sequenz: (XbaI) CTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGAGAG (BamHI) ersetzt. Für letztere Sequenz wurden dazu zwei synthetische DNA-Einzelstrangoligomere zu einem Doppelstrang hybridisiert, wobei an den Enden kurze Einzelstrangüberhänge, kompatibel für die Ligation mit den angegebenen Endstücken des Zielvektors, verblieben. In das neu entstandene Plasmid wurde nach Restriktionsverdau mit BamHI das aus dem Plasmid pQE16 mit den Restriktionsenzymen BamHI und BglII ausgeschnittene DHFR-Gen über die geöffnete BamHI-Stelle mittels Ligation inseriert und Plasmid-Klone mit der richtigen Orientierung des DHFR-Gens isoliert. pHMDHFR enthält damit exakt die gleichen nicht translatierten Regulationselemente wie pHMFA.

Um DHFR mit H-FABP-codierenden Randsequenzen zu versehen, wurden mRNAs für zwei Fusionsproteine aus DHFR und H-FABP hergestellt (Abb. 15). Im ersten Fall wurde die DHFR-Sequenz zwischen Codon 111 und 112 der 133 Codons umfassenden H-FABP-Sequenz inseriert (Fusionsprotein A). Im zweiten Fall folgt die codierende Sequenz von H-FABP direkt auf die 198 Codons umfassende DHFR-Sequenz (Fusionsprotein B).

Abb. 15

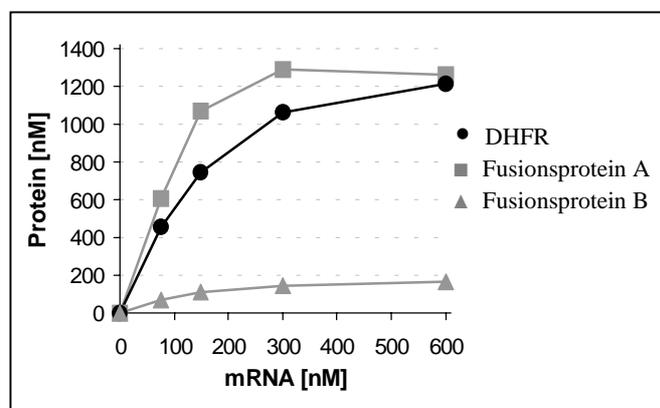


*Schematische Darstellung von DHFR und den Fusionsproteinen A und B aus DHFR und H-FABP*

Die Plasmide für die Konstrukte A und B, pFADHA und pFADHB, wurden durch Insertion der DHFR-Sequenz mit den BamHI- und BglIII-kompatiblen Enden (s.o.) in das mit BamHI linearisierte pHMFA hergestellt. Dazu wurden im H-FABP-codierenden Bereich von pHMFA BamHI-Restriktionsstellen über Punktmutagenese generiert: A) Die DNA-Sequenz entsprechend der H-FABP-Aminosäurecodons 112-113: GGGAAA und B) die Sequenz für die Codons 2-3: GTGGAC wurden jeweils in die Sequenz GGATCC umgewandelt.

Die mRNAs für beide Fusionsproteine sowie für DHFR wurden unter Standardbedingungen transkribiert und in verschiedenen Konzentration als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt (Abb. 16).

Abb. 16



*Translation von DHFR und Fusionsproteinen aus DHFR und H-FABP*

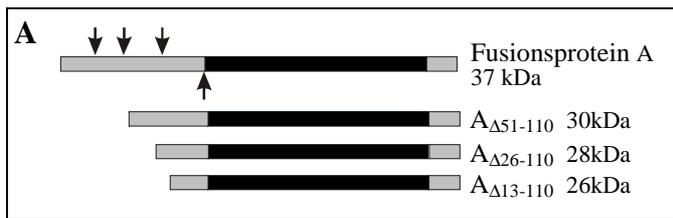
Die Ausbeuten von DHFR und den Fusionsproteinen abhängig von der mRNA-Konzentration wurden über den Einbau von <sup>14</sup>C-Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt ermittelt. Die Molarität der Proteine wurde berechnet, basierend auf der Anzahl der in das jeweilige Protein eingebauten Leucinreste (DHFR 18, Fusionsproteine 27 Leucinreste). Die molare Proteinmenge ist angegeben, da diese die Anzahl der synthetisierten Proteinmoleküle wiedergibt. Die Masseausbeute würde dagegen die Anzahl der tatsächlich verknüpften Peptidbindungen widerspiegeln.

Bei kleineren mRNA-Konzentrationen ist die molare Ausbeute des Fusionsproteins A gegenüber der von DHFR leicht erhöht. Dagegen ist die Expression des Fusionsproteins B sehr gering. Für das gegenüber DHFR etwa 1.6 mal so große Produkt A müssen im elben Zeitraum entsprechend mehr Aminosäuren in das Protein eingebaut werden. Daher ist die tatsächliche Ausbeute von A deutlicher Größer als die von DHFR. Das Insertieren von DHFR in die H-FABP-Sequenz führt also letztlich zu einer deutlich gesteigerten Translationseffizienz.

Die molare Ausbeute an Fusionsprotein A ist im Vergleich zu DHFR für kleinere mRNA-Konzentrationen erhöht. Dagegen erhält man nur sehr geringe Mengen von Produkt B. In erster Näherung ist dieses Ergebnis eine Bestätigung für oben genannte Hypothese, nach der die gering exprimierte DHFR von den codierenden Randsequenzen des effizient translatierten H-FABP profitiert (Produkt A). Gleichzeitig wird das Fusionsprotein B mit DHFR als codierende Startsequenz nur schwach exprimiert.

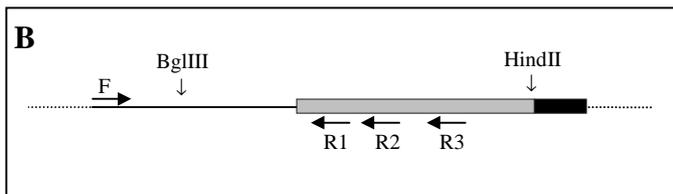
Die leicht gesteigerte molare Ausbeute von Produkt A bedeutet tatsächlich eine deutliche Verbesserung der Translationseffizienz, da für das Fusionsprotein in der selben Zeit wesentlich mehr Peptidbindungen geknüpft werden müssen als für das kleinere Protein DHFR. Daher wurde untersucht, ob eine Reduzierung der Größe des Fusionsproteins A zu einem weiteren Anstieg dessen molarer Ausbeute führen könnte. Dazu wurden drei Varianten des Fusionsproteins A hergestellt, welche Deletionen von 60, 85 bzw 98 Aminosäuren in der Sequenz von H-FABP aufweisen (A<sub>Δ51-110</sub>, A<sub>Δ26-110</sub> und A<sub>Δ13-110</sub>, Abb. 17).

Abb. 17



**A** Schematische Darstellung für die Herstellung der Deletionsmutanten  $A_{\Delta 51-110}$ ,  $A_{\Delta 26-110}$  und  $A_{\Delta 13-110}$  aus Fusionsprotein A

Die Sequenzabschnitte zwischen den Pfeilen wurden deletiert. Der untere Pfeil gibt die konstante stromabwärts liegende, die oberen Pfeile die variablen stromaufwärts liegenden Begrenzungen der deletierten Abschnitte an. In Fusionsprotein  $A_{\Delta 51-110}$  sind die Aminosäuren 51-110 des H-FABP-Teilproteins deletiert. In den Fusionsproteinen  $A_{\Delta 26-110}$  und  $A_{\Delta 13-110}$  sind es die Aminosäuren 26-110 bzw. 13-110. Der 12 Aminosäuren umfassende N-terminale Bereich des H-FABP-Teilproteins ist in allen Deletionsmutanten enthalten. Es wurde hiermit auch untersucht ob dieser konstante Bereich eine Minimalsequenz für effiziente Translation darstellen könnte.



**B** Herstellung der Plasmide für die Deletionsmutanten

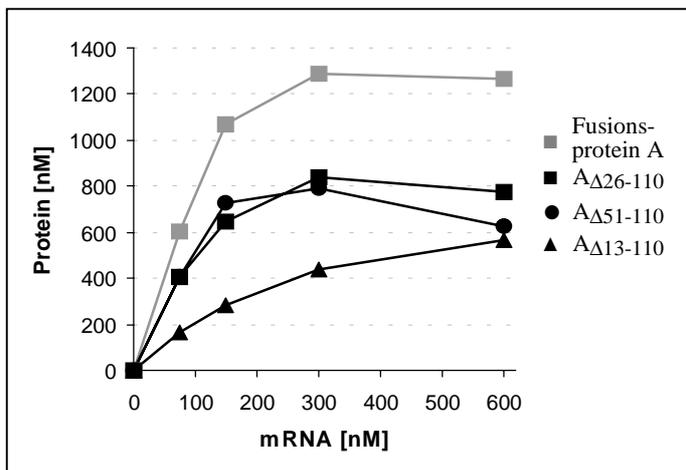
Für die Herstellung der Deletionsmutanten wurde pFADHA zunächst mit den Restriktionsenzymen BglIII und HindII verdaut und das Restplasmid isoliert.

Drei PCR-Produkte wurden hergestellt, mit je-

weils dem stromaufwärts von BglIII hybridisierenden Primer F und pFADHA als Templat. Zur Herstellung der PCR-Produkte für  $A_{\Delta 13-110}$ ,  $A_{\Delta 26-110}$  und  $A_{\Delta 51-110}$  wurden die stromabwärts hybridisierenden Primer R1: 5'-CACTAACTTCCAGGTACCCACG-3', R2: 5'-ACCGAGTGACTTCATGTAGTC-3' und R3: 5'-GACTGTG TCCCATTCAC-3' eingesetzt. Die mit BglIII geschnittenen PCR-Produkte wurden schließlich durch Ligation in das Restplasmid von pFADHA inseriert und Plasmid-Einzelklone isoliert.

Die mRNAs für Fusionsprotein A sowie für die Deletionsmutanten  $A_{\Delta 51-110}$ ,  $A_{\Delta 26-110}$  und  $A_{\Delta 13-110}$  wurden in verschiedenen Konzentration als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt (Abb. 18).

Abb. 18



*Translation von Fusionsprotein A und dessen Deletionsmutanten*

Verschiedene Konzentrationen der mRNAs für das Fusionsprotein A sowie für die Deletionsmutanten  $A_{\Delta 51-110}$ ,  $A_{\Delta 26-110}$  und  $A_{\Delta 13-110}$  wurden als Templat für die Proteinsynthese unter Standardbedingungen eingesetzt. Die Ausbeuten an synthetisiertem Protein wurden über den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt ermittelt. Es wurde untersucht, ob eine Reduzierung der Proteingröße des Fusionsproteins A zu einem Anstieg dessen molarer Ausbeute führt.

Alle Deletionsmutanten werden jedoch mit wesentlich geringerer Ausbeute synthetisiert. Die Reduktion macht sich bei kleinen

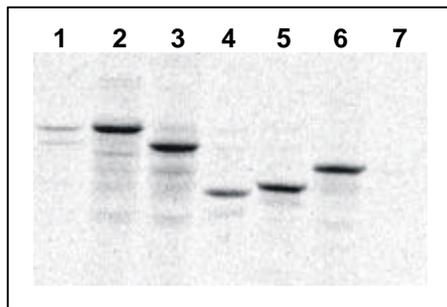
mRNA-Konzentrationen für Produkt  $A_{\Delta 13-110}$  mit der größten Deletion am stärksten bemerkbar. Es scheint so als führe die in allen Mutanten vorgenommene Deletion der Aminosäuren 51-110 des H-FABP-Anteils bzw. des entsprechenden mRNA-Abschnitts zu der Ausbeuteabnahme. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist nicht bekannt.

Alle verkürzten Varianten des Fusionsproteins A werden unabhängig von der mRNA-Konzentration mit deutlich geringerer Ausbeute synthetisiert als das vollständige Produkt. Zusätzlich wurde der C-terminale H-FABP-Anteil (H-FABP<sub>112-133</sub>) aus Fusionsprotein A deletiert. Das resultierende Protein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa wird bei allen unter-

suchten mRNA-Konzentrationen mit der selben Ausbeute synthetisiert wie das Ausgangsprodukt (nicht dargestellt). Offensichtlich spielt der C-terminale Bereich für die Translationseffizienz des Fusionsproteins keine Rolle.

Die vorgenommenen Veränderungen in den verschiedenen Genabschnitten zeigen keinen signifikanten Einfluß auf die Integrität der Translationsprodukte, da fast alle in diesem Kapitel beschriebenen Fusionsproteine als weitgehend homogene Banden mit erwartetem Molekulargewicht detektiert werden (Abb. 19).

Abb. 19



*Autoradiogramm nach Auftrennung der Fusionsproteine im SDS-Gel*  
Die  $^{14}\text{C}$ -markierten Translationsprodukte wurden im 15% Laemmli-gel aufgetrennt und ein Autoradiogramm des Gels erstellt. Die Proben in den nummerierten Spuren entsprechen: 1. Fusionsprotein B, 2. Fusionsprotein A, 3. Fusionsprotein A mit C-terminaler Deletion, 4.  $A_{\Delta 13-110}$ , 5.  $A_{\Delta 26-110}$ , 6.  $A_{\Delta 51-110}$  und 7. Reaktionsansatz ohne Templat.

Die Proteine erscheinen als überwiegend homogene Banden und zeigen sich bezüglich ihrer Integrität von den Umordnungen der Genabschnitte weitgehend unbeeinträchtigt.

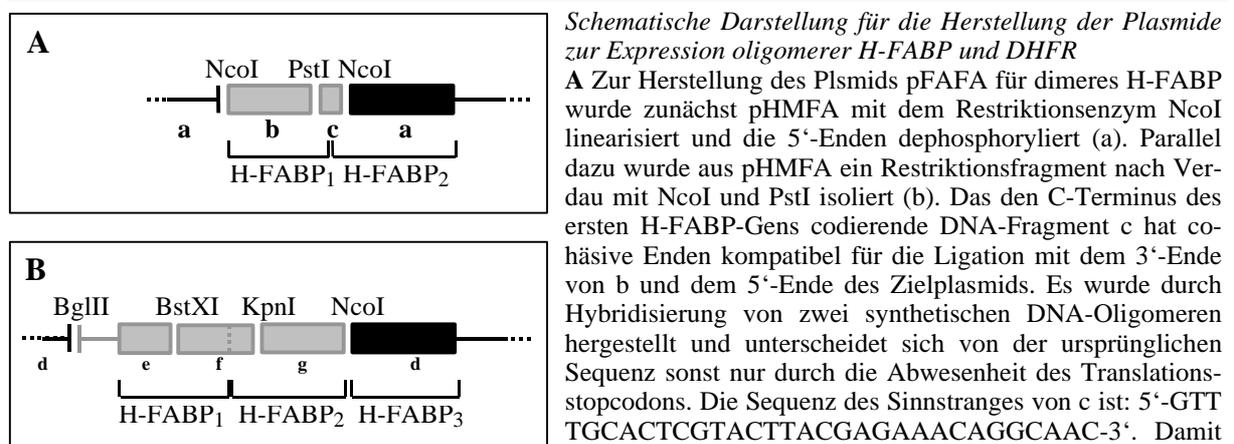
Es wurde untersucht, welchen Einfluß das Fusionieren der schwach exprimierten DHFR mit dem effizient exprimierten H-FABP auf die Translationsausbeute hat. Eine leichte Ausbeute-steigerung des Fusionsproteins A, bei dem die DHFR-Sequenz in die H-FABP-Sequenz inseriert wurde, konnte gegenüber der unfusionierten DHFR festgestellt werden. Verschiedene Deletionen innerhalb des H-FABP-Anteils des Fusionsproteins führen jedoch zu starker Ausbeuteabnahme.

Diese 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. Die verringerte Translationseffizienz der Deletionsmutanten läßt sich ohne weitere Untersuchungen nicht interpretieren. Prinzipiell ist allerdings eine Limitierung der Proteinsynthese durch die Translation der N- und C-terminalen Sequenzen als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Translation in Frage zu stellen. Denkbar wäre ebenso eine durch die Deletionen hervorgerufene veränderte Faltung der mRNAs, welche sich inhibierend auf die Proteinsynthese auswirkte. Tatsächlich scheinen im Fusionsprotein A mindestens die Aminosäuren 51-110 bzw. der entsprechende mRNA-Abschnitt vor dem Übergang zur DHFR-Sequenz eine wichtige Rolle zu spielen, da letztlich deren Deletion zur Ausbeuteabnahme führt. Nicht auszuschließen ist auch ein inhibierender Einfluß aufgrund einer Verzerrung der Proteinfaltung. Durch die Fusion unvollständiger Proteindomänen könnte ein denaturierender Effekt auf das synthetisierte Protein und auch indirekt auf den Translationsapparat ausgehen und möglicherweise eine Inhibition der Proteinsynthese zur Folge haben. Eine Denaturierung der Syntheseprodukte detektierbar in Form von schwerlöslichem Protein konnte allerdings nicht festgestellt werden.

### 4.3. Translationseffizienz oligomerer Fusionsproteine

Anhand der Ergebnisse des vorangehenden Kapitels wurde eine Limitierung der Synthese von H-FABP und DHFR durch die Translation der N- und C-terminalen Sequenzen als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Translation in Frage gestellt. Weiterhin ist zu klären, welche Einflüsse die Proteingröße und die Länge einer mRNA als limitierende Faktoren für die Syntheseausbeute als auch für die Homogenität des translatierten Proteins haben. Wenn die mit der Translationsinitiation bzw. -termination in Zusammenhang stehende Expression der N- und C-terminalen Sequenzen limitierend für die Proteinsynthese wäre, so sollten größere Proteine in größerer Masseausbeute synthetisiert werden als kleine, da für größere Proteine weniger Initiations- bzw. Terminationsschritte notwendig sind. Zur besseren Vergleichbarkeit von großen und kleinen Proteinen wurden mRNAs, die für oligomere Fusionsproteine codieren hergestellt und sich untereinander nur in der Größe, nicht aber im Codongebrauch oder der Struktur der Protein-codierenden Initiations- bzw. Terminationsbereiche unterscheiden. Dazu wurden jeweils die codierenden Sequenzen von H-FABP und DHFR nacheinander auf der mRNA angeordnet, um jeweils einen einzigen Leserahmen für das entsprechende oligomere Fusionsprotein zu erhalten (Abb. 20). Die Translationsstopcodons der intern positionierten Monomere wurden dabei eliminiert. Als Modellbeispiele wurden jeweils H-FABP und DHFR als Mono-, Di- und Trimere synthetisiert und deren Ausbeute sowie Produkthomogenität verglichen (Abb. 21).

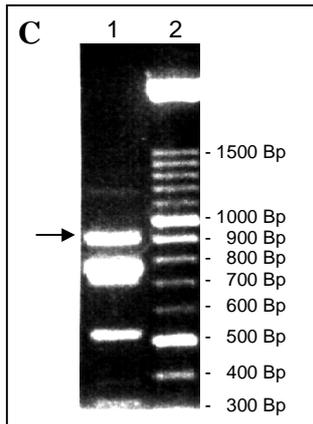
Abb. 20



stelle des Stopcodons das Codon ACC. Die Fragmente a, b und c wurden in einem Ansatz ligiert. Nach Transformation und Amplifikation in *E. coli*-Zellen wurden korrekt ligierte Produkte identifiziert und Plasmid-Einzelklone isoliert.

**B** Für das Plasmid pFAFAFA (trimeres H-FABP) wurden folgende DNA-Fragmente isoliert: Für Fragment e wurde pHMFA zunächst mit BglIII verdaut und die 5'-Enden dephosphoryliert. Anschließend wurde mit BstXI verdaut und das 194 Bp umfassende Spaltprodukt isoliert. Fragment f mit 329 Bp stammt aus dem Verdau von pFAFA mit BstXI und KpnI und anschließender Dephosphorylierung. Fragment g mit 378 Bp geht aus einem Verdau von pFAFA mit NcoI, anschließender Dephosphorylierung und einem zweiten Verdau mit KpnI hervor. Die Dephosphorylierungen sind erforderlich um bei der anschließenden simultanen Ligation von e, f und g zahlreiche unerwünschte Nebenreaktionen weitgehend zu unterdrücken. Das mit der erwarteten Größe entstandene Ligationsprodukt aus e, f und g (siehe C) wurde schließlich über Ligation in das mit BglIII und NcoI verdaute Plasmid pHMFA (d) inseriert und nach Transformation und Amplifikation in *E. coli*-Zellen korrekt ligierte Produkte identifiziert und Plasmid-Einzelklone isoliert.

Da zwischen den H-FABP-codierenden Sequenzen Stopcodons durch Aminosäurecodons ersetzt wurden, sind die Expressionsprodukte von pFAFA und pFAFAFA oligomere Fusionsproteine von H-FABP mit sich selbst.



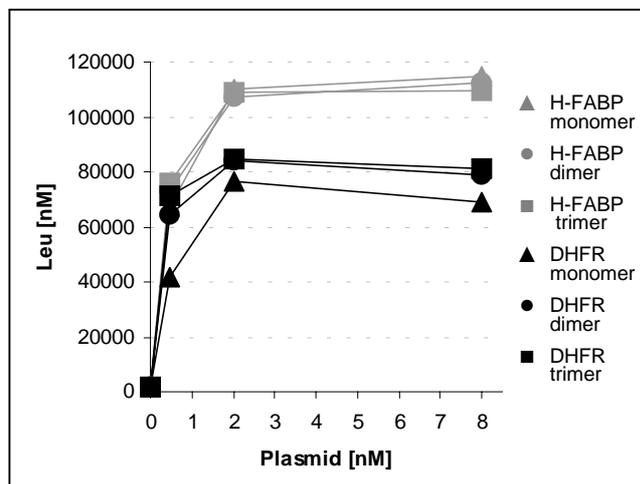
**C** Auftrennung der Produkte aus der Ligation der Restriktionsfragmente e, f und g im Agarosegel

Jeweils 10 pmol der Restriktionsfragmente e, f und g wurden in einem präparativen Ligationsansatz mit 4 U/pmol T4 DNA-Ligase für 16 Stunden bei 25°C inkubiert. Ein Aliquot der Reaktion (Spur 1) wurde im 1.5 % Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Zur Größenbestimmung der Ligationsprodukte wurden in Spur 2 DNA-Standards aufgetragen. Dargestellt ist das unter UV-Licht fotografierte Gel nach Färbung mit Ethidiumbromid.

Der Pfeil gibt die Position des Ligationsprodukts mit gewünschter Größe (901 Bp) an. Kleinere Produkte entsprechen nicht vollständig umgesetzten Edukten bzw. erwarteten Nebenprodukten. Der Ligationsansatz wurde im präparativen Gel getrennt und das Gelstück mit der gewünschten Bande ausgeschnitten. Nach Elution des Ligationsprodukts aus dem Gelstück wurde es für die Ligation mit dem Zielvektor (siehe B) eingesetzt.

**D** Für die Herstellung des Plasmids pDHDH für die Expression dimerer DHFR wurde pHMDHFR mit dem Restriktionsenzym BamHI linearisiert und anschließend die 5'-Enden dephosphoryliert. Das aus dem Verdau von pQE16 mit BamHI und BglII hervorgehende Restriktionsfragment (siehe Kapitel 4.2) wurde über Ligation in das linearisierte Plasmid inseriert. Zur Herstellung von pDHDHDH für trimere DHFR wurde die beschriebene Vorgehensweise wiederholt.

Abb. 21



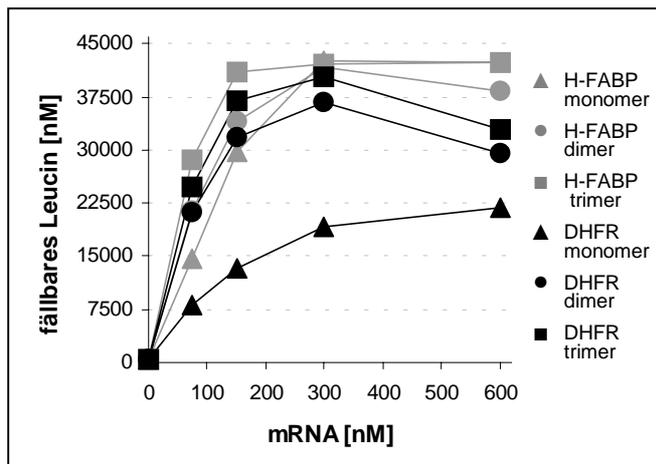
*Gekoppelte Transkription/Translation oligomerer Fusionsproteine von H-FABP und DHFR*

Für die Synthese der H-FABP- und DHFR-Oligomeren wurden die Plasmide pHMFA, pFAFA, pFAFAFA, pHMDHFR, pDHDH und pDHDHDH als Templat eingesetzt. Die Ausbeuten wurden anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt bestimmt. Angegeben ist die Molarität des fällbaren Leucins abhängig von der Plasmidkonzentration. Sie ist ein Maß für die Masse des synthetisierten Proteins. Die Oligomeren von H-FABP bzw. DHFR werden unerwartet jeweils mit fast der selben Masseausbeute exprimiert. Ein Unterschied in der Ausbeute besteht nur zwischen den Proteintypen. Innerhalb eines Proteintyps ist die Ausbeute aber unabhängig von der Größe.

Die Oligomeren von H-FABP und DHFR untereinander zeigen jeweils sehr ähnliche Einbau-raten für  $^{14}\text{C}$ -Leucin und damit sehr ähnliche Masseausbeuten. Die Masseausbeute ist also abhängig vom Proteintyp aber innerhalb eines Proteintyps unabhängig von der Proteingröße. Dieses Ergebnis ist unerwartet, wenn man von der Translationsinitiation und/oder -termination als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Proteinsynthese ausgeht. Tatsächlich scheint die Proteinsynthese nicht durch die Initiation/Termination sondern durch die Anzahl der geknüpften Peptidbindungen limitiert zu sein. Demnach wäre der langsamste Schritt der Proteinsynthese in einem der Prozesse zu suchen, die im weitesten Sinne der Translationselongation angehören.

Allerdings ist nicht geklärt, ob bei der Synthese der Oligomeren eine Translationsinitiation bzw. -termination zwingend limitierend sein mußte, da einige, nach zwei Stunden Inkubationszeit vollständig aufgebrauchten Ressourcen des Translationssystems, letztlich die Maximalsynthese definieren (Dr. Stiege, unveröffentlichte Daten). Daher wurde ein Reaktionsansatz mit kürzerer Reaktionszeit und niedrigerer Inkubationstemperatur, und zur Kontrolle der Templatkonzentration mit mRNA statt DNA als Templat, zum Vergleich herangezogen.

Abb. 22



#### Translation oligomerer Fusionsproteine von H-FABP und DHFR

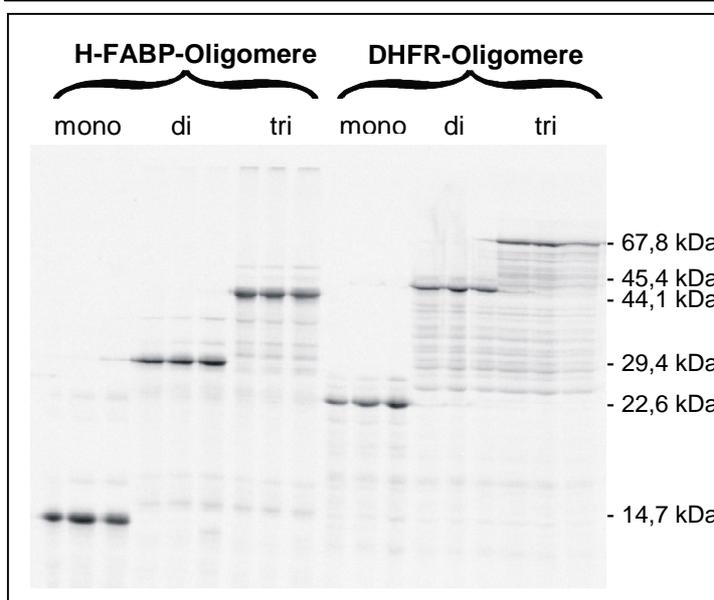
Statt Plasmid-DNA wurde mRNA als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt. Die Reaktionszeit wurde von 120 min auf 45 min herabgesetzt und die Inkubationstemperatur von 37°C auf 30°C erniedrigt.

Der Unterschied in der Syntheseausbeute zwischen den H-FABP- und DHFR-Oligomeren ist hier geringer. Interessanterweise wird das DHFR-Monomer relativ schwach exprimiert. Die Sättigungskonzentration der mRNA wird hier erst bei größeren mRNA-Mengen erreicht. Für das DHFR-Monomer könnte eine Limitierung der Proteinsynthese durch Translationsinitiation und/oder -termination vorliegen.

Es zeigt sich auch bei der Verwendung von mRNA als Templat mit deutlich verkürzter Synthesezeit und bei niedrigerer Reaktionstemperatur ein sehr ähnliches Muster wie bei dem Ansatz mit Plasmid als Templat und voller Ausschöpfung des Systems (Abb. 22). Lediglich monomere DHFR wird im Vergleich zu di- und trimerer DHFR mit geringerer Ausbeute gebildet. Allerdings ist auch eine ähnliche tendenzielle Abstufung von den Trimeren über die Dimeren zu den Monomeren bei beiden Proteintypen für kleine mRNA-Konzentrationen zu erkennen. Für die monomere DHFR könnte eine Translationsinitiation und/oder -termination ein dominierend limitierender Faktor für die Proteinsynthese sein. Bei maximaler mRNA-Konzentration sind die absoluten Unterschiede der Proteinausbeuten jedoch relativ gering. Sollte also eine initiations- oder terminationsbedingte Limitierung bestehen, so ist sie dann unerwartet schwach.

Der Einfluß der Proteingröße auf die Homogenität der synthetisierten Proteine wurde anhand eines Autoradiogramms nach SDS-PAGE ermittelt (Abb. 23). Die im Phosphoimager gemessene Intensität der Produktbanden wurden mit der einer ganzen Gelspur ins Verhältnis gesetzt und somit der prozentuale Anteil an vollständig translatiertem Protein ermittelt (Abb. 24).

Abb. 23

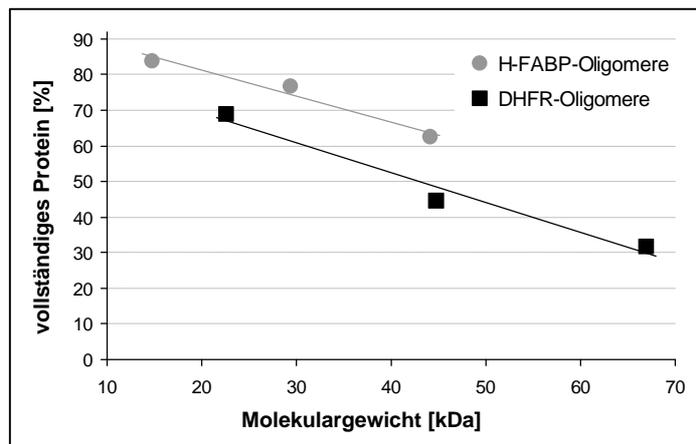


#### Homogenität von H-FABP- und DHFR-Oligomeren

Nach gekoppelter Transkription/Translation wurden die Reaktionsansätze im 15% Laemmliigel getrennt und ein Autoradiogramm des Gels erstellt. Es wurden für jedes Protein drei Reaktionsansätze mit 0,5, 2 und 8 nM Plasmidkonzentration aufgetragen.

Mit zunehmendem Molekulargewicht tauchen verstärkt Nebenprodukte auf. Für H-FABP ist dieser Effekt weniger ausgeprägt als für DHFR. Damit relativiert sich das Ergebnis für die konstante Masseausbeute bei oligomeren Proteinen. Zwar bleibt die Anzahl der geknüpften Peptidbindungen immernoch konstant. Doch mit zunehmender Proteingröße nimmt der Anteil an vollständig synthetisiertem Produkt ab.

Abb. 24



*Prozentualer Anteil an vollständigem Produkt der H-FABP- und DHFR-Oligomere*

Die im Phosphoimager gemessenen Intensitäten der Produktbanden wurden mit denen einer ganzen Gelspur ins Verhältnis gesetzt und damit der prozentuale Anteil an vollständig translatiertem Protein ermittelt. Dieser Prozentsatz ist gegen das Molekulargewicht der Oligomeren aufgetragen. Innerhalb eines Proteintyps nimmt der Anteil an vollständigem Produkt kontinuierlich ab. Dabei scheint der Verlauf in dem untersuchten Bereich linear zu sein. Die Verläufe bei H-FABP und bei DHFR sind dabei zueinander parallel verschoben.

Die Produkthomogenität ist abhängig vom Proteintyp und von der Proteingröße. Prinzipiell wird kein nennenswerter Unterschied bezüglich der Homogenität zwischen Produkten aus Transkriptions/Translationsansätzen oder aus reinen Translationsansätzen detektiert (nicht dargestellt).

Insgesamt sprechen die Ergebnisse gegen eine maßgebliche Limitierung der Expression von H-FABP und DHFR durch die Translationsinitiation und/oder -termination, da die Monomeren mit der selben Masseausbeute synthetisiert werden wie die oligomeren Fusionsproteine, obwohl für die Monomere weniger Initiations- und Terminationsereignisse notwendig sind. Damit ist auch eine Limitierung abhängig von den mRNA-Abschnitten codierend für die C- und N-terminalen Enden der Proteine unwahrscheinlich. Demnach wäre der langsamste Schritt der Proteinsynthese im Zusammenhang mit der Translationselongation zu suchen.

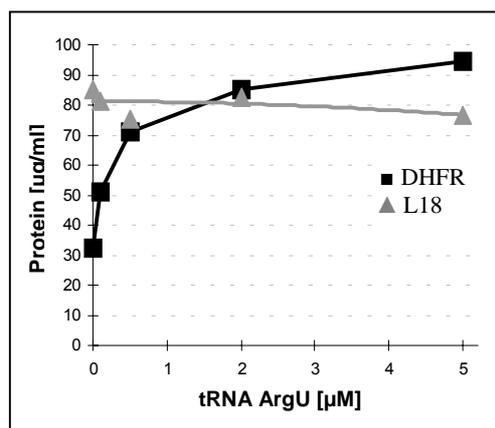
## 4.4 Limitierung der Proteinsynthese durch tRNA

### 4.4.1 Limitierung der DHFR-Synthese

In den vorangegangenen Kapiteln wurde eine mögliche Limitierung der DHFR-Expression durch eine entsprechend geringe Translationsinitiations- bzw. -terminationsrate für unwahrscheinlich befunden. Stattdessen scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt mit der Translationselongation im weitesten Sinne in Zusammenhang zu stehen. Eine solche Limitierung könnte z.B. eine niedrig konzentrierte tRNA sein. Tatsächlich wurde eine Limitierung der Proteinbiosynthese durch AGG- bzw. AGA-reiche mRNAs für *E. coli* beschrieben (Robinson et al., 1984; Spanjaard & van Duin, 1988) und auf die seltene tRNA tArgU zurückgeführt (Brinkmann et al., 1989; Varenne et al., 1989; Chen & Inouye, 1990; Rosenberg et al., 1993; Roche & Sauer, 1999). Es liegt die Vermutung nahe, daß die niedrige Expressionsrate von DHFR gegenüber H-FABP auf die relativ hohe Anzahl der Arginincodons AGG und AGA zurückzuführen ist. Die DHFR-Sequenz enthält 10 solcher nicht in Clustern auftretenden Codons von insgesamt 198 Codons. Die H-FABP-Sequenz enthält dagegen nur 2 von insgesamt 133 Codons. Es wurde untersucht, ob eine Erhöhung der tArgU-Konzentration zu gesteigerter DHFR-Synthese führt und ob dies mit *in vitro* transkribierter tArgU möglich ist.

Ein für tArgU codierendes Plasmid wurde hergestellt. Dazu wurde ein synthetisches DNA-Oligomer mittels PCR vervielfältigt und in einen Plasmidvektor insertiert (Abb. 25B). Ausgehend vom Plasmid wurde die tRNA mit unseren Standardbedingungen unter der Kontrolle von T7 RNA-Polymerase transkribiert und aufgereinigt. Der Effekt von tArgU auf die Expression von *E. coli* ribosomalem L18 Protein und DHFR wurde untersucht (Abb. 25A).

Abb. 25



#### A Einfluß von tArgU auf die Expression von DHFR

*In vitro* synthetisierte tRNA tArgU wurde in verschiedenen Konzentrationen für die Synthese von DHFR und L18 eingesetzt. Zehn der Arginincodons AGA und AGG von insgesamt 198 Codons der DHFR-Sequenz werden von tArgU decodiert.

Dargestellt ist die anhand des Einbaus von <sup>14</sup>C-Leucin ermittelte enorme Ausbeutezunahme von DHFR in Gegenwart steigender Mengen von tArgU. Dagegen bleibt die Synthese von L18, dessen mRNA keines dieser kritischen Codons enthält weitgehend unbeeinträchtigt. Die Expression von L18 dient damit als Kontrollansatz für die hohe Spezifität der Wirkung von tArgU.

Die Ausbeute der normalerweise schwach exprimierten DHFR wird in Gegenwart von 5 µM tArgU etwa verdreifacht. Damit ist die Konzentration dieser tRNA der dominierend limitierende Faktor für die DHFR-Synthese.

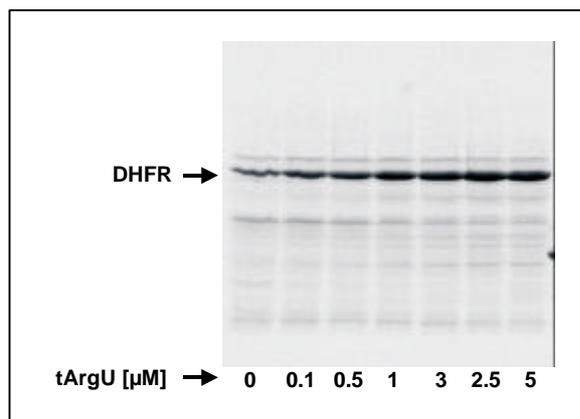
#### B Herstellung des tARGU-codierenden Plasmids und *in vitro* Transkription

Das synthetisch hergestellte DNA-Oligomer 5'-TTCTAATACGACTCACTATAGCGCCCTTAGCTCAGTTG GATAGAGCAACGACCTTCTAAGTCGTGGGCCGAGGTTCTGAATCCTGCAGGGCGGCCAGGTGATC CATCCGGATC-3' wurde als Templat für eine PCR mit den Primern F und R eingesetzt und das PCR-Produkt wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben in das Plasmid pSP64 insertiert. Das neue Plasmid wurde zur Generierung eines run-off Transkripts mit dem 3'-Ende CCA vor der Transkription mit dem Restriktionsenzym BstNI verdaut. Nach Transkription und anschließender Aufreinigung unter unseren Standardbedingungen wurde das Transkript eine Minute bei 80°C denaturiert und eine Neufaltung der tRNA durch Abkühlen auf 30°C über einen Zeitraum von 20 Minuten ermöglicht.

Die Ausbeute von L18 bleibt von der Anwesenheit der tRNA tArgU weitgehend unbeeinflusst. Da die mRNA für L18 keines der Arginincodons AGA und AGG enthält ist der tArgU-vermittelte Arginineinbau spezifisch. Dagegen ist die Syntheseausbeute von DHFR stark abhängig von der tArgU-Konzentration. In Gegenwart von 5  $\mu\text{M}$  der tRNA ist die Ausbeute der normalerweise schwach exprimierten DHFR etwa dreimal so hoch. Die Konzentration der *in vitro* transkribierten tRNA ist damit der dominierend limitierende Faktor für die DHFR-Synthese.

Die im vorangegangenen Kapitel aufgestellte Hypothese, nach der die DHFR-Expression nicht von der Translationsinitiation oder -termination, sondern von einem mit der Elongation in Verbindung stehenden Prozeß limitiert ist, ist damit bestätigt. Letzlich ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Codons AGA und AGG mit der purinreichen Ribosomenbindungsstelle eine unerwünschte Bindung von Ribosomen an interne Bereiche der mRNA nicht auszuschließen. Weiterhin wäre es denkbar, daß unspezifische Translationsinitiationsereignisse an internen Bereichen der mRNA in Gegenwart der tArgU unterdrückt werden (Atkins et al., 1990), da die in Gegenwart von tArgU effizienter translatierenden Ribosomen mit initiiierenden Ribosomen konkurrieren könnten. Daher wurden die Reaktionsansätze für DHFR im Autoradiogramm nach Trennung mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 26).

Abb. 26



#### Einfluß von tArgU auf die Homogenität von DHFR

DHFR wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an tArgU synthetisiert. Das Autoradiogramm des 15% Laemmli-Gels zeigt die mit  $^{14}\text{C}$ -Leucin markierte DHFR sowie Nebenprodukte mit höherem und geringerem Molekulargewicht. Mit zunehmender Menge an tArgU nehmen die absoluten Intensitäten der Nebenproduktbanden zwar nicht ab. Jedoch nimmt die Intensität der Bande für die DHFR im Vergleich zu den Nebenprodukten stark zu. D.h. der prozentuale Anteil an korrekt gebildetem Produkt nimmt deutlich zu. Dies könnte das Ergebnis einer Unterdrückung von Nebenreaktionen wie z.B. einer unspezifischen Translationsinitiation sein.

Der Anteil an erwartetem Produkt für DHFR nimmt im Autoradiogramm eines SDS-Gels mit steigender Menge an tArgU deutlich zu. Dagegen bleibt die Menge an Nebenprodukten etwa konstant. Das heißt die Spezifität der DHFR-Synthese nimmt deutlich zu, wohingegen Nebenreaktionen in Relation hierzu unterdrückt werden.

Interessanterweise sind die von tArgU ausgehenden Effekte relativ stark, obwohl die entsprechenden Arginincodons nicht in Clustern auftreten. Untersuchungen in *E. coli* zeigten, daß die Proteinsynthese vor allem dann stark limitiert wird, wenn mindestens zwei der Arginincodons direkt aufeinander folgen (Varenne et al., 1989; Rosenberg et al., 1993).

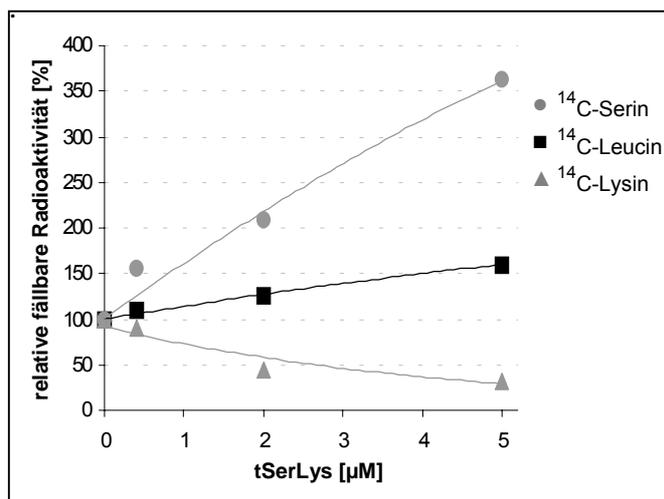
Bemerkenswert ist aber auch die Aktivität von tArgU als *in vitro* Transkript, da die tRNA nicht in prozessierter Form eingesetzt wurde. Am 5'-Ende enthält ein großer Anteil der tRNA-Moleküle synthesebedingt sehr wahrscheinlich eine normalerweise inhibierende Triphosphatgruppe. Das 3'-Ende ist sehr wahrscheinlich synthesebedingt heterogen (Schenborn

& Mierendorf Jr., 1985; Milligan et al., 1987; Triana-Alonso et al., 1995; (Gerrits et al., in Bearbeitung) und posttranskriptionale Modifikationen fehlen. Höchstwahrscheinlich sind daher die für die Reifung der tRNA erforderlichen Enzyme im zellfreien Translationssystem sehr aktiv oder eine Reifung wird nicht benötigt. Dies macht den Einsatz der unter Standardbedingungen hergestellten tRNA ökonomisch.

#### 4.4.2 Limitierung der NusA-Synthese

Die geringe Syntheserate von DHFR konnte auf einen Mangel an tRNA für die Decodierung der Arginincodons AGA und AGG zurückgeführt werden (Kapitel 4.4.1). Im Vergleich zu der hohen Konzentration dieser Arginincodons in der DHFR-Sequenz fällt die große Anzahl von 33 der Lysincodons AAG in der für NusA codierenden Sequenz aus *thermus thermophilus* auf. Sollte auch hier die Konzentration der entsprechenden Lysyl-tRNA bzw. deren Aminoacylierungseffizienz limitierend für die Syntheserate von NusA sein, so müßte dies durch Erhöhung der entsprechenden tRNA-Konzentration nachweisbar sein. In Kapitel 4.1.3 wurde bereits die chimäre tRNA<sub>SerLys</sub> vorgestellt, welche beim Ablesen des Codons AAG(Lys), in Konkurrenz zur endogenen tRNA tLys<sub>CUU</sub>, Serin- anstelle von Lysinresten in Proteine einbaut. NusA wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von tSerLys translatiert. Für die Quantifizierung des Effekts von tSerLys wurden in drei Reaktionsansätzen jeweils verschiedene <sup>14</sup>C-markierte Aminosäuren eingesetzt (Abb. 27)

Abb. 27



*Einfluß von tSerLys auf die Expression von NusA*  
Die mRNA für NusA wurde in einer Konzentration von 200 nM für die Translation von NusA in Gegenwart verschiedener Mengen tSerLys eingesetzt. Um den Effekt von tSerLys quantifizieren zu können wurden drei Parallelreaktionen mit jeweils einer <sup>14</sup>C-markierten Aminosäure (Leucin, Serin und Lysin) durchgeführt und die TCA-fällbare Radioaktivität gemessen. In der Grafik ist die relative Radioaktivität gegen die tSerLys-Konzentration aufgetragen, wobei 100% als die relative Aktivität in Abwesenheit der tRNA definiert sind.

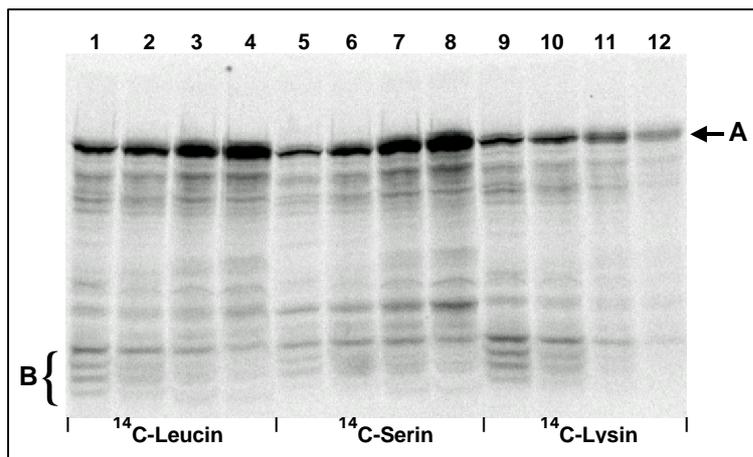
Bei 5 µM tSerLys werden ca. 70% der normalerweise eingebauten Lysinreste durch Serinreste ersetzt. Dabei steigt die durch den Einbau von <sup>14</sup>C-Leucin reflektierte Ausbeute von NusA auf ca.

160 % an. Offenbar ist die endogene beladene Lysyl-tRNA ein limitierender Faktor für die Synthese von NusA. Die NusA-codierende mRNA wurde über *in vitro* Transkription unter der Kontrolle von T7 RNA-Polymerase gemäß unserer Standardbedingungen hergestellt. Als Templat wurde hierzu das mit dem Restriktionsenzym EcoRV verdaute Plasmid pNusA (siehe Kapitel 2, Material) eingesetzt. Dabei definiert die EcoRV-Stelle das Ende des run-off Transkripts.

Die tRNA tSerLys ist sehr aktiv an der Synthese von NusA beteiligt. Bei einer Konzentration von 5 µM tSerLys werden ca. 70% der endogenen Lysyl-tRNA für das AAG Codon verdrängt, da der Einbau von <sup>14</sup>C-Lysin auf ca. 30 % zurückgedrängt wird. Dies kann ein Hinweis auf geringe Aktivität der endogenen tRNA sein. Jedenfalls wird hier, bezogen auf den Einbau von <sup>14</sup>C-Leucin, die Ausbeute des modifiziertem NusA in Gegenwart der chimären tRNA auf bis zu 160 % gesteigert. Damit stellen die endogene Lysyl-tRNA oder die Lysyl-tRNA-Synthetase wahrscheinlich den limitierenden Faktor für die NusA-Synthese dar.

Der Einfluß von tSerLys auf die Homogenität des synthetisierten NusA Proteins wurde aus dem Autoradiogramm nach Trennung der Reaktionsansätze im SDS-Gel ermittelt (Abb. 28).

Abb. 28



#### Einfluß von tSerLys auf Haupt- und Nebenprodukte von NusA

Die Translationsreaktionen für die Synthese von NusA wurden in Gegenwart verschiedener  $^{14}\text{C}$ -markierter Aminosäuren und steigenden Mengen an tSerLys tRNAdurchgeführt. Die Numerierung der Spuren entspricht: 1-4 Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Leucin; 5-8 Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Serin; 9-12 Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Lysin; mit jeweils von links nach rechts 0, 0,4, 2 und 5  $\mu\text{M}$  tSerLys im Reaktionsansatz. In den Spuren 1-4 mit  $^{14}\text{C}$ -Leucin-Markierung läßt sich der Einfluß von steigenden Mengen tSerLys auf die synthetisierten Haupt- und Nebenprodukte verfolgen. Vorallem

die mit A markierte Bande für das vollständige NusA Protein nimmt mit steigender Menge tSerLys im Vergleich zu den Nebenprodukten stark zu. Die absolute, im Phosphoimager gemessene Bandenstärke von NusA nimmt in Gegenwart von tSerLys auf bis zu 230 % zu. Die meisten Nebenprodukte nehmen dabei in ihrer Intensität nur leicht zu oder bleiben in etwa konstant. Einige Banden im markierten Bereich B nehmen sogar deutlich ab. Die Gegenwart der tRNA tSerLys erhöht damit nicht nur die Gesamtproteinsynthese, sondern auch der Anteil an vollständigem Produkt nimmt deutlich zu.

Aus dem Autoradiogramm ist zu ersehen, daß der Anteil an erwartetem Produkt für NusA mit steigender Menge an tSerLys deutlich zu nimmt. Dagegen bleibt die Menge an Nebenprodukten in etwa konstant, bzw. sie nimmt ab (Abb. 28, Bereich B).

In diesem Zusammenhang ist auch hier die Ähnlichkeit der Codons AAG zur Ribosomenbindungsstelle interessant und die Inhibition einer unspezifischen Translationsinitiation an internen Bereichen der mRNA in Gegenwart von tSerLys denkbar. Möglicherweise werden translatierende Ribosomen in Abwesenheit der tSerLys in ihrer Bewegung entlang der mRNA aufgehalten, da bei der Decodierung von AAG-Codons im Translationsapparat die A-Stelle aufgrund eines Mangels an beladener Lysyl-tRNA über längere Zeiträume leer bliebe. Nachfolgende Ribosomen würden aufgestaut und könnten eine Leserasterverschiebung begünstigen oder gar eine abnormale Termination erzwingen. Die gestauten Ribosomen könnten weiterhin eine Inhibition der Bildung neuer Translationskomplexe zur Folge haben. Dies könnte zumindest teilweise die beobachtete absolute Ausbeutezunahme und die Steigerung des Anteils an vollständigem Produkt in Gegenwart der tSerLys erklären, wenn die tRNA den Mangel an endogener tRNA ausgleicht.

#### 4.5 Einfluß des Translationsstopcodons auf die H-FABP-Synthese

Für *E. coli* ist bekannt, daß eine effiziente Termination der Translation von der Art des Stopcodons (UAG, UGA oder UAA) aber auch vom Kontext des Stopcodons abhängen kann (Poole et al., 1995; Poole et al., 1998; Pavlov et al., 1998; Mottagui-Tabar et al., 1994; Mottagui-Tabar, 1998; Bjornsson et al., 1996). Hier wurde der Einfluß des Translationsstopcodons auf die *in vitro* Synthese von H-FABP im Hinblick auf Ausbeute und dem Auftreten von Nebenprodukten untersucht.

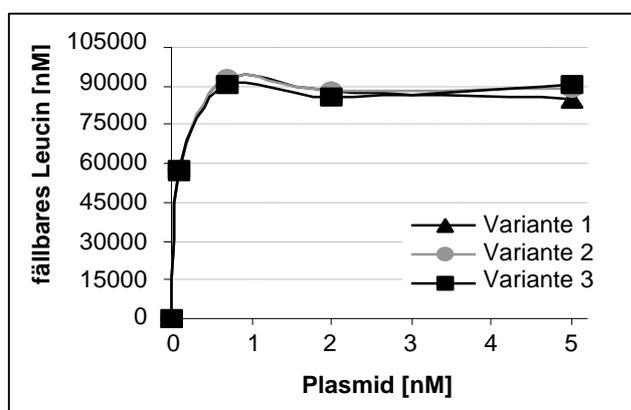
Es wurden drei Varianten des Plasmids pHMFA hergestellt, welche sich in den Sequenzen um das Translationstopcodon unterscheiden. Eine Variante codiert für das Stopcodon UGA, eine weitere für UAA(U). Die dritte Variante codiert für die zwei hintereinandergeschalteten Stop-signale UAA,UAA im Leserahmen des H-FABP-Gens, sowie für zwei weitere UAA Codons im zweiten und dritten Leserahmen (Abb. 29).

Abb. 29

	Gln    Ala <b>Stop</b>	
Variante 1	... CAG, GCA, <b>UGA</b> , CCU, GCC, CUC, UCC, UC ...	<i>Ausschnitt aus der mHMFA-Sequenz um das Translationsstopcodon</i> In den Sequenzausschnitten sind die letzten beiden Aminosäure- und grau unterlegte Stopcodons dargestellt. Für die dritte Variante ist die relative Position der Stop-signale zum Leserahmen der H-FABP-Sequenz angegeben
Variante 2	... CAG, GCA, <b>UAA, UCU</b> , GCC, CUC, UCC, UC ...	
Variante 3	... CAG, GCA, <b>UAA, UAA, GUA, AUU, AAC</b> , UC ...	
	Leserahmen →    1    1    2    3	

Die Varianten von pHMFA(EcoRV) wurden als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt, die H-FABP-Ausbeuten anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt bestimmt (Abb. 30) und die Haupt- und Nebenprodukte anhand eines Autoradiogramms nach SDS-PAGE überprüft (Abb. 31).

Abb. 30



#### H-FABP-Synthese abhängig vom Translationsstopcodon

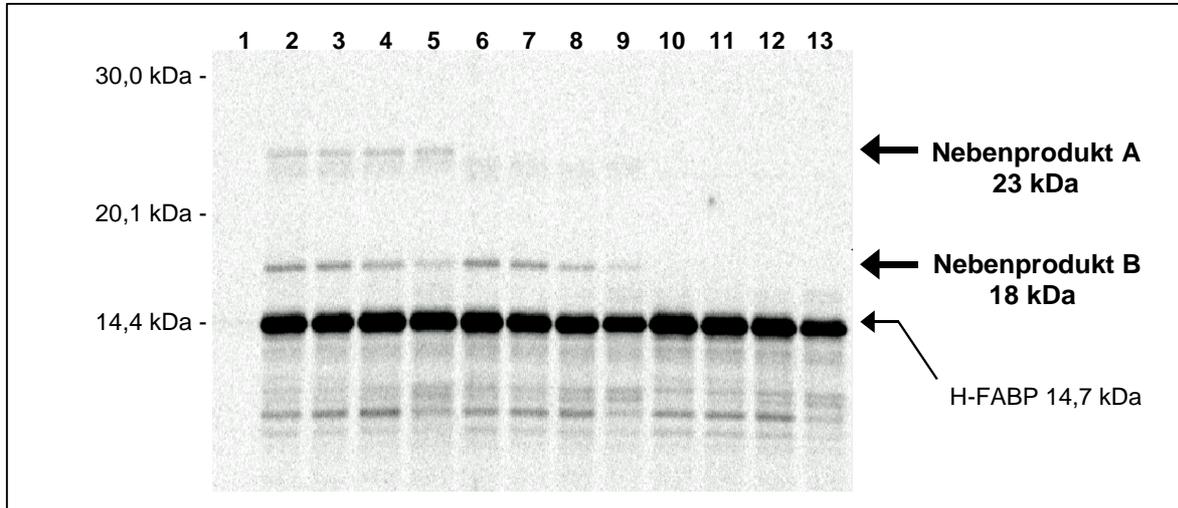
Drei Plasmidvarianten von pHMFA wurden, nach Restriktionsverdau mit EcoRV zur Generierung der Position für run-off Transkription, in verschiedenen Konzentration als Templat für die H-FABP-Synthese eingesetzt. Die Varianten unterscheiden sich nur im Typ und in der Anzahl der Stopcodons, die dem Leserahmen für H-FABP unmittelbar folgen. Die über den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Leucin ermittelte Ausbeute von H-FABP zeigt praktisch keine Abhängigkeit vom Typ und der Anzahl der Translationsstop-signale.

Anhand der Einbaurrate von  $^{14}\text{C}$ -Leucin läßt sich keine Abhängigkeit der H-FABP-Ausbeute vom Typ und der Anzahl der Translationsstop-signale nachweisen.

Dieses Ergebnis steht indirekt im Einklang mit den Untersuchungen zur Synthese von oligo-

meren Fusionsproteinen (siehe Kapitel 4.3). Auch dort wurden starke Indizien dafür erhalten, daß die Translationstermination (UGA-Stop) nicht maßgeblich limitierend für die Synthese von H-FABP sein kann.

Abb. 31

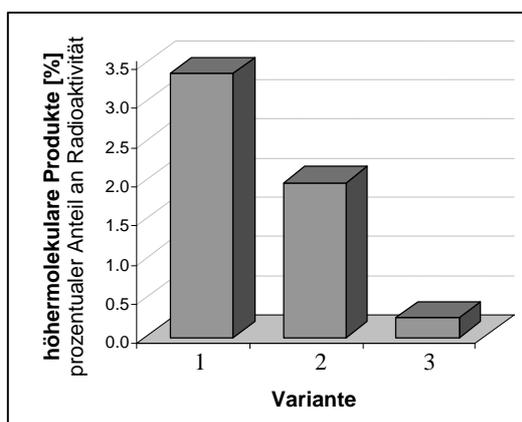


*Bildung von Nebenprodukten bei der H-FABP- Synthese abhängig vom Translationsstopcodon*

Die drei Varianten des Plasmids pHMFA mit unterschiedlichen Translationsstopsignalen wurden als Templat für die Synthese von H-FABP eingesetzt. Nach Trennung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Translationsprodukte im 15 % Laemmliigel wurde ein Autoradiogramm des Gels erstellt. Die für die Ansätze in den nummerierten Spuren eingesetzten Template waren: 1. kein Templat; 2-5. Plasmidvariante 1; 6-9 Plasmidvariante 2; 10-13 Plasmidvariante 3. Es wurden jeweils vier Plasmidkonzentrationen eingesetzt; von rechts nach links: 0.1, 0.7, 2 und 5 nM. Zusätzlich wurden nichtradioaktive Größenstandards aufgetragen (nur im Coomassie-gefärbten Gel zu sehen). Bei der Variante 1 treten im wesentlichen zwei Nebenprodukte (A und B) mit größerem Molekulargewicht von ca. 23 kDa und ca. 18 kDa auf. Bei der Variante 2 ist nur das Nebenprodukt B und bei der Variante 3 ist praktisch kein Nebenprodukt mit größerem Molekulargewicht als dem des H-FABP detektierbar.

Produkte mit höherem Molekulargewicht als dem des H-FABP (14,7 kDa) werden im Autoradiogramm des SDS-Gels nur beim Einsatz der Plasmidvarianten 1 und 2 mit einfachem UGA Stopcodon bzw. UAA(U) Stopcodon detektiert. Im ersten Fall werden zwei zusätzliche Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 23 kDa (Nebenprodukt A) und ca. 18 kDa (Nebenprodukt B), im zweiten Fall nur die Bande mit ca. 18 kDa detektiert. Der prozentuale Anteil der Summe der Radioaktivität in den Banden mit höherem Molekulargewicht im Verhältnis zur Gesamtradioaktivität (ganze Gelspur) wurde mit Hilfe des Phosphoimagers bestimmt.

Abb. 32



*Anteil höhermolekularer Translationsprodukte abhängig vom Stopcodon*

Die Translationsprodukte mit höherem als dem erwarteten Molekulargewicht wurden im Phosphoimager quantifiziert und dessen Anteil an der gesamten Radioaktivität einer Gelspur berechnet. Der Anteil an unspezifischem Translationsprodukt im Vergleich zum erwarteten Produkt ist in allen untersuchten Fällen relativ klein.

Den mit ca. 3 % größten Anteil an höhermolekularen Produkten erhält man bei der Variante 1 mit einfachem UGA Codon. Der Anteil nimmt ab, wenn UGA durch die Sequenz UAA(U) ersetzt wird und ist praktisch kaum noch nachweisbar, wenn drei UAA Codons in allen drei Leserahmen dem H-FABP-Gen direkt folgen.

Der prozentuale Anteil an Radioaktivität in den Banden mit höherem Molekulargewicht beträgt für den Ansatz mit Variante 1 (UGA Stopcodon) ca. 3% (Abb. 32). Er halbiert sich im Ansatz mit Variante 2 (UAAU Stopcodon) und ist bei Anwesenheit von drei Stopcodons in drei Leserahmen mit Variante 3 kaum noch nachweisbar.

Das theoretisch zu erwartende Molekulargewicht der Translationsprodukte, welche bei einem Durchlesen des regulären Stopcodons bzw. beim Auftreten einer Leserasterverschiebung entstehen würden, sind in der folgenden Tabelle für alle drei Plasmidvarianten zusammengefaßt (Tab. 16).

Tab. 16

Varianten 1 und 2:

Typ d. nächsten Stopcodons	Leserahmen	Abstand zum regulären Stopcodon [B]	zusätzlich eingebaute Aminosäuren	erwartetes Molekulargewicht [kDa]
UGA	1	18	6	15.4
UAA	2	94	31	<u>18.1</u>
UAA	3	206	69	<u>22.3</u>

Variante 3:

Typ d. nächsten Stopcodons	Leserahmen	Abstand zum regulären Stopcodon[B]	zusätzlich eingebaute Aminosäuren	erwartetes Molekulargewicht [kDa]
UAA	1	0	1	~14.8
UAA	2	4	2	~14.9
UAA	3	8	3	~15.0

*Theoretisch zu erwartende Translationsprodukte bei ausbleibender Termination am regulären Stopcodon*

Proteine mit größerem als dem erwarteten Molekulargewicht sind zu erwarten, wenn die Translationstermination am regulären Stopcodon aufgrund eines anomalen Durchlesens oder dem Auftreten einer Leserasterverschiebung ausbleibt. Die Molekulargewichte der entsprechenden Produkte, die bei einer Termination am nächsten stromabwärts folgenden Stopcodon entstehen sollten, sind für alle drei Leserahmen dargestellt.

Die Banden für die Produkte mit den unterstrichenen Molekulargewichten konnten im Autoradiogramm gefunden werden (ca. 18 kDa und ca. 23 kDa, siehe Abb. 31).

Bei einem Durchlesen des regulären Stopcodons UGA (Variante 1) bzw. UAAU (Variante 2) und einer Termination am nächsten stromabwärts folgenden Stopcodon ist ein Produkt mit ca. 15,4 kDa zu erwarten. Beim Auftreten einer Leserasterverschiebung kurz vor oder direkt am Stopcodon, was ebenfalls zu einem Durchlesen führte, würden Produkte mit 18,1 kDa (Stop im 2. Leserahmen) und 22,3 kDa (Stop im 3. Leserahmen) entstehen. Tatsächlich werden Produkte mit ca. 18 kDa bzw. ca. 23 kDa detektiert. Die Sequenzen der Konstrukte mit einfachen Terminationscodons sind bis auf drei Basen am Stopcodon identisch. Trotzdem werden in einem Fall zwei, im anderen Fall nur ein definiertes Nebenprodukt mit höherem Molekulargewicht detektiert. Daher ist eine Leserasterverschiebung vom ersten in den dritten Leserahmen direkt am UGA Stopcodon sehr wahrscheinlich. Denn das Nebenprodukt A mit ca. 23 kDa (Termination im dritten Leserahmen) tritt im Ansatz mit UAA(U) Stopcodon nicht auf. Weiterhin ist das Nebenprodukt B mit ca. 18 kDa wahrscheinlich das Ergebnis einer Leserasterverschiebung an den Stopcodons UGA als auch UAA(U) vom ersten in den zweiten Leserahmen. Es kann sich bei den genannten Nebenprodukten nicht um H-FABP-unabhängige Produkte handeln, da bei der Anwesenheit von drei unmittelbar aufeinander folgenden Stopcodons in allen drei Leserahmen diese Nebenprodukte nicht mehr auf treten.

---

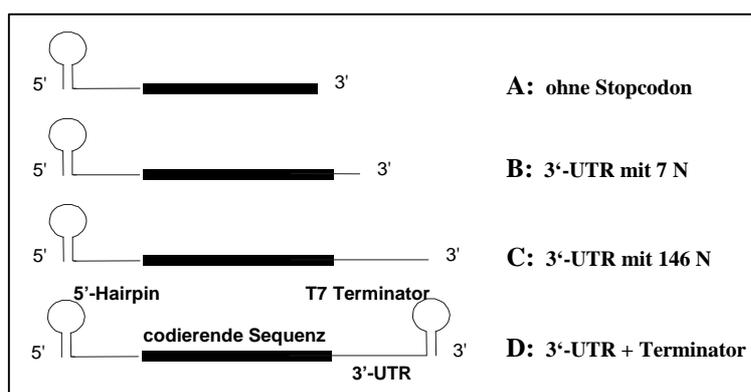
Interessant ist der relativ geringe Anteil an Nebenprodukten, die aus einer Leserasterverschiebung am UGA-Codon in diesem System hervorgehen. Aus Untersuchungen in *E. coli* ging hervor, daß der Unterschied bezüglich der Terminationseffizienz zwischen UAA(U)- und UGA(C)-Stopsignalen sehr groß sein kann (Pavlov et al., 1998; Poole et al., 1998; Poole et al., 1995). In einem Fall wurde eine mehr als elffach höhere Terminationseffizienz von UAA(U) gegenüber dem schwächsten Stoppsignal UGA(C) gefunden (Poole et al., 1995). Da der Anteil an nicht regulär terminiertem Produkt in der zellfreien Translation von H-FABP nur wenige Prozentpunkte beträgt, kann das hier verwendete System als sehr effizient bezüglich der Translationstermination eingeschätzt werden.

## 4.6 Messenger RNA – Stabilität und Proteinsynthese

### 4.6.1 Messenger RNA Stabilität in der *in vitro* Proteinbiosynthese abhängig vom 3'-Terminus

Der Einfluß der 3'-terminalen Sequenz auf die Halbwertszeit der für H-FABP codierenden mHMFA im Translationssystem wurde untersucht. Dabei ist der Einfluß der Länge des 3'-nicht-translatierten Bereichs (3'-UTR) sowie der Einfluß einer Sekundärstruktur am 3'-Terminus auf die Halbwertszeit der mRNA sowie die resultierende Proteinsynthese-Effizienz von Interesse. Ausgehend von einer Variante des Plasmids pHMFA, pFA<sub>SM</sub> (Abb. 33), wurden vier verschiedene mRNAs über *in vitro* Transkription unter der Kontrolle von T7 RNA-Polymerase hergestellt. Die run-off Transkripte unterscheiden sich in der Länge und Struktur ihrer 3' terminalen Sequenz (Abb. 33).

Abb. 33



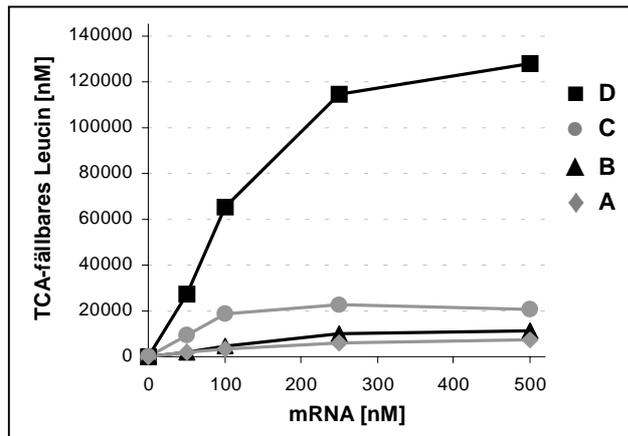
Schematische Darstellung der mFA-Varianten mit verschiedenen 3'-UTRs

pFA<sub>SM</sub> (siehe unten) wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, wodurch die über run-off Transkription entstehenden 3'-Enden definiert wurden. Konstrukt A endet in dem für H-FABP codierenden Bereich, 23 Codons vor dem Stopcodon. B und C haben 3'-UTRs von 7 bzw. 146 Nucleotiden Länge ohne besondere Sekundärstruktur. Konstrukt D hat als 3'-Terminus die starke Sekundärstruktur des T7 Transkriptionsterminators. Die zur De-

finierung der 3'-Enden eingesetzten Restriktionsenzyme sind A: HindII, B: SmaI, C: BamHI und D: EcoRV. Die hier eingesetzte Variante von pHMFA pFA<sub>SM</sub> wurde zur Generierung einer Sequenz modifiziert. Dazu wurde die Sequenz CCCTCT, vier Nucleotide stromabwärts des Translationsstopcodons, durch ortsgerechte Mutagenese in die Sequenz CCCGGG umgewandelt.

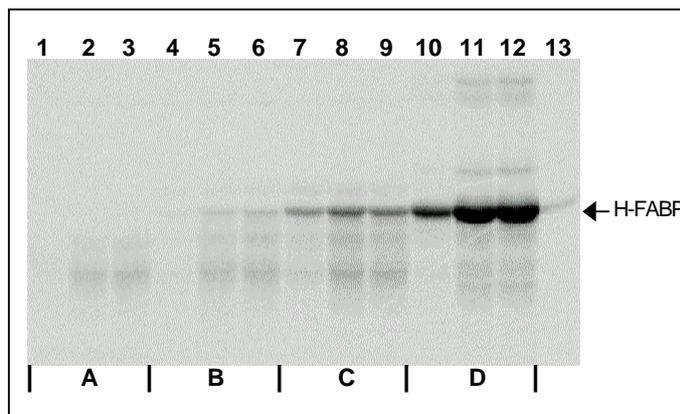
Das Plasmid wurde an verschiedenen Positionen linearisiert. Dabei definieren die Linearisierungsstellen die über run-off Transkription entstehenden 3'-Enden. Variante A endet im codierenden Bereich der mRNA, B kurz nach und Variante C 146 Nucleotide nach dem Translationsstopcodon. Die Variante D unterscheidet sich von C durch die Anwesenheit der starken Sekundärstruktur des T7 Transkriptionsterminators am Ende einer zusätzlichen Sequenz von 111 Nucleotiden. Die mit Hilfe von <sup>35</sup>S-CTP radioaktiv markierten Transkripte wurden als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt und parallel der zeitliche Verlauf der Proteinsynthese (Abb. 34 und 35) und der mRNA-Degradation (Abb. 36 und 37) gemessen. Um eine unerwünschte Detektion der Radioaktivität der mRNA zu vermeiden, wurde jeweils ein Teil der Reaktionsansätze für die Messung der Proteinsynthese mit Ribonuklease A behandelt. Entsprechend wurde der andere Teil der Ansätze für die Bestimmung der zu den bestimmten Zeitpunkten verbliebenen Radioaktivität der mRNA mit Proteinase K behandelt.

Abb. 34

*Einfluß der 3'-UTR auf die Synthese von H-FABP*

Die H-FABP-Translation ausgehend von den mRNA-Varianten A-D mit unterschiedlichen 3'-UTRs wurden anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-Fällbares Translationsprodukt bestimmt. Nur Konstrukt D mit der T7 Terminatorstruktur am 3'-Ende ist ein effizientes Templat für die H-FABP-Synthese. Dagegen ist die Translationseffizienz bei Konstrukt C ohne Terminator auf ca. 15 % reduziert. Eine weitere Halbierung der Proteinsynthese wird bei Konstrukt B mit minimaler 3'-UTR und Konstrukt A mit abwesender 3'-UTR sowie fehlendem Stopcodon beobachtet.

Abb. 35

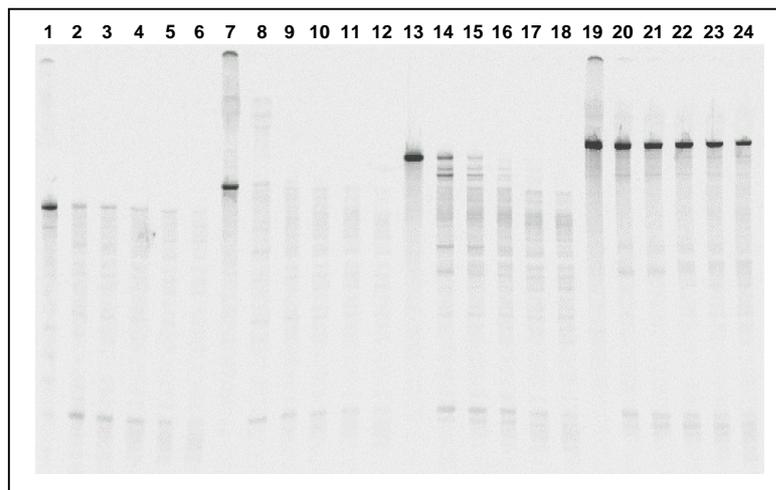
*Einfluß der 3'-UTR auf die Produkthomogenität*

Die Reaktionsansätze gemäß Abb. 34 wurden im 15 % Laemmliigel getrennt und ein Autoradiogramm des Gels erstellt. Der Auftrag in den nummerierten Spuren entspricht: (1-3) Variante A, (4-6) Variante B, (7-9) Variante C, (10-12) Variante D und (13) Reaktionsansatz ohne Templat; für jede Variante sind von links nach rechts Reaktionsansätze mit 50, 250 und 500 nM mRNA aufgetragen. Mit steigender Translationseffizienz, abhängig von der 3'-UTR nimmt auch der prozentuale Anteil an vollständigem Produkt im Vergleich zu den gesamten Translationsprodukten deutlich sichtbar zu.

Die anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin ermittelten Proteinsyntheseraten zeigen eine Korrelation von steigender Translationseffizienz mit zunehmender Länge der 3'-UTR. Eine enorm gesteigerte Proteinsynthese wird bei Anwesenheit der 3'-terminalen Sekundärstruktur des T7 Transkriptionsterminators beobachtet. Mit steigender Translationseffizienz nimmt auch der Anteil an vollständig synthetisiertem Protein im Verhältnis zur gesamten detektierten Radioaktivität erkennbar zu. Die mRNA ohne Translationsstopcodon weist die geringste der beobachteten Syntheseraten auf. Dies ist sehr wahrscheinlich auf eine verringerte Regeneration der Ribosomen zurückzuführen, da durch eine ausbleibende, geregelte Termination die möglicherweise auf der mRNA immobilisierten Ribosomenuntereinheiten nicht mehr für die Translationsinitiation einer neuen Peptidkette zur Verfügung stehen.

Offenbar sind die Länge der 3'-UTR und die Ausprägung einer Sekundärstruktur am 3'-Ende von sehr großer Bedeutung für die Syntheseausbeute von H-FABP.

Abb. 36

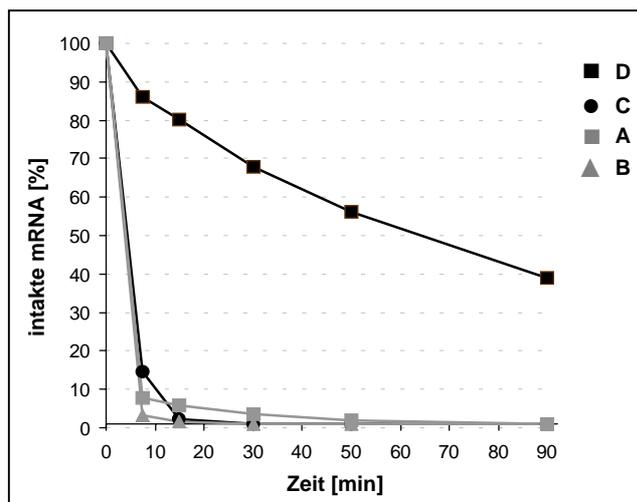


#### Degradation der mRNA-Varianten mit unterschiedlichen 3'-UTRs

Aus Aliquots der Translationsreaktionen, für die jeweils 250 nM der mRNA-Varianten A-D eingesetzt wurden, wurde die zu verschiedenen Zeitpunkten verbliebene, radioaktiv markierte mRNA aufgereinigt und im denaturierenden 5 % Polyacrylamidgel getrennt. Die Auftragung in den nummerierten Spuren entsprechend der Varianten ist: (1-6) A, 392 Nt; (7-12) B, 471 Nt; (13-18) C, 610 Nt und (19-24) D, 746 Nt. Die Aliquots wurden den Translationsreaktionen zu den Zeitpunkten 0, 7.5, 15, 30, 50 und 90 min (jeweils von links nach rechts)

entnommen. Nur bei Anwesenheit der starken Sekundärstruktur des T7 Transkriptionsterminators in Variante D ist intakte mRNA nach 30 Minuten Inkubationszeit in signifikanter Menge noch nachweisbar. Alle anderen Varianten werden wesentlich schneller abgebaut. Variante C mit einer 3'-UTR von 146 N Länge zeigt geringfügig höhere Stabilität als die Varianten A und B ohne nennenswerte 3'-UTR.

Abb. 37



#### Quantifizierung der Degradation der mRNA-Varianten mit unterschiedlichen 3'-UTRs

Die Radioaktivität im Gel aus Abb. 36 wurde mit Hilfe des Phosphoimagers quantifiziert. Dargestellt ist der zum jeweiligen Zeitpunkt verbliebene prozentuale Anteil der Bande mit vollständiger mRNA. Daraus kann die Halbwertszeit der mRNA-Variante D zu ~ 65 min und die der Varianten A-C zu ~ 5 min bestimmt werden. Aus dem Diagramm wird noch einmal sehr deutlich, daß nur die Variante mit 3'-terminaler Sekundärstruktur über einen längeren Zeitraum Resistenz gegen Degradation zeigt. Der Endständige T7 Transkriptionsterminator schützt sehr wahrscheinlich die mRNA gegen enzymatischen 3'-exonucleolytischen Abbau.

Die Halbwertszeit der untersuchten mRNA-Varianten im verwendeten Translationssystem ist extrem abhängig von der Größe der 3'-UTR bzw. der Struktur des 3'-Endes. mRNA ohne Terminator degradiert sehr schnell mit Halbwertszeiten im Bereich von ungefähr 5 Minuten. Bei Anwesenheit der 146 Nucleotide umfassenden 3' UTR ohne besondere Sekundärstruktur ist die Halbwertszeit geringfügig erhöht. Bei Anwesenheit der starken Sekundärstruktur des T7 Transkriptionsterminators ist jedoch intakte mRNA auch nach 30 Minuten Inkubationszeit in großer Menge nachweisbar. In diesem Fall ist die Halbwertszeit der mRNA (mHMFA(EcoRV)) mit etwa 65 Minuten ca. 13 mal größer als bei mRNA ohne Terminator. Die Proteinsyntheseraten korrelieren direkt mit den entsprechenden Halbwertszeiten der mRNAs. So findet nur in Gegenwart des Terminators effiziente Proteinsynthese statt. Es ist höchst wahrscheinlich, daß die Effizienz der Translation von der mRNA-Stabilität abhängt.

Es wird postuliert, daß die mRNA vom 3' Ende her durch Exoribonucleaseaktivität abgebaut wird. In diesem Fall wirkt die Sekundärstruktur des T7 Transkriptionsterminators stark inhibierend auf die Exonucleaseaktivität. Auch die wenig strukturierte 3' UTR hat einen geringen, aber nachweisbaren, inhibierenden Effekt auf den Abbau der mRNA. Trotz der veränderten Reaktionsbedingungen des zellfreien Systems und nicht stattfindender Koexpression zahlreicher Gene, steht dieses Ergebnis im Einklang mit früher gemachten Beobachtungen in *E. coli*, wonach 3'-terminale Sekundärstrukturen mRNA stabilisieren können (Bechhofer, 1993; Platt, 1986; Makrides, 1996; Mertens et al., 1996; Fuchs, 1997) und damit oftmals eine erhöhte Expression des betreffenden Gens bewirken (Higgins et al., 1993).

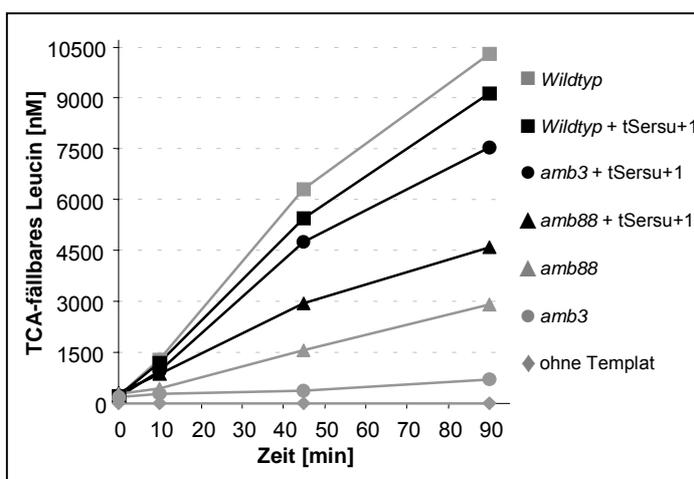
Für die mRNA-Variante ohne Stopcodon (A) wurde ein Pausieren der Ribosomen am 3'-Ende der mRNA aufgrund ausbleibender Translationstermination postuliert. Sollten Ribosomen tatsächlich das 3'-Ende der mRNA bedecken, so wäre damit jedoch kein Schutz der mRNA vor exonucleolytischem Abbau verbunden, da diese mRNA vergleichsweise schnell degradiert. Möglicherweise wirkt hier ein Mechanismus zur Vermittlung einer alternativen Translationstermination (Keiler et al., 1996). Demnach erkennt der Ribonukleoproteinkomplex SsrA nicht terminierte Komplexe aus mRNA, Ribosom und naszierendem Peptid und setzt seine eigene Stopcodon enthaltende RNA als Templat anstelle der Stopcodon-losen mRNA. Die C-terminale Aminosäuresequenz des entstehenden chimären Proteins dient dabei als Erkennungssequenz für die proteolytische Degradation des Proteins. Dies könnte erklären warum die nicht mehr am 3'-Ende geschützte mRNA schnell abgebaut wird und auch kein spezifisches Translationsprodukt nachweisbar ist.

#### 4.6.2 Einfluß der Translation auf die mRNA-Stabilität

Welchen Einfluß hat die Translation auf die Stabilität einer mRNA? Es wurde analysiert in wie weit ein aktiver Translationsapparat gegen mRNA-Degradation schützen kann. Dazu wurde die Halbwertszeit der für H-FABP codierenden mRNA mHMFA(EcoRV) bei minimaler, bei partieller und bei vollständiger Translation untersucht. Um eine vorzeitige Termination der Translation herbeizuführen, wurden mRNAs mit *amber* Stopcodons (UAG) anstelle der Codons 3 und 88 in dem 133 Codons umfassenden Leserahmen des H-FABP-Gens eingesetzt (Gerrits et al., 2001). Zusätzlich wurden die eingeführten Stopcodons mit Hilfe einer *amber* Suppressor-tRNA überlesen, um eine vollständige Translation wiederherzustellen. Dabei ist zu beachten, daß eine 3'-exonukleolytische Degradation des Transkripts durch die Anwesenheit einer 3'-terminalen Sekundärstruktur stark inhibiert ist (siehe Kapitel 4.6.1). Hier wird in erster Linie der Einfluß der Translationseffizienz auf die endonukleolytische Spaltung von mRNA untersucht.

Die radioaktiv markierten Transkripte "Wildtyp" (mHMFA(EcoRV)), "amb3" (mHMFA<sub>amb3</sub>(EcoRV)) und "amb88" wurden für die Translation eingesetzt. Die Proteinsynthese fand in Ab- und Anwesenheit der *in vitro* transkribierten *amber*-Suppressor-tRNA tSer+1 (Gerrits et al., 2001) statt. Der zeitliche Verlauf der Proteinsynthese als auch der mRNA-Degradation wurde wie bereits in Kapitel 4.6.1 beschrieben während der Translation gemessen. Dazu wurde die Proteinausbeute anhand des Einbaus von <sup>14</sup>C-Leucin in TCA-fällbares Material (Abb. 38) und die Homogenität der Translationsprodukte über das Autoradiogramm eines SDS-Gels bestimmt (Abb. 39). Die zu den verschiedenen Zeitpunkten verbliebene Menge an RNA wurde anhand der TCA-fällbaren Radioaktivität bestimmt (Abb. 40). Die RNA wurde aufgereinigt, im denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt und die entstandenen Fragmente im Autoradiogramm des Gels detektiert (Abb. 41).

Abb. 38

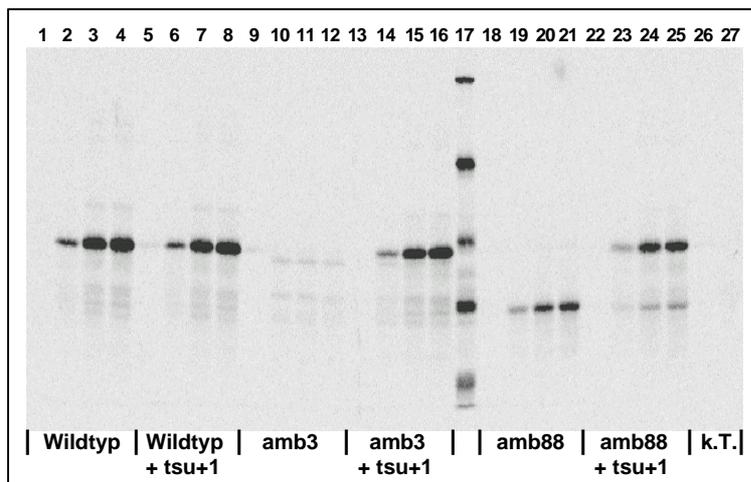


Translation von mHMFA und *amber*-Varianten – Einfluß der *amber*-Suppressor tRNA  
400 nM der mRNAs *Wildtyp*, *amb3* und *amb88* wurden als Templat für die Proteinsynthese in Ab- und Abwesenheit von 2 µM der *in vitro* transkribierten *amber*-Suppressor tRNA tSersu+1 eingesetzt. Die anhand des Einbaus von <sup>14</sup>C-Leucin ermittelten Syntheseraten spiegeln in erster Näherung die Masseausbeute der Translationsprodukte wieder, da das 88 Aminosäurereste umfassende, verkürzte H-FABP etwa das selbe Verhältnis Leucin zu Masse aufweist wie das vollständige Produkt. Die effizienteste Translation geht von der *Wildtyp* mRNA aus. Der Einbau von etwa 103 µM <sup>14</sup>C-Leucin nach 90 min Inkubation entspricht einer Ausbeute von 11.4 µM bzw.

170 µg/ml H-FABP. In Gegenwart von tSersu+1 ist die Ausbeute leicht reduziert. Für *amb3* ist eine geringe Menge Translationsprodukt nachweisbar, das erwartete Syntheseprodukt, das Dipeptid Methionylvalin wird jedoch nicht radioaktiv markiert. In Gegenwart von tSersu+1 ist die H-FABP-Synthese verglichen mit dem *Wildtyp* jedoch weitgehend wiederhergestellt. Ausgehend von *amb88* ist die Translationsausbeute relativ gering. Auch in Gegenwart der Suppressor tRNA erreicht die Syntheseleistung im Vergleich zum *Wildtyp* nur etwa 50 %. Templatunabhängige Translation ist praktisch nicht nachweisbar.

Basierend auf den Ergebnissen des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin verläuft die Proteinsynthese am effektivsten mit der unmodifizierten mRNA. Die Anwesenheit der Suppressor tRNA inhibiert die Translation geringfügig. In Abwesenheit der Suppressor tRNA findet für die *amb3* Variante geringe Synthese statt. Bei Suppression ist die Synthese zu ca. 80%, im Vergleich zum *Wildtyp*, wiederhergestellt. Für die *amb88* Variante wird ohne Suppression nur mäßige, mit Suppression etwas stärkere aber im Vergleich zum *Wildtyp* mit 50% Ausbeute relativ geringe Translation detektiert. Templatanabhängige Translationsprodukte sind kaum nachweisbar.

Abb. 39



#### Amber-Suppression von *mHMFA* und den Varianten *amb3* und *amb88*

Die Translationsprodukte wie in Abb. 38 beschrieben wurden im 15 % Laemmli-gel elektrophoretisch getrennt und ein Autoradiogramm des Gels erstellt. Der Auftrag in den nummerierten Spuren entspricht: (1-4) *Wildtyp*, (5-8) *Wildtyp* + Suppressor tRNA, (9-12) *amb3*, (13-16) *amb3* + Suppressor tRNA, (17) radioaktiv markierte Molekulargewicht-Standards von oben: 30 kDa, 21.5 kDa, 12.5 kDa, 6.5 kDa und 5.7 kDa, (18-21) *amb88*, (22-25) *amb88* + Suppressor tRNA, (26-27) ohne Templat. Von den Reaktionsansätzen mit Templat wurden Aliquots nach 0, 10, 45 und 90 min In-

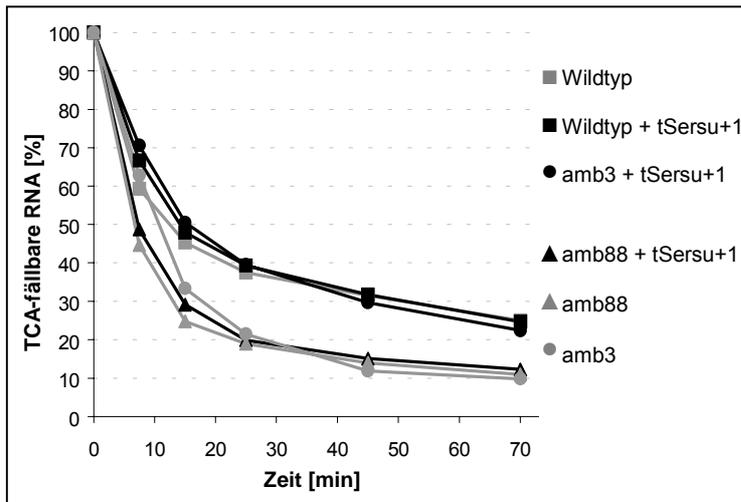
kubationszeit aufgetragen (jeweils von links nach rechts). Die Meßpunkte aus der Reaktion ohne Templat entsprechen 0 und 90 min.

Alle Translationsprodukte erscheinen als klare Banden mit erwartetem Molekulargewicht. Die Suppressionseffizienz, definiert als das molare Verhältnis: Suppressionsprodukt/(Suppressionsprodukt + Terminationsprodukt), für den Ansatz mit *amb88* und Suppressor-tRNA beträgt ca. 70%. Für diese Berechnung wurden die Bandenintensitäten im Phosphoimager quantifiziert und die molare  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der Translationsprodukte berücksichtigt.

Aus dem Autoradiogramm des Proteingels geht hervor, daß weitgehend homogene Produkte mit erwartetem Molekulargewicht synthetisiert wurden. Bei Anwesenheit der Suppressor tRNA findet eine effiziente Suppression statt und das vollständige Protein wird gebildet. Ausgehend von der mRNA-Variante *amb88* wird eine Suppressionsrate (molare Ausbeute des Suppressionsproduktes im Verhältnis zur Summe der molaren Ausbeuten von Suppressions- und Terminationsprodukt) von ca. 70 % ermittelt (Gerrits et al., 2001). Dabei ist die Suppressionrate etwas zeitabhängig (nicht dargestellt).

Zur Bestimmung der zeitlichen mRNA-Degradation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die verbliebene TCA-fällbare Radioaktivität der  $^{35}\text{S}$ -markierten Transkripte in der Translationsreaktion nach Behandlung mit Proteinase K gemessen. Aus Voruntersuchungen ist bekannt, daß der größte Anteil der meßbaren Radioaktivität mit > 95 % dem vollständigen Transkript zukommt und wenig intermediäre Abbaufragmente nachweisbar sind. Daher stimmen die relativen Meßwerte aus TCA-Fällung und der Detektion des vollständigen Produkts im Autoradiogramm des RNA-Gels gut überein.

Abb. 40



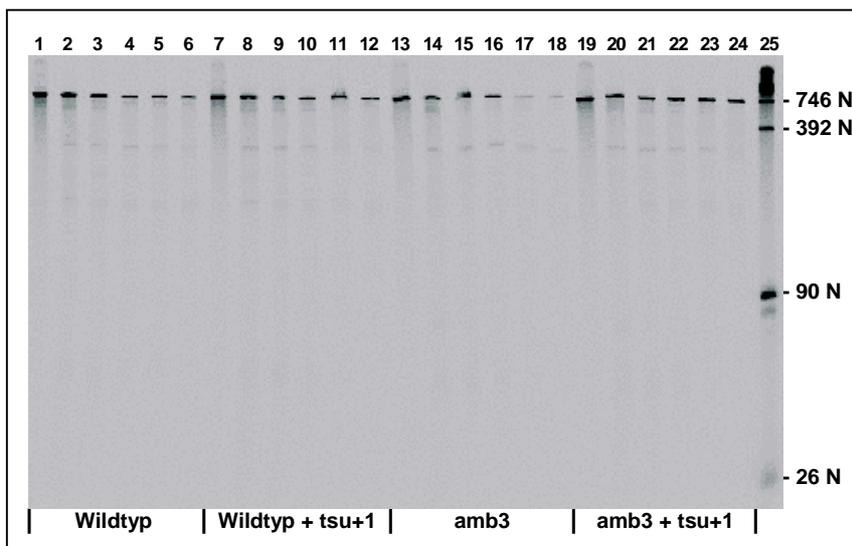
#### Degradation von *mHMFA* und deren *amber*-Varianten – Einfluß der *amber*-Suppressor *tRNA*

Die radioaktiv markierten Transkripte *Wildtyp*, *amb3* und *amb88* wurden in Ab- und Abwesenheit der *amber*-Suppressor-*tRNA* für die Proteinsynthese eingesetzt. Die RNA-Degradation wurde über die zu den verschiedenen Zeitpunkten verbliebene TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt. Prinzipiell können zwei Klassen des Verlaufs der RNA-Degradation unterschieden werden. Die erste, langsamere degradierende Klasse setzt sich zusammen aus Reaktionsansätzen mit *Wildtyp*, *Wildtyp* + Suppressor *tRNA* und *amb3* + Suppressor *tRNA*. Hier werden nach 25

min Inkubation noch ca. 40 % fällbare RNA detektiert. Die zweite Klasse mit schnellerem Abbau der Transkripte betrifft die Ansätze mit *amb3*, *amb88* und *amb88* + Suppressor *tRNA*. Hier ist nach 25 min mit ca. 20 % Rest-RNA gegenüber der ersten Klasse nur noch etwa die Hälfte an verbliebenem Transkript nachweisbar.

Basierend auf der Messung der zu den verschiedenen Zeitpunkten verbliebenen fällbaren RNA zeigte sich, daß einige mRNAs ähnlich schnell degradiert werden, während die anderen mRNAs eine vergleichbare langsamere Degradation zeigen. Langsamere Degradation findet bei Reaktionsansätzen mit unmodifizierter mRNA in An- und Abwesenheit der Suppressor *tRNA* sowie mit *amb3* in Anwesenheit der Suppressor *tRNA* statt. Ein schnellerer Abbau wird für Ansätze mit *amb3* und *amb88* in Abwesenheit der Suppressor *tRNA* sowie mit *amb88* in Gegenwart der Suppressor *tRNA* beobachtet. Im ersten Fall werden nach 25 Minuten noch ca. 40% der für die Translation eingesetzten RNA detektiert. Im zweiten Fall beträgt dieser Wert nach 25 Minuten mit ca. 20 % nur noch etwa die Hälfte.

Abb. 41

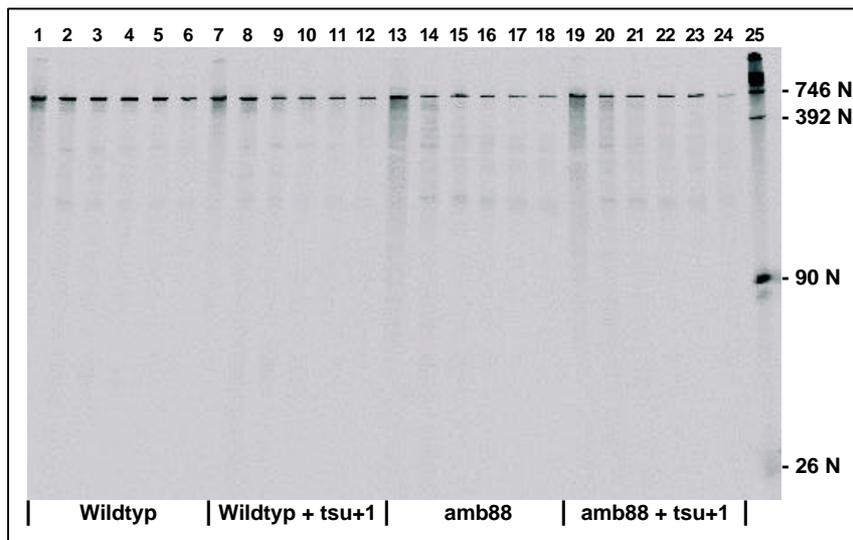


#### Degradation der *Wildtyp* mRNA und deren *amb3* Variante abhängig von *amber*-Suppression

Zu verschiedenen Zeitpunkten der Translation wurden die radioaktiv markierten Transkripte aufgereinigt und auf ein denaturierendes 5,3 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Dargestellt ist das Autoradiogramm des Gels. Der Auftrag in den nummerierten Spuren entspricht Reaktionsansätzen mit: (1-6) *Wildtyp* mRNA, (7-12) *Wildtyp* mRNA + Suppressor *tRNA*, (13-18) *amb3* mRNA, (19-24) *amb3* mRNA + Suppressor *tRNA* und (25) radioaktiv markierte Größenstandards. Die Meß-

punkte für die vier Reaktionsansätze entsprechen jeweils von links nach rechts: 0, 7,5, 15, 45 und 70 min. Für die Reaktion mit *amb3* ohne Suppressor *tRNA* und ohne nachweisbare Proteinsynthese, ist die schnellere Degradation der *amb3* mRNA (Spuren 13-18) deutlich erkennbar. Interessanterweise wird für alle Ansätze nur eine minimale Menge an intermediären Degradationsfragmenten bis hin zu sehr kleinen RNAs von ca. 26 Nukleotiden Länge detektiert.

Abb. 42



*Degradation der Wildtyp mRNA und dessen amb88 Variante abhängig von amber-Suppression*  
Auf diesem Autoradiogramm ist der zeitliche Verlauf der Degradation von *amb88* in Reaktionsansätzen ohne und mit Suppressor tRNA zu sehen. Zur Kontrolle sind hier wie in Abb. 41 die entsprechenden Auftragsungen der Wildtyp-Reaktionen aufgeführt. Der Auftrag in den nummerierten Spuren entspricht Reaktionsansätzen mit: (1-6) Wildtyp mRNA, (7-12) Wildtyp mRNA + Suppressor tRNA, (13-18) *amb88* mRNA, (19-24) *amb88* mRNA + Suppressor tRNA und (25) radioaktiv markierte Größenstandards.

Im Autoradiogramm ist der gegenüber dem Wildtyp schnellere Abbau der *amb88* mRNA zu erkennen. Die beschleunigte Degradation ist hier weitgehend unabhängig von der Anwesenheit der Suppressor tRNA während der Translation.

In den Autoradiogrammen der gelelektrophoretischen Trennungen sind radioaktiv markierte RNAs bis hin zu kleinen Fragmenten von etwa 20 Nukleotiden zu sehen. In den meisten Fällen sind mehr als 95% der im Phosphoimager detektierten Radioaktivität in der Bande mit vollständiger mRNA wiederzufinden. Das heißt der Anteil an Degradationsfragmenten beträgt weniger als 5%. Daher können die Meßwerte aus der TCA-Fällung in sehr guter Näherung - anstelle der Meßwerte für vollständiges Produkt im Gel - zur Auswertung der tatsächlichen zeitlichen Degradation der mRNAs herangezogen werden. Das Bandenmuster der verkürzten Fragmente ist prinzipiell bei allen mRNA-Varianten sehr ähnlich und damit weitestgehend unabhängig von der Anwesenheit der Suppressor tRNA.

Vergleicht man die Geschwindigkeiten der mRNA-Degradationen mit der Proteinsyntheseeffizienz, so ist eine gute Korrelation festzustellen. Die größten Halbwertszeiten weisen mRNAs auf, welche mit hohen Translationsraten verbunden sind. Das sind die unmodifizierte mRNA unabhängig von der Anwesenheit der Suppressor tRNA und die *amb3* Variante bei effizienter Suppression. In diesen Fällen wird das vollständige Protein synthetisiert. Bei der vorzeitigen Termination der Translation im Falle von *amb3* in Abwesenheit der Suppressor tRNA wird die mRNA dagegen wesentlich schneller degradiert. Die Halbwertszeit ist hier auf etwa die Hälfte reduziert. Im Falle der *amb88* mRNA wird verglichen mit der unmodifizierten mRNA weniger Protein synthetisiert. Auch in Anwesenheit der Suppressor tRNA wird die Translationseffizienz nicht vollständig wiederhergestellt und ca. 30% der molaren Ausbeute an Polypeptiden entspricht dem Terminationsprodukt. Die *amb88* mRNA ist unabhängig von der Suppressor tRNA vergleichsweise instabil.

Zusammengefaßt ist hier ein kausaler Zusammenhang zwischen Translationseffizienz und mRNA-Stabilität sehr wahrscheinlich. Je häufiger eine mRNA translatiert wird und je größer der translatierte Bereich, um so größer ist ihre Halbwertszeit.

Da die Translation selbst die Halbwertszeit der mRNA beeinflusst, wird postuliert, daß der auf der mRNA wandernde Translationskomplex die mRNA vor Degradation schützt. Die hier eingesetzten mRNAs weisen an beiden Enden starke Sekundärstrukturen auf, welche einen an den Enden initiierten Abbau inhibieren (Mertens et al., 1996). Vermutlich ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der mRNA-Degradation im Translationsystem ein endonukleolytischer Prozess. In diesem Fall wäre das Ende eines stromaufwärts liegenden Spaltfragments nicht mehr durch eine Sekundärstruktur geschützt. Dieses Fragment würde dann mit hoher Geschwindigkeit von Exoribonucleasen abgebaut. Das nicht mehr translatierbare stromabwärts liegende Spaltfragment verlöre den schützenden Translationsapparat. Dies könnte erklären, daß trotz der beobachteten Abnahme der intakten mRNA mit der Zeit kaum Degradationsintermediate im Autoradiogramm des Gels detektierbar sind.

Nilsson et al. (1987) berichteten eine Destabilisierung der *bla* mRNA, wenn ein Stopcodon innerhalb der ersten 26 Codons eingefügt wurde. Dagegen war die Stabilität normal, wenn das Stopcodon weiter stromabwärts lag. Es blieb jedoch ungeklärt, ob die Destabilisierung der mRNA auch das Resultat einer reduzierten Proteinsyntheseeffizienz, z.B. aufgrund einer veränderten mRNA-Faltung oder eines veränderten Kontexts für die Translationstermination, sein könnte. Tatsächlich wurde hier eine Destabilisierung der *amb88* mRNA beobachtet. Der Grund hierfür scheint nicht die vorzeitige Termination selbst, sondern eine reduzierte Translationseffizienz zu sein, da auch bei hoher *amber* Suppressionseffizienz die normale Stabilität nicht wieder hergestellt wird.

Letztlich wird hier die Hypothese unterstützt, nach der eine mRNA nicht per se gegen endonukleolytischen Abbau stabil sein muß, um hohe Translationsraten erzielen zu können. Vielmehr scheint eine effizient translatierte mRNA durch die Translation selbst stabilisiert zu werden. Die dadurch erhöhte Halbwertszeit hat dann in synergetischer Weise wiederum eine verbesserte Proteinsynthese zur Folge.

#### 4.6.3 Einfluß von Translationsantibiotika auf Proteinbiosynthese und mRNA-Stabilität

Hat die Blockierung einzelner Schritte der Translation verschiedene Einflüsse auf die mRNA-Stabilität? Die Translation von mHMFA wurde auf unterschiedliche Weise inhibiert und nach einer Korrelation zu der resultierenden Stabilität einer mRNA gesucht:

- durch Eliminierung der Ribosomenbindungstelle und
- durch die Wirkung eines Antibiotikums der Initiation der Translation (Aurintricarbonsäure, ATA) und
- durch verschiedene Antibiotika, die die Elongation der Translation inhibieren (Chloramphenicol und Puromycin)

Dabei ist für Chloramphenicol bekannt, daß es zu einem Festsetzen translatierender Ribosomen auf der mRNA führt, während Puromycin eine Trennung des Komplexes aus Ribosomen mRNA und naszierendem Peptid bewirkt (Schneider et al., 1978; Pato et al., 1973).

Weiterhin ist aus Untersuchungen *in vivo* bekannt, daß mindestens ein Translationsantibiotikum einen unspezifischen, mRNA stabilisierenden Effekt zeigt. Es wurde für Chloramphenicol ein indirekter Effekt postuliert, nach dem eine induzierte, gesteigerte rRNA-Synthese zu einer Absättigung der im System vorhandenen Endoribonucleasen führen könnte (Lopez et al., 1998).

Hier werden die Vorteile des *in vitro* Translationsystems ausgenutzt: Effekte, die sich in lebenden Systemen 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.

Eine Variante der für H-FABP codierenden mRNA mHMFA(EcoRV) (kurz: mFA) mit inaktiver Ribosomenbindungstelle, mHMFAOSD(EcoRV) (kurz: mFAOSD), wurde hergestellt. Dazu wurden drei Basen im Bereich der Shine-Dalgarno Sequenz mutiert (Abb. 43). mFAOSD dient als Beispiel einer nicht translatierbaren mRNA. Dabei ist zu erwarten, daß die Translation bereits im Ansatz, nämlich in der Bildung von 30S - Initiationspartikeln, inhibiert ist.

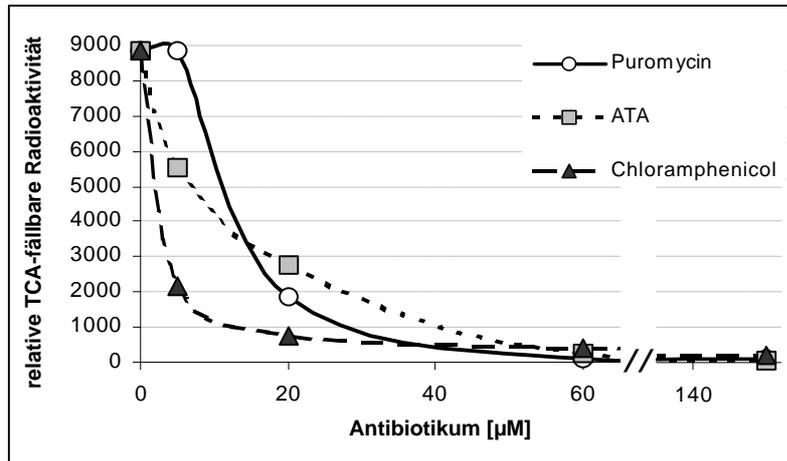
Abb. 43

<pre> TTTAACTTTAAG<b>AAGG</b>AGATATACCATGGTGGAC   mFA           ↓ ↓ ↓ TTTAACTTTAAG<b>TACT</b>AGATATACCATGGTGGAC   mFAOSD           Shine-Dalgarno Sequenzbereich   Startcodon </pre>	<p><i>Sequenzabschnitt aus Translationsinitiationsbereich von mFA und mFAOSD</i></p> <p>Die drei fett gedruckten Nucleotide wurden zur Eliminierung der Ribosomenbindungsaktivität der Shine-Dalgarno Sequenz in mFAOSD mutiert.</p>
--	--

Die beiden mRNAs mit und ohne Shine-Dalgarno Sequenz wurden für die *in vitro* Proteinsynthese eingesetzt und die Translationsaktivität sowie die mRNA-Stabilität untersucht. Zusätzlich wurden diese beiden mRNAs in Gegenwart der Antibiotika ATA, Chloramphenicol und Puromycin im System eingesetzt.

Die Translationsantibiotika ATA, Chloramphenicol und Puromycin wurden in Konzentrationen von 0-150  $\mu\text{M}$  zusammen mit jeweils einer der beiden mRNA Varianten im *in vitro* Translationsystem inkubiert. Die resultierende Proteinsynthese wurde anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt (Abb. 44) und anhand eines Autoradiogramms nach Trennung im SDS-Gel bestimmt (Abb. 45).

Abb. 44

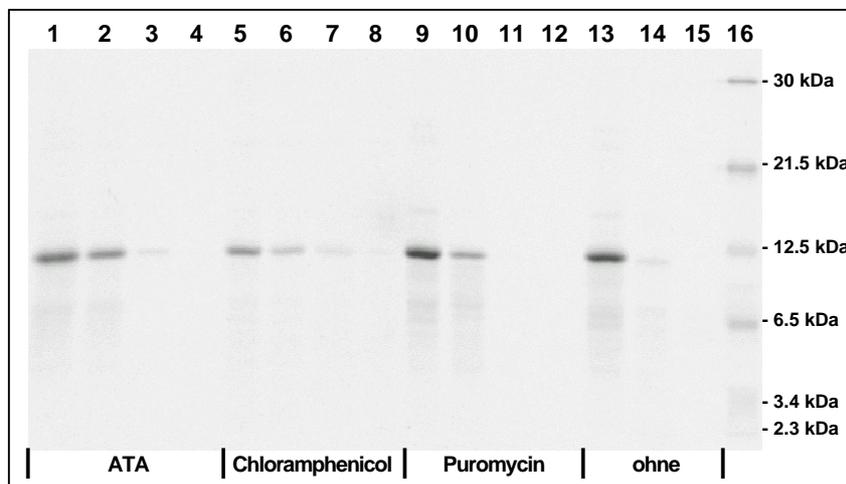


#### *Inhibition der H-FABP-Synthese durch Translationsantibiotika*

mFA (400 nM) wurde im Translationsystem für 70 min in Gegenwart von 0, 5, 20, 60 und 150  $\mu\text{M}$  der Antibiotika ATA, Chloramphenicol und Puromycin inkubiert. Dargestellt ist die anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt gemessene Proteinsynthese in Abhängigkeit der entsprechenden Antibiotikumkonzentration. Alle verwendeten Antibiotika inhibieren die H-FABP-Synthese bereits stark bei Konzentrationen um 20  $\mu\text{M}$  und ab 60  $\mu\text{M}$  nahezu vollständig.

Alle verwendeten Antibiotika inhibieren die H-FABP-Synthese bereits stark bei Konzentrationen um 20  $\mu\text{M}$  und nahezu vollständig bei Konzentrationen ab 60  $\mu\text{M}$ .

Abb. 45



#### *Inhibition der H-FABP-Synthese durch Translationsantibiotika*

Nach Translation von H-FABP in Gegenwart der Antibiotika wurden die Reaktionsansätze im 15 % Laemmli gel getrennt und ein Autoradiogramm des Gels erstellt. Die Ansätze in den nummerierten Spuren entsprechen: (1-4) mFA + ATA, (5-8) mFA + Chloramphenicol, (9-12) mFA + Puromycin, (13) mFA ohne Antibiotikum, (14) mFAOSD, (15) Reaktionsansatz ohne Templat und (16) radioaktiv markierte Molekulargewichtstandards. Die Antibiotika wurden in Konzentrationen von 5, 20, 60 und 150  $\mu\text{M}$  (jeweils von links nach rechts) eingesetzt. Die Bandenintensität von H-FABP nimmt mit zunehmender Antibiotikumkonzentration wie erwartet ab. Für mFAOSD, der mRNA ohne aktive Ribosomenbindungsstelle, sowie für den Reaktionsansatz ohne Templat kann wie erwartet kein spezifisches Translationsprodukt nachgewiesen werden. Ein Einfluß der Antibiotika auf die Anzahl und die Menge an Nebenprodukten wird nicht beobachtet. Das heißt, die über TCA-Fällung ermittelten Mengen an synthetisiertem Protein (Abb. 44) sind weitestgehend dem vollständig synthetisierten H-FABP zuzuordnen.

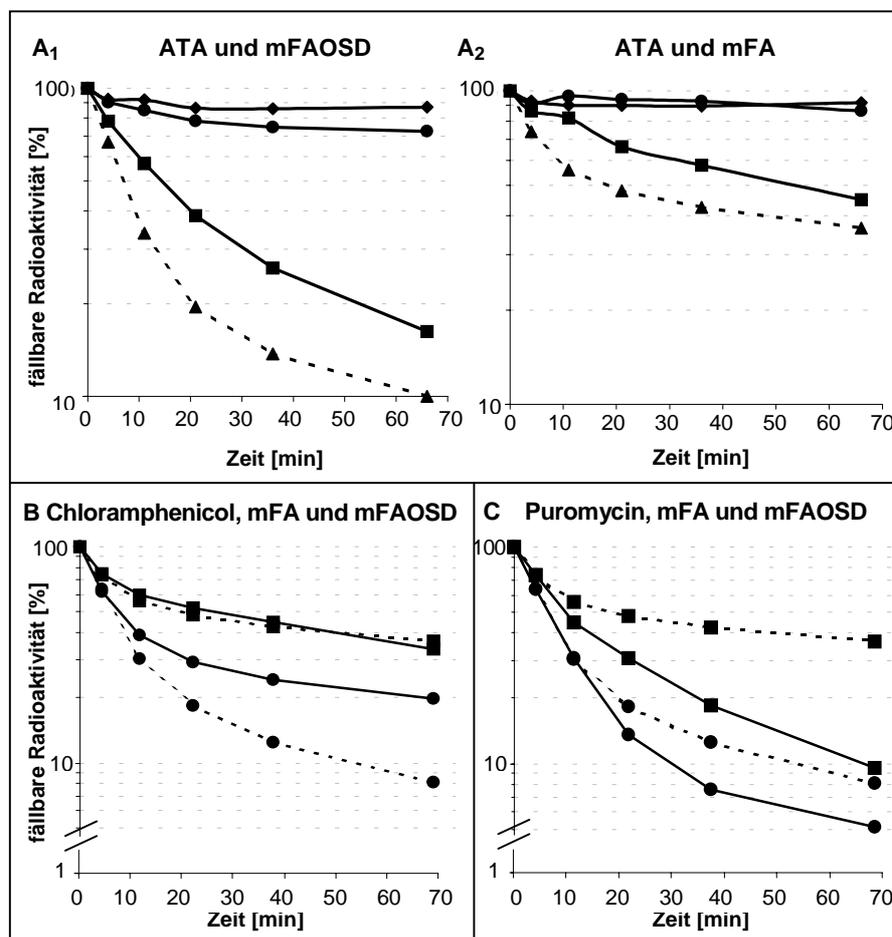
Die Bandenintensität von H-FABP nimmt mit zunehmender Antibiotikumkonzentration wie erwartet ab. Für mFAOSD, der mRNA ohne aktive Ribosomenbindungsstelle, sowie für den Reaktionsansatz ohne Templat kann wie erwartet kein spezifisches Translationsprodukt nachgewiesen werden. Ein Einfluß der Antibiotika auf die Anzahl und die Menge an Nebenprodukten wird nicht beobachtet. Das heißt, die über TCA-Fällung ermittelten Mengen an synthetisiertem Protein (Abb. 44) sind weitestgehend dem vollständig synthetisierten H-FABP zuzuordnen.

Der verbliebene Anteil der radioaktiv markierten Transkripte aus den Translationsansätzen mit Antibiotikum wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels TCA-Fällung (Abb. 46) und anhand der Autoradiogramme nach gelelektrophoretischer Trennung ermittelt (Abb. 47).

Zuvor wurde für Chloramphenicol der optimale Zeitpunkt der Zugabe zum Translationsystem untersucht. Für Chloramphenicol sollte ein spezifischer, schützender Effekt für die mRNA durch festgesetzte Ribosomen nur zu erwarten sein, wenn zuvor eine kurzzeitige Translation für ein mindestens einmaliges Bedecken der mRNA durch translatierende Ribosomen erfolgt war. Dazu wurde das Antibiotikum nach 0, 2,5, 5 und 15 min Inkubationszeit eingesetzt. Tatsächlich konnte praktisch kein Einfluß des Zeitpunkts der Chloramphenicolzugabe zum Translationsystem auf die Stabilität von mFA nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Um jedoch die Wirkung der Antibiotika während der aktiven Proteinsynthese untersuchen zu können wurden die beiden mFA-Varianten mit und ohne aktive Ribosomenbindungstelle vor der Zugabe aller Antibiotika für vier Minuten im Translationsystem vorinkubiert.

Abb. 46



#### Antibiotikumabhängige Degradation von mFA mit und ohne Ribosomenbindungsstelle

Die radioaktiv markierten mRNAs mFA und mFAOSD wurden als Templat für die Proteinsynthese in An- und Abwesenheit der Antibiotika ATA, Chloramphenicol und Puromycin eingesetzt. Der Verlauf des mRNA-Abbaus wurde anhand der zum jeweiligen Zeitpunkt verbliebenen TCA-fällbaren Radioaktivität gemessen.

**A<sub>1</sub>:** mFAOSD und ATA; die Symbole entsprechen Ansätzen mit ATA-Konzentrationen von: ▲ (gestrichelt) 0 μM, ■ 5 μM ● 50 μM, ◆ 150 μM.

**A<sub>2</sub>:** mFA und ATA; Symbole entsprechend A<sub>1</sub>.

**B:** ■ (gestrichelt) nur mFA, ■ (durchgehend) mFA und 150 μM Chloramphenicol, ● (gestrichelt) nur mFAOSD, ● (durchge-

hend) mFAOSD und 150 μM Chloramphenicol.

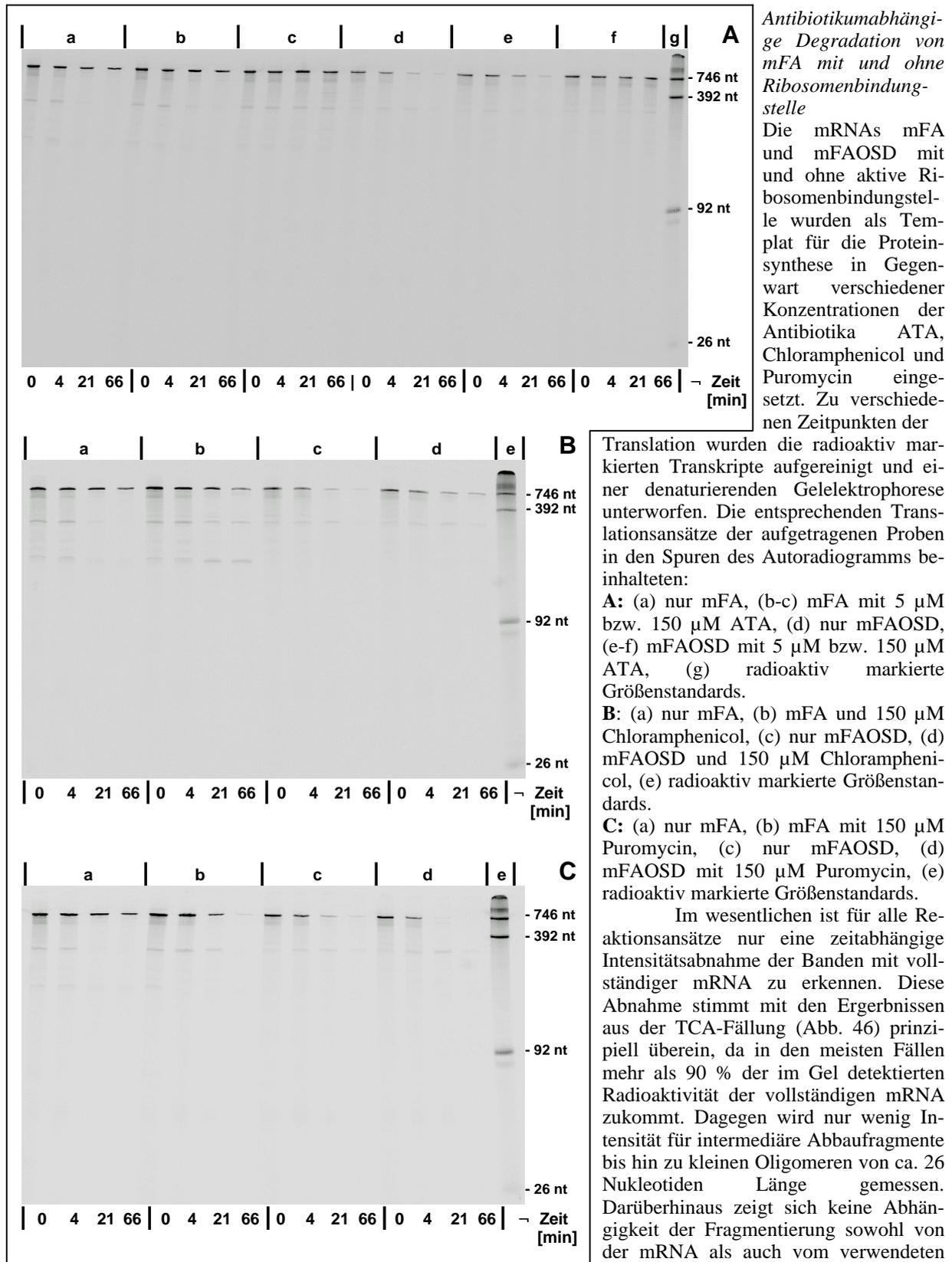
**C:** ■ (gestrichelt) nur mFA, ■ (durchgehend) mFA und 150 μM Puromycin, ● (gestrichelt) nur mFAOSD, ● (durchgehend) mFAOSD und 150 μM Puromycin.

Aus den Abbildungen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> geht eine Stabilisierung sowohl von mFA als auch von mFAOSD hervor. Selbst bei der geringen Konzentration von 5 μM ATA wird nach 35 min Inkubationszeit für mFAOSD noch etwa doppelt soviel fällbares Transkript detektiert wie im Reaktionsansatz ohne ATA. Auch für mFA wird bei 5 μM ATA eine signifikante Verlangsamung des Abbaus gemessen. Bei hoher ATA-Konzentration findet bei beiden mRNAs kaum noch Degradation statt.

Der Abbau von mFA wird praktisch nicht von Chloramphenicol beeinflusst, während die Degradation der nicht-translatierten mFAOSD in Gegenwart von 150 μM Chloramphenicol stark inhibiert wird (Abb. B).

Puromycin wirkt sich schwach destabilisierend auf mFAOSD aus, wohingegen die erwartete Freisetzung des naszierenden Proteins im Reaktionsansatz mit mFA und Puromycin von einer starken Destabilisierung des Transkripts begleitet wird.

Abb. 47



Aurintricarbonsäure wirkt sich während der Translation bei der geringen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  stabilisierend auf mFA aus und inhibiert deren Degradation nahezu vollständig bei Konzentrationen von mindestens 50  $\mu\text{M}$ . Derselbe Effekt wird auch für die nicht translatierbare mFAOSD beobachtet (Abb. 46<sub>A1</sub> und A<sub>2</sub>).

Chloramphenicol hat keinen Einfluß auf den Abbau von mFA. Dagegen ist die Stabilität von mFAOSD unabhängig von der Proteinsynthese signifikant erhöht. Hier ist, in Anwesenheit von Chloramphenicol, nach 66 Minuten Inkubationszeit der Anteil an TCA-fällbarer RNA von ca. 8 % auf 20 % erhöht (Abb. 46<sub>B</sub>).

Puromycin zeigt einen eher umgekehrten Effekt wie Chloramphenicol. mFAOSD wird in Anwesenheit von Puromycin während der Translation leicht destabilisiert. Dagegen ist der Abbau der normalerweise effektiv translatierten mFA enorm beschleunigt (Abb 46<sub>C</sub>). In Gegenwart von Puromycin ähnelt der zeitliche Verlauf der Degradation von mFA dem der mRNA ohne Ribosomenbindungstelle. Nach 70 Minuten Inkubationszeit kann aufgrund der Gegenwart von 150  $\mu\text{M}$  Puromycin nur noch ca. ein viertel an TCA-fällbarer detektiert werden

In allen Fällen kann kein Einfluß der Antibiotika auf die Fragmentierungsmuster der RNAs beobachtet werden, zumal kaum intermediäre Abbaufragmente in den Autoradiogrammen der Polyacrylamidgele sichtbar sind.

Wie bereits in Kapitel 4.6.1 beschrieben ist in dem hier verwendeten System eine exonukleolytische Degradation stark inhibiert. Daher konnte hier in erster Linie der Einfluß der Proteinsynthese auf die mRNA-Degradation untersucht werden, insbesondere ob ein aktiver Translationsapparat den möglicherweise initiiierenden, endonukleolytischen Schritt des mRNA-Abbaus inhibiert.

ATA wurde bereits als relativ spezifischer Inhibitor der Translationsinitiation beschrieben (Stewart et al., 1971; Siegelman & Aprion, 1971) sowie als Inhibitor einer Reihe von Nucleinsäure-bindenden Proteinen einschließlich Ribonukleasen (Hallick et al., 1977; Gonzalez et al., 1979; Schulz-Harder & Tata, 1982; Gonzalez et al., 1980; Skidmore & Beebe, 1989). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein stabilisierender Effekt auf die translatierbare als auch auf die nicht translatierbare Variante von mFA gezeigt werden. Interessanterweise wird dieser Effekt auch bei niedrigen Konzentrationen von ATA beobachtet, welche deutlich unter der Konzentration liegen, für die eine spezifische Inhibition der Translationsinitiation beschrieben wurde (Stewart et al., 1971; Siegelman & Aprion, 1971). Daher muß ATA nicht zwingend ein spezifischer Initiationsinhibitor sein. Wäre das Antibiotikum hochspezifisch, dürfte von ihm kein Einfluß auf die Stabilität der nicht translatierbaren mFAOSD ausgehen, da die Translationsinitiation bereits im Ansatz blockiert war. Darüberhinaus hätte der Abbau der translatierbaren mFA zumindest bei kleinen Konzentrationen von ATA aufgrund des Verlusts des schützenden Translationsapparats beschleunigt werden müssen. Ein früher beschriebener zeitverzögerter Inhibitionseffekt von ATA auf die zellfreie Proteinsynthese wurde als Ausdruck für die spezifische Translationsinitiationsinhibition interpretiert (Stewart et al., 1971; Siegel-

man & Aprion, 1971). Eine solche Verzögerung würde man allerdings auch erwarten, wenn ATA unabhängig von der Initiation mit Translationskomponenten um die Bindung der mRNA konkurriert. Hier wird die Hypothese aufgestellt, nach der eine von ATA vermittelte Inhibition von Ribonukleasen auch schon bei niedrigen Konzentrationen stärker ausgeprägt ist als die zu erwartende Destabilisierung von mFA aufgrund eines Verlusts des schützenden Translationsapparats.

Ein inhibierender Effekt von Chloramphenicol auf die Degradation einer nicht translatierbaren mRNA (Trans-Effekt) *in vivo* wurde beschrieben (Lopez et al., 1998). Eine Titrierung der begrenzten Menge an Ribonukleasen aufgrund eines durch Chloramphenicol indirekt induzierten Überschusses an ribosomaler RNA, wurde postuliert.

Auch im hier angewandten zellfreien System wurde eine translationsunabhängige Inhibition der mRNA ohne aktive Ribosomenbindungsstelle in Anwesenheit von Chloramphenicol beobachtet. Da aus dem System jedoch chromosomale DNA weitgehend entfernt wurde und darüberhinaus die unter der Kontrolle von *E. coli* RNA-Polymerase stehende Transkription von rRNA durch den Einsatz des Antibiotikums Rifampicin blockiert wurde, kann eine gesteigerte rRNA-Synthese nicht verantwortlich für die translationsunabhängige Stabilisierung von mFAOSD sein. Aus den selben Gründen ist auch eine früher vorgeschlagene instabile Komponente des Degradosoms, welche eine fortlaufende Proteinsynthese erforderte (Brawerman, 1993), unwahrscheinlich.

Der Abbau der translatierbaren mRNA bleibt unbeeinträchtigt von Chloramphenicol. Daher scheint es für die Stabilisierung von mFA keine Rolle zu spielen ob der Schutz vor endonukleolytischem Angriff durch einen aktiven oder einen mit Hilfe von Chloramphenicol festgesetzten Translationsapparat vermittelt wird.

Puromycin ist das einzige der hier eingesetzten Antibiotika, das keinen nennenswerten translationsunabhängigen Effekt auf die mRNA-Degradation zeigt. Während der Abbau von mFAOSD wie erwartet weitgehend unberührt bleibt, wird die translatierbare mRNA durch Puromycin, welches zum Freisetzen translatierender Ribosomen führt, stark destabilisiert.

Insgesamt wird hier eine translationsunabhängige Stabilisierung von mRNA durch die Antibiotika ATA und Chloramphenicol festgestellt. Der genaue Mechanismus der Stabilisierung muß noch aufgeklärt werden. Er scheint jedoch unabhängig von der Transkription und der Translation von anderen, in den RNA-Abbau involvierten Komponenten zu sein.

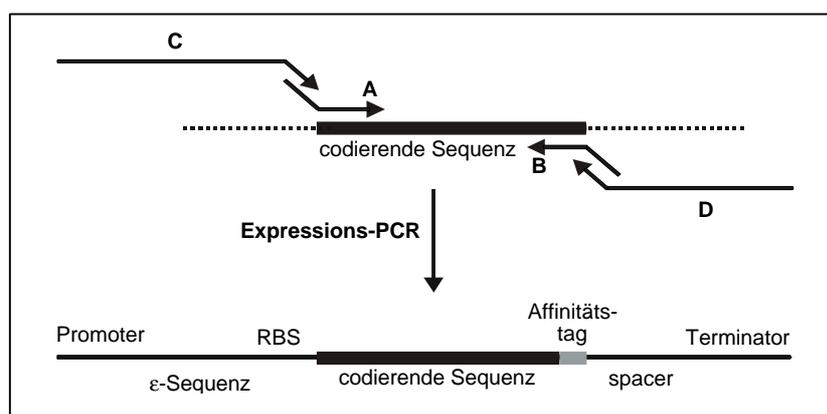
## 4.7 Expressions-Polymerase-Kettenreaktion

### 4.7.1 Expressions-Polymerase-Kettenreaktion für die *in vitro* Proteinsynthese (E-PCR)

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen bezüglich den Erfordernissen für eine effektiv translatierbare mRNA wurde eine Methode entwickelt, mit der unter Umgehung gentechnischer Methoden mit geringem Zeitaufwand kleinste Mengen von Gensequenzen amplifiziert und gleichzeitig mit Regulationselementen für die zellfreie *E. coli* Proteinbiosynthese versehen werden können. Um das synthetisierte Protein einfach aufzureinigen zu können, wurde darüberhinaus eine Sequenz, codierend für einen Affinitäts-tag eingeführt. Außerdem wurde die 3'-terminale Sequenz für die Ausbildung der Sekundärstruktur des T7 Transkriptionsterminators eingeführt. Für letzere wurde gezeigt, daß sie die Halbwertszeit einer mRNA enorm erhöhen kann, was eine gesteigerte Proteinsynthese zur Folge hat (siehe Kapitel 4.6.1). Ein Modellsystem der Expression-PCR (E-PCR) für die zellfreie Proteinbiosynthese von H-FABP wurde erarbeitet.

Die Regulationselemente für die *in vitro* Proteinsynthese wurden via PCR mit zwei Primerpaaren eingeführt (Abb. 48). Dabei hybridisieren zwei genspezifische Adapterprimer sowohl mit den terminalen Bereichen der Protein-codierenden Sequenz des Zielgens als auch mit den Verlängerungsprimern. Letztere dienen der eigentlichen Verlängerung der DNA-Sequenz um die Regulationselemente. Sie sind prinzipiell universell einsetzbar.

Abb. 48



Schematische Darstellung der Amplifikation und Konversion einer nackten Gensequenz für die zellfreie Proteinsynthese

Die beiden Primer A und B, welche mit den Enden der codierenden Sequenz hybridisieren, dienen als Adapter für die Verlängerungsprimer C und D. Die aus den nicht translatierten Regionen des T7 Phagengens 10 stammenden Regulationselemente wie Transkriptionspromoter und Ribosomenbindungstelle werden mit den

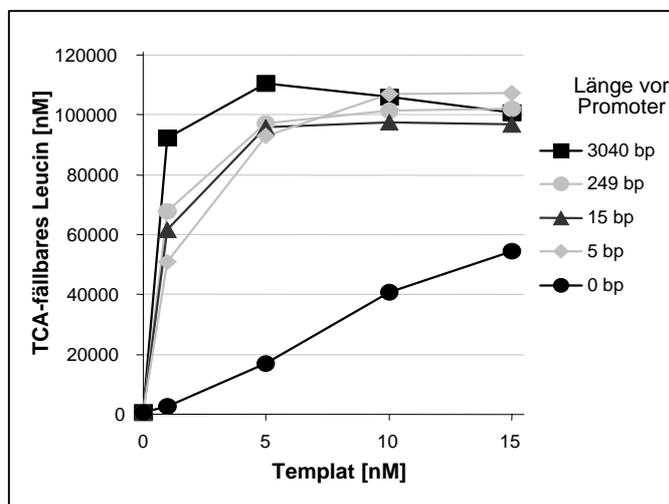
Primern anstelle der ursprünglichen Sequenzen (gestrichelte Linien) eingeführt. Es können aber auch verschiedene Elemente, welche die Effizienz der Proteinsynthese erhöhen oder die Sequenz für einen Affinitäts-tag eingeführt werden (siehe weiter unten).

### 4.7.2 Minimierung der Primergröße

Aus ökonomischen Gründen und um eine möglichst effiziente Amplifikation in der PCR erzielen zu können, wurden Untersuchungen zur Minimierung der Primergröße durchgeführt.

Um eine Limitierung der Transkription auszuschließen wurde die H-FABP-Synthese in Abhängigkeit der Sequenzlänge vor dem Transkriptionspromoter untersucht. Dazu wurden vier PCR-Produkte hergestellt, die sich nur in der Anzahl der Basenpaare vor dem Promotor (0 bis 249 Bp) unterscheiden. Diese PCR-Produkte und das Plasmid pHMFA(EcoRV) wurden in verschiedenen Konzentrationen als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt und die H-FABP-Syntheseraten anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt bestimmt (Abb. 49).

Abb. 49



*H-FABP-Syntheseeffizienz abhängig von der Sequenzlänge vor dem Promoter*

Die vier PCR-Produkte FA1-FA4 mit unterschiedlichen Sequenzlängen (0, 5, 15 und 249 Bp) vor dem Transkriptionspromoter und das Plasmid pHMFA(EcoRV) dienen als Templat für die H-FABP-Expression unter Standardbedingungen mit Ausnahme einer erhöhten T7 RNA-Polymerasekonzentration von 750 U / ml. Die Syntheseleistung wurde anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt bestimmt.

Eine Sequenz von mindestens 5 Basenpaaren ist ausreichend um die gleiche H-FABP-Synthese erzielen zu können wie ausgehend vom linearisierten Plasmid mit 3040 Bp vor dem Promoter.

Mit pHMFA als Templat für die PCR und P3 als jeweils stromabwärts hybridisierenden Primer

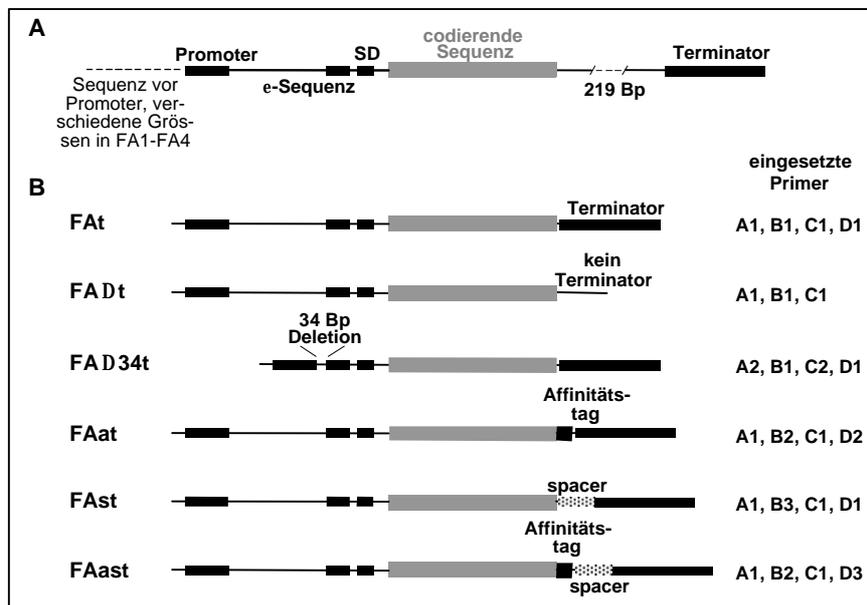
wurden die Produkte FA1-FA4 (Abb. 50) mit folgenden Stromaufwärts-Primern hergestellt: (FA1) Primer P1; (FA2) Primer C1; (FA3 und FA4) Primer P2. FA3 wurde zur Generierung von FA2 mit dem Restriktionsenzym BglII verdaut. Die Primersequenzen sind im Anhang (Kapitel 9) aufgeführt.

In Gegenwart einer Sequenzlänge von mindestens 5 Basenpaaren vor dem Transkriptionspromoter wird eine vergleichbare H-FABP-Ausbeute wie ausgehend vom linearisierten Plasmid erzielt.

Wenn keine dem Promoter vorstehende Sequenz vorhanden ist, muß die RNA-Polymerase durch den dreidimensionalen Raum zum Promoter diffundieren. Mit vorstehender Sequenz könnte die Polymerase unspezifisch an die DNA binden und somit schneller zum Promoter wandern. Offenbar ist eine längere Sequenz vor dem Promotor für eine denkbare beschleunigte Initiation der Transkription für die gegebenen Versuchsbedingungen nicht notwendig.

Da hier eine vorstehende Sequenz von 5 Basenpaaren für die effiziente H-FABP-Synthese ausreicht, ist damit die Mindestgröße für den 5'-Verlängerungsprimer (C) definiert.

Abb. 50



*Schematische Darstellung der PCR-Produkte*

**A** Die PCR-Produkte FA1-FA4 sind mit einem Teil des Plasmids pHMFA, mit dem originalen Abstand von 219 Bp zwischen Stopcodon und Terminator, identisch. Sie unterscheiden sich nur durch ihre Sequenzlänge (0-249 Bp) vor dem Promoter.

**B** Schematische Darstellung der PCR-Produkte und der bezüglich ihres Einflusses auf die H-FABP-Synthese untersuchten Regulationselemente. Die zur Herstellung der PCR-Produkte verwendeten Primer sind ebenfalls dargestellt.

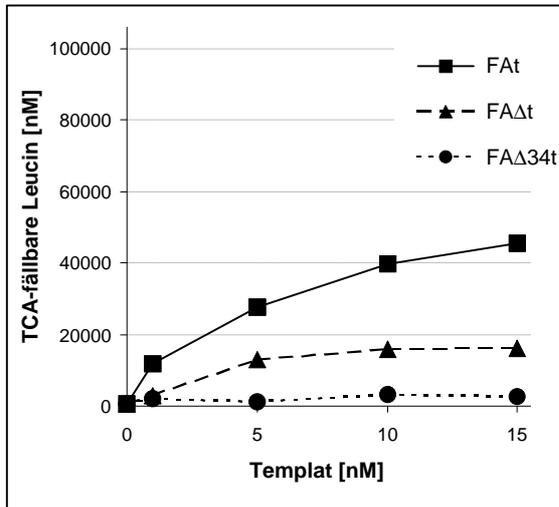
Es wurde weitergehend untersucht, welche Regulationselemente im nicht translatierten Bereich essentiell für eine effiziente Proteinsynthese sind. Als Orientierung dienten die entsprechenden Regionen des T7 Phagengens 10.

Als Templat für die E-PCR wurde ein DNA-Fragment von 548 Bp eingesetzt, welches aus einem Restriktionsverdau des Plasmids pHMFA mit NcoI und BamHI hervorgeht. Dieses Fragment beginnt mit der H-FABP-codierenden Sequenz und hat zusätzlich eine nicht translatierte Sequenz von 150 Bp am 3'-Ende. In einer primären PCR wurde der mit dem Proteincodierenden 5'-Ende hybridisierende Primer A1 (57mer; Primersequenzen: siehe Kapitel 9) zur Einführung der Ribosomenbindungstelle eingesetzt (Abb. 48 und 50). Primer B1 (42mer) hybridisiert mit dem 3'-Ende der codierenden Sequenz. Beide Primer amplifizieren und verlängern die Templatsequenz und dienen zugleich als Adapter für die sekundäre PCR. In der sekundären PCR wurde das Produkt der primären PCR mit den Verlängerungsprimern C1 (75mer) und D1 (41mer) reamplifiziert und verlängert. Dabei hybridisiert Primer C1 mit dem Adapterprimer A1 und führt den Transkriptionspromoter mit einer voranstehenden Sequenz von 5 Bp sowie die nicht translatierte Region des T7 Phagengens ein. Der Verlängerungsprimer D1 hybridisiert mit Primer B1 und führt den 39 Nukleotide umfassenden Transkriptionsterminator am 3'-Ende ein.

Drei PCR-Produkte wurden synthetisiert. FA<sub>t</sub> wurde unter Verwendung der vier oben genannten Primer hergestellt. FA<sub>A</sub>t entsteht aus einer PCR ohne Primer D1. Dies führt zu einem Templat für die Proteinsynthese, welches keinen Terminator ausbildet. FA<sub>Δ</sub>34t ist ähnlich zu FA<sub>t</sub>, mit Ausnahme der Deletion einer nicht translatierten Sequenz von 34 Bp für eine 5'-terminale Hairpin-Struktur zwischen Transkriptionsstart und ε-Sequenz. FA<sub>Δ</sub>34t entsteht unter der Verwendung der Primer A2 (49mer), B1, C2 (47mer) und D1. Diese drei

PCR-Produkte wurden als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt und die H-FABP-Expression anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt (Abb. 51) sowie anhand eines Autoradiogramms nach SDS-PAGE bestimmt (Abb. 53).

Abb. 51



*Steigerung der H-FABP-Synthese in Gegenwart des Terminators und der 5'-terminalen Hairpin-Struktur des T7 Phagengens 10*

Zur Minimierung der Primergröße für die E-PCR wurden drei PCR-Produkte FAt, FAΔt (ohne Terminator) und FAΔ34t (ohne 5'-terminale Hairpin-Struktur) hergestellt und in verschiedenen Konzentrationen als Template für die H-FABP-Expression eingesetzt. Die Ausbeute von H-FABP wurde anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt bestimmt.

Praktisch kein Syntheseprodukt ist aus dem Reaktionsansatz mit FAΔ34t nachweisbar. Eine deutliche Verbesserung der Proteinsynthese wird in Gegenwart der Hairpin-Struktur im Ansatz mit FAΔt erzielt. Eine weitere deutliche Steigerung der H-FABP-Ausbeute auf ca. 280 % geht aus dem Ansatz mit der zusätzlichen 3'-terminalen Sequenz für die Sekundärstruktur des Terminators (FAt) hervor.

Ausgehend von FAΔ34t, dem PCR-Produkt ohne Sequenz für den 5'-Hairpin, ist das Translationsprodukt kaum nachweisbar. Dagegen wird die H-FABP-Synthese in Gegenwart der Hairpin-Struktur deutlich verbessert. Offenbar ist diese Struktur essentiell für eine effiziente Expression von H-FABP.

Es wurde bereits eine, die  $\epsilon$ -Sequenz und die Ribosomenbindungstelle umfassende verkürzte Sequenz des T7 Phagengens 10 für die Expression von  $\beta$ -Lactamase *in vivo* benutzt (Olins et al., 1988; Olins & Rangwala, 1989). An diesem Beispiel konnte gezeigt werden, daß die als Translationsverstärker wirkende  $\epsilon$ -Sequenz auch ohne die Anwesenheit der 5'-terminalen Hairpin-Struktur zu gleicher relativer Proteinausbeute führt. Das Verhältnis synthetisiertes Protein je mRNA-Molekül war unabhängig von der Anwesenheit des Hairpins, die Konzentration der mRNA ohne Hairpin jedoch stark verringert. Eine vergleichbare Minimierung des 5'-Endes führte hier zu einem nahezu vollständigen Verlust der H-FABP-Synthese. Es wurde schon eine früher beschriebene, mRNA-stabilisierende Wirkung von 5'-Sekundärstrukturen mit einer Inhibition von Endonukleasen, welche das 5'-Ende als Eintrittsstelle benutzen, in Zusammenhang gebracht (Bechhofer, 1993). Daher könnte der Grund für die geringe H-FABP-Synthese weniger in einer verringerten Effizienz, der mRNA als Templat für die Proteinsynthese zu dienen, als vielmehr in einer reduzierten Stabilität der mRNA liegen.

Eine Steigerung der H-FABP-Ausbeute auf ca. 280 % wird erzielt, wenn neben der 5'-Hairpinstruktur außerdem die Sequenz für die Ausbildung des Transkriptionsterminators präsent ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit den aus Kapitel 4.6.1 gewonnenen Ergebnissen. Demnach bietet die Sekundärstruktur des Terminators effizienten Schutz gegen den 3'-exonukleolytischen Abbau der mRNA. Die somit gesteigerte Halbwertszeit der mRNA hat dann eine deutlich erhöhte Proteinausbeute zur Folge.

### 4.7.3 Expressions-PCR für die Synthese eines H-FABP-Strep-tag-Fusionsproteins und Steigerung der Proteinausbeute

Um das synthetisierte H-FABP einfach aufzureinigen zu können, wurde via E-PCR zusätzlich eine Sequenz, codierend für den Affinitäts-tag Strep-tag II eingeführt. H-FABP wurde somit als Fusionsprotein mit C-terminalem Strep-tag II synthetisiert. Das PCR-Produkt FAat wurde analog zum Produkt FAt hergestellt. Dazu wurde der Adapterprimer B1 durch B2 und der Verlängerungsprimer D1 durch D2 ersetzt. Dieses Konstrukt enthält gegenüber FAt eine zusätzliche Sequenz von 30 Bp codierend für ein Dipeptid-Verbindungsstück und den acht Aminosäurereste umfassenden Strep-tag II (Abb 50).

Weder ein Unterschied in der Ausbeute noch in der Homogenität des neuen PCR-Produkts, welches mit den längeren Primern von 51(B2) und 72 (D2) Nukleotiden im Vergleich zu 42 (B1) und 41 (D1) Nukleotiden synthetisiert wurde, konnte festgestellt werden (Abb. 54).

Die PCR-Produkte wurden als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt und die Proteinsynthese anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin (Abb. 52) und des Autoradiogramms nach SDS-PAGE (Abb. 53) analysiert.

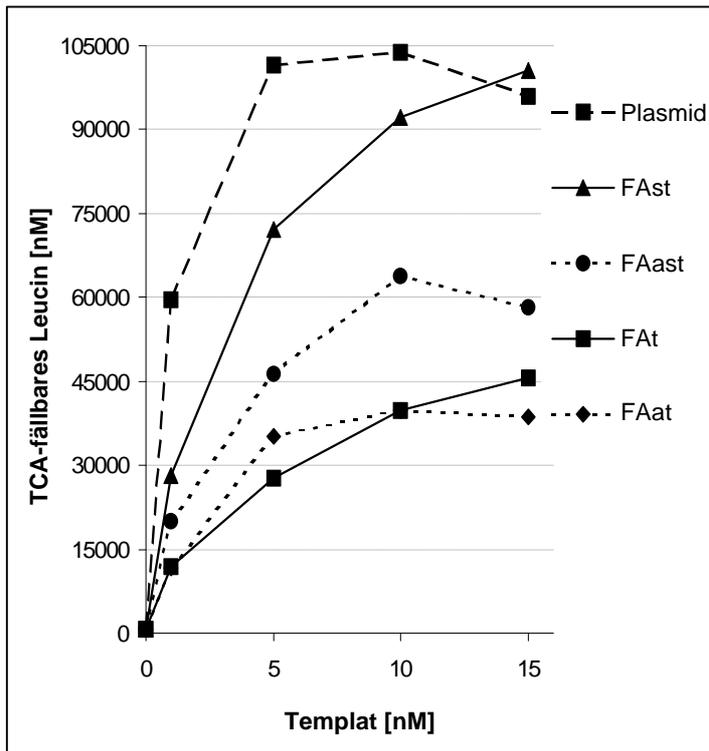
Auch bei der zusätzlichen Expression des Strep-tags ausgehend vom PCR-Produkt FAat bleibt die Proteinsyntheseleistung erhalten. Das scheinbare Molekulargewicht des Fusionsproteins liegt im erwarteten Bereich und ist durch die Anwesenheit des 1.1 kDa Segments bestehend aus Verbindungspeptid und Strep-tag sichtbar erhöht. Auch die Homogenität des Produkts bleibt erhalten, da beide Proteine, H-FABP und das Fusionsprotein, als starke und klare Banden im Autoradiogramm des SDS-Gels erscheinen (Abb. 53).

Obwohl der direkt auf die für H-FABP codierende Sequenz folgende Terminator einen positiven Effekt auf die Proteinsyntheseausbeute ausübt, wurde untersucht, ob diese direkte Nachbarschaft auch gleichzeitig inhibierend auf die Expression wirken könnte.

Zwei neue Templatvarianten von FAt (ohne Tag) und FAat (mit Tag): FAst und FAast, wurden über PCR hergestellt (Abb. 50). FAst entsteht beim Ersetzen von Adapterprimer B1 (42mer) durch Primer B3 (63mer). Für FAast wurde der Verlängerungsprimer D2 (72mer) durch D3 (95mer) ersetzt. Die neuen Primer führen einen zusätzlichen nicht translatierten Abstandhalter (spacer) mit einer Sequenzlänge von 22 Nukleotiden zwischen Translationsstopcodon und Transkriptionsterminator ein.

Auch mit den noch längeren Primern entstehen homogene PCR-Produkte (Abb. 54) in gleicher Ausbeute wie bei den Produkten ohne spacer. In Abb. 52 ist die von dem spacer ausgehende Wirkung auf die gekoppelte Transkription/Translation von H-FABP und dem Fusionsprotein mit Strep-tag II dargestellt und in Abb. 53 der Einfluß auf die Homogenität der Syntheseprodukte.

Abb. 52



#### *Einfluß von Spacer und Strep-tag auf die H-FABP-Synthese ausgehend von E-PCR-Produkten*

Die PCR-Produkte FAt (Terminator), FAst (spacer und Terminator), FAat (tag und Terminator), FAast (tag, spacer und Terminator) und das Plasmid pHMFA(EcoRV) wurden in verschiedenen Konzentrationen als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt und die H-FABP-Synthese anhand des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in TCA-fällbares Translationsprodukt ermittelt.

In Abwesenheit des spacers bleibt die Syntheseausbeute von H-FABP unbeeinflusst von der zusätzlichen Expression des Strep-tags. Dagegen resultiert eine enorme Verbesserung der Proteinausbeute aus der Stromabwärtsverschiebung des Terminators um den 22 Nukleotide umfassenden spacer. Die Expression wird vom Produkt FAat zu FAast aufgrund des spacers auf ca. 160 % erhöht. Im Falle des E-PCR-Produkts FAt beträgt die Steigerung zum Produkt FAst sogar ca. 220 %. Bei hoher Templatkonzentration von 15 nM ist das PCR-Produkt FAst ein ebenso wirkungsvolles Templat für die H-FABP-Synthese wie das sehr effizient funktionierende Plasmid pHMFA. Nach zwei Stunden Inkubationszeit im zellfreien Transkription/Translationsystem werden ausgehend vom E-PCR-Produkt FAst entsprechend der Konzentration an präzipitierbarem Leucin ca. 11200 nM H-FABP gebildet, was einer hohen Ausbeute von 165 Microgramm synthetisiertem Protein je Milliliter Reaktionslösung entspricht. Möglicherweise interferiert die starke Sekundärstruktur des Terminators in Abwesenheit des spacers mit der Aktivität eines effizienten Translationsapparates. Demnach könnte das Aufschmelzen dieser Sekundärstruktur durch den Translationsapparat kurz vor der Translationstermination limitierend für die Proteinsynthese sein. Denkbar wäre auch, daß eine Denaturierung des Terminators durch den Translationsapparat zu einer reduzierten Stabilität der mRNA gegen 3'-Exonukleasen führte (siehe Text). Jedenfalls entspricht die Ausdehnung des spacers etwa der, die von einem translatierenden Ribosom bedeckt wird (siehe Text).

Anhand der über den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Leucin ermittelten Ergebnisse für die Proteinsynthese ausgehend von den E-PCR-Produkten FAt, FAst, FAat und FAast ist zu erkennen, daß in Abwesenheit des spacers die zusätzliche Expression des Strep-tags die Proteinsynthese nicht beeinflusst. Die Positionierung des spacers zwischen Translationstopcodon und Terminator zeigt jedoch einen starken positiven Effekt auf die Synthese von H-FABP als auch auf das Fusionsprotein mit Strep-tag. Durch Einführung des spacers wird eine 1.6-fache Erhöhung der H-FABP-Ausbeute ausgehend vom PCR-Produkt mit Strep-tag-Sequenz und sogar eine 2.2-fache Erhöhung ausgehend vom PCR-Produkt ohne Strep-tag-Sequenz erzielt.

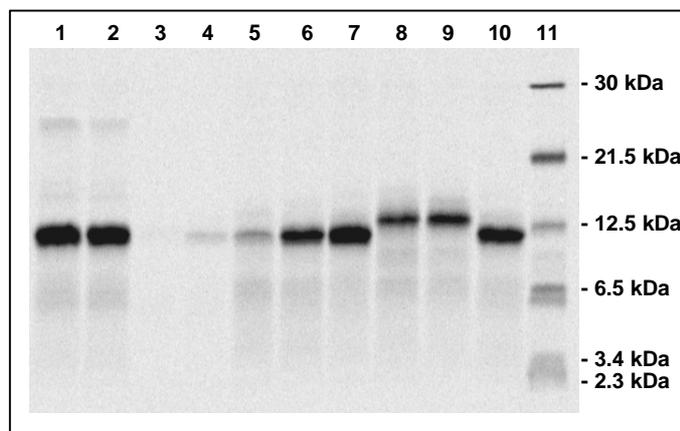
Da die Ausdehnung des spacers mit 22 Nukleotiden etwa der eines ribosomenbedeckten mRNA-Segments entspricht (Moazed et al., 1986), könnte es sein, daß die unmittelbare Nachbarschaft der starken Sekundärstruktur des Terminators zur translatierten Region mit einem aktiven Translationsapparat interferiert. Es wurde auch schon eine Destabilisierung von mRNA aufgrund der Denaturierung einer Sekundärstruktur durch translatierende Ribosomen postuliert (Chen & Belasco, 1990; Klug & Cohen, 1990). Demnach wäre auch eine Destabili-

sierung der mRNA gegenüber 3'-Exonukleasen aufgrund der Denaturierung des Terminators durch translatisierende Ribosomen denkbar.

Jedenfalls ist mindestens das E-PCR-Produkt FAst sehr wahrscheinlich mit den für eine effektive Proteinsynthese essentiellen Elementen an den richtigen Positionen ausgestattet, da basierend auf den Ergebnissen der TCA-Fällung bei hoher Templatkonzentration nach zwei Stunden mit knapp 170 Microgramm synthetisiertem Protein je Milliliter Reaktionslösung eine ebenso hohe Syntheserate erzielt wird, wie mit dem optimierten Plasmidtemplat.

In der folgenden Abbildung sind die synthetisierten Produkte nach Trennung mittels SDS-PAGE als Autoradiogramm dargestellt.

Abb. 53



*Proteinsyntheseprodukte ausgehend von E-PCR-Produkten und Plasmid im Autoradiogramm nach SDS-PAGE*

Nach gekoppelter Transkription/Translation von H-FABP und dessen Fusionsprotein mit dem Strep-tag II wurden die Syntheseprodukte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ein Autoradiogramm des Gels erstellt.

Für die Proben in den numerierten Spuren wurden folgende Templates für die Proteinsynthese in einer Konzentration von 15 nM eingesetzt: (1) FA1, 15 Bp vor Promoter, 3'UTR wie linearisiertes Plasmid; (2) Plasmid pHMFA (EcoRV); (3) kein Templat; (4) FAΔ34t, ohne 5'-Hairpin; (5) FAΔt, ohne Terminator; (6) FAT,

mit Terminator; (7) FAst, mit spacer und Terminator; (8) FAat, mit tag und Terminator; (9) FAast, mit tag, spacer und Terminator; (10) FAst aus der PCR in Gegenwart eines Überschusses an chromosomaler Kompetitor DNA (siehe Kapitel 4.7.4) und (11) radioaktiv markierte Molekulargewichtstandards.

Alle synthetisierten Produkte erscheinen als weitgehend homogene Banden mit erwartetem, scheinbarem Molekulargewicht und erwarteter Bandenintensität. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins mit dem Affinitätstag ist entsprechend dem zusätzlichen Segment von 1.1 kDa bestehend aus Verbindungs-Dipeptid und den acht Aminosäurereste umfassenden Strep-tag II erhöht.

Alle Syntheseprodukte erscheinen im Autoradiogramm des Proteingels als weitgehend homogene Banden mit erwartetem Molekulargewicht. Die Bandenintensitäten stimmen mit den Ergebnissen aus der TCA-Fällung der Reaktionsansätze (Abb. 52 und 53) überein. Damit konnte hier gezeigt werden, daß die für eine effektive Proteinsynthese essentiellen Elemente des DNA-Templats zumindest für das E-PCR-Produkt FAst sehr wahrscheinlich vorhanden und richtig positioniert sein müssen, da das PCR-Produkt zu einer ebenso hohen Proteinausbeute und Produkthomogenität führt wie das bereits optimierte Plasmidtemplat.

#### 4.7.4 Einstufige Expressions-PCR mit vier Primern und Amplifikation aus komplexem DNA-Gemisch

Es wurden Reaktionsbedingungen für die PCR entwickelt, unter denen die primäre PCR mit den Adapterprimern und die sekundäre PCR mit den Verlängerungsprimern gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchgeführt können. Dadurch ist man in der Lage alle für die Proteinsynthese erforderlichen Regulationselemente simultan in das E-PCR-Produkt einzuführen (Abb. 48). Die Reaktionsbedingungen wurden im Hinblick auf Ausbeute und Reinheit des PCR-Produkts optimiert. Bezüglich der Reinheit mußten vor allem die Primerkonzentrationen sorgfältig ausbalanciert werden. Einereits soll genügend PCR-Zwischenprodukt ausgehend von den Adapterprimern entstehen, um reichlich Templat für die Verlängerungsprimer zur Verfügung stellen zu können. Andererseits ist ein quantitatives Umsetzen des Zwischenprodukts zum vollständigen und homogenen Endprodukt wünschenswert. Daher darf das Zwischenprodukt nicht im Überschuß gebildet werden.

Als Templat diente wieder das 548 Bp umfassende Fragment aus pHMFA. Für die E-PCR mit simultanem Gebrauch von vier (langen) Primern wurden folgende optimale Reaktionsbedingungen gefunden (Tab. 17):

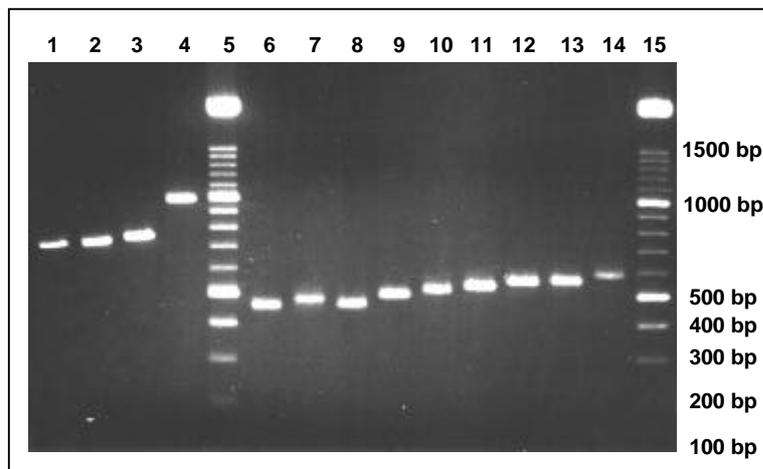
Tab. 17

Reaktionskomponenten (Endkonzentrationen):				
1 x PCR-Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> , Roche MB)				
0.25 mM jeweils von dATP, dCTP, dGTP und dTTP				
0.1 – 20 pg Templat-DNA / 50 µl				
0.1 µM jeweils von zwei Adapterprimern (Ax und Bx)				
0.5 µM jeweils von zwei Verlängerungsprimern (CX und DX)				
3 U <i>Pwo</i> DNA-Polymerase / 50 µl (Roche MB)				
x: für alle Primervarianten gelten die selben Konzentrationen				
Temperaturprogramm:				
30 sec.	94 °C		30 sec.	94 °C
60 sec.	60 °C	→	60 sec.	55 °C
60 sec.	72 °C		60 sec.	72 °C
15 Zyklenwiederholungen			35 Zyklenwiederholungen	

*Optimierte Reaktionsbedingungen für eine Expressions-PCR mit vier simultan wirkenden Primern*  
 Dargestellt sind die optimalen Konzentrationen der Reaktionskomponenten sowie das zweistufige Temperaturzyklenprogramm der Expressions-PCR zur Generierung von Templaten für die Synthese von H-FABP und dessen Fusionsprotein mit Strep-tag II.  
 Nach 50 Temperaturzyklen wurden gewöhnlich aus 0.1-20 pg Templat ca. 4-5 µg PCR-Produkt in einem Reaktionsvolumen von 50 µl synthetisiert. Als optimale Konzentrationen von Verlängerungsprimer und Adapterprimer wurde ein Verhältnis von 0.5 µM zu 0.1 µM für die Synthese von homogenem PCR-Produkt gefunden. Bei Bedarf wurden die PCR-Produkte im Anschluß mit dem "High Pure PCR-Product Purification Kit" von Salzen, Protein und überschüssigen Primern abgetrennt und die Syntheseausbeute bzw. -qualität anhand der Absorption von UV-Licht bei 260 nm bzw. anhand des Absorptionsspektrums von 200-300 nm im Spektralphotometer bestimmt (siehe auch Abb. 53).

Ein optimales Verhältnis von Verlängerungsprimer zu Adapterprimer mit 5:1 (0.5 µM:0.1 µM) wurde gefunden um vollständig umgesetztes, homogenes PCR-Produkt (Abb. 54) mit einer typischen Ausbeute von ca. 5 µg / 50 µl nach 50 Temperaturzyklen synthetisieren zu können. Die Qualität aller bisher aufgeführten PCR-Produkte wurde nach elektrophoretischer Trennung im 1,5 % Agarosegel überprüft (Abb. 54).

Abb. 54



#### Kontrolle der E-PCR-Produkte im Agarosegel

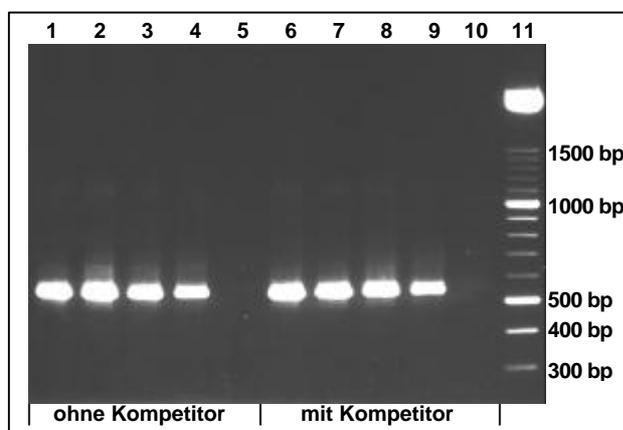
Etwa 100 ng von jedem PCR-Produkt wurden nach Aufreinigung mit dem "High Pure PCR-Product Purification Kit" im 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Dargestellt ist das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel. Die Proben in den nummerierten Spuren entsprechen: (5 und 15) DNA-Größenstandards; (1-4) FA1-FA4, 741, 746, 756 und 990 Bp; (6-8) primäre PCR-Produkte, hergestellt mit den Adapterprimerpaaren A1 und B1, A1 und B3, A1 und B2; (9-14) FA $\Delta$ 34t (494 Bp), FA $\Delta$ t (510 Bp), FA<sub>t</sub> (529 Bp), FA<sub>st</sub> (550 Bp), FA<sub>at</sub> (558 Bp) und FA<sub>ast</sub> (581 Bp).

Alle Produkte erscheinen als homogene Banden im Gel entsprechend der erwarteten Größe. Nicht umgesetzte Zwischenprodukte sind nicht zu sehen. Die PCR-Produkte, die aus aufeinanderfolgenden primären und sekundären PCRs entstanden sind, unterscheiden sich prinzipiell nicht von denen der einstufigen PCR mit simultanem Einsatz von vier Primern.

Mit den optimierten Reaktionsbedingungen werden alle PCR-Produkte als klare, homogene Banden entsprechend der erwarteten Größe nach Trennung im Agarosegel detektiert.

Um die Expressions-PCR eines beliebigen Zielgens aus einem komplexen DNA-Gemisch zu simulieren wurde das PCR-Produkt FA<sub>st</sub> in Gegenwart eines sehr großen Überschusses von *E. coli* chromosomaler Kompetitor-DNA synthetisiert. Für die Synthese wurden die Primer A1, B3, C1 und D1 in einer einzigen Amplifikationsreaktion unter den selben Bedingungen wie in den vorangegangenen Reaktionen mit folgenden Ausnahmen eingesetzt: Die Menge des DNA-Templats betrug zwischen 0.16 pg und 20pg in einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu$ l, und die Reaktionsansätze enthielten zusätzlich 0.83  $\mu$ g sonifizierte (5 min Ultraschall) *E. coli* chromosomale Kompetitor-DNA. Nach 70 Temperaturzyklen wurden die PCR-Produkte im Agarosegel elektrophoretisch getrennt (Abb. 55).

Abb. 55



#### Kontrolle der PCR-Produkte nach Amplifikation aus komplexem DNA-Gemisch

0.16-20 pg Templat wurden für die Synthese des PCR-Produkts FA<sub>st</sub> in Gegenwart von 0.83  $\mu$ g chromosomaler Kompetitor-DNA in einer 50  $\mu$ l Reaktion eingesetzt. Nach 70 Temperaturzyklen wurden die Produkte im 1,5 % Agarosegel getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Proben in den nummerierten Spuren entsprechen Reaktionen mit: (1-5) 20, 4, 0,8, 0.16 und 0 pg Templat ohne Kompetitor-DNA; (6-10) wie 1-5, mit 0.83  $\mu$ g Kompetitor DNA in 50  $\mu$ l Reaktionsvolumen; (11) DNA-Größenstandards.

Auch bei einem sehr großen Überschuss von Kompetitor-DNA gegenüber dem Templat mit einem Verhältnis von ca.  $5 \cdot 10^6$  zu 1 bleibt die PCR unverändert

hochspezifisch bei gleichzeitig hoher Amplifikationsrate. Eine sehr geringe Templat-Menge von 0.16 pg ist ausreichend für eine nahezu ebenso effektive Amplifikation wie bei hohen Templat-Mengen. Dagegen ist die Anreicherung eines unspezifischen PCR-Produkts in Abwesenheit des Templats praktisch nicht nachweisbar.

Die Expressions-PCR zur Herstellung von FAst ist auch bei sehr kleiner Templatkonzentration von 0.16 pg / 50 µl und in Gegenwart eines fünf Millionen-fachen Überschuß von komplexer Kompetitor-DNA noch ebenso hochspezifisch und nahezu gleich effektiv wie bei hohen Templatekonzentrationen und in Abwesenheit des Kompetitors. Dagegen geht praktisch kein unspezifisches Produkt aus einer PCR ohne Templat und mit Kompetitor hervor.

Daher liegt es nahe, daß diese Reaktion für die Amplifikation eines niedrig konzentrierten Zielgens aus einem natürlichen komplexen DNA-Gemisch geeignet ist. Dabei wird das Gen in einer einzigen Reaktion amplifiziert und in eine für die effiziente, zellfreie Proteinsynthese geeignete Form überführt.

Nach der Amplifikation wurde 1 µl des Expressions-PCR-Ansatzes in Gegenwart des Kompetitors direkt, ohne weitere Aufreinigung für eine gekoppelte Transkription/Translation mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt. Hieraus konnte Syntheseprodukt korrespondierend zu ca. 10500 nM TCA-fällbarem Leucin synthetisiert werden. Dies entspricht einer H-FABP-Ausbeute von ca. 155 µg je Milliliter Reaktionslösung.

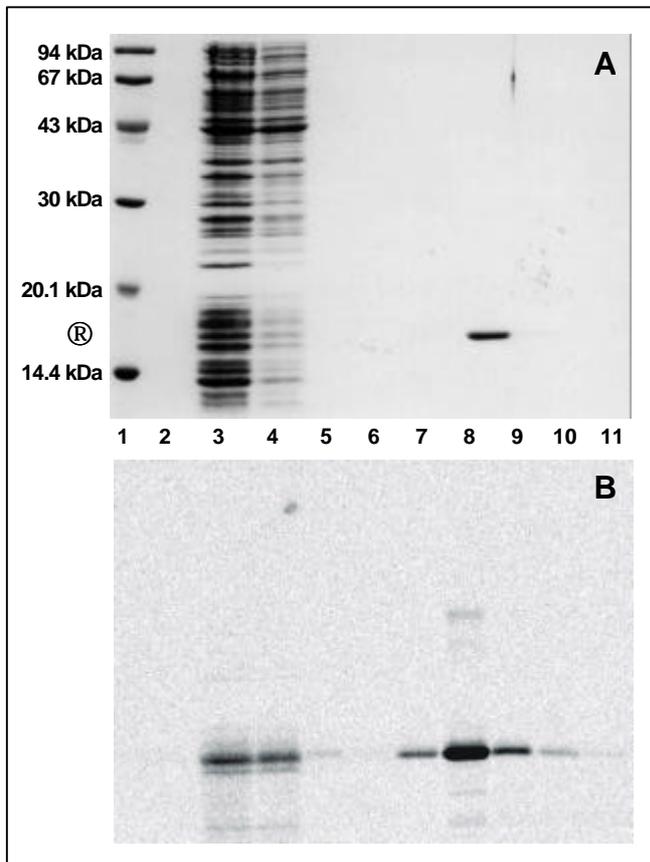
Damit ist dieses in Gegenwart des Kompetitors hergestellte und nicht aufgereinigte PCR-Produkt nahezu gleich effizient wie das PCR-Produkt ausgehend von einem definierten Templat (Kapitel 4.7.3) bzw. wie das gereinigte und optimierte Plasmid. Auch die Homogenität des synthetisierten Proteins ist ebenso hoch wie bei den bereits aufgeführten Syntheseprodukten (Abb. 53).

An diesem Modellbeispiel ist damit gezeigt, daß diese Methode prinzipiell für die sehr schnelle und effiziente Amplifikation einer gering konzentrierten Gensequenz aus einem komplexen DNA-Gemisch wie z.B. einer cDNA-Bibliothek oder einem Intron-losen Genom und für die Konvertierung zu einem effektiven Templat für die Proteinsynthese geeignet ist.

#### 4.7.5 Affinitätsreinigung von H-FABP-Strep-tag II exprimiert vom E-PCR-Produkt

Das aus H-FABP und C-terminalem Strep-tag II bestehende Fusionsprotein wurde ausgehend vom E-PCR-Produkt FAast synthetisiert. Nach zwei Stunden gekoppelter Transkription/Translation wurde der Reaktionsüberstand nach 5 min Zentrifugation bei 15000xg und 25 °C isoliert. Die Affinitätschromatographiesäule mit immobilisiertem StrepTactin wurde mit dem Überstand entsprechend 10 µg (150 µl) des <sup>14</sup>C-markierten Fusionsproteins beladen. Abb. 56 zeigt das Elutionsprofil des H-FABP-Strep-tag II-Fusionsproteins als Coomassie-gefärbetes Gel (A) nach Trennung mittels SDS-PAGE und dessen Autoradiogramm (B). Zur Quantifizierung wurden die isolierten Fraktionen mittels TCA-Fällung analysiert (nicht dargestellt).

Abb. 56



##### *Expression des Fusionsproteins H-FABP-Strep-tag II vom E-PCR-Produkt und Aufreinigung über Affinitätschromatographie*

Die Affinitätsreinigung des Fusionsproteins wurde entsprechend den Angaben des Säulenmatrixherstellers durchgeführt, mit Ausnahme eines reduzierten Volumens des Säulenmaterials von 200 µl. 150 µl Reaktionsansatz entsprechend 10 µg Fusionsprotein wurden auf die Säule aufgetragen. Die Wasch- und Elutionsvolumina betragen jeweils 200 µl bzw. 120 µl. Der jeweils gleiche (Volumen-)Prozentsatz der einzelnen Fraktionen wurde aliquotiert: Ein 20 µl Aliquot vom Durchlauf des Probenauftrags, 26,6 µl Aliquots der Waschfraktionen und 16 µl Aliquots der Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE getrennt, das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt (A) und ein Autoradiogramm des Gels erstellt (B).

Die Proben in den nummerierten Spuren entsprechen: (1) Molekulargewicht-Standards (nur sichtbar in Coomassie-Färbung); (2) Durchlauf des Probenauftrags; (3-5) Waschfraktionen 1-3 und (6-11) Elutionsfraktionen 1-6.

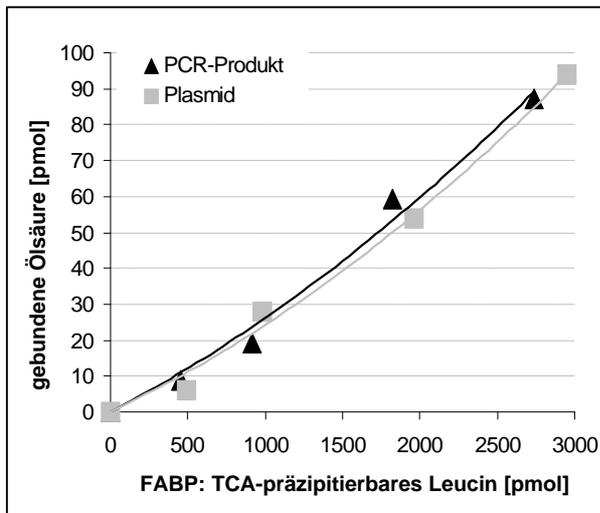
Das gereinigte Fusionsprotein wird größtenteils innerhalb einer Elutionsfraktion als ein klare Bande, sichtbar im Coomassie-gefärbten Gel, eluiert. Zusätzlich sind im Autoradiogramm nicht gebundenes Protein und ein kleinerer Anteil des gereinigten Produkts verteilt auf die anderen Elutionsfraktionen erkennbar. Ca. 81 % der auf die Säule aufgetragenen Radioaktivität wurde in den gesamten Fraktionen wiedergefunden und 67 % konnten als gereinigtes Produkt in den Elutionsfraktionen isoliert werden.

Das Fusionsprotein wird sauber aus dem Reaktionsansatz abgetrennt erkennbar an einer einzigen klaren Elutionsbande im Coomassie-gefärbten SDS-Gel. Nach der Affinitätschromatographie wurden vom eingesetzten Protein 67 % des eingesetzten Materials als gereinigtes Produkt wiedergefunden. Dieses Ergebnis entspricht in der Größenordnung den in unserem Labor gemachten Beobachtungen. Demnach wurde das gleiche Ergebnis mit dem Fusionsprotein erzielt, welches ausgehend vom Plasmid pHMFA mit der entsprechenden Strep-tag-Sequenz synthetisiert wurde (nicht dargestellt).

#### 4.7.6 Aktivitätstest des ausgehend vom E-PCR-Produkt exprimierten H-FABP

Die Aktivität des synthetisierten H-FABP wurde anhand seiner Bindungsaktivität zu Ölsäure gemessen. Dazu wurden die nicht markierten Syntheseansätze mit radioaktiv markierter Ölsäure versetzt und diese Reaktionsansätze gelfiltriert. An H-FABP gebundene Ölsäure wurde von der Diffusion durch die Poren des Gelmaterials ausgeschlossen und somit von der erst mit größeren Elutionsvolumina eluierbaren freien Ölsäure getrennt (Abb. 57).

Abb. 57



*Aktivitätstest des ausgehend vom E-PCR-Produkt synthetisierten H-FABP*

Die gesamten nicht radioaktiv markierten Reaktionsansätze mit unaufgereinigtem H-FABP synthetisiert vom PCR-Produkt FAt und vom Plasmid pHMFA wurden für den Aktivitätstest eingesetzt. Verschiedene Volumina (0-30  $\mu$ l) der Reaktionsansätze wurden mit entsprechendem Ansatz ohne Templat auf 30  $\mu$ l aufgefüllt und ad 120  $\mu$ l mit Translationspuffer (50 mM HEPES pH 7.6, 70 mM KOAc, 30 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM EDTA pH 8.0, 0.002 %  $\text{NaN}_3$ ) versetzt. Nach Komplementierung des Ansatzes mit 2  $\mu$ l 5 mM [9,10(n)- $^3\text{H}$ ]Ölsäure mit einer molaren Aktivität von 1000 dpm/pmol und einer Inkubation für eine Stunde bei 37 °C wurden 50  $\mu$ l Aliquots der Reaktionsansätze durch "Micro Bio-Spin Chromatography Columns" entsprechend der Herstellerangaben gelfiltriert. Die  $^3\text{H}$ -Radioaktivität der Elutionsfraktionen wurde im Szintillationszähler gemessen und unspezifisch gebundene Radioaktivität von den Ergebnissen abgezogen.

Dargestellt ist die Menge der an H-FABP gebundenen Ölsäure in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an synthetisiertem H-FABP. Dabei wurde die H-FABP-Konzentration in den nicht radioaktiv markierten Ansätzen anhand des Vergleichs zu Parallelansätzen mit Quantifizierung über  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität ermittelt. Die Bindungsaktivitäten sind nahezu identisch unabhängig davon ob Plasmid oder E-PCR-Produkt für die H-FABP-Synthese eingesetzt wurde.

Die Bindungsaktivitäten von H-FABP, unabhängig davon ob vom Plasmid oder vom PCR-Produkt synthetisiert, sind nahezu identisch. In Kapitel 4.7.5 wurde bereits festgestellt, daß der Prozentsatz an isolierbarem Fusionsprotein mit Strep-tag ausgehend von beiden Templaten gleich ist. Zusammengenommen zeigt dies an, daß der vom PCR-Produkt ausgehende Anteil an falsch synthetisiertem Protein, z.B. aufgrund von während der PCR auftretenden Mutationen, im Vergleich zum Plasmid sehr klein ist und nicht detektierbar ist.

Die vier PCR-Produkte FAt, FAat, FAt und FAast aus einer Amplifikation mit 50 Temperaturzyklen wurden für eine DNA-Sequenzierungsanalyse in ein Plasmid insertiert. Dazu wurden die PCR-Produkte vor der Epsilon Sequenz mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut. Die isolierten Verdauprodukte wurden in das mit XbaI und EcoRV geschnittene Plasmid pHMFA insertiert und nach Transformation und Zellanzucht jeweils ein Klon sequenziert. Die überprüften Sequenzen erstrecken sich dabei jeweils über einen Bereich von unmittelbar stromaufwärts der epsilon Sequenz bis stromabwärts der Sequenz des Transkriptionsterminators. In keinem der untersuchten Fälle konnte eine Mutation nachgewiesen werden.

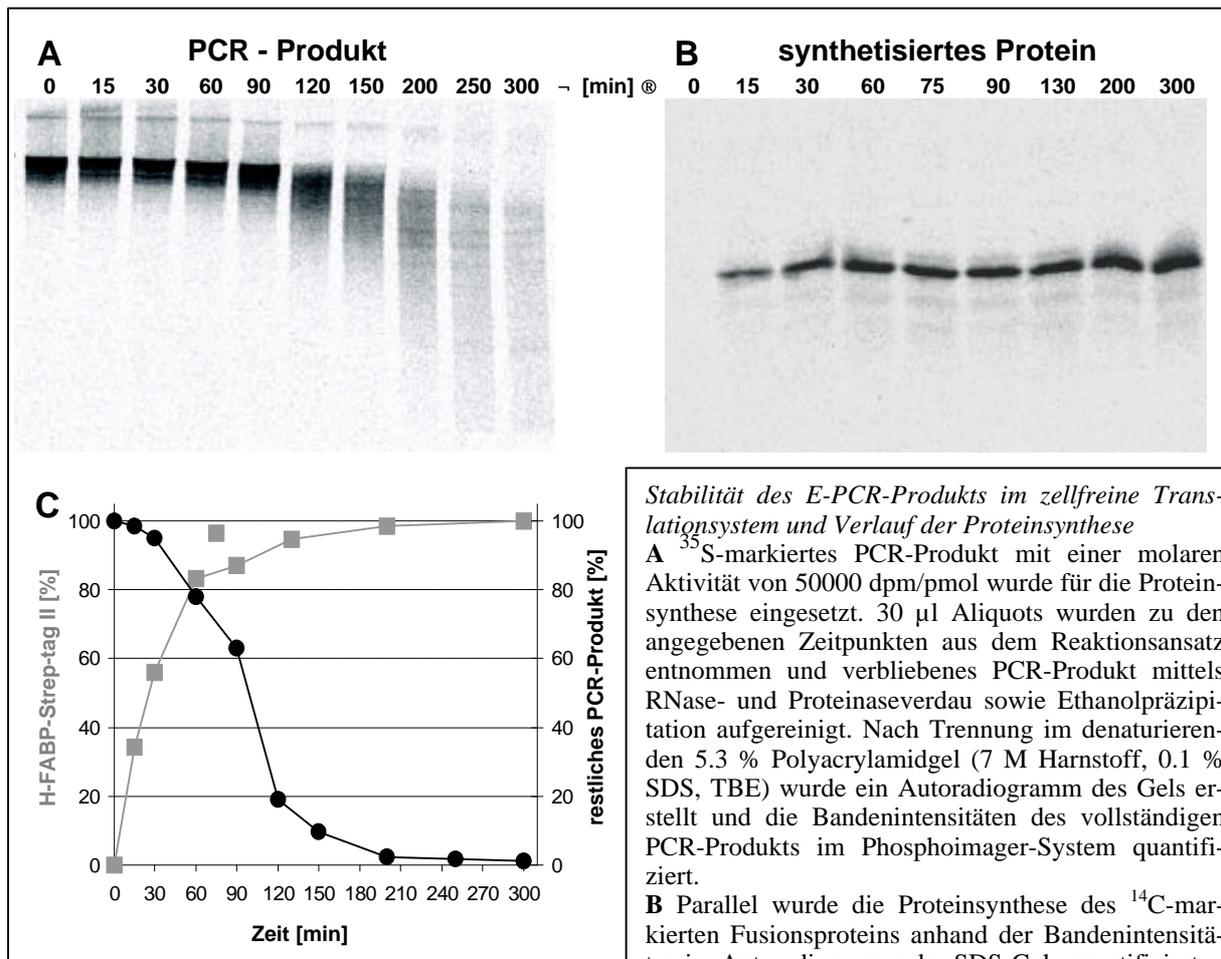
Damit wurde hier auf mehreren Ebenen gezeigt, daß ein E-PCR-Produkt prinzipiell ein ebenso gutes Templat für die Proteinsynthese sein kann wie ein Expressionsplasmid.

#### 4.7.7 Stabilität des E-PCR-Produkts im zellfreien Proteinsynthesystem

Wenn die Ressourcen des *in vitro* Translationsystems für längere als die hier benötigten Inkubationszeiten ausreichte, wäre eine Limitierung der Proteinsynthese durch die Halbwertszeit des PCR-Produkts denkbar. Daher wurde die Stabilität des E-PCR-Produkts FAast im Proteinsynthesystem untersucht.

Das während der Synthese mit  $^{35}\text{S}$ -dCTP markierte PCR-Produkt wurde als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt und Aliquots der Reaktion an aufeinander folgenden Zeitpunkten aus dem Reaktionsansatz entnommen. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde dann im denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt und ein Autoradiogramm des Gels erstellt (Abb. 58<sub>A</sub>). Parallel dazu wurde synthetisiertes H-FABP mit Hilfe eines Autoradiogramms nach Auftrennung durch SDS-PAGE gemessen (Abb. 58<sub>B</sub>). Der zeitliche Verlauf der PCR-Produkt-Degradation und der Proteinsynthese sind in Abb. 58<sub>C</sub> dargestellt.

Abb. 58



**C** Dargestellt ist der zeitliche prozentuale Verlauf der Proteinsynthese sowie der Degradation des PCR-Produkts. Die Proteinsynthese ist etwa innerhalb der ersten 90 min effektiv und erreicht dann langsam ein Plateau. Innerhalb des selben Zeitraums bleibt der größte Anteil des eingesetzten PCR-Produkts als Bande mit vollständiger Größe detektierbar. Nach etwa 100 min ist etwa die Hälfte des Templats degradiert. Damit ist die Halbwertszeit des PCR-Produkts ähnlich zu dem Zeitpunkt an dem die Proteinsynthese ihr Plateau erreicht. Möglicherweise ist diese zeitliche Korrelation zufällig. Denkbar wäre aber auch, daß die Halbwertszeit des PCR-Produkts von der Expressionsaktivität abhängt oder umgekehrt.

Die Halbwertszeit des PCR-Produkts im Proteinsynthesystem wurde zu ca. 100 min bestimmt. Das ist in der Größenordnung auch der Zeitpunkt, zu dem die H-FABP-Synthese zur Sättigung kommt. Diese zeitliche Korrelation von PCR-Produkt-Degradation und dem Erliegen der Proteinsynthese könnte zufällig sein. Es ist aber auch möglich, daß aufgrund verbrauchter Ressourcen die Proteinsyntheseaktivität abnimmt und das PCR-Produkt dadurch zunehmend der Degradation ausgesetzt wird. Oder aber die Proteinsynthese ist durch die Halbwertszeit des PCR-Produkts limitiert.

Es wurde schon mehrmals gezeigt, daß die *in vitro* Proteinsynthese deutlich verbessert werden kann, wenn dem Syntheseansatz Reaktionkomponenten (Energiekomponenten und Aminosäuren) kontinuierlich zugeführt werden, während verbrauchte Komponenten entfernt werden (Spirin et al., 1988; Kim et al., 1996; Yao et al., 1997; Kim & Choi, 1996; Stiege & Erdmann, 1995; Nakano et al., 1999). Solche Systeme können über Zeitperioden von zwanzig und mehr Stunden produktiv sein. Zukünftige Experimente werden zeigen, ob PCR-Produkte für Langzeitinkubationen genügend stabil sind. Für ein diskontinuierliches System konnte hier gezeigt werden, daß das PCR-Produkt etwa solange stabil ist wie die Proteinsynthese andauert. Sollte die Stabilität des PCR-Produkts unabhängig von der Proteinsyntheseaktivität sein, so müßte es wahrscheinlich gegen Degradation, z.B. durch Einbau schwer hydrolysierbarer Nukleotidanaloga, geschützt werden, oder desoxyribonukleasearme Zellstämme müßten für die Präparation des Translationsystems eingesetzt werden. Es wurde bereits berichtet, daß die Degradation von linearen Templaten im zellfreien *E. coli* - System limitierend für die Proteinsynthese sein kann (Kudlicki et al., 1992). Dessenungeachtet wird für dieses System zusammen mit den zukünftigen Verbesserungen der zellfreien Expression die Ermöglichung der beschleunigten Synthese von Protein im Milligrammbereich je Milliliter Reaktionslösung mit relativ geringem Aufwand vorhergesagt. Dadurch würden in Zukunft schneller komplexere Analysen von Proteinen wie z.B. die Strukturbestimmung ermöglicht werden. Aber auch die Synthese größerer Mengen von Proteinen, die sich der Synthese in zellulären Systemen entziehen wäre deutlich erleichtert.

#### 4.8 Fehlerabschätzung bei Ermittlung der Konzentration an synthetisiertem Protein

Das Pipettieren sehr kleinen Volumina bei der Erstellung der komponentenreichen Reaktionsansätze für die Proteinsynthese sowie bei der Analytik ist mit einem natürlichen Meßfehler behaftet. Dieser wurde anhand der Abweichung der Meßergebnisse von Doppel- oder bei Bedarf von Dreifachbestimmungen beurteilt und beträgt normalerweise weniger als 2-5 %.

In der aus *E. coli* isolierten Enzymfraktion ist ein unbestimmter Anteil an Aminosäure-beladener tRNA enthalten. Dieser wurde in der über den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren bestimmten Konzentration des synthetisierten Proteins nicht berücksichtigt. Daher sind die berechneten Konzentrationen der synthetisierten Proteine tatsächlich etwas größer einzustufen.

Neben dem gewünschten Produkt werden oft auch verkürzte Fragmente gebildet. Diese Fragmente gehen in die Messung der Proteinkonzentration über radioaktives, TCA-fällbares Translationsprodukt mit ein, was den Hauptfehler dieser Bestimmung ausmacht. Nach Trennung der Syntheseprodukte mittels SDS-PAGE kann jedoch der Anteil an vollständigem Produkt im Vergleich zur Gesamtheit der Produkte ermittelt, und die aus der TCA-Fällungsanalytik erhaltenen Meßwerte korrigiert werden.

Unspezifisches Syntheseprodukt, welches aus der Translation endogener (während der Präparation des Systems nicht vollständig entfernt) mRNA hervorgeht, wird anhand der Messung von Reaktionen ohne zugegebenem Templat bestimmt. Die entsprechenden Meßwerte sind normalerweise relativ klein und werden von den Meßwerten aus Reaktionen mit zugegebenem Templat abgezogen. Es ist jedoch bekannt, daß Ressourcen für die Synthese unspezifischer Produkte in Anwesenheit von effizienten Templaten zugunsten des spezifischen Produkts verschoben werden. Daher sind auch hier die berechneten Konzentrationen der synthetisierten Proteine tatsächlich etwas größer einzustufen.

Insgesamt wird der Fehler bei der Bestimmung der Proteinkonzentration um etwa zehn Prozent eingeschätzt.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird sowohl von der Reihenfolge der pipettierten Komponenten als auch von der Geschwindigkeit der Zusammenstellung eines Ansatzes und damit vom Experimentator beeinflusst. Erfahrungsgemäß können hier die größten Abweichungen in den Ergebnissen mit bis zu 20 % entstehen.