

6. Zusammenfassung

Ziel dieser anwendungsorientierten Arbeit war es, die Templateigenschaften und ihre Herstellung im Hinblick auf die Syntheseleistung des *in vitro* Translationsystems aus *Escherichia coli* zu verbessern. Limitierungen der Expressionseffizienz zweier Modellproteine auf der Ebene der Sekundärstruktur einer mRNA, der Translationsinitiation, des Codongebrauchs und der Stabilität einer mRNA sollten aufgezeigt und vermindert werden. Abschließend sollte eine auf die Polymerase Kettenreaktion basierende zeitsparende Methode zur Herstellung von Templaten für die Proteinsynthese entwickelt werden.

Es wurde gezeigt, daß die Expressionseffizienz eines Proteins am Übergang von der Translationsinitiation zur Elongation sehr stark vom zweiten Aminosäurecodon abhängt. In diesem Zusammenhang wurden deutliche Indizien für eine Abhängigkeit der Synthese des Fettsäure Bindenden Proteins (H-FABP) von der Stärke einer Sekundärstruktur im Initiationsbereich der mRNA gefunden. Effekte basierend auf der Art der eingebauten Aminosäure und der entsprechenden tRNA wurden dagegen als unwahrscheinlich angesehen.

Anhand der Expression von heterogenen Fusionsproteinen aus H-FABP und Dehydrofolatreduktase (DHFR) sowie von Multimeren dieser beiden Proteine konnte festgestellt werden, daß im Gegensatz zu Zellkultursystemen die Translationsinitiation optimierter Template *in vitro* sehr wahrscheinlich nicht der limitierende Faktor für die Proteinsynthese ist. Dagegen wird die Expression von DHFR entscheidend durch einen Mangel an der seltenen tRNA^{ArgU} begrenzt. Die Synthese des Proteins konnte durch Ergänzung des Systems mit *in vitro* transkribierter tRNA deutlich verbessert werden. Ähnliches gilt für die Expression des lysinreichen Proteins NusA, bei dem die Konzentration der entsprechenden beladenen Lysyl-tRNA als limitierender Faktor identifiziert werden konnte.

Die Stabilität der für H-FABP codierenden mRNA steigt mit zunehmender Expression des korrespondierenden Proteins an. Sie wird gleichermaßen erhöht, wenn man die Ribosomen durch die Zugabe von Chloramphenicol blockiert. Dagegen führt das Freisetzen von Ribosomen durch Puromycin zu einer verminderten Stabilität der mRNA. Diese Ergebnisse zeigen, daß allein eine Bedeckung des translatierten Bereichs der mRNA mit Ribosomen stabilisierend wirkt. Die Stabilität der mRNA nimmt auch mit der Ausprägung einer definierten Sekundärstruktur und zunehmender Länge im 3'-nicht-translatierten Bereich zu. Eine früher veröffentlichte translationsunspezifische, die mRNA stabilisierende Wirkung von Chloramphenicol konnte bestätigt, einige hierfür vorgeschlagene Mechanismen jedoch ausgeschlossen werden.

Schließlich wurde eine Methode zur schnellen Amplifikation kleinster Mengen einer Gensequenz aus einem komplexen DNA-Gemisch bei gleichzeitiger Einführung von prokaryontischen Regulationssequenzen für die zellfreie Proteinbiosynthese entwickelt und optimiert. Am Modellsystem der Expressions-Polymerase Kettenreaktion für die Synthese von H-FABP wurde gezeigt, daß ein auf diese Weise hergestelltes PCR-Produkt ebenso effizient exprimiert werden kann wie ein bereits optimiertes Plasmid. Die Methode stellt eine enorme Zeitersparnis der Expression vor allem neu gefundener Gene dar und hat darüberhinaus den Vorteil, daß nicht mit gentechnisch veränderten Organismen gearbeitet werden muß.