

1. Einleitung

1.1 Das zentrale Dogma der Molekularbiologie

Die Expression von Genen umfaßt mehrere Schritte, bei denen die in der Nukleotidsequenz der DNA (Deoxyribonukleinsäure) codierte Erbinformation zum phänotypisch erkennbaren Ausdruck gelangt. Dieser Ablauf folgt dem "zentralen Dogma der Molekularbiologie", nach dem die Information in Nukleinsäuren vererbt und übertragen wird. Bei der Vererbung wird die DNA-Doppelhelix semikonservativ in zwei identische Kopien dupliziert und auf segregierende Zellen aufgeteilt. Im zweistufigen Vorgang der Expression dient zunächst im Stadium der Transkription (Kapitel 1.2) ein Strang der DNA als Matrize für die Synthese eines komplementären Stranges aus Boten-Ribonukleinsäure (mRNA). Im zweiten Stadium, der Translation (Kapitel 1.3), die eine der komplexesten Reaktionen der Zelle darstellt, wird die Information in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Der Informationstransfer ausgehend vom Proteinprodukt ist irreversibel.

1.2 Transkription

Die Synthese von RNA erfolgt durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, ein in Prokaryonten aus 5 Untereinheiten bestehendes Enzym ($\alpha_2\beta\beta'$ und σ -Faktor), welches das Ablesen der DNA über RNA-DNA-Basenpaarungen reguliert. Die Transkription kann in die drei Stadien Initiation, Elongation, Termination unterteilt werden.

Bei der Initiation bindet mit Hilfe des σ -Faktors das RNA-Polymerase-Kernenzym an stromaufwärts von Strukturgenen gelegenen Promotoren. Diese bestehen aus zwei konservierten Sequenzen: 1. die -35 Box und 2. die Pribnow Box (TATA Box), welche sich 35 bzw. 5-9 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts befinden. Nach Bildung des binären Enzym/Promotor-Komplexes wird ein Bereich von ca. 17 Bp der DNA aufgeschmolzen und es entsteht der offene Enzym/Promotor-Komplex.

Im Elongations-Stadium werden unter Bildung eines ternären Komplex (DNA, Enzym und RNA) Nukleotide kovalent über Phosphodiesterbindungen an das wachsende 3'-Ende der RNA gebunden. Nach Entlassung des σ -Faktors entwindet die Polymerase die DNA und bewegt sich während der Synthese an der DNA entlang. Dabei besteht fortwährend eine "wandernde" Hybridhelix aus RNA und DNA von ca. 12 Bp.

Das faktorunabhängige Signal für die Polymerase zum Abbruch der Synthese wird von einer palindromischen 20-25 Basenpaare langen, Guanin- und Cytosin-reichen Sequenz am Ende der wachsenden RNA-Kette durch Ausbildung einer Haarnadelstruktur vermittelt. Dieses Signal zwingt die Polymerase zum Pausieren. Schwache Wechselwirkungen von Desoxyribo-

denosin der DNA zu Ribouridin der RNA werden durch stärkere Wechselwirkungen mit Desoxythymidin des nicht-codierenden DNA-Strangs ersetzt. Dadurch wird die RNA aus dem ternären Komplex verdrängt. Dagegen wird bei der Rho-Faktor-abhängigen Termination eine ATP-abhängige 5'-3' Helikaseaktivität des Proteins für DNA-RNA-Hybride durch Bindung einer ca. 75 Nukleotide langen Sequenz der RNA aktiviert und es kommt zu einer noch nicht vollständig geklärten Termination der Transkription.

Die aus einem einzigen Polypeptid mit 98 kDa Molekulargewicht bestehende RNA-Polymerase des T7 Phagens (Dunn & Studier, 1983) ist ähnlich zu anderen Phagenpolymerasen mit einer Einbaurate von etwa 200 Nukletiden je Sekunde etwa acht mal so schnell wie die RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* (Golomb & Chamberlin, 1974; Chamberlin & Ryan, 1982). Da letztere im Bereich der Translationsgeschwindigkeit von *E. coli* Ribosomen mit ca. 7-12 Codons bzw. 21-36 Nukleotide je Sekunde liegt (Bremer & Dennis, 1987; Iost et al., 1992; Sørensen et al., 1989), ist die T7 Transkription von der Translation zeitlich entkoppelt.

1.3 Translation

1.3.1 Übersicht

Bei der Proteinsynthese wird die Nukleinsäure-codierte genetische Information kolinear in das entsprechende Protein translatiert. Dabei werden Proteine durch die Ribosomen vom Amino- zum Carboxylende durch Anfügen von Aminosäuren an die Carboxylgruppe der naszierenden Peptidkette synthetisiert. Die Entzifferung des genetischen Codes verläuft über die Übersetzung einer Abfolge von Nukleotid-Tripletts (Codons) in die Sequenz der entsprechenden Aminosäuren. Transfer RNAs (tRNAs) dienen dabei als Adapter für die Informationsübertragung vom Codon zur Aminosäure, indem sie spezifische Basenpaarungen mit den Codons eingehen. Die aktiven Vorstufen sind Aminoacyl-tRNAs, in denen die Carboxylgruppe einer Aminosäure an das 3'-Ende einer tRNA kovalent gebunden ist. Die Verknüpfung einer Aminosäure mit ihrer tRNA wird von einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase in einer ATP-abhängigen Reaktion katalysiert. Zu jeder der 20 Standardaminosäuren gibt es mindestens eine tRNA und eine Synthetase. Da es mit 61 Aminosäurecodons von 64 möglichen weit mehr Codons als Aminosäuren gibt, ist der genetische Code degeneriert. Die drei verbleibenden Nicht-Aminosäurecodons signalisieren dem Translationsapparat das Ende der Translation.

Die Translation kann in drei Stadien Initiation, Elongation und Termination unterteilt werden. Bei der Initiation kommt es zur Bindung der mit Formylmethionin beladenen Initiator-tRNA ($fMet-tRNA_f^{Met}$) an das Startcodon der noch wachsenden mRNA. Dabei besetzt die Initiator-tRNA eine der beiden tRNA-Bindungsstellen des Ribosoms, die P-Stelle. Die Elongation wird eingeleitet mit der Bindung einer Aminoacyl-tRNA an die zweite Bindungsstelle des Ribosoms, den Akzeptorbezirk (A-Stelle). Anschließend wird unter Hydrolyse von GTP (Gua-

nosin-5'-triphosphat) eine Peptidbindung zwischen der Aminogruppe der neuen Aminoacyl-tRNA und der Carboxylgruppe des fMet der Initiator-tRNA gebildet und die entstandene Di-peptidyl-tRNA von der A-Stelle zur P-Stelle verschoben. Dabei verläßt die entladene tRNA das Ribosom. Durch Anlagerung einer neuen Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle beginnt eine neue Elongationsrunde. Die Termination findet statt, wenn ein Terminationsfaktor in Wechselwirkung mit einem Stopcodon der mRNA tritt. Dies führt zur Ablösung der fertigen Polypeptidkette. Das Protein faltet sich spontan oder mit Hilfe von molekularen "Lotsen", den Chaperonen, in seine native Konformation, wobei die Aminosäuresequenz die dreidimensionale Struktur vorgibt.

1.3.2 Ribosomen

Die komplexen Teilschritte der Translation finden an den Ribosomen, Zellpartikel zusammengesetzt aus Proteinen und RNAs, statt. Ribosomen aus *Escherichia coli* haben eine Masse von etwa 2500 kDa, einen Durchmesser von rund 20 nm und weisen einen Sedimentationskoeffizienten von 70S auf. Der Anteil an RNA (ribosomale RNA, rRNA) ist mit 66% größer als der Protein-Anteil. Die Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten mit Sedimentationskoeffizienten von 50S und 30S zum vollständigen Ribosom erfordert die Anwesenheit von Magnesium-Ionen.

Die große Untereinheit besteht aus 34 verschiedenen Proteinen, von denen zwei in mehreren Kopien vorliegen (Terhorst et al., 1972; Pettersson et al., 1976; Pettersson & Liljas, 1979), der 23S rRNA (Brosius et al., 1980) und der 5S rRNA (Brownlee et al., 1968; Erdmann et al., 1983; Specht et al., 1991). Sie enthält unter anderem eine GTP-Hydrolyse-Aktivität, eine Peptidyltransferase-Funktion und eine Membran-Verankerungsstelle. Die 30S-Untereinheit setzt sich aus 21 Proteinen und der 16S rRNA zusammen (Brosius et al., 1978; Carbon et al., 1978).

1.3.3 Aminoacylierung von Transfer-Ribonukleinsäure

tRNAs zeichnen sich vor allem durch ihre Länge von 60-95 Nukleotiden, durch eine große Anzahl von intramolekularen Basenpaarungen und modifizierten Nukleotiden sowie durch den allen tRNAs gemeinsamen 3'-Terminus CCA-3' aus.

Für die exakte Translation sind zwei Erkennungsmechanismen, erstens die Wahl der richtigen Aminosäure zur kovalenten Verknüpfung mit der entsprechenden tRNA und zweitens eine von der mRNA spezifizierte Auswahl der mit Aminosäure beladenen tRNA, notwendig. Der erste Schritt wird von den für die entsprechenden Aminosäuren und tRNAs hochspezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysiert. Diese untereinander nur entfernt verwandten Enzyme erkennen individuelle Strukturen, meist auf der inneren Oberfläche der L-förmigen tRNA. In einigen Fällen ist auch das Anticodon ein essentielles Erkennungsmerkmal. In der

ATP-abhängigen Reaktionsfolge wird die Aminosäure zunächst zum Aminoacyl-AMP-Zwischenprodukt umgesetzt und über die Carboxylgruppe mit der 2'- oder 3'-Hydroxylgruppe der Ribose am 3'-Ende der tRNA unter Bildung eines aktivierten Aminosäureesters verknüpft.

1.3.4 Initiation

Nach Beendigung einer Polypeptidsynthese bleiben die 50S- und 30S-Untereinheiten des Ribosoms als inaktives 70S Ribosom verbunden. Die Initiationsfaktoren 1 und 3 (IF-1 und IF-3) bewirken die Dissoziation des Komplexes. Die Proteinsynthese beginnt mit der Bindung der mRNA und einem Komplex von IF-2, GTP und fMet-tRNA^{fMet} an die 30S-Untereinheit des Ribosoms unter Bildung des 30S-Initiationskomplexes. Dabei findet Watson-Crick-Basenpaarung zwischen den drei Basen des Anticodons der tRNA und dem Basentriplett des Startcodons statt. Die 16S rRNA ragt mit einem pyrimidinreichen Abschnitt in der Nähe der P-Stelle aus dem Ribosom heraus. Durch Basenpaarung mit einer purinreichen Sequenz von 3-10 Nukleotiden der mRNA, der Shine-Dalgarno-Sequenz, deren Zentrum sich ca. 10 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons befindet, wird es dem Ribosom ermöglicht, das Startcodon korrekt zu positionieren. Dieser Prozeß wird durch IF-3 unterstützt. Unter Ablösung von IF-3 und Hydrolyse von GTP zu GDP + P_i verbinden sich die ribosomale 50S-Untereinheit und der 30S-Initiationskomplex zum 70S-Initiationskomplex (Abb. 1). Dabei werden IF-1 und IF-2 freigesetzt. Die Initiation ist unter Normalbedingungen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Translation. Während die Elongation mit dem Einbau von etwa 12 Aminosäuren je Sekunde voranschreitet (Sørensen et al., 1989), werden mRNAs in einem Intervall von etwa 3.2 Sekunden mit Ribosomen beladen (Kennell & Riezman, 1977).

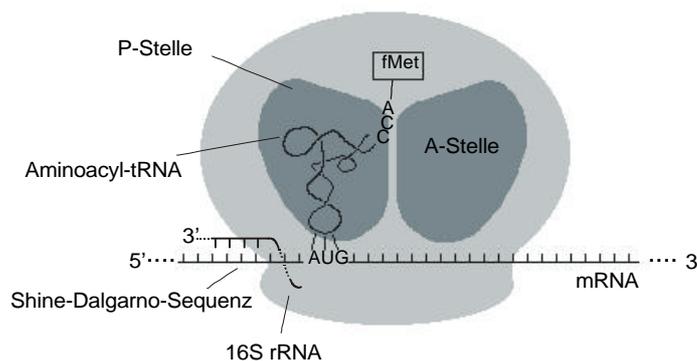


Abb. 1 Schematische Darstellung des 70S-Initiationskomplex

Die einzige variable Komponente im Initiationsschema ist die mRNA. Sowohl die Spezifität für die Auswahl des Translationsstarts als auch die sehr großen Unterschiede in der Expressionsstärke verschiedener Gene müssen in der mRNA codiert sein. Um eine effiziente Translationsinitiation erzielen zu können sind einige regulierende und limitierende Parameter ausgehend von der verwendeten mRNA zu beachten. Die Shine-Dalgarno-Sequenz oder Ribosomenbindungstelle (RBS) muß für eine primäre Assoziation der mRNA mit der ribosomalen

30S Untereinheit einen vom Sequenzkontext abhängigen Abstand zum Startcodon von meistens 5 ± 2 Nukleotiden aufweisen, wobei der Abstand über eine fixe Position der Consensus-Sequenz der Shine-Dalgarno-Sequenz definiert ist (Chen et al., 1994). Mindestens drei Basen müssen mit der 16S rRNA hybridisieren. Ist die RBS in eine Sekundärstruktur involviert, so wird abhängig von der Stärke dieser Struktur die Initiation inhibiert (de Smit & van Duin, 1994 und zugehörige Referenzen). In polycistronischen mRNAs kann die Expression über die Sekundärstruktur im Initiationsbereich reguliert werden, indem diese durch die Translation eines stromaufwärts liegenden Gens aufgelöst wird (Schümperli et al., 1982). Diese Methodik der gekoppelten Translation wurde für die gesteigerte Expression von strukurreichen mRNAs erfolgreich angewendet (Birikh et al., 1995; Makoff & Smallwood, 1990; Omer et al., 1995; Schoner et al., 1986).

Die Translationsinitiationsbereiche der *E. coli* Gene haben zu 91% AUG als Startcodon. Die alternativen Startcodons GUG und UUG (8% und 1%; Gren, 1984; Gualerzi & Pon, 1990; Stormo et al., 1982) weisen meistens geringere Initiationseffizienz auf (Stormo et al., 1982; Vellanoweth & Rabinowitz, 1992; Ringquist et al., 1992). Iserentant & Fiers (1980) und Gheysen et al. (1982) argumentierten, daß Sekundärstrukturen, die das Startcodon involvieren einen stärker inhibierenden Effekt auf die Initiation haben könnten als Strukturen gleicher Stärke um die RBS. Dafür spricht, daß mRNA auch ohne RBS translatiert werden kann (Ptashne et al., 1976; Tzavera et al., 1994) und dies im Extremfall sogar ebenso effizient wie mit RBS (Fargo et al., 1998).

Eukaryontische mRNAs benötigen für die Initiation keine Shine-Dalgarno-Sequenz. Entsprechende Sequenzen in Kombination mit einem benachbarten Startcodon wurden daher in ihrer Evolution nicht eliminiert. Daher kann die Expression solcher mRNAs in prokaryontischen Systemen zu Nebenprodukten aufgrund von Initiationsereignissen an internen, Proteincodierenden Bereichen führen.

Außer der RBS und dem Startcodon gibt es spezifisch die Translation verstärkende Elemente, die als "Translations-Enhancer" bezeichnet werden. Uridinreiche Sequenzen stromaufwärts der RBS wurden als Enhancer charakterisiert. Das Ziel von diesen und ähnlichen Sequenzen ist das ribosomale S1 Protein (Boni et al., 1991; Tzareva et al., 1994). Sprengart et al. (1990 und 1996) zeigten, daß eine spezifische Region im Bereich von etwa 9-15 bis 21-26 Nukleotide stromabwärts vom Startcodon bestimmter Gene, "Downstream-Box" genannt, als Enhancer fungieren. Diese Region zeigt Komplementarität zu den Nukleotiden 1469-1483 der 16S rRNA, der sogenannten "Anti-Downstream-Box".

Olins et al. (1988a, 1989 und 1990) charakterisierten eine 9 Nukleotide umfassende Sequenz, welche als sehr effiziente RBS zu agieren scheint und die Expressionsausbeute einiger Gene 40- bis 340-fach erhöht (Olins et al., 1988b und 1990). Stromaufwärts von synthetischen RBS positioniert, wirkt sie als Translationsverstärker (Olins et al., 1989). Mechanistisch ist nicht geklärt ob dieser Enhancer über eine Interaktion mit Nukleotiden der 16S rRNA wirkt, oder ob er der mRNA Stabilität gegen Degradation vermittelt wird (Sprengart et al., 1996).

Scherer et al. (1980) berichteten als erste von einem nicht zufälligen Charakter der Basen um die RBS von etwa 20 Nukleotide vor bis 10 Nukleotide nach dem Startcodon. Diese fünf Bereiche umfassende extra Information könnte für die Feineinstellung des Translationsstarts und die Expressionseffizienz relevant sein. Einer dieser Bereiche ist das zweite, dem Startcodon direkt folgende Codon. Einige Codons, insbesondere AAA, GCU und CUG treten in stark translatierten *E. coli* Genen an zweiter Position mit hoher Frequenz auf (Gold et al., 1981; Gren, 1984). Ein beträchtlicher Einfluß des zweiten Codons auf die Expressionseffizienz *in vivo* wurde experimentell nachgewiesen (Hui et al., 1984; Looman et al., 1987; Cantrell et al., 1991) und AAA wurde *in vivo* mit hohen Translationsraten in Verbindung gebracht. Das häufig auftretende Codon GCU kommt tatsächlich in jedem der stark exprimierten Hauptgene des T7 Phagens an zweiter Position vor (Dunn & Studier, 1983). Es ist jedoch nicht genau bekannt, ob diese Präferenz für das zweite Codon auf Effekte von tRNAs oder auf die Erkennung durch das Ribosom zurückzuführen ist (Stormo, 1986).

1.3.5 Elongation

Die Elongation der Proteinbiosynthese setzt sich aus einem dreistufigen Reaktionszyklus

1. der Positionierung einer Aminoacyl-tRNA an der A-Stelle,
2. der Knüpfung einer Peptidbindung (Transpeptidierung) und
3. der Translokation

zusammen.

Dabei wird die Polypeptidkette durch Anfügen von Aminosäuren an den C-Terminus verlängert. Durch den Austausch von GDP gegen GTP wechselt der Elongationsfaktor EF-Tu in eine aktive Konformation. Diese Reaktion wird vom Elongationsfaktor Ts durch Verdrängung von GDP und anschließender Verdrängung von EF-Ts durch GTP katalysiert. Die Aminoacyl-tRNA wird im ternären Komplex mit EF-Tu-GTP zum Anticodon der mRNA an der A-Stelle des Ribosoms positioniert. Dabei gehen die Nukleotide vom Anticodon der tRNA und dem Codon der mRNA spezifische Basenpaarungen ein. EF-Tu-gebundenes GTP wird zu GDP und P_i hydrolysiert und der Elongationsfaktor dissoziiert vom Ribosom. Bei der Knüpfung der Peptidbindung verdrängt die Aminogruppe der Aminosäure der Aminoacyl-tRNA die tRNA an der P-Stelle. Damit wird die naszierende Peptidkette der Peptidyl-tRNA an der P-Stelle auf die tRNA der A-Stelle übertragen und um eine Aminosäure verlängert. Die deacylierte tRNA der P-Stelle wird nach kurzfristiger Bindung an eine Austrittsstelle (E-Stelle), freigesetzt. Die Peptidyl-tRNA der A-Stelle wird zusammen mit der über Codon-Anticodon-Wechselwirkung gebundenen mRNA zur P-Stelle translociert. Für diesen Vorgang findet eine Elongationsfaktor G-abhängige Hydrolyse von GTP statt. Nach Dissoziation des EF-G-GDP-Komplex kann eine neue Elongationsrunde folgen oder die Proteinsynthese terminiert werden. Der exakte Mechanismus und die Regulation der Elongation sind bis heute nicht bis ins Detail geklärt und verschiedene Modelle sind Gegenstand kontroverser Diskussion (Nierhaus K., 1993; Abel and Jurnak, 1996; Rodrina et al., 1997).

Die in der mRNA codierte Information kann unter bestimmten Voraussetzungen bis zu einem hohen Grad limitierend für die Elongationseffizienz sein. In erster Linie ist der Codongebrauch der mRNA relativ zur verfügbaren Menge an Aminoacyl-tRNA von Interesse. Sowohl pro- als auch eukaryontische Gene zeigen einen nicht zufälligen Gebrauch der zur Verfügung stehenden Codons (Gouy & Gautier, 1982; Gutman & Hatfield, 1989; Ikemura, 1985; Sharp et al., 1988; Zhang et al., 1991). Für fast alle degenerierten Codon-Familien gibt es eine Präferenz für ein oder zwei Codons. Stark exprimierte Gene haben eine ausgeprägtere Präferenz. Die Häufigkeit des Auftretens von synonymen Codons korreliert gewöhnlich mit dem Vorkommen der entsprechenden tRNA (de Boer & Kastelein, 1986). Konsequenterweise ist eine ineffiziente Expression von mRNAs mit einer Anhäufung von seltenen Codons wahrscheinlich.

Die folgende Tabelle (Tab. 1) zeigt den genetischen Code von *Escherichia Coli* mit den selten benutzten Codons (fett gedruckt).

1. Position (5'-Ende)	2. Position				3. Position (3'-Ende)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Tab. 1 Genetischer Code und seltene Codons in *Escherichia coli*.

Die Frequenz des Codongebrauchs variiert abhängig vom Autor (Kane, 1995; Wada et al., 1992; Zhang et al., 1991). Seltene Codons sind definiert mit einer Frequenz von < 1% in den Genen von *E. coli* (fett gedruckt).

Für die bakterielle Expression von Säugetiergenen wurde gezeigt, daß die seltene tArgU (tRNA^{Arg(AGG/AGA)}) ein limitierender Faktor sein kann (Brinkmann, 1989). Die Koexpression des entsprechenden *argU* (*dnaY*) Gens (Garcia et al., 1986; Lindsey et al., 1989) in *E. coli* kann die Proteinausbeute enorm erhöhen (Brinkmann, 1989). Auch die Koexpression des *ileX* Gens für die AUA decodierende Isoleucyl-tRNA führte zu verstärkter heterologer Expression in *E. coli* (Del Tito et al., 1995). Die Proteinsynthese konnte schon mehrfach durch Austausch von seltenen gegen häufige Codons verbessert werden (Referenzen siehe: Makrides, 1996). Zwei Forscherteams berichteten von negativen Einflüssen der seltenen Arginyl- bzw. Leucylcodons AGG bzw. CUA auf die Expression, wenn diese im möglicherweise kritischen Anfangsbereich der Protein-codierenden Sequenz lokalisiert sind (Chen & Inouye, 1990; Goldman et al., 1995). Tatsächlich treten Cluster seltener Codons im Anfangsbereich von *E. coli* Genen häufiger als statistisch zu erwarten auf (Phoenix & Korotkov, 1997).

Allerdings werden auch einige Gene mit seltenen Codons sehr effizient translatiert (Ernst & Kawashima 1988; Huh et al., 1996; Lee et al., 1992; Rosenberg & Studier 1987; Young et al., 1983; Andrews et al., 1996) und es konnte bisher keine eindeutige und allgemeingültige Regel für die Vorhersage, wann die Expression eines Gens durch seltene Codons beinflusst wird, aufgestellt werden. Besonders ausgeprägt ist der Effekt seltener Codons meistens, wenn diese

in Clustern auftreten (Varenne et al., 1989; Rosenberg et al., 1993; Spanjaard & van Duin, 1988). In diesen Fällen ist nicht nur die Expressionseffizienz reduziert sondern auch der Anteil an vollständig translatiertem Produkt, da Cluster seltener Codons eine abnormale Verschiebung des Leserahmens zur Folge haben können (Spanjaard & van Duin, 1988). Darüberhinaus können seltene Codons bei gleichzeitigem Mangel entsprechender tRNA zu induzierter Termination und Degradation des Polypeptids führen (Roche & Sauer, 1999). Dabei wird der pausierende Translationsapparat von der mRNA auf die für eine Proteaseerkennungssequenz codierende RNA des SsrA-Komplex übertragen (Keiler et al., 1996).

Interessanterweise kann eine verlangsamte Translation aufgrund seltener Codons auch zu höherer Aktivität des synthetisierten Proteins führen, weil dem naszierenden Protein möglicherweise mehr Zeit für die korrekte cotranslationale Faltung in seine native dreidimensionale Struktur zur Verfügung steht (Komar et al., 1999; Ivanov et al., 1997). Das heißt, daß eine schnellere Translation ohne pausierende Ribosomen nicht zwingend zu einer höheren Ausbeute an aktivem Protein führen muß.

1.3.6 Termination

Für die Termination der Translation sind ein Stopcodon auf der mRNA (eines der Nukleotid-Triplets UAA, UGA oder UAG), sowie die Terminationsfaktoren RF-1, RF-2 und RF-3 (release factors) erforderlich. RF-1 ist an der Erkennung der Signale UAA und UAG, und RF-2 an der Erkennung von UAA und UGA beteiligt. RF-1 und RF-2 binden mit Unterstützung eines Komplexes von RF-3 und GTP an das Ribosom. Die Bindung an ein Stopcodon (an der A-Stelle) führt zu Hydrolyse der Esterbindung zwischen der Aminoacyl-tRNA der P-Stelle und dem auf diese Weise freigesetzten Polypeptid. Die Terminationfaktoren werden unter Hydrolyse von GTP freigesetzt. Nach Janoshi et al. (1996, und zugehörige Referenzen) wird schließlich der verbliebene Komplex aus deacylierter tRNA an der P-Stelle, der mRNA und dem Ribosom mit Hilfe von EF-G und dem mit GTP assoziierten Ribosome Recycling Factor (RRF) unter Hydrolyse von GTP dissoziiert. Die ribosomalen Untereinheiten bleiben zunächst als inaktives 70S-Ribosom assoziiert. Der Initiationsfaktor IF-3 dissoziiert die ribosomalen Unterheiten mit Hilfe von IF-1 und eine neue Translationsrunde kann beginnen.

Die Gegenwart eines Stopsignals in der mRNA ist eine unentbehrliche Komponente im Prozeß der Translationstermination. Darüberhinaus wird die Effizienz der Termination vom Kontext des Stopcodons beeinflusst. Die Sequenz stromaufwärts zum Stopcodon beeinflusst die Termination unabhängig von dessen Nukleotidzusammensetzung. Dagegen können die Ladungs- und Hydrophobizitätseigenschaften der vorletzten Aminosäure des naszierenden Peptids einen bis zu 30-fachen Unterschied in der Terminationseffizienz am UGA Stopcodon verursachen (Mottagui-Tabar et al., 1994; Björnsson et al., 1996). Die Neigung der letzten Aminosäure im C-terminalen Bereich des Proteins an der Struktur von α -Helices, β -Faltblät-

tern oder Umkehrschleifen teilzunehmen wirkt ebenfalls auf die Termination am UGA Codon ein (Björnsson et al., 1996).

In *E. coli* gibt es eine Präferenz für UAA Stopcodons (Sharp & Bulmer, 1988). Über statistische Analyse der *E. coli* Gene wurde eine nicht zufällige Verteilung sowohl im Stopcodon als auch bezüglich des direkt folgenden Nukleotids (+1) festgestellt (Tate & Brown, 1992; Poole et al., 1995). Abhängig vom Stopcodon und dem direkt folgenden Nukleotid wurde gezeigt, daß sich die Terminationseffizienz innerhalb der acht möglichen Varianten UAAN und UGAN (N steht für eines der vier Nukleotide A, C, G, U) in Konkurrenz zu einer Leserasterverschiebung im Bereich von 7% (UGAC) bis zu 80% (UAAU) enorm unterscheidet (Poole et al., 1995). Der Grund hierfür liegt sehr wahrscheinlich in einer unterschiedlichen Bindungsaffinität der Terminationsfaktoren zum Stopcodon einschließlich des +1 Nukleotids. Für RF-2 konnte eine dreifach höhere Affinität des Terminationsfaktors RF-2 zu UAAU gegenüber UAAC und ein entsprechender zweifacher Unterschied für RF-1 gezeigt werden (Pavlov et al., 1998). Das Stopsignal für die Proteinsynthese wird daher sehr wahrscheinlich von mindestens vier Nukleotiden gebildet. Darüberhinaus zeigten Cross-linking Experimente mit RF-2 und thio-modifizierten Nukleotiden im mRNA-Bereich unmittelbar stromabwärts zum Stopcodon UGA, daß die sich die Terminationsfaktor-Erkennungssequenz möglicherweise sogar über ein Hexanukleotid erstreckt (Poole et al., 1998).

1.4 Abbau von messenger RNA-Molekülen in *Escherichia coli*

1.4.1 Regulation der mRNA-Degradation

Der Prozeß der mRNA-Degradation stellt einen Hauptkontrollpunkt für die Regulation der Genexpression in praktisch allen Organismen dar (Ross, 1995). Das Konzept der mRNA und deren Instabilität wurde schon vor etwa 40 Jahren eingeführt (Brenner et al., 1961; Gros et al., 1961; Jacob & Monod 1961). Dennoch ist die Aufklärung des detaillierten Mechanismus dieses Prozesses bis heute aus mehreren Gründen eine große Herausforderung (Belasco, 1993).

Der Abbau bzw. die Inaktivierung einer spezifischen mRNA-Population erfolgt exponentiell (Kennell, 1986; Petersen 1987). Als Maß für die Stabilität einer messenger RNA gilt ihre chemische bzw. funktionelle Halbwertszeit. Ein einfacher Degradationsweg ausgehend von unspezifisch, statistisch schneidenden Endonukleasen ist ausgeschlossen, da es keine inverse Korrelation zwischen der Länge einer mRNA und deren Halbwertszeit gibt (Belasco et al., 1986; Brawerman, 1987; McCormick et al., 1994; Chen & Belasco, 1990).

Die Halbwertszeit wird von der Struktur der mRNA, die die Wechselwirkung der mRNA mit den Ribonukleasen beeinflusst, durch die Konzentrationen der verschiedenen Ribonukleasen und durch mRNA-unabhängige modulierende Faktoren, bestimmt. Solche Faktoren können RNA-bindende Proteine, wie Translationsrepressoren (Singer & Nomura, 1985; Cole & Nomura, 1986; Mattheakis & Nomura, 1988), modifizierte Chaperonine (Georgellis et al., 1995) oder antisense-RNA-Moleküle (Case et al., 1990; Blomberg et al., 1990) sein.

Cis-wirkende Elemente wie Sequenz und Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der mRNA determinieren die Resistenz bzw. Sensibilität gegenüber Ribonukleasen. Für einige RNasen (Ribonukleasen) sind Erkennungselemente Strukturen höherer Ordnung (Krinke & Wulff, 1990; Ehretsmann et al., 1992; McDowall et al., 1995). Dagegen gibt es zwei Klassen schützender Sekundärstrukturen in den nicht translatierten 5'- und 3'- bzw. intercistronischen Bereichen der mRNA. (Mott et al., 1985; Chen et al., 1988; Emory & Belasco, 1990; Aiba et al., 1991; Bouvet & Belasco, 1992; Bechhofer, 1993; Higgins et al., 1993).

Es besteht eine deutliche Korrelation von steigender Stabilität einer mRNA und zunehmender Translationsinitiations-Effizienz (u.a. Baumeister et al., 1991; Jain & Kleckner, 1993; Papaport & Mackie, 1994; Lopez & Dreyfus, 1996; Mertens et al., 1996; Mackie et al., 1997; Arnold et al., 1998; Joyce & Dreyfus, 1998). Dabei kann in Abwesenheit einer Translation die alleinige Bindung der 30S ribosomalen Untereinheit an die mRNA eine Stabilisierung bewirken. Dieser Effekt wurde mit einem Konkurrieren von initiiierenden Ribosomen und im 5' nicht translatierten Bereich agierender RNase in Zusammenhang gebracht (Wagner et al., 1994; Agaisse & Lereclus, 1996; Arnold et al., 1998). Die Bedeutung der Geschwindigkeit der 30S Komplexbildung zeigt sich auch bei einer Entkopplung von (beschleunigter) Transkription und Translation (Chevrier-Miller et al., 1990). So besteht eine inverse Kor-

relation zwischen der Stabilität einer mRNA und der RNA-Polymerase-Geschwindigkeit (Iost et al., 1992; Chow & Dennis, 1994; Makarova et al., 1995; Iost & Dreyfus, 1995).

Translatierende Ribosomen können die mRNA auch unabhängig von der Bindung an 5' nicht translatierte Bereiche schützen. Eine vorzeitige Termination der Translation an insertierten Stopcodons kann abhängig von der mRNA und von der Position des Stopcodons zu einer Destabilisierung der mRNA führen (Nilsson et al., 1987; Papaport & Mackie, 1994).

Es wird allgemein angenommen, daß die prokaryontische Translation inhibierende Antibiotika, die Stabilität der mRNA beeinflussen, indem sie die Aktivität bzw. den Abstand translatierender Ribosomen auf der mRNA verändern. Dabei hängt die Wirkung davon ab, wie die Antibiotika auf die Translation einwirken. Chloramphenicol, Tetracyclin und Fusidinsäure, die zu einem Festsetzen translatierender Ribosomen auf der mRNA führen, stabilisieren die mRNA. Dagegen wird sie durch Puromycin und Kasugamycin, die zu einem Freisetzen der Ribosomen führen, destabilisiert (Schneider et al., 1978; Pato et al., 1973). Es wurde allerdings von Lopez et al. (1998) gezeigt, daß der stabilisierende Effekt eines Antibiotikums zumindest teilweise unabhängig von der Translation und dem daraus resultierenden Schutz der mRNA resultiert. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist noch ungeklärt.

1.4.2 Initiation der Degradation

5'-Ende

Die Degradation von RNA ist ein hochgradig organisierter Prozeß, in dem neben anderen proteinogenen Komponenten Nukleasen beteiligt sind. In *Escherichia coli* sind diese Komponenten in einem hochmolekularen Komplex organisiert, dem Degradosom. Das Schlüsselenzym für den initialen Schritt des RNA-Abbaus ist die Endoribonuklease E.

Die nukleolytisch gespaltene Erkennungstelle für Endonukleasen wird sehr häufig durch die umgebende Sekundär- oder Tertiärstruktur in der (m)RNA gebildet. Dabei können Standardstrukturen wie doppelsträngige Stämme, Schleifen (loops) und Ausbuchtungen einzelner Nukleotide aus einem doppelsträngigen Bereich (bulges) und deren Kombination zahlreiche strukturierte Elemente für die Erkennung durch eine Nuklease bilden.

Die mRNA-Degradation wird, insbesondere wenn das 3'-Ende stabilisiert ist, oft in 5'-3'-Richtung beobachtet, obwohl in Prokaryonten (im Gegensatz zu Eukaryonten) 5'-3'-Exonukleasen nie gefunden wurden. Im heute allgemein anerkannten Modell wird der mRNA-Abbau durch einen geschwindigkeitsbestimmenden, endonukleolytischen Schnitt - sehr wahrscheinlich durch RNase E - initiiert. Dieser Schnitt findet manchmal stromaufwärts von durch Sekundärstrukturen geschützten 3'-Enden, häufiger jedoch nahe dem 5'-Ende statt. Im ersten Fall wird das stromaufwärts generierte Spaltfragement schnell durch 3'-5'-Exonukleasen degradiert. Im zweiten Fall erkennt RNase E ein zugängliches 5'-Ende und bewirkt einen weiter stromabwärts gelegenen Schnitt, dem wiederum der 3'-5'-exonukleolytische Abbau der Fragmente folgt (Bouvet & Belasco, 1992; Lin-Chao & Cohen, 1991). Durch Zirkularisierung

der mRNA blockierte 5'-Enden (Mackie, 1998) oder 5'-terminale Sekundärstrukturen (Kapitel 1.4.1) können den RNase E vermittelten initierenden Schnitt inhibieren. Dabei kann die gesamte stromabwärts liegende mRNA samt nachfolgendem Leserahmen in einem Dicistron stabilisiert werden. Da eine 5'-terminale Sekundärstruktur eine gesamte mRNA schützen kann, scheint ein initialer Kontakt mit dem 5'-Ende vor dem ersten Schnitt wahrscheinlich. Das 5'-Ende muß dabei über eine Länge von etwa zwei bis vier Nukleotiden ungepaart sein. Außerdem muß das bei der Transkription entstandene 5'-Triphosphat in ein Monophosphat umgewandelt worden sein (Mackie, 1998). Interessanterweise haben aus polycistronischer mRNA ausgeschnittene funktionelle Teil-mRNAs 5'-Monophosphate und unterscheiden sich daher in ihrer Empfindlichkeit gegenüber 5'-initiiertes Degradation.

3'-Ende

Sekundärstrukturen an 3'-Enden von mRNAs und intercistronischen Regionen sind ein verbreitetes Merkmal in Prokaryonten (Stern et al., 1984). Diese können einen 3'-5'-exonukleolytischen Abbau inhibieren (Newbury et al., 1987; Klug et al., 1987; Mackie, 1987). Für den Abbau dieser Strukturen bedarf es wahrscheinlich eines besonderen Mechanismus.

Prokaryontische mRNAs können am 3'-Ende polyadenyliert werden (Sarkar, 1997), mit poly(A)-Längen in *E. coli* zwischen 15 und 50 Nukleotiden (O'Hara et al., 1995). Es wurde von Li et al. (1998) vorgeschlagen, daß Polyadenylierung in *E. coli* ein allgemeines Merkmal ist. Während Poly(A)-Schwänze in Eukaryonten einen stabilisierenden Effekt auf mRNA ausüben, scheinen sie in Prokaryonten genau das Gegenteil zu bewirken (Korner & Wahle, 1997). Zwei Poly(A)-Polymerasen PAP I und PAP II konnten in *E. coli* identifiziert werden (Cao & Sarkar, 1992; Kalapos et al., 1994). Polynukleotid Phosphorylase (PNPase) und RNase II können ihre 3'-5' Prozessivität stromabwärts einer 3'-Sekundärstruktur nur auf 3'-Enden mit einer Länge im Bereich von etwa 12 ungepaarten Nukleotiden ausüben (Coburn & Mackie, 1996). Die Anzahl der für PNPase-Verdau zugänglichen Substratsequenzen erhöht sich in Anwesenheit von Poly(A)-Schwänzen drastisch (Xu & Cohen, 1995; Cohen, 1995).

Es wird heute allgemein angenommen, daß für den exonukleolytischen Angriff des 3'-Endes abhängig von der thermodynamischen Stabilität, ein fein abgestimmtes Sortiment von degradativen Werkzeugen zur Anwendung kommt (Rauhut & Klug, 1999): Unstrukturierte Enden werden schnell durch PNPase und RNase II abgebaut. Stabilere Strukturen erfordern eine einmalige Polyadenylierung (Xu & Cohen, 1995). Stärkere Sekundärstrukturen erfordern eine wiederholte Aktivität von PAP I und PNPase, und sehr stabile Sekundärstrukturen benötigen das Degradosom (siehe unten) samt ATP-abhängiger Helicase (Py et al., 1996).

1.4.3 Ribonukleasen und Degradosom

Ribonuklease E

Die 180 kDa schwere RNase E autoreguliert ihre eigene Synthese durch Repression der Tran-

skript-Konzentration bei erhöhter Zerfallsrate. Die N-terminale Domäne enthält das katalytische Zentrum. Die RNA-spaltende Aktivität von RNase E wurde anhand einer Reihe von Standardsubstraten wie dem 9S rRNA Vorläufer der 5S rRNA, RNA I (Antisense-Regulator von ColE1) und den für OmpA, TrxA und die ribosomalen Proteine S20 und S15 codierenden mRNAs untersucht. Die Spaltprodukte enthalten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen. Die Spaltung erfolgt bevorzugt an einzelsträngigen Adenin- und Uracil-reichen Regionen (Mackie, 1992), die von Sekundärstrukturen flankiert sind (Ehretsmann, 1992; Cormack & Mackie, 1992). Eine einfache Consensus-Erkennungssequenz konnte auch nach intensivem Studium nicht gefunden werden (McDowall et al., 1994 und 1995). Die höher geordnete Struktur der RNA und nicht die Primärstruktur scheint das Kernmerkmal für die Erkennung durch RNase E zu sein.

Carpousis et al. (1994) konnten als erste aktive RNase E aufreinigen. Py et al. (1994) konnten einen 500 kDa Komplex bestehend aus RNase E, PNPase (α -Untereinheit) und anderen nicht identifizierten Proteinen isolieren. Einige dieser Proteine konnten als EIF (exonuclease-impeding-factor, Causton et al., 1994), RhlB (RNA-Helicase) und Enolase identifiziert werden (Py et al., 1996).

Polynukleotid Phosphorylase und Ribonuklease II

Escherichia coli PNPase wird allgemein als Homotrimer aus 78kDa Untereinheiten beschrieben (Regnier et al., 1987). PNPase und RNase II sind die zwei wichtigsten 3'-5'-Exoribonukleasen in *E. coli*. PNPase ist eine P_i -abhängige, prozessive Exonuklease und erfordert freie 3'-Hydroxyl-Enden für seine Aktivität. Das Enzym produziert Mononukleosiddiphosphate, die das Protein inhibieren. RNase II ist dagegen ein monomeres 70kDa Protein, welches 5'-Nukleotidmonophosphate generiert. RNase II greift auch 2'- oder 3'-Phosphat-Enden an, jedoch langsamer als 3'-Hydroxyl-Enden (Cannistraro & Kennell, 1994). Nossal & Singer (1968) konnten zeigen, daß diese Ribonuklease prozessiv degradiert, bis ein restliches Oligoribonukleotid der Größe von ca. 4 Nukleotiden verbleibt.

Die gesamte Exonukleaseaktivität in *E. coli* verteilt sich fast vollständig auf die zwei Enzyme mit ~90% für RNase II und 10% für PNPase (Deutscher & Reuven, 1991).

Polyphosphat Kinase

Polyphosphat Kinase (PPK) ist die am spätesten entdeckte Komponente des Degradosoms (Blum et al., 1997). Das aus 80kDa Untereinheiten aufgebaute Homotetramer katalysiert die reversible Reaktion von Poly(P) und ADP zu ATP (Kornberg, 1995). PPK interagiert mit RNase E und *ppk*⁻-Zellstämme weisen eine erhöhte mRNA-Stabilität auf (Blum et al., 1997). Polyphosphate aus verschiedenen Quellen inhibieren die RNA-Degradation stark (Kornberg, 1995). Daher könnte der inhibitorische Effekt von Poly(P) und Nucleosiddiphosphaten im Degradosom durch PPK gehemmt werden.

Helicasen

RhlB ist eine ATP-abhängige DEAD-Box Helicase (Py et al., 1996; DEAD steht für die in dieser Proteinfamilie auftretende Sequenz Asp-Glu-Ala-Asp). Sie gehört zur zweiten von fünf Gruppen der großen Superfamilie der Helicasen (Luking et al., 1998; Bird et al., 1998) und enthält sieben an der Bindung von Magnesiumionen, ATP und RNA beteiligten Motive. RhlB liegt wahrscheinlich als Dimer vor und benötigt zur Entwindung von Duplex-RNA einzelsträngige, überhängende Bereiche. Wie es scheint, entwindet RhlB in einer ATP-abhängigen Reaktion strukturierte RNA um die Aktivität der PNPase zu unterstützen, da die Prozessivität der PNPase in Abwesenheit von RhlB an doppelsträngigen Bereichen zum Erliegen kommt. Als Teil des Degradasoms kommen Helicasen eine Hauptrolle im RNA-Abbau zu (Anderson & Parker, 1996).

Degradosom

Das katalytische Zentrum von RNase E liegt in der N-terminalen Hälfte (siehe oben). Die C-terminale Hälfte enthält dagegen einzelne Bindungsstellen für die drei Degradosomkomponenten RhlB, Enolase und PNPase (Vanzo et al., 1998), wobei diese Bindung auch in Abwesenheit der N-terminalen Hälfte stattfindet (Kaberdin et al., 1998). Dabei scheinen die drei Komponenten äquimolar an die Plattform des Degradosoms, die RNase E zu binden, während zwischen den dreien untereinander kein Kontakt besteht. RhlB wird durch die Bindung an RNase E in seiner Aktivität verstärkt (Vanzo et al., 1998).

Andere Ribonukleasen

Andere, vorallem an der Prozessierung von RNAs beteiligten Ribonukleasen sind RNase III, RNase M, RNase D, RNase F und RNase P.

RNase III ist doppelstrangspezifisch mit symmetrischer Erkennungssequenz (Krinke & Wulff, 1990) und schneidet meist beide Stränge in der Duplex-RNA. Das 50 kDa Enzym kommt als Dimer vor und hinterläßt nach Spaltung 5'-Phosphat-Enden (Deutscher, 1985 und 1983). Das Hauptsubstrat ist der Vorläufer ribosomaler RNAs. Eine posttranslationale Phosphorylierung von Serinresten kann die RNase III-Aktivität, als Reaktion auf die Infektion durch den T7 Phagen steigern (Mayer & Schweiger, 1983). Eine Beteiligung an der Initiation des mRNA-Abbaus konnte mehrfach nachgewiesen werden (Bardwell et al., 1989; Takata et al., 1992; Regnier & Grunberg-Manago, 1989).

RNase M ist relativ unspezifisch. Sie könnte am Abbau der messenger RNA des lac Operons beteiligt sein. Das 27 kDa Monomer schneidet bevorzugt zwischen Pyrimidin- und Adenosinresten und liefert 3'-Phosphat-Enden.

Weitere Exonukleasen bzw. oligoribonukleotidspezifische Ribonukleasen sind RNase R bzw. RNase I und RNase I*. Das 80 kDa RNase R Monomer spaltet alle Phosphodiesterbindungen exonukleolytisch in 3'-5'-Richtung und liefert 5'-Nukleosidmonophosphate (Deutscher, 1985). Ihre Funktion ist noch ungeklärt. Die Funktion von des 27kDa Monomers RNase I*

liegt möglicherweise im letzten Schritt bei der mRNA-Degradation, dem Abbau verbliebener Oligoribonukleotide mit einer Länge von 3 bis 8 Nukleotiden (Klee & Singer 1968). Das Enzym spaltet alle Phosphodiesterbindungen der Oligoribonukleotide und liefert 3'-Nukleosidmonophosphate. Im Vergleich zu cytoplasmatisch lokalisierter RNase I* unterscheidet sich RNase I in der enzymatischen Aktivität und der Lokalisierung im Periplasma (Cannistaro & Kennell, 1991).

RNase H spaltet spezifisch den RNA-Strang von DNA-RNA-Hybrid-Doppelsträngen und spielt bei der natürlichen Regulation der mRNA-Degradation vermutlich keine Rolle. Dagegen kann in Gegenwart von RNase H der Abbau von mRNA künstlich durch Hybridisierung mit einzelsträngiger DNA induziert werden.

1.5 Translation *in vitro*

Proteine werden für biotechnologische und medizinische Anwendungen mit Hilfe gentechnischer Methoden produziert. Dazu wird klonierte Fremd-DNA in Form von Vektoren (Plasmiden) bevorzugt in prokaryontische Organismen eingeschleust und die Gene in Zellkulturen exprimiert. Seit etwa vier Jahrzehnten ist bekannt, daß mRNA- und DNA-abhängige Proteinbiosynthese auch außerhalb der lebenden Zelle möglich ist (Nierenberg und Matthaei, 1961; De Vries & Zubay, 1967, Gold & Schweiger, 1969; Zubay, 1973; Herrlich & Schweiger, 1974). Für die *in vitro* Proteinbiosynthese werden biologisch aktive Zellextrakte benutzt, die mit Aminosäuren, Energiekomponenten und der Templat-Nukleinsäure versetzt werden. Wird als Nukleinsäure DNA verwendet, ist die Anwesenheit einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase erforderlich.

Einer der Vorteile dieser Methode ist, daß bei der Isolierung der Zellextrakte (Lysate) zelluläre Nukleinsäuren, welche für tausende verschiedene Proteine codieren, größtenteils entfernt werden können. Dadurch kann gezielt das gewünschte Protein als einziges Translationsprodukt neu synthetisiert werden. Die gesamten Ressourcen des Systems stehen dabei für die Herstellung eines Produkts zur Verfügung. Darüberhinaus kann die spezifische Markierung des einzigen synthetisierten Proteins z. B. durch Einbau isotoopen- oder fluoreszenzmarkierter Aminosäuren dessen Analytik enorm erleichtern. Die kurze Reaktionsdauer des *in vitro* Systems ermöglicht die analytische Untersuchungen des Produkts schon nach weniger als einer Stunde. Mit dem *in vitro* System ist es prinzipiell möglich, für lebende Zellen toxische Polypeptide herzustellen, und der Einsatz gentechnologischer Methoden, mit den damit verbundenen gesetzlichen Beschränkungen und Sicherheitsbestimmungen, ist nicht notwendig.

Da die zellfreie Proteinbiosynthese ein offenes System darstellt, können zahlreiche Reaktionsparameter genau definiert werden. So können dem System Komponenten, die die Halbwertszeit der mRNA und des synthetisierten Proteins erhöhen, in definierter Form und Konzentration zugegeben werden. Es kann vollständig synthetisch hergestellte und gezielt modifizierte mRNA mit größerer Halbwertszeit eingesetzt und die Konzentration des Templats genau eingestellt werden (Ovodov & Alakhov, 1990; Bald et al., 1992; Ueda et al., 1991). Eine ursprünglich von Herrlich und Schweiger (1974) beschriebene Methode für die partielle Aufreinigung und Trennung des Zellysats in die sogenannten 70S Ribosomen- und S100 Enzymfraktionen ermöglicht die teilweise Entfernung von limitierenden Komponenten wie Ribonukleasen (Fuchs et al., 1997). Durch den Einsatz *in vitro* transkribierter Suppressor-tRNA und deren chemischer Beladung mit einer Aminosäure wurde eine neue Perspektive mit der Möglichkeit der gezielten Einführung modifizierter Aminosäuren an spezifischen Positionen des Proteins eröffnet (Kurzchalia et al., 1988; Noren et al., 1989; Bain et al., 1992; Cornish & Schultz, 1994; Short et al., 1999 und zugehörige Referenzen). Proteine mit gezielt eingebauten unnatürlichen Aminosäuren können für medizinische Diagnostik und zur Entwicklung von Biosensoren verwendet werden (Kurzchalia, 1988). Proteine, die an bestimmten Positionen

mit Isotopen markiert wurden, können zur Ermittlung deren Struktur und Faltung eingesetzt werden (Medynski, 1992). Die kürzlich unter dem Begriff "ribosome-display" bekannt gewordene Methodik, die die Techniken der *in vitro* Translation und der SELEX Methode (Tuerk & Gold, 1990) vereinigt, wird zur Selektion und Evolution von *in vitro* synthetisierten Proteinen eingesetzt (Hanes & Plückthun, 1997; He & Taussig, 1997; Roberts & Szostak, 1997).

Die Produktion aggregierter Proteine kann durch Einstellung eines günstigen Reaktionsmilieus und der Verwendung von Chaperonen vermieden werden. Einfache posttranslationale Modifikationen wie die Ausbildung von Disulfidbrücken ist auch im zellfreien System möglich. Es konnte z.B. gezeigt werden, daß die Herstellung hochaktiver single-chain antibodies (Einzelstrang-Antikörper) in einem auf *Escherichia coli* basierenden *in vitro* Proteinbiosynthesystem möglich ist (Ryabova et al., 1997; Merk et al., 1999). Einen weiteren Vorteil bieten zellfreie Systeme in der Möglichkeit der einfachen und schnellen Aufarbeitung des Syntheseprodukts (Hochuli et al., 1987; Haukanas & Kvam, 1993; Nygren et al., 1994).

Ein limitierender Faktor bezüglich der Proteinausbeute sind die Energiekomponenten ATP und GTP, welche in hohem Maße von der Translation entkoppelt hydrolysiert werden. Präparative Synthesen sind jedoch in kontinuierlichen Durchflusssystemen (Spirin et al., 1988; Baranov et al., 1989; Kigawa & Yokoyama, 1991; Kudlicki et al., 1992; Stiege & Erdmann, 1995) oder in semi-kontinuierlichen Systemen möglich (Kim & Choi, 1996a, Nakono et al., 1999; Madin et al., 2000). Das Prinzip basiert auf der ständigen Zufuhr neuer Aminosäuren und Energiekomponenten. Gleichzeitig werden verbrauchte Energiekomponenten und wenn möglich das synthetisierte Protein durch eine permeable Membran abgeführt. Dadurch kann die Reaktionszeit für die Proteinsynthese enorm, auf etwa das 10 bis 40-fache, verlängert und die Produktausbeute erheblich gesteigert werden. Die kontinuierliche Entfernung des synthetisierten Proteins sollte sogar die Synthese von normalerweise inhibitorisch auf die Proteinsynthese wirkenden Proteinen ermöglichen.

Die zellfreie Proteinsynthese stellt ein ideales Werkzeug für die Untersuchung zahlreicher Mechanismen dar, die im Zusammenhang mit der Translation stehen. So wird die Translation eines Proteins durch koexprimierte Proteine, die einerseits um Translationskomponenten konkurrieren und andererseits verschiedene regulierende Wirkungen auf die Proteinsynthese haben können, nicht beeinflusst. Da die mRNA direkt als Templat für die Proteinsynthese eingesetzt werden kann, können Studien zur Translation unter Ausschluß von Effekten, die auf DNA-Replikations oder Transkriptionsebene stattfinden, durchgeführt werden.

In den letzten 10 bis 15 Jahren konnten große Fortschritte in der *in vitro* Proteinbiosynthese erzielt werden. Durch den Einsatz kondensierter Zellextrakte und optimierter Konzentrationen von Polyethylenglykol und ATP-regenerierendem Phosphoenolpyruvat konnte die Proteinausbeute deutlich verbessert werden (Kim & Choi, 1996b). Auch zur Minimierung von Limitierungen seitens der apparativen Ausrüstung kontinuierlicher Proteinsynthesysteme (Proteinbioreaktoren) wurde Optimierungsarbeit geleistet.

Die einzige variable Komponente mit dem größten Potential für eine Limitierung der Proteinausbeute in der *in vitro* Proteinbiosynthese ist jedoch die messenger RNA. Die Primärstruktur definiert den relativen Bedarf einzelner Komponenten wie Aminosäure- und tRNA-Konzentration aber auch die Aminoacylierungseffizienz. Im zellfreien System liegen speziell für die *in vitro* Proteinsynthese optimierte Reaktionsbedingungen vor. Ein zusätzlicher Unterschied zu den Bedingungen in der lebenden Zelle ist durch die Methodik der Herstellung des Systems bedingt. So werden hierbei z.B. die Zellwand und -membran des Bakteriums nach dessen Lyse größtenteils entfernt. Die im Hinblick auf maximale Proteinausbeute optimierte Konzentration an Magnesiumionen stellt einen kritischen Faktor dar, da viele enzymatische Prozesse empfindlich auf die Magnesiumkonzentration reagieren und bei hoher Konzentration unspezifische Reaktionen erzwungen werden können. Ein Extremfall sind z.B. erste *in vitro* Translationsexperimente mit Poly(U) als Templat (Nierenberg & Matthaei, 1961). Hier konnte in Abwesenheit der Ribosomenbindungstelle und dem Initiationscodon nur aufgrund einer erhöhten Magnesiumkonzentration Polyphenylalanin synthetisiert werden.

Aus diesen Gründen könnte sich das optimale mRNA-Templat *in vitro* von dem *in vivo* unterscheiden. Daher müssen die vom Templat ausgehenden Limitierungen der Proteinexpression *in vitro* zum Teil neu charakterisiert und mögliche Unterschiede zum Zellkultursystem aufgezeigt werden. Da normalerweise nur eine mRNA für die Proteinsynthese eingesetzt wird, ergeben sich neue Voraussetzungen für die Regulationselemente der mRNA. So liegt es z.B. nahe, daß der Einfluß der Ribosomenbindungstelle bzw. der Translationsinitiation *in vitro* geringer ist als *in vivo*, da die mRNA nicht mit anderen, möglicherweise besser angepassten mRNAs um eine limitierte Menge von 30S ribosomalen Untereinheiten konkurrieren muß (Gualerzi & Pon, 1990). Die gesamte Ribonukleaseaktivität des Systems konzentriert sich auf die heterologe mRNA. Damit könnte der Struktur der mRNA im Hinblick auf deren Resistenz gegen enzymatische Hydrolyse eine besondere Bedeutung zukommen.

Der Vorteil der zellfreien Proteinsynthese mit der Möglichkeit zur schnellen Analyse der Translationsregulation und der synthetisierten Proteine wird durch die Notwendigkeit der gentechnischen Erzeugung des Templates eingeschränkt. Die Herstellung und Klonierung rekombinanter DNA ist zeit- und kostenaufwendig und erfordert außerdem die Einhaltung von Sicherheitsbestimmungen. Zur Verwirklichung einer vollständigen *in vitro* Technik ist eine schnelle und zellfreie Methode für die Generierung von DNA- oder mRNA-Templatelementen wünschenswert. Dabei sind sowohl die Größe der mRNA als auch der Kostenaufwand für deren chemische Synthese limitierende Faktoren.

Zur Vermeidung der Restriktionen früherer Techniken zur Templatelementgenerierung wurde die Methode der Expressions-PCR entwickelt. PCR Produkte wurden sowohl in eukaryontischen (Kain et al., 1991; Kain & Lanar, 1994; Switzer & Heneine, 1995; Henkel & Baeuerle, 1993; Resto et al., 1992) als auch in prokaryontischen *in vitro* Proteinsynthesystemen eingesetzt (Lesley et al., 1991; Martemyanov et al., 1997; Ohuchi et al., 1998; Nakano et al., 1999). Prokaryontische Systeme haben den Nachteil der Erfordernis bakterienspezifischer Regulations-

elemente wie z.B der Shine-Dalgarno-Sequenz. Der Vorteil liegt jedoch in der weitaus größeren Produktivität dieser Systeme.

Bis heute wurde der Methodik zur Herstellung von effizienten PCR-Produkten für den direkten Einsatz in der zellfreien Proteinsynthese wenig Beachtung beigemessen. Ein Grund hierfür könnten der Bedarf an relativ großen nicht translatierten Regionen für die zellfreie bakterielle Proteinsynthese sein. Wenn das zu amplifizierende Gen nicht bereits mit effizienten Regulationselementen ausgestattet ist, müssen für dessen Einführung sehr lange PCR-Primer zum Einsatz kommen. Große Primer stellen einen Kostenaufwand dar und erhöhen die Wahrscheinlichkeit der Generierung inhomogener PCR-Produkte.

Hinzu kommt, daß bisher wenig Optimierungsarbeit bezüglich der Expressionseffizienz von PCR-Produkten geleistet wurde. Die Schwierigkeit liegt darin, die erforderlichen Regulationselemente auf engstem Raum anzuordnen, da dieser Raum durch die Größe der Primer limitiert ist.