

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen des in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. V.A. Erdmann von Dr. W. Stiege geleiteten Projekts: “*Escherichia coli in vitro* Proteinbiosynthese-Systeme“ habe ich mich für das Doktorarbeitsprojekt: “Steigerung der Effizienz des *Escherichia coli in vitro* Translationssystems durch Optimierung der Nukleinsäurekomponenten“ entschieden.

Das Ziel dieser anwendungsorientierten Arbeit sollte es sein, Limitierungen der Expressionseffizienz im Zusammenhang mit den Nukleinsäurekomponenten messenger RNA, Transfer RNA und DNA aufzuzeigen und diese zu reduzieren. Da im Vergleich zu Zellkultursystemen deutlich veränderte Reaktionsbedingungen für die Genexpression vorliegen, sollten mögliche Besonderheiten des zellfreien Systems aufgedeckt und die daraus gewonnene Information zur Steigerung der *in vitro* Expressionseffizienz angewendet werden.

Limitierungen der *in vitro* Proteinsynthese sollten vor allem anhand der Expression zweier eukaryontischer Gene untersucht werden. Der Einfluß der Translationsinitiationsregion einer mRNA, insbesondere der dem Startcodon folgenden Sequenz, als auch der Einfluß der Translationstermination auf die Genexpression sollten analysiert werden.

Durch den Vergleich der Expression unterschiedlich großer Proteine wurden Hinweise auf Begrenzungen der Translation bezüglich der potentiell geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Initiation und Termination aber auch im Hinblick auf die Proteingröße erwartet. Weiterhin sollte ermittelt werden, ob der Codongebrauch der untersuchten mRNAs eine Limitierung für die Proteinsynthese darstellt und wie diese gegebenenfalls überwunden werden könnte.

Einer der potentiell am stärksten begrenzenden Faktoren der Proteinsynthese, der Einfluß der 3'-terminalen Struktur einer mRNA auf die Stabilität des Templates im zellfreien System sollte analysiert werden. Desweiteren sollte die Halbwertszeit einer mRNA in verschiedenen Funktionszuständen der Translation untersucht werden. Um Aufschluß über die Abhängigkeit der mRNA-Degradation von der Translationseffizienz zu erhalten, sollte ein System zur Charakterisierung der vorzeitigen Translationstermination inklusive deren Inhibition entwickelt werden.

Schließlich sollte unter Einschluß der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eine Methode entwickelt werden, mit der bei geringem Zeitaufwand kleinste Mengen von Gensequenzen amplifiziert und gleichzeitig mit den prokaryontischen Regulationselementen für die zellfreie Proteinbiosynthese versehen werden können. Die mit Hilfe der PCR (Polymerase Kettenreaktion) produzierten Template sollten charakterisiert und bezüglich der Ausbeute des synthetisierten Proteins optimiert werden. Dazu sollte ein Modellsystem der Expressions-PCR für die zellfreie Proteinbiosynthese entwickelt werden.