

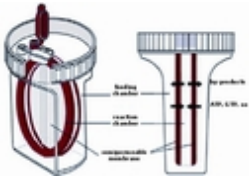
Zellanalyse

Proteinbiosynthese

Zellfreie Proteinbiosynthese

08.10.2009 | Autor: Marc Platthaus

Die Entwicklungen im Bereich der Genom- und Transkriptom-Untersuchungen lieferten in den letzten Jahren unzählige Daten zur Zusammensetzung „der mRNA“ einer Zelle. Unter Hochdruck versuchen Labore, den zehn- bis hunderttausenden Sequenzen Funktionen zuzuordnen.



Mithilfe dieses Systems ist es möglich, Reaktionen bis zu 24 Stunden und mehr aufrecht zu erhalten, so dass sich Proteinausbeuten und -reinheit drastisch erhöhen. (Bild: RiNA)

Mit der Zunahme an Proteinsequenzen ohne zugeordnete Funktion steigt der Bedarf an effektiven Proteinsynthesystemen für die Bereitstellung von Proteinen für nachgeordnete Funktions- und Strukturuntersuchungen enorm. Die Methode der zellfreien Proteinbiosynthese erlebt aus diesem Grund seit einigen Jahren eine Renaissance, da sie es erlaubt, die notwendigen Schritte von DNA und RNA zu Protein schneller und mit weniger Aufwand zu gehen. Doch auch für kleine Ansätze im Labor bietet die zellfreie Proteinbiosynthese attraktive Vorteile gegenüber dem klassischen Weg der Proteinexpression in Zellen.

Neben Schnelligkeit und **Reinheit** bietet die zellfreie Proteinbiosynthese nahezu unbegrenzte Variationsmöglichkeiten, die über die Grenzen der klassischen zellulären Proteinexpression weit hinausgehen. Dies sei anhand des folgenden Beispiels verdeutlicht: Bei der Proteinsynthese ist neben der vollständigen Synthese der Polypeptidkette die richtige Faltung von elementarem Interesse. Nur so kann ein Protein seine native Funktion

korrekt ausüben. Da zellfreie Systeme offene Systeme sind, erlauben sie bereits während der Proteinsynthese die Zugabe milder Detergenzien oder anderer Zusätze, die eine richtige Faltung des Proteins von Anfang an begünstigen. Lebende Zellen vertragen Detergenzien kaum, weil hierdurch die lebenswichtigen Membranen destabilisiert, perforiert oder sogar aufgelöst werden. Auch die Zugabe hochmolekularer **Additive**, beispielsweise Chaperone, Aminoacyl-tRNAs oder Lipidmembranen, oder eine Anpassung des Reaktionsmilieus ist im Hinblick auf die Synthese bestimmter Proteinklassen (Disulfidbrückenproteine, **Membranproteine** etc.) in zellfreien Systemen leicht möglich. Ein weiterer Vorteil ist die wesentlich erleichterte Aufreinigung von Proteinen aus Lysaten mit definierter Zusammensetzung, die oft sogar zu höheren Proteinaktivitäten als bei der in vivo Expression von Proteinen führt. Und wo wir gerade dabei sind: Auch die bei Zellbiologen sonst allgegenwärtige Sorge um Zellvitalität, Mutationen, Kontaminationen, Gefahrenstufen usw. entfällt bei der in vitro Synthese.

Reaktionen im kleinen Maßstab

Zellfreie Systeme erlauben es, Reaktionen auch in sehr kleinem µl-Maßstab und in vielfach parallelen Ansätzen durchzuführen, was ideal für ein erstes Screening interessanter cDNAs oder für das Austesten geeigneter Reaktionsparameter sein kann. Mittlerweile sind neben E. coli - basierten Systemen zellfreie Systeme aus verschiedensten Zelltypen und Organismen, beispielsweise aus Weizenkeimen, Retikulozyten und Insektenzellen verfügbar,

die das Spektrum funktionell darstellbarer Proteine beträchtlich erweitern und zum Teil sogar eine Synthese von membranintegrierten Proteinen und posttranslational modifizierten Proteinen ermöglichen. Eine besondere Domäne der zellfreien Proteinbiosynthese ist auch die Herstellung von Proteinen mit besonderen artifiziellen Aminosäuren.

Heutzutage ist die Proteinbiosynthese mittels zellfreier Translation keine schwarze Kunst mehr, denn kommerzielle Anbieter, beispielsweise die Firmen Roche mit ihrem Rapid Translation System (RTS), Qiagen mit ihrer EasyXpress – Plattform oder auch Promega mit ihren TNT-Systemen liefern mittlerweile verlässliche Kit-basierte Lysate aus verschiedenen Organismen und passendes Zubehör für die Durchführung. Andere Firmen, wie die Berliner Firma RiNA GmbH, die eine prominente Stellung bei der Entwicklung von Systemen für zellfreie Proteinbiosynthese einnimmt, bieten auch einen Proteinsyntheservice auf der Basis der zellfreien Proteinbiosynthese an. Optimale Syntheseraten erreichen im Batch-Verfahren gegenwärtig Werte um 0,5 mg Protein/ml Reaktion, im so genannten „Continuous-Exchange Cell-Free“ Verfahren (CECF-Verfahren) bis zu 5 mg Protein/ml. Als Standard hat sich heutzutage die Verwendung gekoppelter Reaktionen etabliert, bei denen in einem Ansatz die mRNA von einer Template-DNA transkribiert und daraus gleichzeitig die gewünschten Proteine translatiert werden. Ein Anwender kann also morgens mit einer PCR auf einer cDNA beginnen und bereits abends sein reines Protein in den Händen halten.

CECF-Verfahren zur zellfreien Proteinbiosynthese

CECF-Systeme bestehen aus einer Synthesekammer mit einem Volumen zwischen 50 µl und 10 ml und einem angeschlossenen Vorratsbehälter, der die Reaktion kontinuierlich über eine Dialysemembran mit frischen Verbrauchssubstanzen wie ATP und GTP als Energieträgern und allen notwendigen Aminosäuren als Bausteine für die Proteinsynthese versorgt. Zugleich werden über die Membran niedermolekulare Abfallstoffe wie z.B. **Phosphate** aus der Synthesekammer entfernt, die bei zunehmender Konzentration stören würden. In der Synthesekammer verbleiben unterdessen die codierenden Nukleinsäuren, die Maschinerie zur Synthese sowie die sich anreichernden Proteine. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich, Reaktionen bis zu 24 Stunden und mehr aufrecht zu erhalten, so dass sich Proteinausbeuten und -reinheit gegenüber batch-Verfahren teilweise verzehn- bis verzwanzigfachen, wovon vor allen Dingen die im allgemeinen weniger produktiven eukaryotischen Systeme profitieren.

Die Beiträge auf dieser Website sind urheberrechtlich geschützt. Bei Fragen zu den Nutzungsrechten wenden Sie sich bitte an manuela.maurer@vogel.de oder Tel.: 0931-418-2888.

Dieses PDF wurde Ihnen bereitgestellt von <http://www.laborpraxis.vogel.de>