

ROBERT LEIDENFROST UND RÖBBE WÜNSCHIERS
HOCHSCHULE MITTWEIDA

Die ‚zellfreie Proteinsynthese‘ (CFPS) gewinnt als Plattform für die Produktion von Proteinen in Forschung und Entwicklung zunehmend an Bedeutung. Vorteile dieser Technik sind die vergleichsweise einfache Handhabung, die gezielt wähl- und kontrollierbaren Reaktionsbedingungen und vielfachen Anwendungsmöglichkeiten. So lassen sich sogar toxische Proteine unabhängig von in zellulären Systemen herrschenden Einschränkungen exprimieren. Derzeit übliche CFPS Systeme basieren auf Zellysat pro- (z.B. *E. coli* [1, 2]) oder eukaryotischen (z.B. HeLa-Zellen) Ursprungs oder werden aufwändig aus Einzelkomponenten definiert (z.B. PURE-System [3]).

Ziel dieses Projektes ist die Etablierung einer robusten, kostengünstigen Plattform basierend auf *E. coli* Lysat und folgend die Übertragung auf ein cyanobakterielles System. Das Augenmerk liegt auf der Herstellung von Lysat, dem Design von adäquaten Expressionsvorlagen und von Detektionsmethoden:

Extraktpräparation

Zur Herstellung von Zellextrakten für CFPS-Systeme werden z.B. *E. coli* Bakterien angezogen und mittels Ultraschall lysiert. Das gewonnene Lysat wird durch Zentrifugation geklärt und wenn nötig einer sogenannten Run-off Reaktion zugeführt. Das Lysat enthält alle wichtigen Komponenten wie z.B. die Ribosomen, tRNAs, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren, etc., oder ggf. die RNA-Polymerase (z.B. vom Phagen T7).



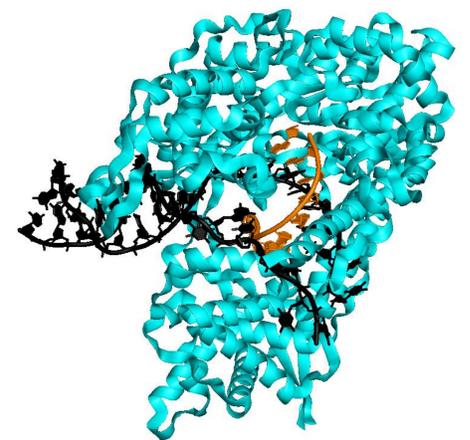
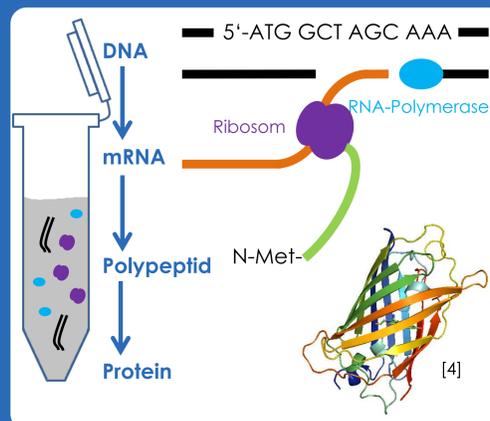
Templatedesign

CFPS-Systeme nutzen entweder zirkuläre oder (PCR-generierte) lineare DNA-Vorlagen (so genannte Templates). Wichtige Elemente des Templates sind das kodierende Gen (●), passende Promotor (●) und ggf. Terminatorsequenzen (●), ribosomale Bindestellen zur Translationsinitiation (●) und ggf. weitere Elemente wie z.B. Hexahistidin-Tags (●) zur Proteindetektion und/oder zur einfachen Aufreinigung.



In vitro Expression

Bei Vorlage eines für das System geeigneten zirkulären oder linearen Templates finden Transkriptions- und Translationsreaktion gekoppelt statt. Hierzu werden der Zellextrakt, ein Energiesystem, diverse Baustoffe (Nukleotide und Aminosäuren), ein Reaktionspuffer mit Hilfsmolekülen sowie die oben genannte DNA-Vorlage benötigt. Die Reaktion erfolgt bei definierter Temperatur und Zeit und kann ggf. in Echtzeit beobachtet werden. Die Skalierbarkeit der Reaktionsansätze erlaubt die einfache Anpassung für die gewünschten Downstream-Applikationen.

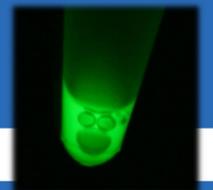


T7-RNA-Polymerase bei der Arbeit [5]

Fazit und Ausblick

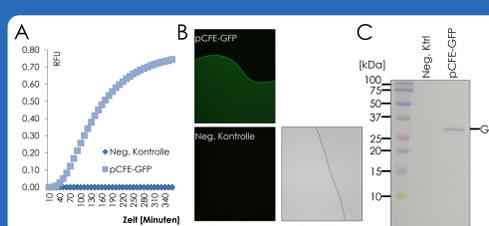
Ausgehend von selbsterstellten Templates konnte Protein erfolgreich mit eu- und prokaryotischem Zellysat *in vitro* exprimiert und detektiert werden. Möglichkeiten zur Extraktpräparation werden weiter untersucht. Ebenso soll die Optimierung und Übertragung auf ein cyanobakterielles System erfolgen.

GFP aus *E. coli* CFPS:



Detektion

Die Detektion des zellfrei synthetisierten Proteins kann bei geeigneter Wahl (hier z.B. das grün fluoreszierende Protein GFP, kodiert im pCFE-GFP Template) in Echtzeit (A), nach Ablauf der Reaktion fluoreszenzmikroskopisch (B) oder generell via SDS-PAGE und z.B. Western Blot (C) erfolgen.



Quellen und Kontakt

Quellen

- [1] doi: 10.1038/srep08663
- [2] doi: 10.1002/btpr.2082
- [3] doi: 10.1016/j.ymeth.2005.04.006
- [4] PDB 1EMA modifiziert mit Pymol
- [5] PDB 1MSW modifiziert mit Pymol

Kontakt

Robert Leidenfrost
Angewandte Computer- und Biowissenschaften
Biotechnologie und Chemie
Technikumplatz 17
09648 Mittweida
+49 (0)3727 58-1174
robert.leidenfrost@hs-mittweida.de