

## 6. Diskussion

Die Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine ist mit Hilfe *in vitro* transkribierter *amber*-Suppressor-tRNAs möglich, die chemisch mit der gewünschten Aminosäure acyliert wurden und nicht durch die innerhalb des Translationsystem vorhandenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen reacyliert werden können. Allerdings können mit der entsprechenden Methodik einige Aminosäuren mit besonders wertvollen Eigenschaften nur äußerst ineffizient eingebaut werden. Eine wesentliche Hypothese der vorliegenden Arbeit bestand darin, daß die zur Zeit für die Einführung unnatürlicher Aminosäuren verwendeten *amber*-Suppressor-tRNAs relativ ineffiziente Suppressoren sind und daß es möglich ist, effizientere Suppressoren zu finden. Während zu Beginn der vorliegenden Arbeit zur Suppression *in vivo* relativ viele Daten vorlagen, war das Wissen über die Suppression *in vitro* äußerst begrenzt. Aus diesem Grund wurde der Untersuchung der Suppressionseffizienz *in vitro* transkribierter *amber*-Suppressor-tRNAs innerhalb der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet. Zunächst mußten hierzu die mit der Nutzung und Untersuchung von *in vitro* transkribierten *amber*-Suppressor-tRNAs verbundenen Methoden innerhalb der Arbeitsgruppe etabliert werden. Im Rahmen einer vergleichenden Untersuchung zur Suppressionseffizienz wurden dann verschiedene *in vitro* transkribierte *amber*-Suppressor-tRNAs auf unterschiedlichen Funktionsebenen in einem fraktionierten System für die *in vitro* Proteinbiosynthese untersucht (vgl. Abb. 54).

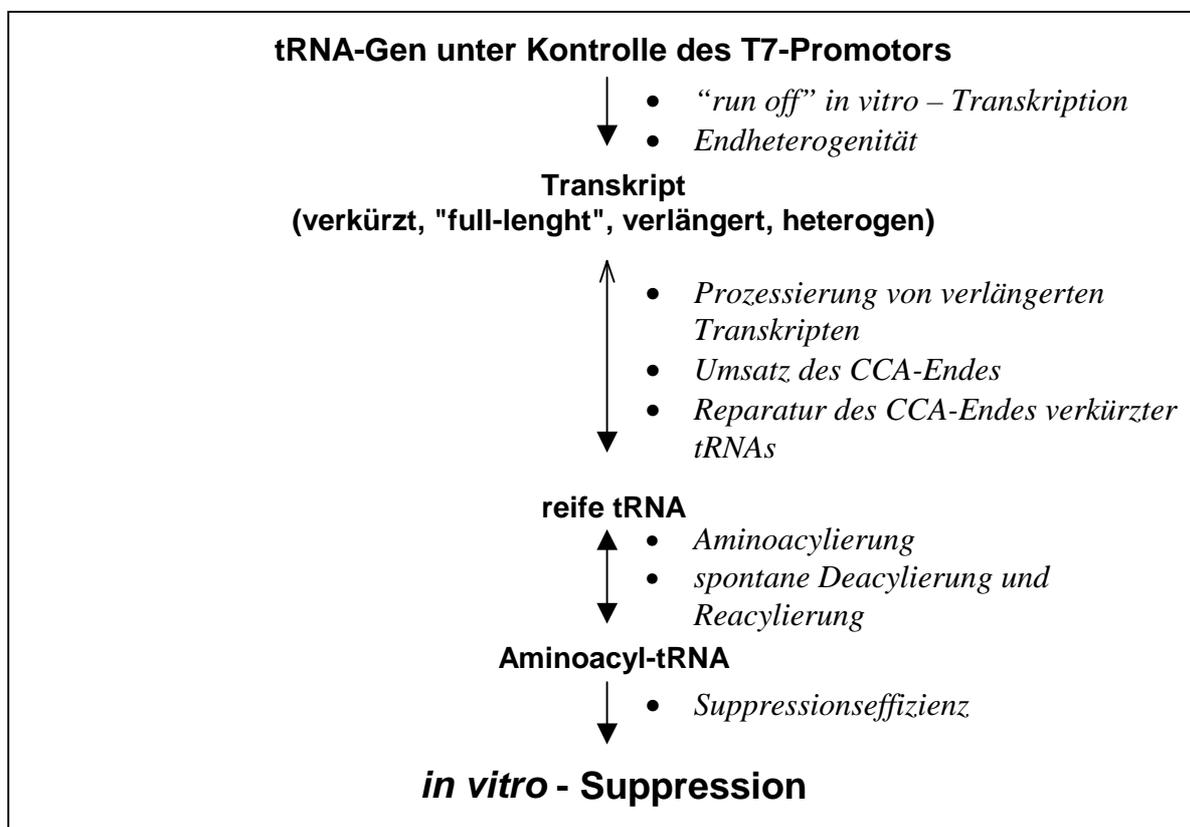


Abb. 54: Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Funktionsebenen *in vitro* transkribierter tRNAs.

Homogene tRNA-Präparationen mit korrektem CCA-Ende konnten durch eine Prozessierung oder durch die Regeneration des 3'-Endes der *in vitro* transkribierten tRNAs in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems erhalten werden. Die Prozessierung verlängerter tRNAs und die Reparatur verkürzter tRNAs innerhalb des Gesamtsystems erwiesen sich als nicht limitierend für die Proteinbiosynthese. Die Ergebnisse zu Prozessierung und tRNA-Reparatur, sowie zum Umsatz des 3'-Endes der tRNA wurden bereits innerhalb des Ergebnisteils ausführlich diskutiert. Diese Untersuchungen hatten letztendlich ein Ziel. Sie sollten eine genaue Konzentrationsbestimmung der funktionellen tRNAs ermöglichen. Auch der Einfluß der Aminoacylierung auf den Gehalt an Aminoacyl-tRNA innerhalb des *in vitro* Translationssystems wurde ausführlich untersucht und bereits erörtert. Hierbei konnte gezeigt werden, daß die Aminoacylierung der tRNAs  $tRNA^{Ser}_{CUA} (su^+_1)$ ,  $tRNA^{Tyr}_{CUA} (su^+_3)$ ,  $tRNA^{Leu}_{CUA}(su^+_6)$ ,  $tRNA^{Leu(5)}_{CUA}$ ,  $tRNA^{Phe}_{CUA}$ ,  $tRNA^{HisA}_{CUA}$  und  $tRNA^{Ala}_{CUA}$  innerhalb des *in vitro* Translationssystems höchstwahrscheinlich nicht limitierend für die Suppression war. Für  $tRNA^{Tyr}_{CUA}$  konnte eine Limitierung der Suppression durch die Aktivität der Tyrosyl-tRNA-Synthetase zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, die tRNA zeigte aber unter bestimmten Bedingungen eine Suppressionsaktivität, die der von  $tRNA^{Ser}_{CUA}$  vergleichbar war. Bei den erwähnten tRNAs kann somit die Suppressionseffizienz auf strukturelle Eigenschaften der Aminoacyl-tRNA zurückgeführt werden.

### 6.1 Suppression *in vivo* und *in vitro*

In der Literatur gibt es umfangreiche Studien zur Aktivität verschiedener *amber*-Suppressor-tRNAs *in vivo* (z.B.: Bossi und Roth 1980, Miller und Albertini 1983, Kleina et al. 1990, Normanly et al. 1990, Ericson und Björk 1991, Rennel et al. 1991, Mottagui-Tabar 1998). Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde der Untersuchung der Suppressionseffizienz *in vitro* transkribierter *amber*-Suppressor-tRNAs eine erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet. Ein direkter Vergleich der Aktivität der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *in vitro* transkribierten *amber*-Suppressor-tRNAs mit der Aktivität *in vivo* exprimierter tRNAs in der lebenden Zelle ist nur sinnvoll, wenn die Konzentrationen der einzelnen tRNA-Spezies *in vitro* und *in vivo* miteinander vergleichbar sind. Während innerhalb der vorliegenden Arbeit genaue Angaben zu den Konzentrationen der eingesetzten tRNAs *in vitro* gemacht werden konnten, sind keine Konzentrationsangaben zu den einzelnen tRNA-Spezies in *in vivo* erhältlich.

Deshalb - und um die umfangreichen *in vivo*-Daten in der Literatur mit den Verhältnissen *in vitro* in Beziehung setzen zu können - wurden Gesamt-tRNA-Präparationen aus neun verschiedenen *amber*-Suppressor-Zellstämmen von *Escherichia coli* in der *in vitro*-Translation eingesetzt. Auf diese Weise konnte ein Teil der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies sowohl als *in vitro*-Transkript, sowie auch als *in vivo* exprimierte tRNA untersucht werden. Die in der vorliegenden Arbeit für die

Aufarbeitung der entsprechenden Gesamt-tRNA-Präparationen verwendeten Zellstämme sind in der Literatur für die Untersuchung der Suppression *in vivo* beschrieben (Kleina et al. 1990 und dortige Referenzen). Es war zu erwarten, daß die in den entsprechenden Gesamt-tRNA-Präparationen enthaltenen *amber*-Suppressor-tRNAs sowohl bezüglich der tRNA-Menge als auch bezüglich des Vorkommens von Modifikationen die Verhältnisse *in vivo* widerspiegeln.

*Die Aktivität einiger Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ist vermutlich in vitro gegenüber in vivo vermindert.*

In Tabelle 19 sind die innerhalb der vorliegenden Arbeit mit den verschiedenen Gesamt-tRNA-Präparationen erhaltenen Suppressionsaktivitäten im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Suppressionsaktivitäten der entsprechenden tRNAs in der lebenden Zelle

<b><i>amber</i>- Suppressor- tRNA</b>	<b>in vivo</b> <sup>a)</sup> (Kleina et al. 1990)		<b>in vitro</b> <sup>b)</sup> (diese Arbeit)	
	<b>Codierung</b>	<b>Suppressionsrate</b> [%]	<b>Suppressionsrate</b> [%]	<b>Aminoacylierung</b>
<b>tLeu</b> (su <sup>+</sup> <sub>6</sub> )	chromosomal	64 (30-100)	49	+
<b>tHisA</b>	Plasmid	67 (16-100)	48	+
<b>tTyr</b> (su <sup>+</sup> <sub>3</sub> )	chromosomal	52 (11-100)	29	+
<b>tSer</b> (su <sup>+</sup> <sub>1</sub> )	chromosomal	27 (6-54)	23	+
<b>tPhe</b>	Plasmid	77 (48-100)	0	-
<b>tGly1</b>	Plasmid	66 (24-100)	12	-
<b>tArg1</b>	Plasmid	44 (11-55)	10	-
<b>tCys</b>	Plasmid	39 (17-54)	0	-
<b>tLys</b> (su <sup>+</sup> <sub>5</sub> )	chromosomal	16 (5-19)	0	-

Tabelle 19: Vergleich der Suppressionsraten ausgewählter *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies *in vivo* und *in vitro*:

**a)** Kleina et al. (1990) untersuchten insgesamt sieben verschiedene Codonkontexte anhand der Expression von lacI-Z. Aus diesen sieben Codonkontexten wurde für jede tRNA-Spezies eine mittlere Suppressionsrate bestimmt. Die Werte in Klammern () geben den jeweils niedrigsten und höchsten Wert der Suppression für jede tRNA-Spezies an (aus den Tabellen 3 bzw. 7 der Arbeit von Kleina et al. 1990)

**b)** Aus den auch von Kleina et al. (1990) verwendeten Zellstämmen wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit Gesamt-tRNA-Präparationen hergestellt und für die Suppression in FABP<sub>Amb3</sub> eingesetzt. Die Aminoacylierbarkeit der einzelnen *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies wurde anhand der Aminoacylierbarkeit der entsprechenden T7-Transkripte in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems überprüft. +: gute Aminoacylierbarkeit des entsprechenden T7-Transkriptes, -: das entsprechende T7-Transkript ließ sich in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems nicht aminoacylieren.

aufgeführt. Es sind beträchtliche Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* sichtbar. *In vivo* zeigen alle aufgeführten tRNAs eine mehr oder minder gute Aktivität. Demgegenüber zeigen von den in der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersuchten Gesamt-tRNA-Präparationen, die aus den auch von Kleina et al. (1990) verwendeten Zellstämmen gewonnen wurden, einige keine Suppressionsaktivität. Beispielsweise war tPhe in der *in vivo*-Studie von Kleina et al. sehr

aktiv, *in vitro* dagegen nicht. Ähnliches trifft auch auf einige der anderen untersuchten tRNA-Spezies zu.

Die Aminoacylierbarkeit der verschiedenen *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit anhand der entsprechenden *in vitro*-Transkripte untersucht (vgl. Tab.19). Man kann davon ausgehen, daß die Aminoacylierbarkeit der *in vitro*-Transkripte die Aminoacylierbarkeit der in den Gesamt-tRNA-Präparationen enthaltenen modifizierten *amber*-Suppressor-tRNAs widerspiegelt. Es ist bekannt, daß sich das Fehlen von Modifikationen in der Regel kaum auf die Aminoacylierung von tRNAs auswirkt (tGly: Samuelsson et al. 1988; tTyr: Himeno et al. 1990; tPhe: Peterson und Uhlenbeck 1992; tCys: Komatsoulis und Abelson 1993; tLeu: Asahara et al. 1993; tSer: Sampson und Saks 1993, Asahara et al. 1993/1994). Für tLys wurde zwar ein Einfluß einer Modifikation innerhalb des Anticodons auf die Aminoacylierung gezeigt (Tamura et al. 1992), das entsprechende modifizierte Nukleotid ist aber im *amber*-Suppressor ohnehin mutiert.

Alle tRNA-Spezies, die *in vitro* keine Suppressionsaktivität zeigten, konnten in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems auch nicht aminoacyliert werden. Wenn man nur die tRNAs berücksichtigt, die sich *in vitro* auch aminoacylieren ließen, zeigt sich, daß die mit den Gesamt-tRNA-Präparationen *in vitro* erzielten Suppressionsraten gut mit denen der entsprechenden tRNAs *in vivo* korrelieren. tHis und tLeu zeigen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Suppressionsraten auf einem gemeinsamen Niveau. Von den drei Suppressoren tLeu, tHis und tSer erzielt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* tLeu die höchste und tSer die niedrigste Suppressionsrate. Dies deutet darauf hin, daß für diese tRNAs die Verhältnisse *in vitro* denen *in vivo* weitgehend entsprechen.

Alle in der S100-Enzymfraktion nicht aminoacylierbaren tRNAs besitzen die wichtigsten Erkennungselemente für die entsprechende Aminoacyl-tRNA-Synthetase innerhalb ihres Anticodons. Für tPhe wurde gezeigt, daß der Austausch des "Wildtyp"-Anticodons GAA gegen CUA zu einer drastischen Erniedrigung des  $k_{cat}/K_M$ -Wertes der Aminoacylierung um mehr als Faktor 1000 führt (Peterson und Uhlenbeck 1992). Im Falle der tRNA<sup>Cys</sup> führt der Ersatz des "Wildtyp"-Anticodons gegen CUA zu einer Erniedrigung des  $k_{cat}/K_M$ -Wertes um Faktor 3000 (Komatsoulis und Abelson 1993). Auch in tRNA<sup>Lys</sup> ist die Sequenz des Anticodons (UUU) essentiell für die Erkennung durch Lysyl-tRNA-Synthetase. Diese erkennt alle drei Nukleotide des Anticodons (Commans et al. 1998), von denen in der entsprechenden *amber*-Suppressor-tRNA zwei mutiert sind. Die hohe Suppressionsaktivität dieser tRNAs *in vivo* läßt darauf schließen, daß die erwähnten tRNAs *in vivo* aminoacyliert werden können, obwohl in allen tRNAs wesentliche Erkennungselemente der Aminoacylierung innerhalb des Anticodonarmes mutiert sind. Möglicherweise ist die Konzentration dieser tRNAs und der korrespondierenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen *in vivo* so hoch, daß der wesentlich schlechtere  $K_m/K_{Cat}$ -Wert der Aminoacylierung hierdurch ausgeglichen werden kann. Dies ist *in vitro* offensichtlich nicht möglich. Die *in vitro* gegenüber *in vivo* unterschiedlichen

Relationen zwischen den Suppressionsaktivitäten der verschiedenen *amber*-Suppressor-tRNAs (vgl. Tab.19) lassen sich am besten durch eine *in vitro* gegenüber *in vivo* verminderte Aktivität der entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erklären.

*Die Suppressionsaktivitäten der Gesamt-tRNA-Präparationen reflektieren die in vivo höchst unterschiedlichen Expressionsraten der verschiedenen amber-Suppressor-tRNA-Spezies*

Eine Vergleich der Suppressionsaktivitäten *in vitro* transkribierter tRNAs mit denen der entsprechenden Gesamt-tRNA-Präparationen zeigt, daß unabhängig vom Grad der Aminoacylierbarkeit mit den Transkripten der *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies, die *in vivo* chromosomal kodiert sind, bessere Suppressionsraten erzielt werden können als mit den entsprechenden Gesamt-tRNA-Präparationen (Tab.20). Demgegenüber bewirken alle Gesamt-tRNA-Präparationen plasmidkodierter tRNAs höhere oder gleiche Suppressionsraten verglichen mit den entsprechenden Transkripten.

<i>amber</i> - Suppressor- tRNA	Codierung der tRNA im für die Aufarbeitung der Bulk-tRNA verwendeten Zellstamm *	Suppressionsrate [%] <sup>2)</sup>	
		Bulk-tRNA *	Transkript <sup>1)</sup>
tLeu (su <sup>+</sup> <sub>6</sub> )	chromosomal	49	100
tTyr (su <sup>+</sup> <sub>3</sub> )	chromosomal	29	80
tSer (su <sup>+</sup> <sub>1</sub> )	chromosomal	23	100
tLys (su <sup>+</sup> <sub>5</sub> )	chromosomal	0	8
tHisA	Plasmid	48	35
tGly1	Plasmid	12	0
tArg1	Plasmid	10	0
tPhe	Plasmid	0	0
tCys	Plasmid	0	0

Tabelle 20: Vergleich der Suppressionsraten von Bulk-tRNA-Aufarbeitungen mit der *in vitro* transkribierter tRNAs:

\* Alle Gesamt-tRNA-Präparationen (Bulk-tRNAs) wurden aus den entsprechenden auch von Kleina et al. (1990) verwendeten *amber*-Suppressor-Zellstämmen isoliert; <sup>1)</sup> Transkript-Konzentration 5 µM; <sup>2)</sup> Die Suppressionsraten wurden anhand FABP<sub>Amb3</sub> bestimmt.

Ein wichtiger Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* besteht darin, daß die Konzentrationen der einzelnen tRNAs *in vitro* äußerst genau kontrolliert werden können, während die Konzentrationen der einzelnen tRNAs *in vivo* nur sehr schwer einzuschätzen sind. Unter den in den Gesamt-tRNA-Präparationen enthaltenen *amber*-Suppressor-tRNAs werden manche tRNAs von chromosomalen Genen exprimiert, während die Gene anderer tRNAs auf „high copy“-Plasmiden liegen. Im Falle von tSer(su<sup>+</sup><sub>1</sub>), tLys(su<sup>+</sup><sub>5</sub>) oder tLeu(su<sup>+</sup><sub>6</sub>) gibt es beispielsweise in jeder *Escherichia coli*-Zelle nur ein einziges Gen (Eggertsson und Söll 1988). Die entsprechenden tRNAs gehören im Falle von Leucin und Serin zu den selteneren Spezies.

Die Gene der *amber*-Suppressor-tRNAs für Cystein, Phenylalanin oder Histidin hingegen liegen auf Plasmiden, die in einer hohen Kopienzahl in jeder Zelle vorkommen (Masson und Miller 1986). Alle plasmidkodierte *amber*-Suppressor-tRNAs stehen unter der Kontrolle des hocheffizienten Lipoprotein-Promotors (Nakamura und Inouye 1982, Normanly et al. 1986, Kleina et al. 1990). Das Expressionsniveau der *amber*-Suppressor-tRNA für Histidin in dem auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellstamm wurde von Masson und Miller (1986) bestimmt. Die Menge der Histidyl-tRNA war hier in etwa genauso groß wie die Menge aller anderen in der Zelle vorhandenen tRNAs zusammen. Es ist somit kein Wunder, daß die durch tHis gezeigte Suppressionsaktivität unter die Suppressionsaktivitäten anderer tRNAs fällt, wenn ihre Konzentration wie im Falle der Transkripte genau auf das Niveau anderer tRNAs eingestellt wird. Das Expressionsniveau plasmidkodierter tRNAs kann zudem - abhängig von den Wachstumsbedingungen oder dem genetischen Hintergrund - über einen weiten Bereich variieren (Yarus et al. 1986a/b, Masson und Miller 1986). Alle diese Fakten legen nahe, daß die Konzentrationen der in den einzelnen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gesamt-tRNA-Präparationen vorhandenen *amber*-Suppressor-tRNAs - und damit das Expressionsniveau der entsprechenden tRNAs *in vivo* - nicht miteinander vergleichbar sind. Eine höhere Suppressionsaktivität der einen oder der anderen Gesamt-tRNA-Präparation läßt sich folglich nicht in Richtung einer besseren Suppressionseffizienz der entsprechenden *amber*-Suppressor-tRNA interpretieren.

## 6.2 Struktur der Aminoacyl-tRNA und Suppressionseffizienz

Die erwähnten in der Literatur beschriebenen Suppressionsaktivitäten *in vivo* untersuchter tRNAs erlauben - unter anderem aufgrund fehlender Konzentrationsdaten - kaum Rückschlüsse auf die Suppressionseffizienz der tRNAs. Im Gegensatz hierzu wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit die Konzentration und auch die Aminoacylierung der eingesetzten tRNAs so genau wie möglich bestimmt. Letztendlich konnten die unterschiedlichen Suppressionsaktivitäten der Transkripte von sieben *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies ( $tRNA^{\text{Ser}}_{\text{CUA}} (\text{su}^+_1)$ ,  $tRNA^{\text{Tyr}}_{\text{CUA}} (\text{su}^+_3)$ ,  $tRNA^{\text{Leu}}_{\text{CUA}} (\text{su}^+_6)$ ,  $tRNA^{\text{Leu}(5)}_{\text{CUA}}$ ,  $tRNA^{\text{Phe}}_{\text{CUA}}$ ,  $tRNA^{\text{HisA}}_{\text{CUA}}$  und  $tRNA^{\text{Ala}}_{\text{CUA}}$ ) auf strukturelle Eigenschaften der entsprechenden Aminoacyl-tRNAs zurückgeführt werden.

Ein großer Teil der Kenntnisse, die wir zur Zeit über die Wechselwirkungen zwischen tRNA-Struktur und Suppressionseffizienz besitzen, stammt aus mehreren exzellenten Studien der Gruppe Yarus (Yarus 1982, Yarus et al. 1986a/b, Raftery und Yarus 1987, Schultz und Yarus 1994 etc.). Theoretische Betrachtungen der Nukleotidfolgen verschiedener tRNA-Anticodonarme führten 1982 zur Theorie des "Extended Anticodon" (Yarus 1982). Die Theorie des "Extended Anticodon" wurde ursprünglich aus Sequenzvergleichen unterschiedlicher tRNAs abgeleitet. Hierbei zeigte sich, daß tRNAs mit identischer dritter Anticodon-Position auffallende Homologien innerhalb der Sequenz ihres Anticodon-Armes aufwiesen. Der Theorie des "Extended Anticodon" liegen zwei Ideen zugrunde. Erstens ist die funktionale Anticodon-Sequenz Teil einer größeren Struktur, die an der Dekodierung des Codons Teil hat. Die dem Anticodon benachbarten Strukturen, das "Extended Anticodon", wurden in Richtung einer optimalen Codonerkenung hin evolviert, so daß der natürliche Anticodon-Arm eine ideale Sequenz für die Erkennung des jeweiligen Codons besitzt. Zweitens spielt das Nukleotid in der dritten Position des Anticodons, das sogenannte kardinale Nukleotid (Position 36), bei der Optimierung der Codonerkenung eine besondere Rolle. Die Sequenz des Anticodon-Armes ist vor allen Dingen auf dieses Nukleotid, das mit der ersten Codon-Position in Wechselwirkung tritt, abgestimmt.

Beispielsweise enthält der größte Teil der "Wildtyp"-tRNAs, die in der dritten Anticodon-Position ein A besitzen - also Codons lesen, die mit einem U-beginnen - an den Positionen, die dem Anticodon direkt benachbart sind, die Nukleotidfolge  $A_{37}A_{38}$ . Entsteht aus einer tRNA, die diese Nukleotidfolge nicht enthält, durch eine Mutation des Anticodons eine *amber*-Suppressor-tRNA, läßt sich die Suppressionseffizienz der entsprechenden *amber*-Suppressor-tRNA verbessern, wenn man die ursprüngliche Nukleotidfolge auf der 3'-Seite des Anticodons durch  $A_{37}A_{38}$  ersetzt (Bradley et al. 1981, Yarus et al. 1986b, Kleina et al. 1990). So bewirkte ein Austausch von  $U_{38}$  in den auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten *amber*-Suppressor-tRNAs für Histidin und Alanin gegen  $A_{38}$  eine Verbesserung der Suppressionsaktivität (Kleina et al. 1990). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Nukleotidfolge  ${}^5\text{C}_{34}\text{U}_{35}\text{A}_{36}\text{A}_{37}\text{A}_{38}{}^3$  als ideal für die Effizienz von *amber*-Suppressoren



über 20 mal so effizient wie der schwächste Suppressor,  $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_{\text{CUA}}$ . Eine *amber*-Suppressor-tRNA entsteht durch die Mutation eines Anticodons, das normalerweise für die Erkennung eines der 20 Sinncodons evolviert wurde. In Tabelle 21 sind die Anzahl der Mutationen, die ausgehend von der "Wildtyp"-Sequenz zum jeweiligen *amber*-Suppressor führen, sowie die relativen Effizienzen der einzelnen *amber*-Suppressor-tRNAs aufgeführt. Man findet eine klare Korrelation zwischen der Anzahl der Mutationen und der relativen Effizienz einer *amber*-Suppressor-tRNA. Generell ist die Suppressionseffizienz um so besser, je mehr die Sequenz der *amber*-Suppressor-tRNA der Sequenz der ursprünglichen Wildtyp-tRNA ähnelte. Mit zunehmender Anzahl der Mutationen, die nötig sind, die Sequenz  ${}^5\text{C}_{34}\text{U}_{35}\text{A}_{36}\text{A}_{37}\text{A}_{38}{}^3$  innerhalb der Anticodon-Schleife zu erhalten, nimmt die Suppressionseffizienz der tRNAs ab. Die drei besten *amber*-Suppressoren sind  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{\text{CUA}}$  ( $\text{su}^+_1$ ),  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}_{\text{CUA}}$  ( $\text{su}^+_3$ ) und  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{CUA}}$  ( $\text{su}^+_6$ ). Die entsprechenden Wildtyp-tRNAs unterscheiden sich von diesen drei *amber*-Suppressor-tRNAs jeweils nur durch eine einzige Base innerhalb ihres Anticodons. In  $\text{tRNA}^{\text{Leu}(5)}_{\text{CUA}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{CUA}}$  sind bereits zwei Nukleotide des Anticodons ausgetauscht. In allen fünf erwähnten tRNAs enthielt schon die entsprechende Wildtyp-tRNA als kardinales Nukleotid die Base  $\text{A}_{36}$ , die auch in den entsprechenden *amber*-Suppressoren enthalten ist.

<i>amber</i> -Suppressor-tRNA	ID Wildtyp-tRNA-Sequenz <sup>1)</sup>	Wildtyp-Anticodon-Schleife <sup>2)</sup> (32 33 34 35 36 37 38)	Anzahl mutierter Nukleotide im <i>amber</i> -Suppressor	relative Effizienz (tAla = 1)
<b>tSer</b>	DS1660 (Ser1)	CU CGA AA	1	23
<b>tTyr</b>	DY1661 (Tyr2)	CU <b>GUA</b> AA	1	18
<b>tLeu<sub>su+6</sub></b>	DL1662 (Leu3)	UU CAA AA	1	9
<b>tLeu(5)</b>	DL1664 (Leu5)	UU <b>UAA</b> AA	2	4,1
<b>tPhe</b>	DF1660 (Phe)	UU <b>GAA</b> AA	2	2,8
<b>tHis</b>	DH1660 (His)	UU <b>GUG</b> AU	3	2,2
<b>tAla</b>	DA1661 (Ala2)	AU <b>GGC</b> AU	4	1

Tab. 21: Ableitung der *amber*-Suppressor-tRNAs aus den entsprechenden Wildtyp-tRNA-Sequenzen:

**tSer:**  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{\text{CUA}} \{\text{su}^+_1\}$ , **tTyr:**  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}_{\text{CUA}} \{\text{su}^+_3\}$ , **tLeu<sub>su+6</sub>:**  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{CUA}} \{\text{su}^+_6\}$ , **tLeu(5):**  $\text{tRNA}^{\text{Leu}(5)}_{\text{CUA}}$ , **tPhe:**  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{CUA}}$ , **tHis:**  $\text{tRNA}^{\text{HisA}}_{\text{CUA}}$ , **tAla:**  $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_{\text{CUA}}$ . <sup>1)</sup> Die Bezeichnungen der tRNA-Sequenzen sind entnommen aus der im Internet zugänglichen Datenbank für tRNA-Sequenzen (Sprinzl et al. 1999). <sup>2)</sup> Fettgedruckt sind die Nukleotide, die in den entsprechenden *amber*-Suppressor-tRNAs mutiert sind, um die Sequenz CUA AA zu erhalten, die allen in der Arbeit verwendeten *amber*-Suppressor-tRNAs gemeinsam ist.

Einen weiteren Hinweis darauf, daß die Anwesenheit der Nukleotidfolge  $\text{A}_{37}\text{A}_{38}$  alleine nicht ausreichend ist, um eine möglichst hohe Suppressionseffizienz der entsprechenden *amber*-Suppressor-tRNA zu gewährleisten, geben die beiden tRNAs  $\text{tRNA}^{\text{HisA}}_{\text{CUA}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_{\text{CUA}}$ . In  $\text{tRNA}^{\text{HisA}}_{\text{CUA}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Ala}}_{\text{CUA}}$  wurde die kardinale Position des Anticodons relativ zu den

entsprechenden Wildtyp-tRNAs geändert (Kleina et al. 1990). Der durch die Theorie des "Extended Anticodon" vorhergesagte Konflikt zwischen dem neuen kardinalen Nukleotid und den das Anticodon flankierenden Nukleotiden wurde in diesen tRNAs durch die Einführung von A<sub>38</sub> zwar teilweise aufgelöst, die beiden tRNAs weisen aber immer noch die geringsten Effizienzen von allen *amber*-Suppressor-tRNAs auf.

Die Korrelation zwischen der Anzahl der im jeweiligen *amber*-Suppressor relativ zur Wildtyp-tRNA eingeführten Mutationen und der Suppressionseffizienz zeigt, daß die Sequenz der tRNA auf die Erkennung des Codons hin evolviert wurde. Insofern unterstützen die Ergebnisse die Theorie des "Extended Anticodon". In allen tRNAs müssen außerhalb der erwähnten für die Suppression günstigen Sequenz 5'CUAAA<sup>3'</sup> noch andere Informationen für eine effiziente Dekodierung des *amber*-Codons enthalten sein; sonst wären die Suppressionseffizienzen nicht so unterschiedlich. Es ist die Frage, ob die entsprechenden Elemente innerhalb oder außerhalb des Anticodon-Armes zu suchen sind.

*Ein C an Position 32 innerhalb der Anticodon-Schleife begünstigt möglicherweise generell die amber-Suppression*

Die Anticodon-Schleifen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten tRNAs differieren in Position 32. Die beiden mit Abstand besten Suppressoren tRNA<sup>Ser</sup><sub>CUA</sub>(su<sup>+</sup><sub>1</sub>) und tRNA<sup>Tyr</sup><sub>CUA</sub>(su<sup>+</sup><sub>3</sub>) enthalten die Base C<sub>32</sub> innerhalb der Anticodon-Schleife (vgl. Abb.55, S.143). Es folgen dann vier tRNAs mit einem U an dieser Position. Der innerhalb der vorliegenden Studie ineffizienteste *amber*-Suppressor tRNA<sup>Ala</sup><sub>CUA</sub> besitzt als einzige der untersuchten tRNAs mit der Base A ein Purin an Position 32. Dies ist ein Hinweis darauf, daß Position 32 möglicherweise einen größeren Einfluß auf die Suppression hat.

Yarus et al. (1986a) führte sättigende Mutationen an einzelnen Nukleotidpositionen innerhalb des Anticodon-Armes von tRNA<sup>Trp</sup><sub>CUA</sub>(su<sup>+</sup><sub>7</sub>) durch. Expressionsniveau, Aminoacylierungsraten oder der Grad der Modifizierung in den einzelnen tRNAs wurden im Hinblick auf die Suppressionseffizienz untersucht. In der Studie von Yarus et al. lagen die ausgetauschten Nukleotide über den ganzen Anticodon-Arm verteilt. Die Positionen mit den größten Effekten waren - in dieser Reihenfolge - Position 38, Position 37 Position 32 und Position 33. Die Auswirkungen von Mutationen innerhalb des Anticodon-Stammes waren dagegen vergleichsweise klein. Innerhalb von Position 32, der einzigen Position, in der sich die Anticodon-Schleifen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *amber*-Suppressor-tRNAs unterscheiden, war die Suppressionseffizienz für C<sub>32</sub> am größten, mit weitem Abstand gefolgt von der Base U<sub>32</sub>, die wieder eine wesentlich größere Effizienz als A<sub>32</sub> oder gar G<sub>32</sub> zur Folge hatte. Bei Yarus et al. (1986a) wurde der Zusammenhang zwischen Suppressionseffizienz und Anticodon-Arm-Sequenz anhand einer Mutagenesestudie mit einer einzigen tRNA *in vivo* untersucht. In der vorliegenden Arbeit brachte ein Vergleich unterschiedlicher Spezies *in vitro* exakt das gleiche Resultat.

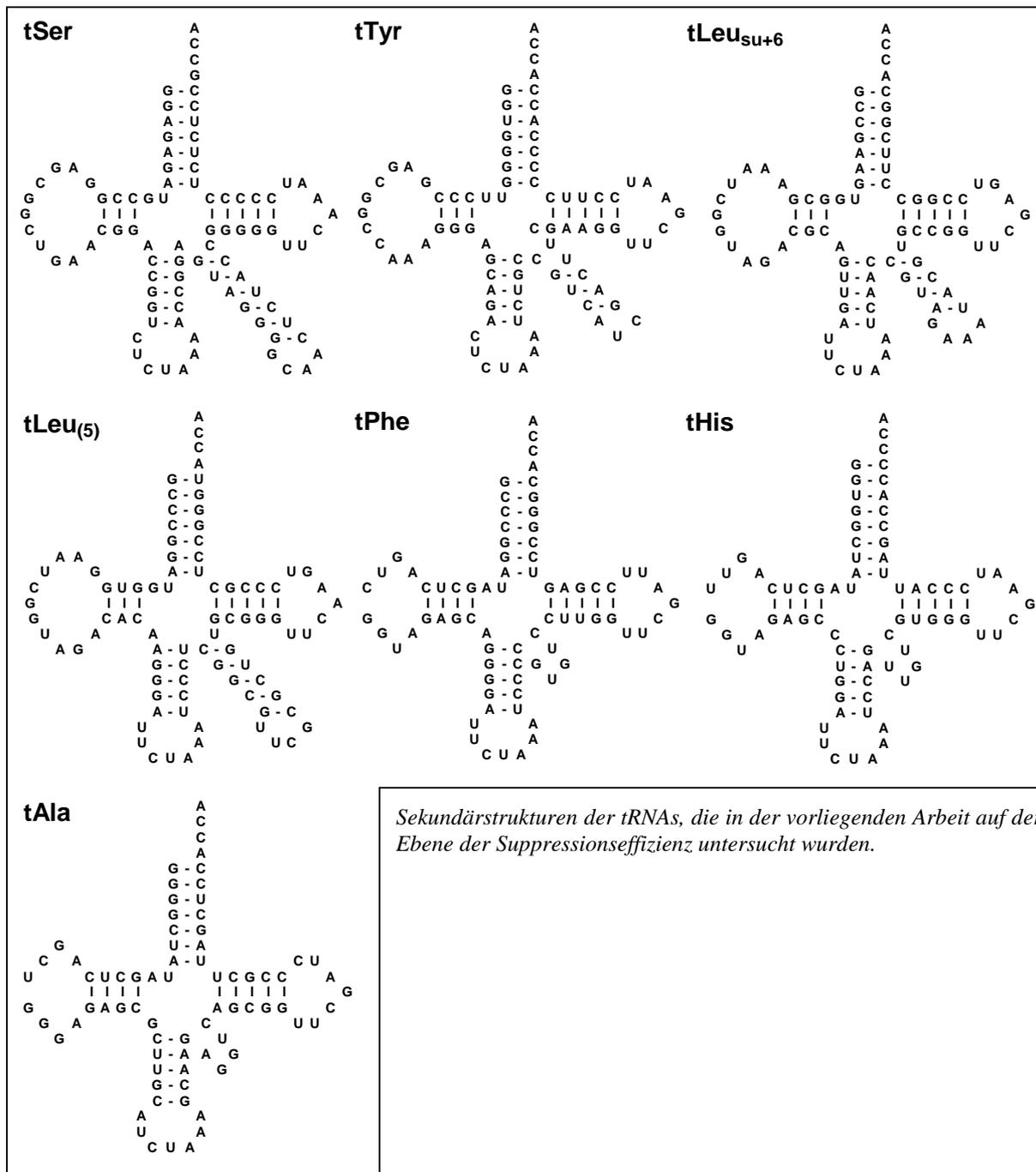
Warum könnte ein C an Position 32 eine effizientere Suppression bewirken? In einer interessanten Studie wurde der Einfluß von Modifikationen innerhalb des Anticodon-Armes auf die Ribosomenbindung anhand theoretischer Betrachtungen verschiedener tRNA-Sequenzen und praktischer Versuche mit modifizierten und unmodifizierten DNA-Analoga von Anticodon-Armen analysiert (Dao et al. 1994). Eine Folgerung aus dieser Studie war, daß offene Anticodon-Schlaufen von der Natur evolviert wurden, um die Ribosomenbindung zu verstärken. Dao et al. (1994) postulierten, daß eine Anticodon-Domäne mit einer geschlossenen Schlaufe die tRNA von einer stärkeren Interaktion mit dem Ribosom abhält. Ein Sequenzvergleich von über 500 tRNAs ergab, daß in allen tRNAs, in denen theoretisch zwei Basenpaarungen innerhalb der Anticodon-Schlaufe möglich wären, mindestens eine der beiden möglichen Paarungen durch eine Basenmodifikation verhindert wird (Dao et al. 1994). Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten tRNAs enthalten *in vivo* Modifikationen innerhalb der Anticodon-Schlaufe, beispielsweise  $ms^2i^6A$  (Eggertson und Söll 1988). Wir wissen nicht, ob innerhalb des in der vorliegenden Arbeit verwendeten *in vitro* Translationssystems Modifikationen möglich sind. Wenn nicht, könnte dies erklären, daß die Base  $U_{32}$  eine geringere Suppressionseffizienz der entsprechenden tRNA zur Folge hat als  $C_{32}$ .  $U_{32}$  könnte theoretisch mit  $A_{38}$  paaren, während eine Basenpaarung von  $C_{32}$  mit  $A_{38}$  ausgeschlossen ist, so daß die Anwesenheit von  $C_{32}$  eine offene Schlaufe gewährleistete.  $tRNA^{Ala}_{CUA}$  besitzt allerdings an Position 32 ein A, wodurch ebenfalls eine Basenpaarung mit  $A_{38}$  ausgeschlossen wird. Diese tRNA war unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten tRNAs aber der schwächste Suppressor von allen. Möglicherweise ist also nicht so sehr die Tatsache entscheidend, daß durch die Anwesenheit von  $C_{32}$  eine Basenpaarung unterbunden wird, sondern es gibt eine allgemeine Präferenz für ein bestimmtes Nukleotid an dieser Position. Ähnlich wie auf der 3'-flankierenden Seite des Anticodons, wo die Folge  $A_{37}A_{38}$  generell günstig für die Suppression zu sein scheint, ist möglicherweise auf der 5'-flankierenden Seite die Folge  $C_{32}U_{33}$  gut. Die ideale Anticodon-Schlaufe besitzt somit vermutlich generell die Nukleotidsequenz  ${}^5'CUCUAAA{}^3'$ , wie sich in der Studie von Yarus et al. (1986a) schon angedeutet hatte.

#### *Hat eine TypII-Struktur eine erhöhte Suppressionseffizienz zur Folge?*

Unter den in der vorliegenden Arbeit auf der Ebene der Suppressionseffizienz untersuchten *amber*-Suppressor-tRNAs waren vier tRNAs vom TypII und drei tRNAs vom TypI (vgl. Abb.56). Alle untersuchten tRNAs mit einer TypII-Struktur ( $tRNA^{Ser}_{CUA}$ ,  $tRNA^{Tyr}_{CUA}$ ,  $tRNA^{Leu}_{CUA}(su^+_6)$  und  $tRNA^{Leu(5)}_{CUA}$ ) wiesen eine bessere Suppressionseffizienz auf als die tRNAs mit einer TypI-Struktur ( $tRNA^{Phe}_{CUA}$ ,  $tRNA^{HisA}_{CUA}$  und  $tRNA^{Ala}_{CUA}$ ). Somit besteht die Möglichkeit, daß die Suppressionseffizienz einer tRNA generell durch eine TypII-Struktur begünstigt wird.

TypII-tRNAs unterscheiden sich von TypI-tRNAs durch die Anwesenheit eines langen Extraarmes und durch eine andere Architektur des D-Armes, der aus einem Stamm mit nur

Abb. 56



drei Basenpaaren und einer sehr großen Schlaufe besteht. Die wesentlichen Unterschiede zwischen TypI- und TypII-tRNAs liegen innerhalb der sogenannten "Core-Region" der tRNA. Die "Core-Region" hat einen wesentlichen Anteil an der dreidimensionalen Faltung und an der Flexibilität des tRNA-Moleküls (Dock-Bregeon et al. 1989, Biou et al. 1994, Nissan et al. 1999, Batey et al. 1999). In der Literatur sind Einflüsse von Nukleotiden in der sogenannten "Core-Region" der tRNA auf die Effizienz der Suppression beschrieben. Beispielsweise können Mutationen innerhalb des D-Stammes oder Mutationen des obersten Basenpaares des Anticodon-Stammes zu einer Änderung der Suppressionseffizienz der tRNA führen (Raferty et al. 1986, Smith und Yarus 1989a/b, Schulz und Yarus 1994a/b). Diese Mutationen wirken

sich wahrscheinlich über die Lesegenauigkeit auf die Effizienz der tRNA aus, indem sie vermutlich die Flexibilität des Moleküls erhöhen (Raferty et al. 1986, Smith und Yarus 1989b, Schulz und Yarus 1994a).

Einen Anhaltspunkt dafür, daß eine TypII-Struktur die Suppression begünstigt, gibt ein Vergleich der beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten tRNAs  $tRNA^{\text{Leu}(5)}_{\text{CUA}}$  und  $tRNA^{\text{Phe}}_{\text{CUA}}$ . Die Kleeblatt-Strukturen der tRNAs sind in Abb.56 aufgeführt.  $tRNA^{\text{Leu}(5)}_{\text{CUA}}$  ist eine tRNA vom TypII,  $tRNA^{\text{Phe}}_{\text{CUA}}$  eine tRNA vom TypI. Beide tRNAs besitzen nahezu identische Anticodon- und Akzeptorarme. Die Akzeptorarme unterscheiden sich ausschließlich an Position 72. Innerhalb der Anticodon-Arme der beiden tRNAs differiert alleine das oberste Basenpaar. Zudem sind Anzahl und Position der im jeweiligen *amber*-Suppressor gegenüber den entsprechenden "Wildtyp"-tRNAs ausgetauschten Nukleotide in beiden tRNAs identisch. Die wesentlichen Unterschiede zwischen  $tRNA^{\text{Leu}(5)}_{\text{CUA}}$  und  $tRNA^{\text{Phe}}_{\text{CUA}}$  konzentrieren sich auf D-Arm und Extraarm, also auf die Strukturelemente, die den Unterschied zwischen TypI- und TypII-tRNAs ausmachen und in der erwähnten "Core-Region" der tRNAs liegen. Es ist somit durchaus möglich, daß die TypII-Struktur von  $tRNA^{\text{Leu}(5)}_{\text{CUA}}$  für die gegenüber  $tRNA^{\text{Phe}}_{\text{CUA}}$  erhöhte Suppressionseffizienz verantwortlich ist.

In der Literatur gibt es eine einzige Untersuchung, in der ebenfalls ein Effekt der TypII-Struktur der tRNA auf die Codon-Erkennung postuliert wird. Curran et al. (1995) untersuchten die Selektion verschiedener tRNAs an verschiedenen Sinncodons in allen möglichen 3'-Kontexten. In der Studie wurden unter anderem die beiden tRNAs  $tRNA^{\text{Ser}}_{\text{UGA}}$  und  $tRNA^{\text{Trp}}_{\text{CCA}}$  miteinander verglichen.  $tRNA^{\text{Ser}}_{\text{UGA}}$  ist eine tRNA vom TypII,  $tRNA^{\text{Trp}}_{\text{CCA}}$  eine vom TypI. Die Effizienz der Dekodierung wurde mit Hilfe der „Frameshift-Site“ im Gen für RF2 bestimmt. Von den beiden tRNAs reagierte nur die tRNA mit TypI-Struktur  $tRNA^{\text{Trp}}_{\text{CCA}}$  auf das Nukleotid, das 3' auf das Codon folgte.  $tRNA^{\text{Ser}}_{\text{UGA}}$ , die tRNA vom TypII, zeigte keine Kontextabhängigkeit und besaß eine höhere Effizienz. Die bessere Suppressionseffizienz von TypII-tRNAs innerhalb der vorliegenden Arbeit könnte somit auf ein generelles Schema zurückzuführen sein.

#### *Signifikanz der Untersuchungen zur Suppressionseffizienz*

Der Einfluß der Struktur des Anticodon-Armes auf die Translationseffizienz von tRNA konnte bisher nur anhand von Mutagenese-Studien einzelner tRNA-Spezies belegt werden (z.B.: Bradley et al. 1981, Yarus et al. 1986a/b, Raferty und Yarus 1987, Kleina et al. 1990, Lustig et al. 1993, Schulz und Yarus 1994a). Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die von Yarus 1982 in der Theorie des "Extended Anticodon" formulierten Voraussagen anhand der relativen Effizienzen verschiedener *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies bestätigt werden. Die Ergebnisse erlauben zudem eine Einstufung der Suppressionseffizienz der tRNAs  $tRNA^{\text{Leu}(5)}_{\text{CUA}}$ ,  $tRNA^{\text{Phe}}_{\text{CUA}}$ ,  $tRNA^{\text{HisA}}_{\text{CUA}}$  und  $tRNA^{\text{Ala}}_{\text{CUA}}$ , für die bisher keine Daten zur Suppressionseffizienz vorlagen. Im Unterschied zu den *in vivo*-

Resultaten von Kleina et al. (1990) weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine hervorragende Übereinstimmung mit den Voraussagen der Theorie des "Extended Anticodon" auf. *In vivo* zeigen  $tRNA^{Phe}_{CUA}$ ,  $tRNA^{HisA}_{CUA}$  und  $tRNA^{Ala}_{CUA}$  eine nach der Theorie des "Extended Anticodon" unerwartet hohe Aktivität (Kleina et al. 1990). Diese ist vermutlich auf die Überexpression der entsprechenden tRNAs zurückzuführen. Im Unterschied hierzu zeigen die erwähnten tRNAs *in vitro* untereinander und auch zu den anderen *amber*-Suppressoren die gemäß der Theorie des "Extended Anticodon" erwarteten Relationen. Die Suppressionseffizienz von  $tRNA^{Leu}_{CUA}(su^+_6)$  lag innerhalb der vorliegenden Arbeit unter der von  $tRNA^{Ser}_{CUA}(su^+_1)$  und  $tRNA^{Tyr}_{CUA}(su^+_3)$ . Dies war unerwartet, da in nahezu allen bekannten *in vivo*-Studien  $tRNA^{Leu}_{CUA}(su^+_6)$  eine höhere Suppressionsaktivität als die beiden anderen tRNAs aufwies. Die niedrigere Suppressionseffizienz von  $tRNA^{Leu}_{CUA}(su^+_6)$  *in vitro* ist möglicherweise auf einen Effekt des Nukleotids an Position 32 innerhalb der Anticodon-Schleife zurückzuführen, wie bereits ausgeführt wurde.

### 6.3 Konsequenzen der Untersuchungen zur Suppressionseffizienz für den Einsatz chemisch aminoacylierter tRNAs

Die Einführung einer unnatürlichen Aminosäure in ein Protein ist mit Hilfe einer *amber*-Suppressor-tRNA möglich, die chemisch mit der gewünschten Aminosäure acyliert wurde und nicht durch die innerhalb des Translationsystems vorhandenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen reacyliert werden kann (Noren et al. 1989, Robertson et al. 1991). Die Zugabe der beladenen *amber*-Suppressor-tRNA in eine Translationsreaktion führt zu der ortsspezifischen Insertion der entsprechenden Aminosäure in ein ausgewähltes Protein. Die Einführung einer unnatürlichen Aminosäure wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit anhand der Insertion von  $\epsilon$ -Dansyl-Lysin ( $\epsilon$ -DnsLys) in FABP demonstriert. Hierzu wurde  $tRNA^{Phe}_{CUA}$  aus *Saccharomyces cerevisiae* (tPheY) verwendet. Die Effizienz des Einbaus erwies sich als äußerst ineffizient. Die Synthese an verändertem Protein betrug nur ca. 0,3  $\mu$ M. Ein relativ ineffizienter Einbau von Dansyl-modifizierten Aminosäuren ist auch aus anderen Untersuchungen bekannt. Steward et al. (1997) beispielsweise beschrieben den Einbau von  $\epsilon$ -DnsLys in  $\beta$ -Galaktosidase in einem *Escherichia coli* S30-System mit Hilfe von  $tRNA^{Gly}_{CUA}$  aus *Escherichia coli*. Sie erzielten eine Suppressionsrate von ca. 4% mit einem Lysat, das einen hitzeinaktivierbaren Terminationsfaktor RF1 enthielt. Cornish et al. (1994) waren gar nicht dazu in der Lage,  $\epsilon$ -DnsLys in T4-Lysozym in einem *Escherichia coli* S30-Lysat einzubauen, während andere unnatürliche Aminosäuren, beispielsweise 7-Aza-Trp, relativ gut eingebaut werden konnten. Es ist bekannt, daß die Einbaubarkeit unnatürlicher Aminosäuren zum Teil von der Polarität des einzuführenden Restes abhängt (Clod et al. 1996). Andere unnatürliche Aminosäuren können wesentlich besser eingebaut werden als  $\epsilon$ -DnsLys. Für bestimmte Aminosäuren sind in der Literatur Suppressionsraten von bis zu 50% beschrieben (Judice et al. 1993, Clod et al. 1996, Steaward et al. 1997). Dennoch sind die Syntheseraten der entsprechenden Proteine, gemessen an der Menge an eingesetzter Aminoacyl-tRNA

äußerst gering. Wie auch innerhalb der vorliegenden Arbeit werden in der Regel Konzentrationen der chemisch beladenen tRNA zwischen 10 und 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Proteinausbeuten in der Literatur können allenfalls grob geschätzt werden. Sie dürften aber, wie auch innerhalb der vorliegenden Arbeit, auf keinen Fall über 1  $\mu\text{M}$  liegen. Dies bedeutet, daß nur ein sehr kleiner Teil der eingesetzten Aminoacyl-tRNAs für die Proteinsynthese wirkt. Die Notwendigkeit, die Einbauraten zu verbessern, ist aus diesem Grund allgemein anerkannt.

Eine zu Anfang der Arbeit aufgestellte Hypothese war, daß die geringe Effizienz des Einbaus unnatürlicher Aminosäuren in Proteine zum Teil auf die mangelnde Suppressionseffizienz der zur Zeit für den Einbau verwendeten *amber*-Suppressor-tRNA zurückzuführen ist. Die in der Literatur für den Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine favorisierte und auch innerhalb der vorliegenden Arbeit für den Einbau von  $\epsilon$ -DnsLys verwendete tPheY entstand durch den Austausch des Wildtyp-Anticodons GAA gegen CUA. Somit wurden in der entsprechenden "Wildtyp"-tRNA zwei Nukleotide ausgetauscht, um den *amber*-Suppressor zu erhalten. Die Anticodon-Schleife von tPheY enthält die für die Suppression als ideal eingestufte Sequenz 5'-CUCUAAA<sup>3'</sup>. Obwohl nach den in der vorliegenden Arbeit aufgestellten Kriterien solche *amber*-Suppressor-tRNAs, für deren Generierung nur ein Nukleotid innerhalb des Anticodon ausgetauscht werden muß, eine bessere Effizienz aufweisen sollten, ist die extrem geringe Effizienz des Einbaus mit tPheY in Anbetracht der idealen Anticodon-Schleife zunächst überraschend. Möglicherweise kann tPheY aber nicht in das Muster eingeordnet werden, da sie aus einem anderen Organismus stammt. Ihre Sequenz wurde nicht auf die Wechselwirkung mit dem 70S-Ribosom aus *Escherichia coli*, sondern auf die Wechselwirkung mit dem eukaryotischen 80S-Ribosom hin evolviert. In der Tat besitzt tRNA<sup>Phe</sup> aus Hefe eine geringere Affinität zum *Escherichia coli*-Ribosom als tRNA<sup>Phe</sup> aus *Escherichia coli* (Lill et al. 1984).

In der Literatur gibt es zwei Referenzen, in denen die Effizienz von tPheY beim Einbau unnatürlicher Aminosäuren direkt mit der anderer *amber*-Suppressoren verglichen wird. Cload et al. (1996) fanden, daß tRNA<sup>Asn</sup><sub>CUA</sub> aus *E. coli*, tRNA<sup>Gln</sup><sub>CUA</sub> aus *Tetrahymena* und bei einigen Aminosäuren tRNA<sup>Asp</sup><sub>CUA</sub> aus *E. coli* bessere Einbauraten als tPheY erlauben. Bei den *E. coli*-tRNAs müssen zwei (tRNA<sup>Asn</sup><sub>CUA</sub>) bzw. drei (tRNA<sup>Asp</sup><sub>CUA</sub>) Nukleotide ausgetauscht werden, um den entsprechenden *amber*-Suppressor zu generieren. In beiden tRNAs mußte auch das kardinale Nukleotid ausgetauscht werden, so daß ein Konflikt mit der evolvierten tRNA-Sequenz in den *amber*-Suppressoren vorprogrammiert ist. In Anbetracht der Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit ist somit nicht zu erwarten, daß die beiden tRNAs eine wesentlich verbesserte Suppressionseffizienz zeigen. Interessant ist der bei Cload et al. untersuchte *amber*-Suppressor tRNA<sup>Gln</sup><sub>CUA</sub> aus *Tetrahymena*. In *Tetrahymena* kodieren die in anderen Organismen normalerweise als Terminationscodons fungierenden Codons UAG (*amber*) und UAA (*ochre*) Glutamin (Schüll und Beier 1994). In der Studie von Cload et al. war die Effizienz von tRNA<sup>Gln</sup><sub>CUA</sub> beim Einbau von Valin und Homoglutamat besser als die von tPheY. Leider geben Cload et al. nicht an, welche der drei Glutaminyl-tRNAs aus *Tetrahymena* sie verwendeten. Somit ist die Effizienz der verwendeten tRNA<sup>Gln</sup><sub>CUA</sub> schwer

einzuschätzen. Zu berücksichtigen ist, daß die tRNA wie auch tPheY aus einem anderen Organismus als *E. coli* stammt.

In der zweiten Referenz wurde tPheY mit tRNA<sup>AlaC70</sup><sub>CUA</sub> aus *E. coli* verglichen (Karginov et al. 1997). tRNA<sup>AlaC70</sup><sub>CUA</sub> ist für die Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine nach chemischer Aminoacylierung der tRNA offenbar besser geeignet als tPheY. Innerhalb der vorliegenden Arbeit bekommt die Bestimmung der Suppressionseffizienz von tRNA<sup>Ala</sup><sub>CUA</sub> somit eine wichtige Bedeutung. Unter der Annahme, daß sich der Austausch des für die Aminoacylierung von Alanyl-tRNAs entscheidenden Basenpaares G<sub>3</sub>-U<sub>70</sub> gegen G<sub>3</sub>-C<sub>70</sub> nicht auf die Suppressionseffizienz der tRNAs auswirkt, sollte die Suppressionseffizienz von tRNA<sup>Ala</sup><sub>CUA</sub> die Suppressionseffizienz von tRNA<sup>AlaC70</sup><sub>CUA</sub> reflektieren und somit eine Einordnung der Suppressionseffizienz der zur Zeit für die Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine verwendeten tRNAs ermöglichen. Die Struktur des Akzeptorarms wird durch die Mutation C<sub>70</sub> ausschließlich lokal beeinflusst (Mueller et al. 1999, Varani und McClain 2000). Während der Aminoacylierung von tRNA<sup>Ala</sup> durch Alanyl-tRNA-Synthetase ist das Ausklappen von U<sub>70</sub> aus der Helix ein wichtiger Mechanismus (Mueller et al. 1999). Durch die Einführung von C<sub>70</sub> wird die Energie der Basenstapelung innerhalb der Akzeptorarmhelix lokal erhöht, so daß ein Ausklappen der Base nicht mehr möglich ist und die Aminoacylierung abgeschaltet wird. Ein Einfluß der Struktur des Akzeptorarms auf die Suppression wurde bisher noch nicht gezeigt. Man kann somit annehmen, daß der Austausch der für die Aminoacylierung wichtigen Base U<sub>70</sub> gegen C<sub>70</sub> keinen Einfluß auf die Suppressionseffizienz hat. Folglich ist tRNA<sup>Ala</sup><sub>CUA</sub> eine geeignete Referenz-tRNA für einen Vergleich sehr unterschiedlicher *amber*-Suppressor-tRNAs im regenerierenden System. In der vorliegenden Untersuchung hatte diese tRNA die niedrigste Suppressionseffizienz von allen *amber*-Suppressoren. Man kann somit davon ausgehen, daß die zur Zeit für die Einführung unnatürlicher Aminosäuren verwendeten *amber*-Suppressor-tRNAs äußerst schlechte Suppressoren sind.

Ein wichtige Frage im Rahmen der vorliegenden Arbeit war, ob man die Suppressionseffizienz der zur Zeit für die chemische Aminoacylierung verwendeten tRNAs verbessern kann. Könnte man aus tRNA<sup>Ala</sup><sub>CUA</sub> eine hocheffiziente *amber*-Suppressor-tRNA machen? Möglicherweise könnte ihre Effizienz erhöht werden, wenn man die Sequenz ihres Anticodon-Armes in Richtung der Konsensus-Sequenz des "Extended Anticodon" verbessern würde. Da die einzelnen Positionen der Konsensus-Sequenz nicht klar definiert sind, würden sich als Ziel einer solchen Maßnahme sehr viele unterschiedliche Sequenzen anbieten. Die das Anticodon 3'-flankierende Sequenz der Anticodon-Schleife war schon aufgrund der Literaturdaten klar definiert. Aufgrund der Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit ist nun auch Position 32 klar definiert, so daß die Sequenz der Anticodon-Schleife 5'CUCUAAA<sup>3</sup> lauten sollte. Dennoch ist aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht zu erwarten, daß eine solcherart verbesserte Variante von tRNA<sup>Ala</sup><sub>CUA</sub> die Suppressionseffizienz der besten tRNAs erreicht. Da offensichtlich nicht nur der Anticodon-Arm, sondern die gesamte Struktur der

tRNA auf die Erkennung des jeweiligen Codons hin evolviert wurde, erscheint es günstiger, bei der Konstruktion verbesserter *amber*-Suppressoren von einer tRNA auszugehen, die schon als Wildtyp-tRNA eine möglichst optimale Struktur im Hinblick auf die Erkennung des *amber*-Codons ausgebildet hat. Hierfür kommen nach den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen im Prinzip nur die tRNAs in Frage, aus denen sich durch einen einzigen Nukleotidaustausch in der ersten oder zweiten Anticodon-Position eine *amber*-Suppressor-tRNA ableiten läßt. Diese Voraussetzung erfüllen nur die *amber*-Suppressoren  $tRNA^{\text{Ser}}_{\text{CUA}}(\text{su}^+_1)$ ,  $tRNA^{\text{Tyr}}_{\text{CUA}}(\text{su}^+_3)$ ,  $tRNA^{\text{Leu}}_{\text{CUA}}(\text{su}^+_6)$  und  $tRNA^{\text{Trp}}_{\text{CUA}}(\text{su}^+_7)$ . Tatsächlich wiesen von den innerhalb der vorliegenden Arbeit untersuchten *amber*-Suppressor-tRNAs  $tRNA^{\text{Ser}}_{\text{CUA}}(\text{su}^+_1)$  und  $tRNA^{\text{Tyr}}_{\text{CUA}}(\text{su}^+_3)$  die höchste Suppressionseffizienz auf.

#### 6.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einführung einer unnatürlichen Aminosäure anhand der Insertion von  $\epsilon$ -Dansyl-Lysin in FABP demonstriert. Anhand der beschriebenen Einführung von Dansyl-Lysin in FABP wurden zwei Limitationen der Methode "Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine mit Hilfe chemisch aminoacylierter *amber*-Suppressor-tRNAs" deutlich. Als eine erste Limitation erwies sich die Präparation größerer Mengen an *in vitro* transkribierten homogenen tRNAs für die Herstellung der mit der unnatürlichen Aminosäure beladenen tRNA. Aufgrund der starken 3'-Endheterogenität der während der T7-Transkription entstehenden Produkte war die Aufreinigung korrekter Transkripte für die Herstellung der chemisch aminoacylierten tRNA äußerst aufwendig. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Temperaturabhängigkeit der n+1-Aktivität von T7-RNA-Polymerase bedeutet – vor allen Dingen durch ihre Einfachheit – einen Fortschritt im Hinblick auf eine Generierung homogenerer RNA-Populationen während der T7-Transkription. Die Anwendung höherer Temperaturen während der Transkription, möglicherweise in Kombination mit anderen Methoden, wie der Einführung eines modifizierten Terminatornukleosids am 5'-Ende des nichtkodogenen Matrizenstranges (Khao et al. 1999), könnte letztendlich eine Aufreinigung von homogenen T7-Transkripten über einfachere Methoden – wie beispielsweise mittels HPLC – ermöglichen.

Als eine zweite Limitation erwies sich die Suppressionseffizienz der für die Einführung der unnatürlichen Aminosäure verwendeten *amber*-Suppressor-tRNAs. Die Effizienz des Einbaus unnatürlicher Aminosäuren könnte letztendlich über zwei Wege erhöht werden, die sich nicht gegenseitig ausschließen sondern ergänzen. Ein Weg besteht in der Verminderung der Aktivität von RF1 in den Lysaten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß schon geringste Mengen an RF1 zu einer starken Konkurrenz der *amber*-Suppressor-tRNAs führen. Ein entsprechender Ansatz zur Verminderung der Aktivität von RF1 ist in der Literatur bereits mit der Herstellung von Lysaten aus Zellstämmen, die einen thermosensitiven RF1 enthalten, beschrieben (Steward et al. 1997). Der zweite Weg besteht in der Konstruktion stärkerer

*amber*-Suppressoren für die chemische Aminoacylierung. Von einigen Autoren, beispielsweise Cload et al. (1996), werden nur tRNAs für die chemische Aminoacylierung in Betracht gezogen, die *in vivo* nicht aminoacyliert werden können und aufgrund dessen *in vivo* keine Suppressionsaktivität zeigen. Die vermutlich gegenüber *in vivo* verminderte Aktivität einiger Aminoacyl-tRNA-Synthetasen *in vitro* erweitert das Spektrum an potentiell für die chemische Aminoacylierung geeigneten *amber*-Suppressor-tRNAs beträchtlich, da die Abschaltung der Aminoacylierung wesentlich vereinfacht wird. Mutationen, die *in vivo* noch keine völlige Abschaltung der Aminoacylierung zur Folge haben, führen *in vitro* offensichtlich zu einem Erliegen der Aktivität der entsprechenden tRNAs.

Durch die verminderte Aktivität einiger Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wird eine weitere Perspektive eröffnet. tRNAs, deren Aminoacylierung abgeschaltet wurde, können offensichtlich durch eine erhöhte Synthetase-Konzentration aminoacyliert werden. Dies kann, wie am Beispiel von tPhe anhand der Zugabe von FRS aus *Thermus thermophilus* demonstriert, innerhalb des Translationssystems geschehen. Man könnte die tRNAs aber genauso gut schon vor der Zugabe in das Translationssystem mit aufgereinigter Aminoacyl-tRNA-Synthetase aminoacylieren, so daß eine Reacylierung der tRNAs innerhalb des Systems ausgeschlossen wäre. Auf diese Weise könnte man verschiedene <sup>15</sup>N- oder <sup>13</sup>C-markierte Aminosäuren, beispielsweise <sup>15</sup>N-Lysin oder <sup>13</sup>C-Phenylalanin, ortsspezifisch mit Hilfe enzymatisch aminoacylierter *amber*-Suppressor-tRNAs in Proteine insertieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß die Suppressioneffizienz von *in vitro* transkribierten tRNAs in der zellfreien Proteinbiosynthese generell den Voraussagen der Theorie des "Extended Anticodon" gehorcht. Die Theorie konnte in der vorliegenden Arbeit in dem Sinne bestätigt werden, daß die Suppressioneffizienz durch die Anwesenheit einer - in der Theorie geforderten - auf die Erkennung des jeweiligen Codons hin evolvierten Struktur der tRNA begünstigt wird. Die gefundene Korrelation zwischen der Anzahl ausgetauschter Nukleotide und der Suppressioneffizienz ermöglicht in gewissen Grenzen eine Vorhersage der Suppressioneffizienz einer *amber*-Suppressor-tRNA aus der Sequenz der entsprechenden "Wildtyp"-tRNA unter Berücksichtigung der Theorie des "Extended Anticodon". Die bedeutenste Perspektive der vorliegenden Arbeit besteht in der Konstruktion wesentlich verbesserter *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies für die Einführung unnatürlicher oder modifizierter Aminosäuren in Proteine mit Hilfe chemisch aminoacylierter *amber*-Suppressor-tRNAs. Es erscheint am günstigsten, bei der Konstruktion neuer *amber*-Suppressoren möglichst nah an den Vorgaben der Natur zu bleiben. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, werden einige der untersuchten aminoacylierbaren tRNAs mehr als 20 mal häufiger durch das Ribosom ausgewählt als die zur Zeit für die chemische Aminoacylierung verwendeten tRNAs. Ein bedeutender Fortschritt in Richtung eines effizienteren Einbaus unnatürlicher Aminosäuren wäre gemacht, wenn es gelänge, von tRNA<sup>Ser</sup><sub>CUA</sub> (su<sup>+</sup><sub>1</sub>) oder tRNA<sup>Tyr</sup><sub>CUA</sub> (su<sup>+</sup><sub>3</sub>) entsprechende nicht aminoacylierbare Varianten herzustellen.