

## 5. Ergebnisse

### Vorbemerkungen:

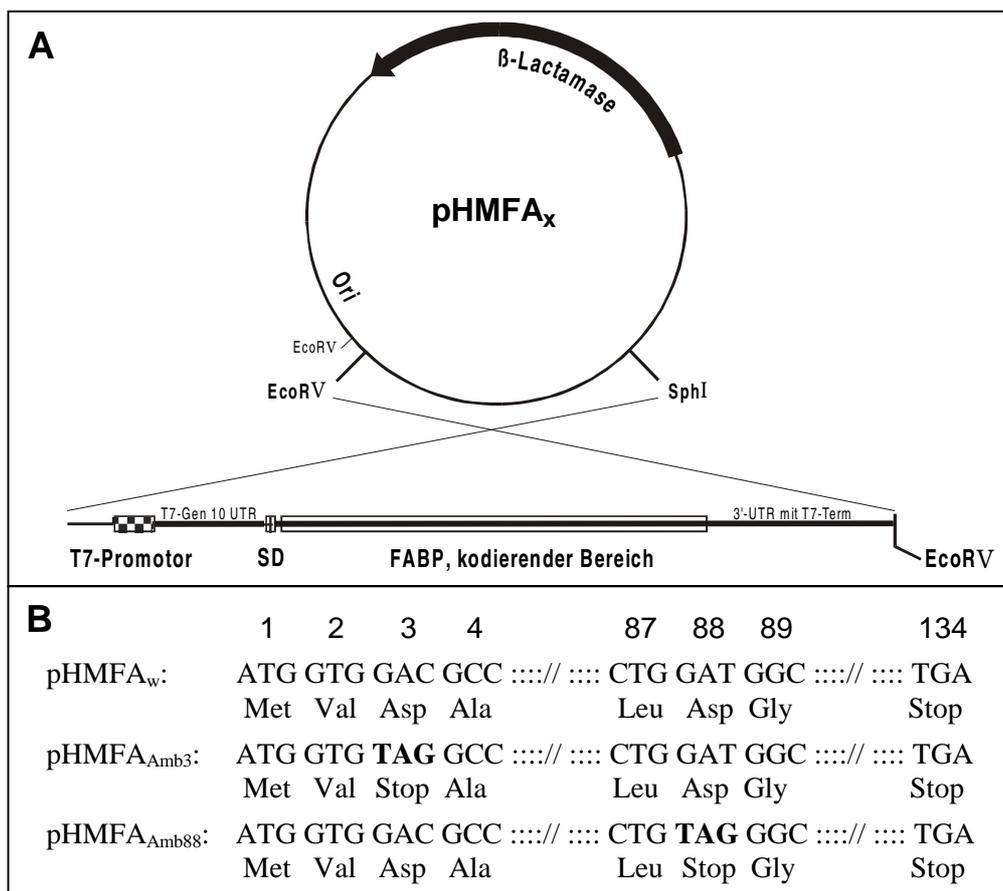
Für die zellfreie Proteinbiosynthese wurde das auf Herrlich und Schweiger (1974) zurückgehende und im Labor von Prof. V.A. Erdmann von Dr. W. Stiege weiterentwickelte fraktionierte System verwendet, das sich im wesentlichen aus einer ribosomalen 70S und einer S100-Enzymfraktion zusammensetzt. (zur Zusammensetzung des Systems vgl. auch Abb.9, S.62). Dieses System hat den Vorteil, daß sich bestimmte Parameter wie Aminoacylierung und Prozessierung *in vitro* transkribierter tRNAs in einer tRNA-freien Teilfraktion des Gesamtsystems, der S100-Enzymfraktion, untersuchen lassen. Durch eine Untersuchung der Aminoacylierungskinetik einer tRNA in der S100-Enzymfraktion wird so beispielsweise die Angabe einer minimalen Aminoacylierungskapazität des Gesamtsystems ermöglicht.

Als Matrize für die Proteinsynthese wurde, wenn nicht anders erwähnt, linearisierte Plasmid-DNA eingesetzt. Zu Gunsten einer besseren Lesbarkeit werden tRNAs abweichend von der offiziellen Nomenklatur mit einem vorangestellten "t" gekennzeichnet. Handelt es sich um *amber*-Suppressor-tRNAs, wird auf die Wiedergabe des Anticodons CUA im tRNA-Namen verzichtet (z.B. tLeu5; offizielle Nomenklatur tRNA<sup>Leu5</sup><sub>CUA</sub>). Alle anderen tRNA-Namen enthalten die Sequenz des Anticodons im Namen. mRNAs und Plasmide werden mit vorangestelltem "m" bzw. "p" (z.B. mHMFA<sub>w</sub>, pHMFA<sub>w</sub>) gekennzeichnet. Zur Identifizierung von Matrizen gleicher Herkunft wird das zur Linearisierung des Plasmids bzw. zur Definierung des 3'-Endes verwendete Restriktionsenzym in Klammern gesetzt (z.B. ptPheY(FokI)). Anstelle des deutschen Wortes Gesamt-tRNA-Präparation wird der Ausdruck Bulk-tRNA verwendet. Die entsprechenden Bulk-tRNAs werden mit einem Kürzel, bestehend aus der Silbe "Amb" (für *amber*) und dem Kürzel für die Aminosäure, die durch die entsprechende in der Bulk-tRNA-Präparation enthaltende *amber*-Suppressor-tRNA eingebaut wird, bezeichnet (z.B. AmbLeu für eine Bulk-tRNA-Präparation, die die *amber*-Suppressor-tRNA tLeu enthält). Informationen zu Plasmid- und RNA-Sequenzen sind dem Anhang (Kapitel 10) zu entnehmen.

### 5.1. Aufbau und Charakterisierung von *amber*-Suppressions-Assays

Der Nachweis der Suppression beruht auf der Unterscheidung von Suppression und Termination. Zum Nachweis von Suppressionsereignissen mußte in der Arbeitsgruppe zunächst ein entsprechendes Nachweissystem etabliert werden, das auf die Verwendung in der *in vitro* Translation zugeschnitten und mit den in der Arbeitsgruppe vorhandenen Analysemethoden kompatibel war. Für die Konstruktion des Versuchssystems wurden verschiedene Proteine in Betracht gezogen, von denen zunächst die entsprechenden *amber*-Varianten hergestellt werden mußten. Letztendlich wurden in der vorliegenden Arbeit die *amber*-Varianten von drei verschiedenen Proteinen verwendet, von FABP (fatty acid binding protein) aus Rinderherz, von CAT (chloramphenicol acetyl transferase) und von RBD (ras binding domaine des ras bindenden Proteins). Der grundlegende Unterschied zwischen den prinzipiell möglichen Systemen wird am Beispiel zweier FABP-*amber*-Varianten deutlich, deren Konstruktion und Eigenschaften nachfolgend beschrieben werden.

Abb. 10

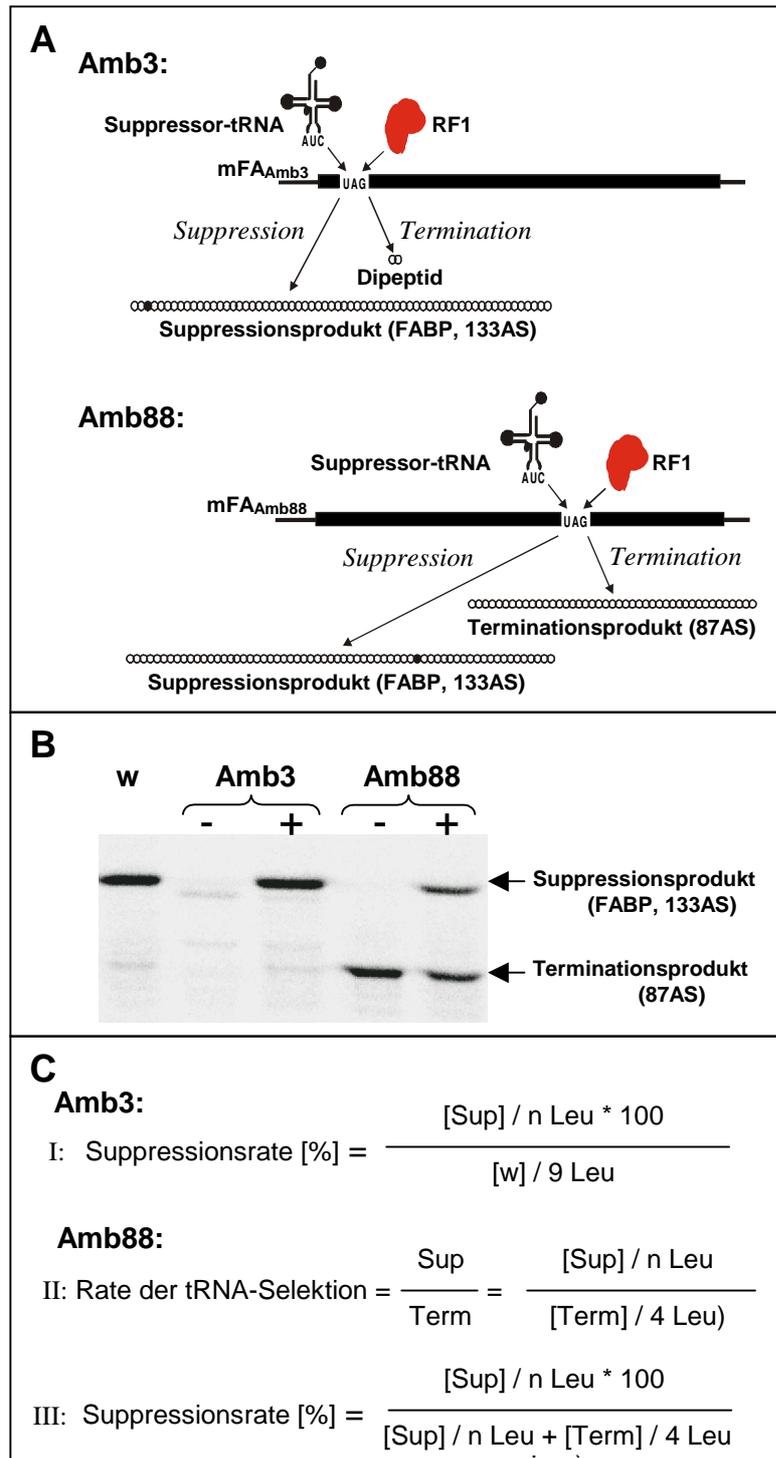


Aufbau der für Expression von FABP und FABP-*amber*-Varianten verwendeten Vektoren:

**A:** Skizze des für die Konstruktion der verschiedenen *amber*-Mutanten verwendeten Grundvektors. Für die gekoppelte Transkription/ Translation oder die präparative Transkription von mRNA wird der Vektor mit EcoRI linearisiert.

**B:** Kontext und Lage der in das Gen für FABP eingeführten *amber*-Codons. Position 1 entspricht dem Startpunkt des kodierenden Bereichs des fabp-Gens, Position 134 dem Ende (vgl. A, gleiche Abbildung). Für die Konstruktion von pHMFA<sub>Amb3</sub> wurde Codon 3, für die Konstruktion von pHMFA<sub>Amb88</sub> wurde Codon 88 gegen TAG ausgetauscht. Die *amber*-Codons liegen bezüglich der 5'- und 3'- direkt benachbarten Basen in identischen Kontexten.

Abb. 11



Charakterisierung der beiden in der Arbeit verwendeten FABP-amber-Varianten:

**A:** Schematische Darstellung der Suppression in FABP<sub>Amb3</sub> und FABP<sub>Amb88</sub>:

**Amb3:** Die Konkurrenz zwischen Suppressor-tRNA und RF1 während der Translation von mFA<sub>Amb3</sub> führt im Falle der Termination zu einem kurzen Dipeptid, das gelelektrophoretisch nicht nachzuweisen ist (vgl. B, gleiche Abbildung). Die Suppression führt zur Synthese von FABP.

**Amb88:** Die Konkurrenz zwischen Suppressor-tRNA und RF1 während der Translation von mFA<sub>Amb88</sub> führt im Falle der Termination zu einem 87 Aminosäuren langen Terminationsprodukt, das dem ersten zwei Dritteln der FABP-Sequenz entspricht und gelelektrophoretisch nachweisbar ist (vgl. B, gleiche Abbildung). Die Suppression führt wie im Falle von Amb3 zur Synthese des vollständigen ("full-length")-FABP.

**B:** PhosphoImage eines Gels mit den während der Translation der verschiedenen FABP-Varianten entstehenden Peptiden:

w: "Wildtyp"-fabp; **Amb3**: fabp-amber-Mutante mit amber-codon an Position 3; **Amb88**: fabp-amber-Mutante mit amber-codon an Position 88; +: Reaktion in Anwesenheit von amber-Suppressor-tRNA; -: Reaktion in Abwesenheit von amber-Suppressor-tRNA

*In vitro*-Translationsreaktionen wurden durchgeführt wie unter Material und Methoden beschrieben. 12 µl-Aliquots einer jeden Reaktion wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das <sup>14</sup>C-markierte Protein mit dem PhosphoImager detektiert.

**C:** Berechnung der Suppressionseffizienz:

Die Quantifizierung der Proteinsynthese erfolgt über den Einbau von <sup>14</sup>C-Leucin.

**Amb3:** Für die Suppression in FABP<sub>Amb3</sub> kann auf der Basis der Expression von FABP<sub>Amb3</sub> und FABP<sub>w</sub> eine Suppressionsrate in % angegeben werden, wobei die Proteinexpression über eine TCA-Fällung oder über eine Quantifizierung der entsprechenden Banden im Gel mit dem Programm ImageQuant quantifiziert wird (Formel I).

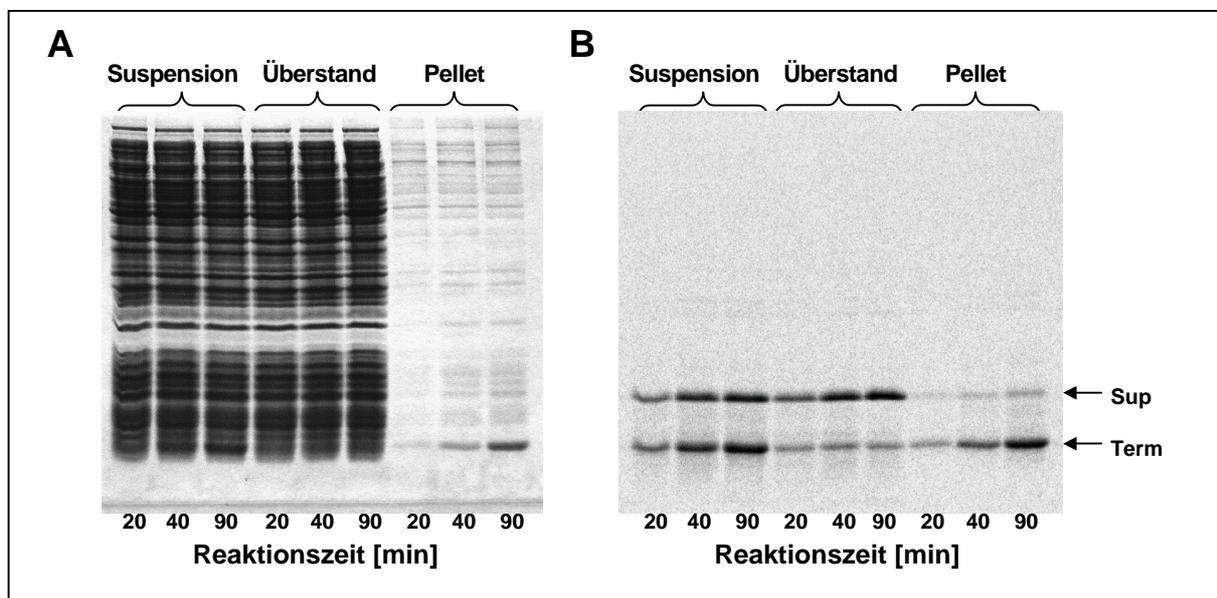
**Amb88:** Für die Suppression in FABP<sub>Amb88</sub> berechnet sich das molare Verhältnis zwischen Suppressions- und Terminationsprodukt, die Rate der tRNA-Selektion, aus den Intensitäten der entsprechenden Banden im Gel (Formel II). Alternativ kann eine Suppressionsrate angegeben werden, die dem prozentualen Anteil des Suppressionsproduktes an der Summe aus Suppressions- und Terminationsprodukt entspricht (Formel III).

[Sup]: Radioaktivität des (mit <sup>14</sup>C-Leucin markierten) Suppressionsproduktes, [w]: Radioaktivität von "Wildtyp"-FABP, [Term]: Radioaktivität des Terminationsproduktes; n: Anzahl der Leucine im Molekül (wird zur Berechnung molarer Peptidmengen berücksichtigt, n = 9 oder 10), Leu: Leucin ("Wildtyp"-FABP enthält 9 Leu, das Terminationsprodukt 4 Leu), Sup/Term: molares Verhältnis aus Suppressions- und Terminationsprodukt.

Für die Konstruktion der in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich verwendeten *amber*-Varianten wurde mit dem FABP (aus Rinderherz) ein Protein ausgewählt, dessen Eigenschaften in der *in vitro*-Translation hervorragend charakterisiert waren. Ausgehend vom Vektor pHMFA<sub>w</sub>, der das Gen für FABP enthielt, wurden mittels PCR-gerichteter Mutagenese zwei neue Plasmidkonstrukte hergestellt, pHMFA<sub>Amb3</sub> und pHMFA<sub>Amb88</sub>: pHMFA<sub>Amb3</sub> enthält eine *amber*-Mutation an Aminosäureposition 3 im kodierenden Bereich des Gens für FABP, pHMFA<sub>Amb88</sub> eine *amber*-Mutation an Aminosäureposition 88 (Abb.10). Die korrekten Sequenzen der beiden Konstrukte wurden durch Sequenzierung der entsprechenden Plasmide verifiziert.

Die während der Translation der beiden Konstrukte pHMFA<sub>Amb3</sub> und pHMFA<sub>Amb88</sub> in An- und Abwesenheit von *amber*-Suppressor-tRNA entstehenden Peptide wurden gelelektroporetisch analysiert (Abb.11B, S.73). Die Kontrollreaktion mit dem für die Konstruktion der beiden *amber*-Mutanten verwendeten Ausgangsplasmid (pHMFA<sub>w</sub>) zeigt, daß der Wildtyp von FABP unter den verwendeten Standardbedingungen von 12 mM Magnesium und einer Temperatur von 37°C in einer äußerst homogenen Zusammensetzung exprimiert wurde. Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Varianten besteht in der Nachweisbarkeit der Terminationsprodukte. Die Termination führt im Falle von

Abb. 12



*Löslichkeit der bei der Translation von pHMFA<sub>Amb88</sub> entstehenden Peptide:*

Gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktionen wurden durchgeführt wie unter Material und Methoden beschrieben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden den Reaktionen Aliquots entnommen und wie folgt analysiert: Ein Teil der Reaktion wurde als Suspension entnommen und für die Elektrophorese vorbereitet. Der andere Teil der Reaktion wurde für drei Minuten in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Pellet und Überstand dieser Zentrifugation wurden hiernach für die Elektrophorese vorbereitet. Suspension, Überstand und Pellet wurden einer SDS-Page unterworfen und das <sup>14</sup>C-markierte Protein mit einem PhosphorImager detektiert.

**A:** Coomassiefärbung des Gels; **B:** PhosphorImage des Gels; **Sup:** Suppressionsprodukt, **Term:** Terminationsprodukt.

FABP<sub>Amb3</sub> zur Expression eines Dipeptids, das gelelektrophoretisch - und auch über eine TCA-Fällung - nicht nachweisbar war. In Anwesenheit der *amber*-Suppressor-tRNA führt die Translation von pHMFA<sub>Amb3</sub> zu dem gleichen Expressionsmuster wie die des entsprechende Wildtyp pHMFA<sub>w</sub>.

Im Falle von pHMFA<sub>Amb88</sub> war das entstehende 87 Aminosäuren lange Terminationsprodukt sowohl gelelektrophoretisch als auch mittels TCA-Fällung hervorragend nachzuweisen. In Abwesenheit von Suppressor entstanden keine Peptide, die länger waren als das Terminationsprodukt. Die Anwesenheit der *amber*-Suppressor-tRNA führt zu einer deutlichen Expression von "full-length"-Protein neben der des Terminationsproduktes. Bemerkenswert ist, daß das gegenüber dem Wildtyp von FABP um 56 Aminosäuren verkürzte Terminationsprodukt unter nativen Bedingungen eine wesentlich geringere Löslichkeit aufwies als das Suppressionsprodukt (Abb.12). Das 87 Aminosäuren lange Terminationsprodukt ließ sich durch eine kurze Zentrifugation der Reaktionsansätze nahezu komplett sedimentieren. Für die gelelektrophoretische Analyse der Reaktionsprodukte spielte dies allerdings keine Rolle, da die Reaktionsansätze nach Ablauf der Reaktionszeit ohnehin durch Acetonfällung präzipitiert wurden.

### 5.1.1 Berechnung der Suppressionseffizienz

Mögliche Nachweissysteme zur Quantifizierung von Suppressionsereignissen weisen grundsätzliche Unterschiede auf, je nachdem ob in den betreffenden Systemen ausschließlich nur das Suppressionsprodukt oder Suppressions- und Terminationsprodukt erfaßt werden. Für die Angabe der Suppressionseffizienz gibt es in der Literatur verschiedene Berechnungsgrundlagen. Die meisten Autoren verwenden Versuchssysteme, die keine Erfassung der Terminationsprodukte erlauben (z.B.: Garen et al. 1965, Zubay et al. 1971, Bossi und Roth 1980, Miller und Albertini 1983, Kleina et al. 1990, Normanly et al. 1990). Die Berechnung der Suppressionseffizienz beruht in diesen Fällen auf dem Vergleich zwischen *amber*-Mutante und einem Konstrukt, das an der betreffenden Aminosäureposition kein *amber*-Codon besitzt, in der Regel der Wildtyp. Die entsprechende mRNA des Wildtyps besitzt in diesem Fall eine andere Sequenz als die der *amber*-Mutante und wird in einem anderen Zellstamm - oder einer anderen *in vitro*-Translationsreaktion - exprimiert. Die Suppressionsrate entspricht dem prozentualen Anteil des gebildeten Suppressionsproduktes an einer theoretisch möglichen maximalen Synthese, die anhand der Expression des Wildtyps bestimmt wird. Suppressionsraten, die mit dieser Methode bestimmt werden, zeigen einen nichtlinearen Verlauf. Für Suppressoren mit einer guten Suppressionseffizienz wird relativ schnell eine Sättigung erreicht. Analog hierzu wurde die Suppressionseffizienz für das Konstrukt pHMFA<sub>Amb3</sub> auf der Basis der Expression von FABP-*amber*-Mutante und FABP-Wildtyp berechnet (Abb.11C, Seite 73, Formel I). Hierzu konnte das entstandene Produkt

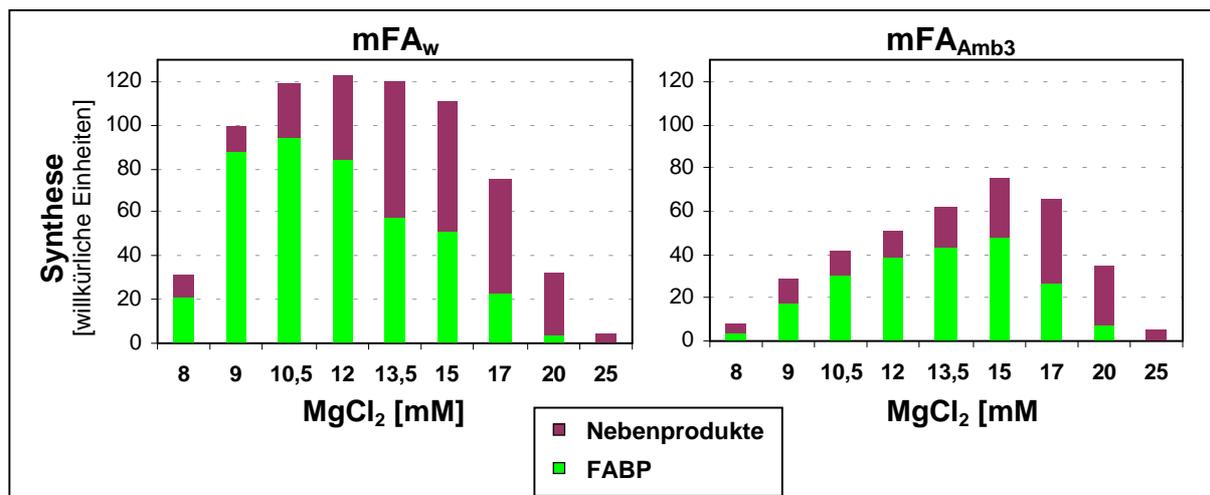
entweder mittels TCA-Fällung oder nach gelelektrophoretischer Auftrennung der radioaktiv markierten Peptide quantifiziert werden. Bei der Berechnung wurde die in den entsprechenden Peptiden enthaltene Menge an radioaktiver Aminosäure berücksichtigt, so daß sich die in der Arbeit angegebenen Suppressionsraten auf die Molarität der Translationsprodukte beziehen.

Eine wesentlich genauere Bestimmung der Suppressionseffizienz kann mit Hilfe des Konstruktes pHMFA<sub>Amb88</sub> durchgeführt werden. Suppression und Termination können bei diesem Konstrukt anhand der Expression von Suppressionsprodukt und Terminationsprodukt in einer einzelnen Spur im Gel quantifiziert werden. Die Suppressionseffizienz wird hier anhand des Verhältnisses zwischen Suppressions- und Terminationsprodukt bestimmt. Die Quantifizierung von Suppressions- und Terminationsprodukt erfolgte hierbei ausschließlich anhand der Intensitäten der entsprechenden Banden in der Autoradiographie des Gels, die mit dem PhosphoImager-System ermittelt wurden. Da Suppressions- und Terminationsprodukt in derselben Translationsreaktion erzeugt werden und von derselben mRNA stammen, sind mögliche Veränderungen im Verhältnis der beiden Proteinprodukte eine direkte Funktion der Konkurrenz der verwendeten *amber*-Suppressor-tRNAs mit Terminationsfaktor RF1 um das *amber*-Codon auf der mRNA. Die Bestimmung der Suppressionseffizienz sollte folglich unabhängig von der Gesamtmenge an Translationsprodukt sein, das in der Reaktion gebildet und auf das Gel aufgetragen wurde. Durch die Angabe des molaren Verhältnisses zwischen Suppressions- und Terminationsprodukt (Sup/Term, Rate der tRNA-Selektion) wird eine direkte Aussage über die Rate möglich, mit der die *amber*-Suppressor-tRNA durch den ribosomalen Komplex ausgewählt wird (Abb. 11C, Seite 73, Formel II). Die Rate der tRNA-Selektion steigt hierbei linear mit der Suppressionseffizienz an, wodurch auch eine genaue Unterscheidung guter *amber*-Suppressoren möglich ist. Eine analoge Form der Berechnung findet sich in der Literatur bei Crawford et al. (1999).

### **5.1.2 Der Einfluß der Magnesiumkonzentration auf Translation und Suppression am Beispiel von FABP<sub>W</sub> und FABP<sub>Amb3</sub>**

Viele biochemische Reaktionen sind abhängig vom Vorhandensein zweiwertiger Kationen. In Systemen für die zellfreie Proteinbiosynthese ist besonders die Konzentration an Mg<sup>2+</sup> wichtig (Gold und Schweiger 1969, Ma et al. 1993). Die Konzentration an Magnesiumionen muß in der Regel für jede neue Aufarbeitung eines *in vitro* Translationssystems neu optimiert werden. Der Einfluß der Magnesiumkonzentration auf Ausbeute und Zusammensetzung der in der *in vitro* Translation entstehenden Proteine wird am Beispiel von FABP<sub>Amb3</sub> deutlich. Sowohl die Gesamtmenge als auch die Homogenität der Translationsprodukte zeigten eine große Abhängigkeit von der Konzentration der Magnesium-Ionen (Abb. 13). Hierbei war die Homogenität der Translationsprodukte bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen deutlich größer als bei höheren Konzentrationen. Mit zunehmender Magnesiumkonzentration kam es zu einem deutlich vermehrten Auftreten von Nebenprodukten. Eine weitere Erhöhung der

Abb. 13



Einfluß der Magnesiumkonzentration auf Menge und Homogenität der bei der *in vitro* Translation von mFA<sub>w</sub> und mFA<sub>Amb3</sub> entstehenden Proteinprodukte:

*In vitro*-Translationsreaktionen wurden in Anwesenheit von Bulk-tRNA AmbLeu wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Aliquots der Reaktionen wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das <sup>14</sup>C-markierte Protein mit dem PhosphoImager detektiert. Ein anderer Teil einer jeden Reaktion wurde mit TCA gefällt und die mit <sup>14</sup>C-Leucin markierten Proteine mittels Flüssig-Szintillationszählung quantifiziert. Auf der Basis der ermittelten TCA- und PhosphoImager-Daten wurde nun die Menge an FABP sowie die Menge der während der Translation entstehenden Nebenprodukte berechnet. Die Gesamtsynthese pro Reaktion ließ sich hierbei anhand der TCA-Werte bestimmen. Der relative Anteil von "full-length"-FABP (14,7 kDa) sowie der Nebenprodukte an der Gesamtsynthese wurde anhand der PhosphoImager-Werte berechnet.

**FABP:** Menge der Proteine mit erwartetem Molekulargewicht von 14,7 kDa; **Nebenprodukte:** Menge aller sonstigen in jeder Reaktion synthetisierten Peptide.

Bezogen auf die Synthese an "full-length"-FABP zeigt die Translation von mFA<sub>Amb3</sub> ein deutlich höheres Magnesiumoptimum als die von mFA<sub>w</sub>. Die Menge an unerwünschten Nebenprodukten nimmt mit zunehmender Magnesiumkonzentration stark zu. Die Translationsreaktion wird mit zunehmender Magnesiumkonzentration sehr schnell unspezifischer.

Magnesiumkonzentration führte schließlich zum Erliegen der Translation. Letztendlich ist das Profil der Magnesiumabhängigkeit des in der vorliegenden Arbeit verwendeten fraktionierten Systems nahezu identisch mit dem des von Gold und Schweiger für die Synthese von  $\beta$ -Glycosyltransferase verwendeten fraktionierten Systems (Gold und Schweiger 1969), auf deren Studien das in der vorliegenden Arbeit verwendete System ja auch im Prinzip zurückgeht. Gold und Schweiger führten die Zunahme an Nebenprodukten auf eine bei höheren Magnesiumkonzentrationen unspezifischere Initiation der Translation zurück.

Die Synthese der Suppressionsprodukte zeigte ein deutlich höheres Magnesiumoptimum als die Synthese des Wildtyps. Das Resultat hiervon war eine drastische Erhöhung der Suppressionsrate bei höheren Magnesiumkonzentrationen. Eine ähnliche Relation zwischen Magnesiumkonzentration und Suppression wurde auch von Ma et al. (1993) gefunden. Bei der Interpretation von Suppressionsdaten muß somit die Magnesiumkonzentration in Betracht gezogen werden. Zugunsten einer größeren Homogenität der Translationsprodukte wurde standardmäßig auf einen Teil der Ausbeute an Suppressionsprodukt verzichtet und bei Magnesiumkonzentrationen zwischen 10 und 12 mM gearbeitet.

## 5.2 Vergleich der Suppressionsaktivität von Gesamt-tRNA-Präparationen aus verschiedenen *Escherichia coli*-amber-Suppressor-Zellstämmen

In der Literatur gibt es umfangreiche Studien zur Aktivität verschiedener *amber*-Suppressor-tRNAs *in vivo* (Bossi und Roth 1980, Miller und Albertini 1983, Kleina et al. 1990, Ericson und Björk 1991, Rennel et al. 1991, Mottagui-Tabar 1998). Diese Untersuchungen basieren auf der Verwendung von *Escherichia coli*-Zellstämmen, in denen die entsprechenden *amber*-Suppressor-tRNAs auf chromosomalen Genen liegen. Beispiele hierfür sind tSer (su+1), tGln (su+2), tTyr (su+3) oder tLeu (su+6). Ende der 80er Jahre wurde das Spektrum der zur Verfügung stehenden in *Escherichia coli* exprimierbaren *amber*-Suppressor-tRNAs durch die Untersuchungen der Gruppe Miller wesentlich erweitert (Masson und Miller 1986, Normanly et al. 1986, Kleina et al. 1990, Normanly et al. 1990). Mit Hilfe Plasmid codierter *amber*-Suppressor-tRNAs konnten nun neue Zellstämme konstruiert werden. Die *amber*-Suppressor-tRNA-Gene stehen in diesen Zellstämmen unter der Kontrolle der Promotor-Sequenz des Lipoprotein-Gens aus *Escherichia coli* (Masson und Miller 1986).

Zellstamm	<i>amber</i> -Suppressor-tRNA	Gen (Bezeichnung)	Wachstum der Stämme in M9-Medium (ohne Arginin)
AmbSer	tSer	chromosomal (su+1)	++
AmbTyr	tTyr	chromosomal (su+3)	++
AmbLys	tLys	chromosomal (su+5)	++
AmbLeu	tLeu, su+6	chromosomal (su+6)	++
AmbArg	tArg1	Plasmid	++
AmbCys	tCys	Plasmid	+
AmbGly	tGly1	Plasmid	+
AmbHis	tHisA	Plasmid	++
AmbPhe	tPhe, E.c.	Plasmid	+
Kontrolle	-	-	-

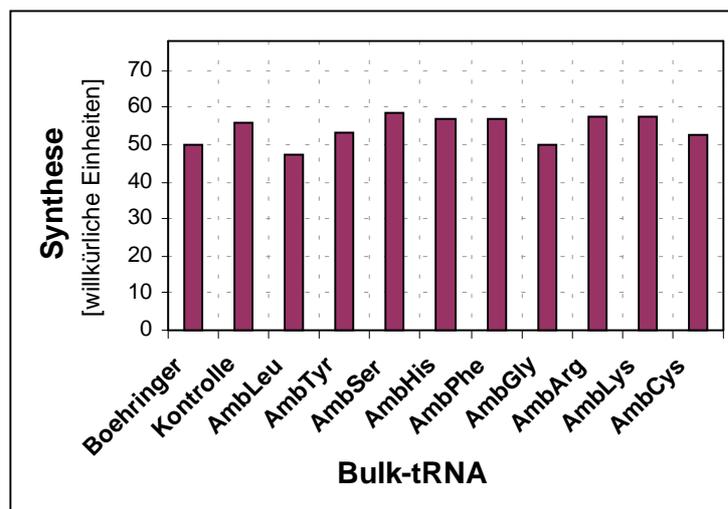
Tabelle 17: Übersicht über die zur Präparation von Gesamt-tRNA verwendeten Zellstämme

Um die umfangreichen *in vivo*-Ergebnisse in der Literatur mit den Verhältnissen *in vitro* in Beziehung setzen zu können, wurden Gesamt-tRNA-Präparationen (Bulk-tRNAs) aus insgesamt 10 verschiedenen *Escherichia coli*-Zellstämmen in der *in vitro*-Translation eingesetzt. 9 dieser Zellstämme enthielten Gene für verschiedene *amber*-Suppressor-tRNAs (Kleina et al. 1990, Normanly et al. 1990), ein Zellstamm, der keine Suppressor-tRNA exprimiert, diente als Kontrolle zur Bestimmung der "Read-through"-Rate. Alle Zellstämme enthielten zur Aufrechterhaltung der Suppressoraktivität eine Mutation in einem Schlüsselenzym des Argininbiosyntheseweges ( $argE^{am}$ ). Die Zellstämme sollten somit in Abwesenheit von Arginin in Minimalmedium (M9) nur dann wachsen können, wenn die *amber*-Suppressor-tRNAs auch exprimiert werden. Um einen zusätzlichen Selektionsdruck ausüben zu können, enthielten alle Zellstämme mit Plasmid codierten *amber*-Suppressor-tRNAs Antibiotikaresistenzen auf den entsprechenden Plasmiden.

Die Expression der *amber*-Suppressor-tRNAs während der Anzucht der Zellen wurde kontrolliert, indem die Zellen in Minimalmedium, das kein Arginin enthielt, mit den entsprechenden Antibiotika vorkultiviert wurden. Der Kontrollstamm war erwartungsgemäß nicht in der Lage, in diesem Medium zu wachsen, während alle anderen Zellstämme wachsen konnten (Tab.17). In diesen Stämmen wurde folglich die entsprechende *amber*-Suppressor-tRNA exprimiert.

Für die Präparation von möglichst aktiver Bulk-tRNA erwies es sich als entscheidend, eine möglichst schonende Zellaufschlußmethode anzuwenden. Das zunächst angewandte Verfahren, die Zellen enzymatisch mit Lysozym aufzuschließen (in Verbindung mit dem Zusatz von NaDeoxycholat und DNaseI) brachte sehr gute Ausbeuten an tRNA (bis zu 4 mg/g Frischgewicht Zellen). Die tRNA war aber vollkommen inaktiv in der *in vitro* Translation, obwohl sie gelektrophoretisch nicht von aktiven Präparationen zu unterscheiden war. Letztendlich wesentlich erfolgreicher war das mechanische Aufbrechen der Zellen mit Hilfe

Abb. 14



Aktivität von Gesamt-tRNA-Präparationen (Bulk-tRNA) aus verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen anhand der Expression von  $FABP_w$  in der gekoppelten Transkription/ Translation im fraktionierten System:

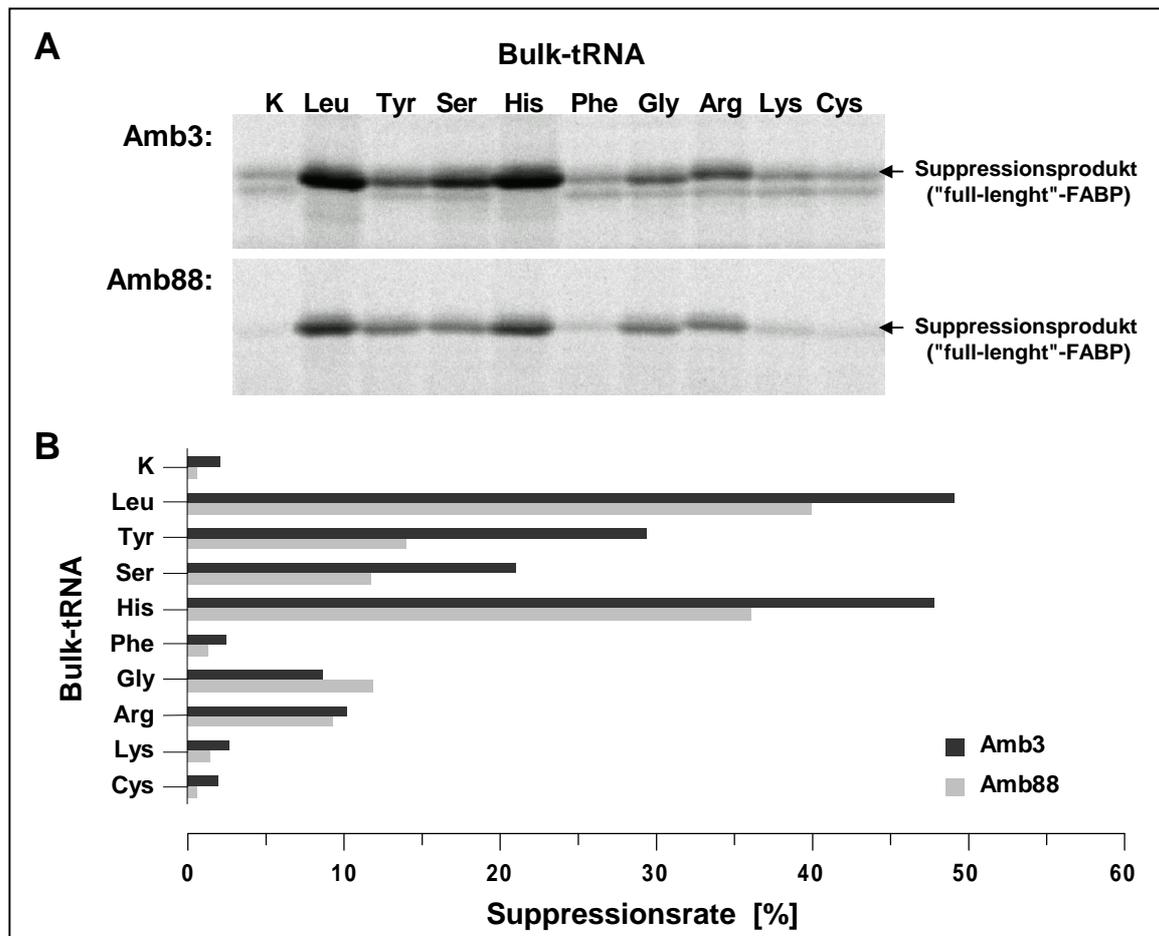
*In vitro*-Translationsreaktionen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Aliquots der Reaktionen wurden mit TCA gefällt und das TCA-fällbare,  $^{14}C$ -markierte Protein mittels Flüssigszintillationszählung quantifiziert. Die Standardabweichung zwischen zwei Meßwerten betrug maximal 10%.

**Boehringer:** kommerziell erhältliche Bulk-tRNA der Firma Roche, **Kontrolle:** Bulk-tRNA-Aufarbeitung aus einem Zellstamm, der keine Suppressor-tRNA exprimiert.

von Alcoa. Mit dieser Aufschlußmethode wurden Bulk-tRNAs erhalten, deren Aktivität in der *in vitro* Translation in etwa bei der käuflich erhältlicher Gesamt-tRNA lag (Abb. 14).

Die Gesamt-tRNA-Präparationen aus den unterschiedlichen *amber*-Suppressor-Zellstämmen wurden nun zur Suppression des *amber*-Codons in  $FABP_{Amb3}$  und  $FABP_{Amb88}$  eingesetzt. Die Aktivitäten der verschiedenen, in den einzelnen Gesamt-tRNA-Präparationen vorhandenen *amber*-Suppressor-tRNAs erwiesen sich als äußerst unterschiedlich. Die beste Suppressionsrate zeigte Bulk-tRNA AmbLeu mit nahezu 50% in  $FABP_{Amb3}$ . Drei der eingesetzten Bulk-tRNAs (AmbLys, AmbPhe und AmbCys) zeigten keine deutlich

Abb. 15



Vergleich der Suppressionsaktivität von Gesamt-tRNA-Präparationen (Bulk-tRNA) aus verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen anhand der Expression von  $FABP_{Amb3}$  und  $FABP_{Amb88}$ :

Zur Untersuchung der Aktivität *in vivo* exprimierter *amber*-Suppressor-tRNAs wurde die Aktivität von Bulk-tRNAs aus verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen anhand der Expression von  $FABP_{Amb3}$  und  $FABP_{Amb88}$  im fraktionierten System untersucht.

**A:** PhosphoImage des Gels. Aliquots gekoppelter *in vitro*-Translationsreaktionen wurden einer Gelelektrophorese unterzogen und das radioaktiv markierte Protein mit dem PhosphoImager detektiert. Gezeigt ist jeweils der Ausschnitt des Autoradiogramms mit den Suppressionsprodukten (←).

**B:** Suppressionsraten der verschiedenen Bulk-tRNAs. Für  $Amb3$  wurden Reaktionen mit TCA gefällt und das TCA-fällbare,  $^{14}C$ -markierte Protein mittels Flüssigszintillationszählung quantifiziert. Für jede Bulk-tRNA wurde eine Vergleichsreaktion mit  $pHMFA_w$  durchgeführt. Die Expression von "Wildtyp"-FABP in dieser Vergleichsreaktion wurde jeweils zur Berechnung der Suppressionsrate herangezogen (vgl. Formel I, Abb. 11, Seite 71). Für  $Amb88$  wurden die Intensitäten der Banden von Suppressions- und Terminationsprodukt mit dem Programm ImageQuant quantifiziert und die Suppressionsraten nach der in Abb. 11, Seite 71 angegebenen Formel III berechnet.

**Amb3:** Expression von  $pHMFA_{Amb3}$ , **Amb88:** Expression von  $pHMFA_{Amb88}$ ; **K:** Bulk-tRNA-Aufarbeitung aus einem *Escherichia coli*-Stamm, der keine Suppressor-tRNA exprimiert. **Leu, Tyr, Ser, His, Phe, Gly, Arg, Lys, Cys:** Bulk-tRNAs aus den entsprechenden *amber*-Suppressor-Zellstämmen.

Die Relationen zwischen den Aktivitäten der verschiedenen *amber*-Suppressor-tRNAs sind für beide  $FABP$ -*amber*-Varianten ähnlich. Die Leucyl-*amber*-Suppressor-tRNA (Leu) zeigt in beiden Fällen die beste Suppression, gefolgt von der Hystidyl-*amber*-Suppressor-tRNA (His). Einige der *amber*-Suppressor-tRNAs zeigen in beiden  $FABP$ -*amber*-Varianten keine nachweisbare Suppression.

*Anmerkung:* Bei  $Amb3$  ist in einigen Fällen eine Doppelbande sichtbar (beispielsweise bei K, Phe, Lys und Cys). Die untere der beiden Banden tritt etwas zurück, wenn die obere Bande, bei der es sich um "full-length"-FABP handelt, stärker exprimiert wird. Bei dem Peptid in der Bande unterhalb von "full-length"-FABP handelt es sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um eine verkürzte Variante von FABP, die durch eine Initiation der Translation am Codon 12 (GUG) entsteht (Merk 2000, dortige Abb. 4 auf Seite 53).

nachweisbare Suppression. Dies ist offensichtlich nicht auf die mangelnde Aktivität der Gesamt-tRNA-Präparationen zurückzuführen, wie die Synthese von "Wildtyp"-FABP zeigt (vgl. Abb.14). Diese lag auch bei den Bulk-tRNAs mit nicht nachweisbarer Suppressionsaktivität auf dem Niveau der übrigen Gesamt-tRNA-Präparationen. *In vivo* wurden die Aktivitäten der in der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersuchten *amber*-Suppressor-tRNAs anhand der Expression von lacI/lacZ durch Kleina et al. (1990) untersucht. In der Studie von Kleina zeigen auch die *amber*-Suppressor-tRNAs für Lysin (AmbLys), Phenylalanin (AmbPhe) und Cystein (AmbCys) eine sehr deutliche Suppression. AmbPhe gehört *in vivo* sogar zu den Suppressoren mit der höchsten Aktivität.

### 5.2.1 Simulation von "*in vivo*-Verhältnissen" in einem *in vitro*-Translationssystem

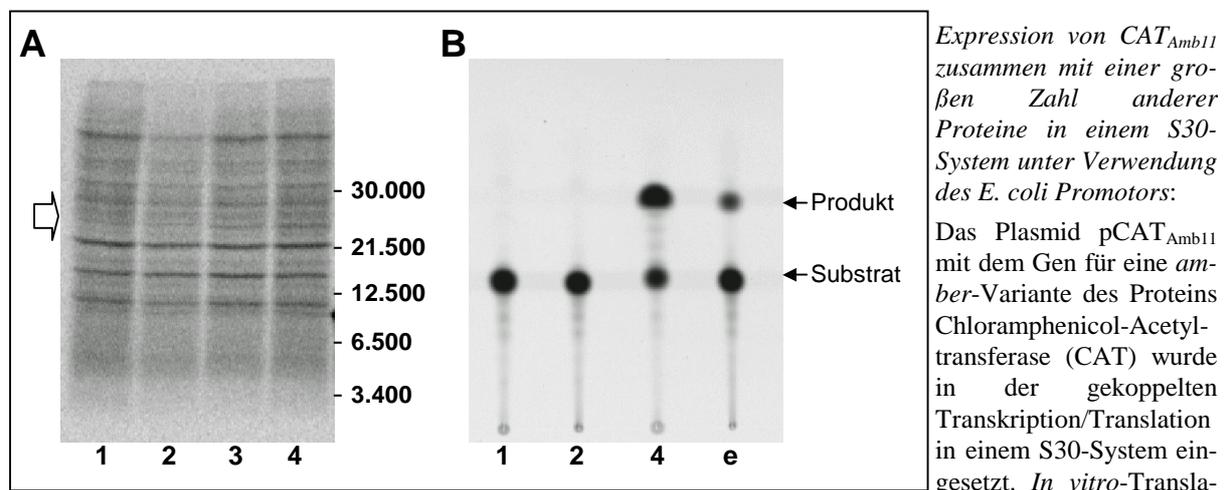
Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Expression eines Proteins *in vivo* und der eines Proteins *in vitro* ist, daß in einer *in vitro* Translationsreaktion in der Regel nur ein einziges Protein synthetisiert wird, während *in vivo* die Expression des gewünschten Proteins neben der normalen in der Zelle stattfindenden Proteinexpression erfolgt. Aus diesem Grund verwenden die meisten Autoren für die Analyse der Suppression *in vivo* Systeme, in denen die Aktivität von *amber*-Suppressor-tRNAs mit Hilfe enzymatisch aktiver *Proteine* bestimmt wird (Garen et al. 1965, Miller und Albertini 1983, Kleina et al. 1990, Normanly et al. 1990, Weygand-Durasevic et al. 1994). Mit dem Ziel, die Verhältnisse während der *in vitro* Translation mehr denen *in vivo* anzugleichen, wurden Suppressionsversuche in einem anderen *in vitro*-Translationssystem durchgeführt. Hierbei wurden die Bedingungen innerhalb des verwendeten Systems bewußt so gestaltet, daß neben der gewünschten *amber*-Variante des Reporterproteins möglichst viele andere Proteine koexprimiert wurden. Da der Terminationsfaktor RF1 neben dem *amber*-Codon UAG auch das *opal*-Codon UGA erkennt, das in der Mehrzahl der Proteingene als Stopp-Codon vorkommt, während die *amber*-Suppressor-tRNA nur das *amber*-Codon erkennt, sollte die Konkurrenz von RF1 mit der *amber*-Suppressor-tRNA in einem solchen Fall nicht so stringent für die Suppression sein.

Die folgenden Versuche wurden in einem nicht fraktionierten System, einem sogenannten S30-System durchgeführt. In dem entsprechenden für die Herstellung des S30-Systems verwendeten Zelllysate verbleiben gewöhnlich größere Mengen chromosomaler DNA. Die Expression der in dieser DNA kodierten Proteine während der *in vitro*-Translation ist normalerweise unerwünscht und kann dadurch verhindert werden, daß man die zelleigene *Escherichia coli* RNA-Polymerase durch die Zugabe von Rifampicin in die Lysate inhibiert. Unterbleibt die Inhibition der *Escherichia coli* RNA-Polymerase, wird eine größere Zahl von *Escherichia coli*-Proteingenen neben dem gewünschten zugegebenen Proteingen während der *in vitro*-Translationsreaktion koexprimiert.

Für die nachfolgenden Versuche wurde ein möglichst niedriger Anteil der *amber*-Variante des Reporterproteins an der Gesamtmenge der synthetisierten Proteine und ein enzymatischer Nachweis der entstehenden Suppressionsprodukte angestrebt. Mit den bisher verwendeten *amber*-Varianten von FABP waren diese Vorgaben - vor allen Dingen auf Grund der zu starken Expression - nicht zu erfüllen.

Aus diesem Grund wurden die nun folgenden Suppressionsversuche mit einer *amber*-Variante des Proteins Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) durchgeführt. Als Kontrolle für die Aktivität der jeweils verwendeten Gesamt-tRNA-Präparation diente der entsprechende Wildtyp des Proteins. Die entsprechenden für die gekoppelte Transkription/Translation verwendeten Plasmide bekamen die Bezeichnung pCAT<sub>Amb11</sub> und pCAT<sub>w</sub>, wobei pCAT<sub>w</sub> mit dem häufig für *in vivo*-Studien verwendeten Plasmid pACYC184 identisch ist. Das Gen der

Abb. 16



Das Plasmid pCAT<sub>Amb11</sub> mit dem Gen für eine *amber*-Variante des Proteins Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) wurde in der gekoppelten Transkription/Translation in einem S30-System eingesetzt. *In vitro*-Translationsreaktionen wurden in An- und Abwesenheit von pCAT<sub>Amb11</sub> sowie von Bulk-tRNA AmbLeu durchgeführt. Ein Teil der Reaktionen wurde einer SDS-PAGE unterworfen und das <sup>14</sup>C-markierte Protein mit dem PhosphoImager detektiert. Ein anderer Teil der Reaktionen wurde für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von CAT mittels CAT-Assay eingesetzt.

**A:** PhosphoImage des Gels. **1:** Reaktion ohne Matrize; **2, 3 und 4:** Reaktionen in Anwesenheit der Matrize pCAT<sub>Amb11</sub>; **2:** ohne zusätzliche Bulk-tRNA aus einem *amber*-Suppressor-Zellstamm, **3 und 4:** mit 200 bzw. 400 µg/ml Bulk-tRNA AmbLeu. der Blockpfeil (⇨) markiert die erwartete Position von Chloramphenicol-Acetyltransferase im SDS-Gel.

**B:** Fluographie der Dünnschichtplatte des CAT-Assays, mit dem die enzymatische Aktivität von CAT in den unter A mittels SDS-PAGE analysierten *in vitro* Translationsreaktionen bestimmt wurde. **1, 2 und 4:** Analyse der gleichen *in vitro*-Translationsreaktionen wie unter A, **e:** Eichstandard; **Edukt:** das nicht umgesetzte fluoreszenzaktive Substrat (BODIPY FL 1-deoxychloramphenicol), **Produkt:** das entstandene durch Chloramphenicol-Acetyltransferase acetylierte Chloramphenicol-Derivat.

Das Gen der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) steht in pCAT<sub>Amb11</sub> unter der Kontrolle des *E. coli* Promotors. Dies und die relativ schlecht für die Expression *in vitro* geeigneten untranslatierten Regionen der korrespondierenden mRNA bewirken eine äußerst niedrige Translationsrate des Proteins. Das synthetisierte Protein ist im Anschluß an eine SDS-PAGE autoradiographisch vor dem Hintergrund der zahlreich unter den verwendeten Bedingungen koexprimierten Proteine nicht zu detektieren. Die enzymatische Aktivität der synthetisierten Chloramphenicol-Acetyltransferase kann aber mit Hilfe des CAT-Assays sehr gut nachgewiesen und quantifiziert werden. In Abwesenheit von Suppressor wird offensichtlich kein aktives Protein synthetisiert (1 und 2). Die Zugabe der Bulk-tRNA aus einem Zellstamm, der eine *amber*-Suppressor-tRNA exprimiert, führt zu einer in der Fluographie des CAT-Assays deutlich sichtbaren Synthese der *amber*-Variante von CAT (4).

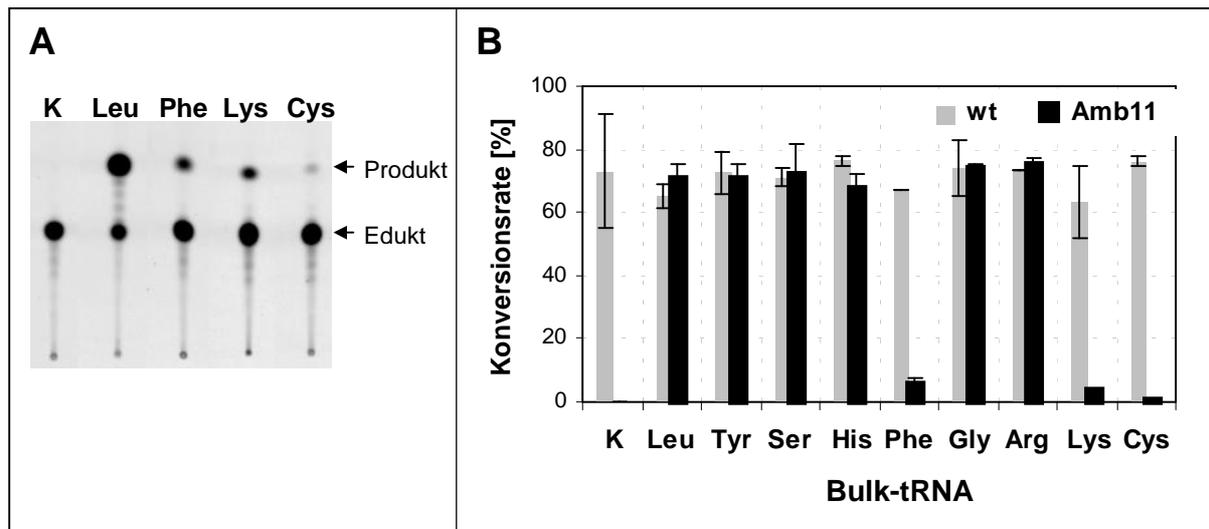
Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) steht in diesen Plasmiden unter der Kontrolle eines *E. coli* Promotors, dessen Transkriptionsrate weit unter der entsprechender Phagenpromotoren, wie dem sonst in der vorliegenden Arbeit verwendeten T7-Promotor, liegt. Dies und die relativ schlecht für die Expression *in vitro* geeigneten 5' und 3' untranslatierten Regionen der korrespondierenden mRNA bewirken eine sehr niedrige Translationseffizienz des Proteins. Autoradiographisch ließ sich das synthetisierte Protein vor dem Hintergrund der vielen anderen koexprimierten Proteine nicht detektieren. Die enzymatische Aktivität des synthetisierten Proteins konnte aber mit Hilfe des CAT-Assays sehr gut nachgewiesen und quantifiziert werden (Abb.16). Anhand des Gels und der enzymatischen Aktivität des Proteins im CAT-Assay ist eine - zugegebenermaßen relativ ungenaue - Abschätzung des Anteils von CAT<sub>Amb11</sub> an der Gesamtsynthese von Protein während der *in vitro* Translationsreaktion möglich. Die Synthese von CAT<sub>Amb11</sub> lag hiernach bei etwa 1% der Gesamtsynthese an Protein.

Anhand der Synthese von CAT<sub>Amb11</sub> und CAT<sub>w</sub> in der gekoppelten Transkription/ Translation wurde nun die Suppressionsaktivität der aus den verschiedenen *Escherichia coli* *amber*-Suppressor-Zellstämmen aufgereinigten Bulk-tRNAs analysiert. Anhand der Bestimmung der enzymatischen Aktivität von CAT<sub>Amb11</sub> mit Hilfe des CAT-Assays konnte nun auch für die Bulk-tRNAs AmbPhe, AmbLys und AmbCys eine deutlich sichtbare Suppressionsaktivität nachgewiesen werden (Abb.17). Diese Bulk-tRNAs hatten bei der Expression der beiden FABP-*amber*-Varianten keine nachweisbare Suppression gezeigt (vgl. Abb.15, S.80). Die Suppressionsaktivitäten der Bulk-tRNAs AmbPhe, AmbLys und AmbCys lagen aber nach wie vor immer noch weit unter denen *in vivo*.

Für alle anderen Bulk-tRNAs (AmbLeu, AmbTyr, AmbSer, AmbHis, AmbGly und AmbArg) lagen die Synthesen der CAT-*amber*-Variante CAT<sub>Amb11</sub> und die von "Wildtyp"-CAT auf einem gleich hohen Niveau (Abb.17). Die Relationen in der Aktivität der verschiedenen *amber*-Suppressor-tRNAs innerhalb des S30-Systems entsprachen hingegen dann denen des fraktionierten Systems, wenn die beiden im vorhergehenden Kapitel untersuchten FABP-*amber*-Varianten innerhalb des in diesem Kapitel verwendeten S30-Systems exprimiert wurden (nicht dargestellt). Die Nivellierung der Suppressionsaktivitäten dieser Bulk-tRNAs ist somit keine Eigenschaft des verwendeten S30-Systems per se. Vielmehr scheint die Expression des Reporterproteins CAT an sich limitierend zu sein, so daß die Aktivitäten einiger *amber*-Suppressoren im Sättigungsbereich der Synthese des Proteins liegen.

Warum zeigen einige der untersuchten *amber*-Suppressor-tRNAs in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten System nahezu keine Suppression, während sie sich *in vivo* als sehr aktiv erwiesen? Die Kultivierung der verschiedenen *amber*-Suppressor-Zellstämme richtete sich in der vorliegenden Arbeit nach den in der Literatur beschriebenen Bedingungen. Man sollte also

Abb. 17



Vergleich der Suppressionsaktivität von Gesamt-tRNA-Präparationen (Bulk-tRNA) aus verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen anhand der Expression von Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT):

Die Aktivität verschiedener *in vivo* exprimierter, in entsprechenden Gesamt-tRNA-Präparationen vorhandener *amber*-Suppressor-tRNAs wurde anhand der Expression von CAT<sub>Amb11</sub> bestimmt, einer *amber*-Variante des Proteins Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) mit einer *amber*-Mutation an Aminosäureposition 11. Als Kontrolle für die Aktivität der Gesamt-tRNA-Präparation diente der entsprechende Wildtyp des Proteins. Gekoppelte *in vitro* Translationsreaktionen wurden in An- und Abwesenheit der verschiedenen Bulk-tRNAs durchgeführt. Als Matrize diente pCAT<sub>Amb11</sub> oder pCAT<sub>w</sub> (andere Bezeichnung: pACYC184). Je zweimal 5 µl einer Reaktion wurden für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Chloramphenicol-Acetyltransferase mittels CAT-Assay eingesetzt.

**A:** Fluographie der Dünnschichtplatte eines CAT-Assays: **Edukt:** das nicht umgesetzte fluoreszenzaktive Substrat (BODIPY FL 1-deoxychloramphenicol), **Produkt:** das entstandene durch Chloramphenicol-Acetyltransferase acetylierte Molekül; **K:** Bestimmung der enzymatischen Aktivität in einer *in vitro* Translationsreaktion, die in Abwesenheit von *amber*-Suppressor-tRNA durchgeführt wurde; **Leu, Phe, Lys, Cys:** Bestimmung der enzymatischen Aktivität von *in vitro* Translationsreaktionen, die in Anwesenheit der Bulk-tRNAs aus den entsprechenden *amber*-Suppressor-Zellstämmen durchgeführt wurden.

**B:** Graphische Auftragung der als Maß für die Suppressionsaktivität verwendeten, mit Hilfe des CAT-Assays ermittelten Konversionsraten, die die Aktivität der in der jeweiligen *in vitro* Translationsreaktion synthetisierten Chloramphenicol-Acetyltransferase widerspiegeln. **wt:** gekoppelte Transkription/Translation von pCAT<sub>w</sub>, **Amb11:** gekoppelte Transkription/Translation von pCAT<sub>Amb11</sub>; **Leu, Tyr, Ser, His, Phe, Gly, Arg, Lys, Cys:** Bulk-tRNAs aus den entsprechenden *amber*-Suppressor-Zellstämmen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei verschiedenen Reaktionen.

Anhand der Bestimmung der enzymatischen Aktivität von CAT<sub>Amb11</sub> mit Hilfe des CAT-Assays kann auch für die Bulk-tRNAs AmbPhe, AmbLys und AmbCys eine deutlich sichtbare Suppressionsaktivität nachgewiesen werden. Diese Bulk-tRNAs hatten bei der Expression der beiden FABP-*amber*-Varianten keine nachweisbare Suppression gezeigt (vgl. Abb. 15, S. 78). Für alle anderen Bulk-tRNAs liegen die Aktivitäten der CAT-*amber*-Variante CAT<sub>Amb11</sub> und die von "Wildtyp"-CAT auf einem gleich hohen Niveau, wie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der entsprechenden Proteine zeigt. Höchstwahrscheinlich ist die Aktivität der einzelnen *amber*-Suppressor-tRNAs in diesen Gesamt-tRNA-Präparationen nicht limitierend für die Expression der *amber*-Variante von CAT.

eigentlich erwarten, daß die Aktivitäten der verschiedenen *amber*-Suppressor-tRNAs *in vitro* die Verhältnisse *in vivo* widerspiegeln. Interessanterweise enthalten alle *amber*-Suppressor-tRNAs, die eine gegenüber *in vivo* verminderte Suppressionsaktivität zeigen, wichtige Erkennungselemente für die entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen innerhalb ihres Anticodons. Für tRNA<sup>Phe</sup> wurde gezeigt, daß der Austausch des "Wildtyp"-Anticodons GAA gegen CUA zu einer drastischen Erniedrigung des  $k_{cat}/K_M$ -Wertes der Aminoacylierung um

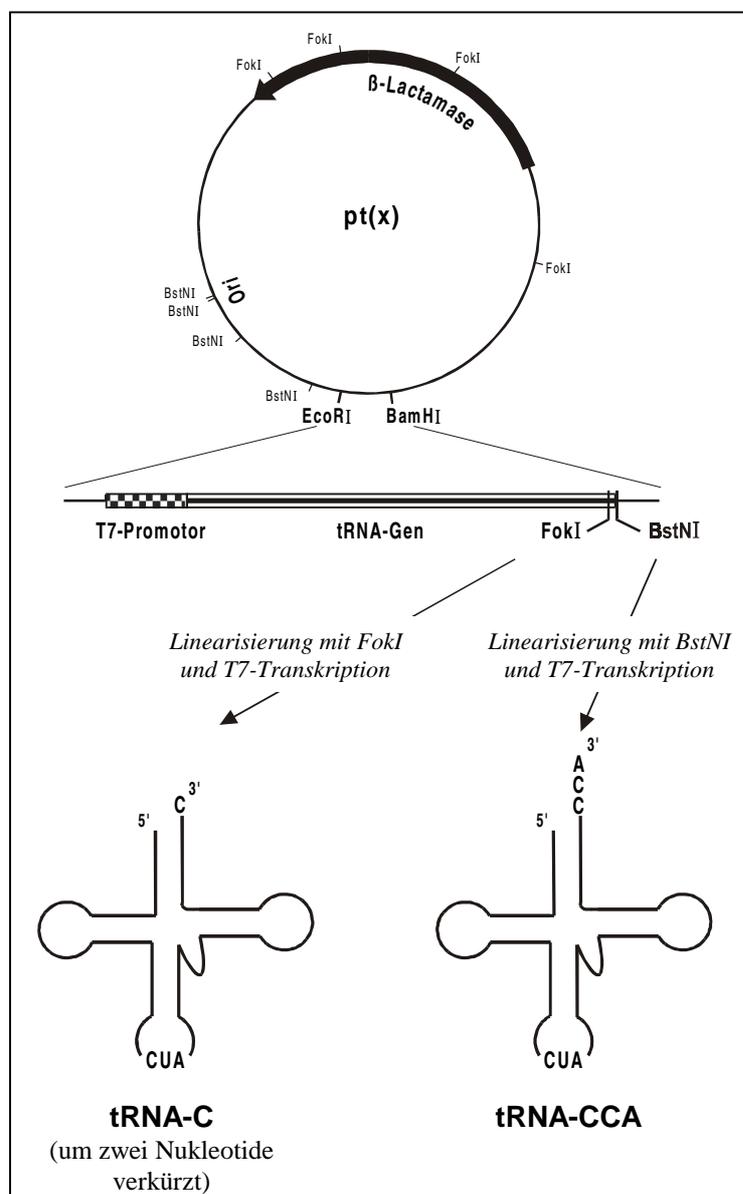
---

mehr als Faktor 1000 führt (Peterson und Uhlenbeck 1992). Im Falle der tRNA<sup>Cys</sup> führt der Ersatz des "Wildtyp"-Anticodons gegen CUA gar 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. Schon das Fehlen der Modifikation  $mnm^5s^2U34$  in der ersten Anticodon-Position der tRNA führt zu einer Verringerung der Aminoacylierungsaktivität um Faktor 140 (Tamura et al. 1992). Trotz der herabgesetzten Aminoacylierungsraten können die erwähnten *amber*-Suppressor-tRNAs tPhe, tCy und tLys *in vivo* offensichtlich aminoacyliert werden, wie die Nachweisbarkeit ihrer Suppressionsaktivität *in vivo* belegt (Kleina et al. 1990). Die äußerst geringe Suppressionsaktivität *in vitro* könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, daß die Aktivität einiger Aminoacyl-tRNA-Synthetasen in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten *in vitro* Translationssystem geringer ist als die Aktivität der entsprechenden Synthetasen in der lebenden Zelle.

### 5.3 Konstruktion von Plasmiden für die T7-Transkription von tRNAs

Es wurden für eine vergleichende Untersuchung der Suppressionseffizienz *in vitro* transkribierter *amber*-Suppressor-tRNAs insgesamt 13 verschiedene *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies ausgewählt. Die Plasmide für die *in vitro* Transkription von tRNAs wurden im Prinzip nach den Vorgaben von Uhlenbeck et al. (1988) konstruiert (vgl. Abb.19). Mit Hilfe der PCR wurde ausgehend von DNA-Oligos für jede tRNA-Spezies eine Genkassette hergestellt (Abb.20), die in den Vektor pSP64 kloniert wurde. Im Verlaufe der Arbeit wurde eine zeitsparende Strategie zur Klonierung der PCR generierten tRNA-Gene entwickelt (siehe Kapitel 4.2.8.2 und Kapitel 4.2.8.3). Die Klonierung erfolgte in der Regel über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI, um eine gleichbleibende Orientierung des

Abb. 19



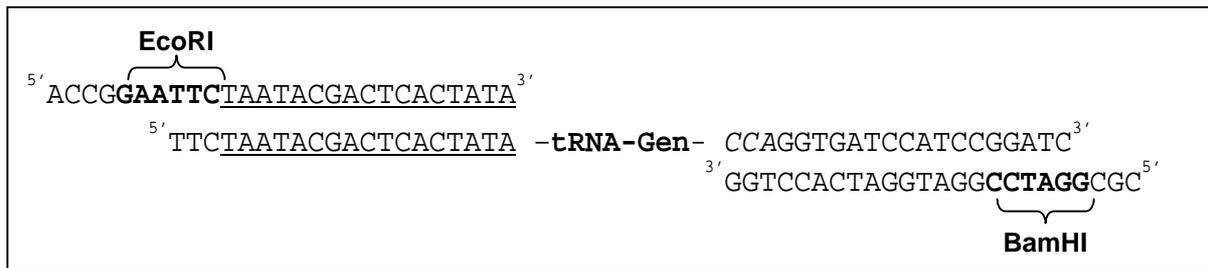
Schematische Darstellung der Herstellung von tRNAs mit Hilfe der T7-Transkription:

Eine Genkassette mit dem tRNA-Gen wird über die Schnittstellen EcoRI und BamHI in den Grundvektor pSP64 kloniert. Innerhalb der Genkassette ist das 5'-Ende der tRNA durch die Lage des T7-Promotors definiert. Das 3'-Ende der tRNA wird durch zwei alternative Restriktionsschnittstellen festgelegt: BstNI mit der Erkennungssequenz CC'AGG und FokI, dessen Erkennungssequenz 3' von der Schnittstelle liegt.

Nach Linearisierung der Plasmide können mit Hilfe der sogenannten „run off“-Transkription tRNAs mit nahezu jeder gewünschten Sequenz hergestellt werden. Die einzige Voraussetzung ist, daß das 5'-Ende der tRNA mit einem G beginnt. Die Wahl von Sequenz und Länge der 3'-Enden der tRNAs wird alleine durch die Erkennungssequenzen der für die Linearisierung zur Verfügung stehenden Restriktionsenzyme limitiert. Durch die Wahl eines Restriktionsenzym wie FokI, dessen Erkennungssequenz außerhalb der Schnittstelle liegt, läßt sich nahezu jedes gewünschte 3'-Ende generieren. Die Zugabe von GMP in die Transkriptionsansätze bewirkt, daß die *in vitro* transkribierten tRNAs wie ihre *in vivo* exprimierten Verwandten am 5'-Ende ein Monophosphat enthalten.

**tRNA-C:** Die Transkription eines mit FokI linearisierten Plasmids liefert eine tRNA, deren 3'-Ende um zwei Nucleotide verkürzt ist. **tRNA-CCA:** Die Transkription des mit BstNI linearisierten Plasmids liefert tRNAs mit vollständigem CCA-Ende.

Abb. 20



Herstellung von tRNA-Genen für die T7-Transkription von tRNAs:

Die in der vorliegenden Arbeit optimierte Strategie zur Herstellung neuer tRNA-Gene mit Hilfe der PCR beruht auf der Nutzung von 3 verschiedenen chemisch synthetisierten Oligomeren. Ein langes Oligomer enthält die Sequenz der gewünschten tRNA sowie an beiden Enden konstante Bereiche, so daß zur Amplifikation für alle neuen tRNA-Gene zwei Universalprimer verwendet werden können. Mit diesen Universalprimern werden die beiden für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI in einer einstufigen PCR an die tRNA-Gene angefügt.

unterstrichen: T7-Promotor, *kursiv*: das CCA-Ende der tRNA

tRNA-Gens innerhalb des Plasmids zu gewährleisten. Innerhalb einer jeden Genkassette ist das 5'-Ende der tRNA durch den Startpunkt der T7-Polymerase festgelegt. Am 3'-Ende der tRNAs wurden jeweils zwei unterschiedliche Restriktionsschnittstellen positioniert. Je nach Wahl des Restriktionsenzym konnten auf diese Weise von ein und demselben Konstrukt sowohl tRNAs mit vollständigem 3'-Ende (tRNA-CCA) als auch tRNAs mit einem um zwei Nukleotide verkürzten 3'-Ende (tRNA-C) transkribiert werden (vgl. Abb.19). Die vollständigen Sequenzen der Konstrukte sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

#### 5.4 Einsatz einer chemisch aminoacylierten *amber*-Suppressor-tRNA ( $\epsilon$ -DnsLys-tPheY)

Für die ortsspezifische Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine mit Hilfe chemisch aminoacylierter *amber*-Suppressor-tRNAs stehen in der Literatur mehrere tRNAs zur Verfügung (Noren et al. 1989: tRNA<sup>Phe</sup><sub>CUA</sub> aus *S. cerevisiae*; Bain et al. 1991: tRNA<sup>Gly</sup><sub>CUA</sub> aus *E. coli*; Karginov et al. 1997: tRNA<sup>Ala/C70</sup><sub>CUA</sub> aus *E. coli*). Am weitesten verbreitet ist die Nutzung der tRNA<sup>Phe</sup><sub>CUA</sub> aus Hefe (z.B.: High et al. 1993, Judice et al. 1993, Nowak et al. 1994, Cornish et al. 1994, Turcatti et al. 1996). Aus diesem Grund wurde tRNA<sup>Phe</sup><sub>CUA</sub> (in dieser Arbeit: tPheY) ausgewählt, um die Verwendung einer chemisch aminoacylierten *amber*-Suppressor-tRNA in unserem *in vitro*-Translationssystem zu demonstrieren.

*Eine erste Limitation der Methode: Die Bereitstellung genügender Mengen an verkürzten tRNAs für die Herstellung der chemisch aminoacylierten tRNA*

Für die Herstellung der chemisch beladenen tRNA wurden sehr große Mengen an verkürzten tRNA-Transkripten benötigt. Die Herstellung homogener Mengen an solchen Transkripten erwies sich als äußerst aufwendig. Die T7-Transkription des mit FokI linearisierten Plasmids

ptPheY brachte zwar Ausbeuten von zwei bis drei Milligramm Transkript in einem Milliliter Reaktionsansatz. Die 3'-Enden der Transkripte waren jedoch sehr heterogen. Auf das korrekte, am 3'-Ende um zwei Nukleotide verkürzte Transkript der tRNA (tRNA-C) entfielen weniger als 40% der Gesamtmenge an Transkript. Daneben enthielten die Transkriptionsprodukte einen großen Anteil an Transkripten, die um ein oder sogar zwei Nukleotide verlängert waren (vgl. Abb.22 auf Seite 92). Die Entstehung solcher am 3'-Ende um ein oder zwei Nukleotide verlängerter Transkripte ist aus der Literatur bekannt und wird als n+1-Aktivität oder Endheterogenität bezeichnet (Milligan et al. 1987, Sammuelson et al. 1988, Kao et al. 1999). Die Methode der chemischen Aminoacylierung von tRNA beinhaltet die *in vitro*-Transkription einer um die letzten beiden Nukleotide des Akzeptorarms (pCpA) verkürzten Form der tRNA, die synthetische Herstellung des Dinukleotids pCpA, die Acylierung des Dinukleotids mit der entsprechenden unnatürlichen Aminosäure und die enzymatische Ligation des chemisch aminoacylierten Dinukleotids an das *in vitro*-Transkript (vgl. Abb.3, Seite 5). Eine Entfernung der verlängerten Transkripte aus der Präparation der verkürzten tRNAs war somit zwingend erforderlich, um die Entstehung inaktiver tRNA-Formen mit falschen 3'-Enden während der Ligation des chemisch aminoacylierten Dinukleotids (pCpA-Aminosäure) an die verkürzte tRNA zu vermeiden.

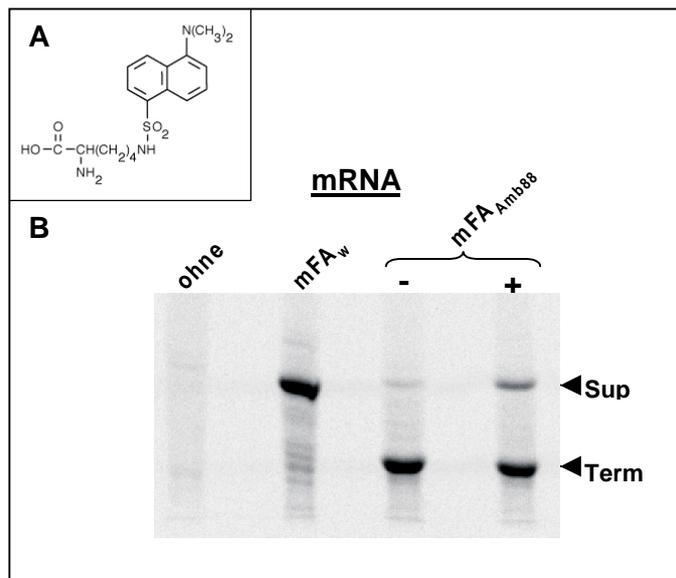
Zur Aufreinigung homogener um zwei Nukleotide verkürzter tRNAs (tRNA-C) wurden die Transkripte deshalb auf präparativen, hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamid-Gelen auf ein Nukleotid genau aufgetrennt und die Transkripte mit korrekter Länge eluiert. Hierfür wurden Gele mit einer Dimension von 0,5 x 30 x 40 cm verwendet. Trotz der Dicke der Gele erwies sich die Kapazität der Methode unter anderem aufgrund der hohen benötigten Trennschärfe als äußerst begrenzt. Die Ausbeuten an homogenem Transkript lagen bei maximal 20% der eingesetzten Transkript-Menge, so daß aus einem präparativen Gel höchstens 150 µg (6000 pmol) verkürzte tRNA gewonnen werden konnten. Nach der Reinigung wurden die verkürzten tRNAs (tRNA-C) mit dem chemisch mit Dansyl-Lysin (DnsLys) acylierten Dinukleotid  $\epsilon$ -DnsLys-pCpA zu funktionaler Aminoacyl-tRNA ( $\epsilon$ -DnsLys-tPheY) ligiert. Die Herstellung des chemisch acylierten Dinukleotids  $\epsilon$ -DnsLys-pCpA und die nachfolgende Ligation an das Transkript der tRNA-C wurden dankenswerterweise von Fritz Benselaer (IBA, Göttingen) durchgeführt.

#### *Die Herstellung von mit Dansyllysin modifiziertem FABP*

Die Aktivität der chemisch aminoacylierten tRNAs wurde nicht in dem sonst in der vorliegenden Arbeit verwendeten fraktionierten Translationssystem sondern in einem sogenannten S30-Zellextrakt unter den im Labor von Dr. Stiege optimierten Reaktionsbedingungen analysiert. Dieses System wurde dem fraktionierten System vorgezogen, da in ihm neben wesentlich höheren Proteinausbeuten auch deutlich höhere Suppressionsraten erzielt werden können als im fraktionierten System. Hierauf wird in einem

der folgenden Kapitel noch genauer eingegangen werden. Als Template für die Proteinsynthese wurde aufgereinigte mRNA ( $mFA_{Amb88}$ ) eingesetzt, um dem System vom Beginn der Reaktion an genügend mRNA anzubieten. Der Einbau der unnatürlichen Aminosäure DnsLys in der *in vitro* Translation zeigte sich anhand einer deutlich nachweisbaren Suppression in  $FABP_{Amb88}$  (Abb.21).

Abb. 21



*Einführung der unnatürlichen Aminosäure Dansyllysine in FABP mit Hilfe einer chemisch aminoacylierten tRNA:*

Zur Einführung von Dansyllysine wurden verkürzte Transkripte von tPheY (tRNA-C) hergestellt und mit dem mit Dansyllysine acylierten Dinukleotid ( $\epsilon$ -DnsLys-pCpA) ligiert. Die so beladene Aminoacyl-tRNA  $\epsilon$ -DnsLys-tPheY wurde hiernach zur Suppression in  $FABP_{Amb88}$  eingesetzt (f.c.: 10  $\mu$ M). Als Matrize diente  $mFA_{Amb88}$ . Die Reaktionsansätze wurden für 20 min bei 37°C inkubiert. 12  $\mu$ l-Aliquots einer jeden Reaktion wurden einer SDS-Page unterworfen und das  $^{14}$ C-markierte Protein mit einem PhosphorImager detektiert

**A:** Dansyl-Lysin

**B:** Autoradiographie des Gels: **ohne:** Kontrollreaktion ohne mRNA; **mFA<sub>w</sub>:** Die Kontroll-

reaktion mit  $mFA_w$  zeigt die Position von „full-length“-FABP ( $FABP_w$ ); **mFA<sub>Amb88</sub>:** Translation in Anwesenheit von  $mFA_{Amb88}$ ; **-** Zugabe der nicht aminoacylierten tRNA (tPheY); **+**: Reaktion in Anwesenheit der chemisch aminoacylierten tRNA ( $\epsilon$ -DnsLys-tPheY); **Sup:** Suppressionsprodukt. **Term:** Terminationsprodukt.

Die Zugabe der chemisch aminoacylierten tRNA führt zu einer deutlichen Synthese von Suppressionsprodukt, während die nicht beladene tRNA keine Suppression zeigt.

### *Die zweite Limitation der Methode wird anhand des Einbaus der unnatürlichen Aminosäure Dansyllysine deutlich*

Die synthetisierten Mengen an Suppressionsprodukt waren im Vergleich zur Synthese des Wildtyps äußerst niedrig. Der größte Teil der Synthesekapazität des verwendeten Translatiosystems entfiel während der Translation von  $mFA_{Amb88}$  auf das 87 Aminosäuren lange Terminationsprodukt, das sehr effektiv gebildet wurde. Der Anteil des Suppressionsproduktes an der während der Reaktion synthetisierten Gesamtmenge an Protein betrug nur ca. 6%. Die Dekodierung des *amber*-Codons durch den Terminationsfaktor RF1 ist anscheinend wesentlich effizienter als die Dekodierung des Codons durch die zugegebene Suppressor-tRNA. Natürlich wäre es äußerst wünschenswert, wenn der größte Teil der Kapazität für die Synthese des gewünschten Produktes genutzt werden könnte. In diesem Zusammenhang ist eine Kalkulation der erhaltenen Mengen mit den theoretisch zu erwartenden Mengen sinnvoll:

Die synthetisierte Menge an FABP mit der Aminosäure Dansyllysine an Position 88 betrug

etwa 4  $\mu\text{g}$  Protein pro Milliliter Reaktionsansatz. Der größte Teil der Synthese entfiel auf das 87 Aminosäuren lange Terminationsprodukt. Die theoretisch mögliche Menge an Suppressionsprodukt wird durch die Synthese des Wildtyps von FABP verdeutlicht (Abb.7,  $mFA_w$ ). Die synthetisierte Menge an Wildtyp-FABP betrug ca. 70  $\mu\text{g}$  Protein pro Milliliter Reaktionsansatz, was einer Konzentration des Proteins von etwa 5  $\mu\text{M}$  entspricht. Eine vergleichbare Menge an Suppressionsprodukt hätte theoretisch auch mit der eingesetzten Menge der Aminoacyl-tRNA  $\epsilon$ -DnsLys-tPheY erreicht werden können. Die Konzentration der beladenen Aminoacyl-tRNA betrug am Anfang der Reaktion ca. 10  $\mu\text{M}$ , also das Doppelte der theoretisch möglichen Menge an Suppressionsprodukt. Die synthetisierte Menge an Suppressionsprodukt (FABP mit der Aminosäure Dansyllysin an Position 88) betrug aber nur etwa 4  $\mu\text{g}$  Protein pro Milliliter Reaktionsansatz. Die Menge an Suppressionsprodukt reflektiert somit nur 3 % der eingesetzten Aminoacyl-tRNA.

Der relativ ineffiziente Einbau von Dansyl-modifizierten Aminosäuren ist auch aus anderen Untersuchungen bekannt (Steward et al. 1997, Cornish et al. 1994). Steward et al. (1997) beispielsweise zeigten 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 RF1 enthielt.  $\epsilon$ -DnsLys gehörte in dieser Studie zu den Aminosäuren, die nur sehr ineffizient eingebaut werden konnten. Andere unnatürliche Aminosäuren hingegen werden wesentlich besser eingebaut, zum Beispiel 5-OH-Trp mit einer Rate von ca. 45%, 7-aza-Trp ca. 30%. Cornish et al. (1994) waren gar nicht dazu in der Lage,  $\epsilon$ -DnsLys in T4-Lysozym in einem *Escherichia coli* S30-Lysat einzubauen, während 7-Aza-Trp relativ gut eingebaut werden konnte.

### Fazit

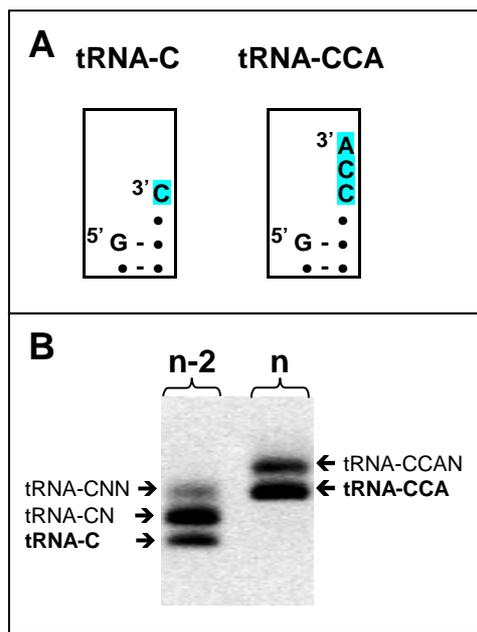
Anhand der beschriebenen Einführung von Dansyl-Lysin in FABP mit Hilfe der tRNA tPheY werden die Limitationen der Methode Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine mit Hilfe chemisch aminoacylierter *amber*-Suppressor-tRNAs sehr deutlich. In der vorliegenden Studie erwiesen sich vor allen Dingen die Effizienz des Einbaus der unnatürlichen Aminosäure und die Bereitstellung genügender Mengen an den für die Ligation des chemisch aminoacylierten Dinukleotids verwendeten verkürzten tRNAs als problematisch.

## 5.5 Untersuchungen zur Endheterogenität von T7-transkribierten tRNAs

Während der T7-Transkription ist das 5'-Ende der tRNA durch den Startpunkt der T7-Polymerase, das 3'-Ende der tRNA durch eine Restriktionsschnittstelle innerhalb der DNA-Matrize festgelegt. Theoretisch sollten die entstehenden tRNAs somit eine einheitliche Länge aufweisen. In der Praxis jedoch führt die Methode der „run off“-Transkription linearisierter DNA-Matrizen zu dem Auftreten einer Reihe unerwünschter Nebenprodukte (Milligan et al. 1987, Draper et al. 1988, Triana-Alonso et al. 1995, Kholod et al. 1998, Helm et al. 1999, Kao et al. 1999). Weisen die linearisierten Plasmide 3' überhängende Enden auf, so können beispielsweise Transkripte entstehen, die sehr viel länger sind als das erwartete Produkt (Schenborn und Mierendorf 1985, Weitzmann et al. 1993). Diese verlängerten Transkripte entstehen möglicherweise dadurch, daß die Polymerase am Gegenstrang des linearisierten Plasmids zurückläuft (Rong et al. 1998). Auch die RNA selbst kann vermutlich bei der Verlängerung von Transkripten als Matrize dienen (Triana-Alonso et al. 1995). Neben stark verlängerten Produkten entstehen während der Initiation der Transkription sehr kurze, unter 10 Nukleotide lange Oligonukleotide in großen Mengen (Martin et al. 1988, Moroney und Piccirilli 1991). In der Praxis sind solche in der Länge stark von der Länge der gewünschten Transkripte abweichenden Nebenprodukte sehr einfach aus der Präparation der tRNAs zu entfernen, indem man die gewünschten Produkte aus denaturierenden Gelen eluiert oder mittels HPLC aufreinigt.

Ein wesentlich größeres Problem jedoch stellen Transkripte dar, die um ein oder zwei zusätzliche Nukleotide verlängert sind, wie schon bei der Bereitstellung von Transkripten für die Herstellung chemisch aminoacylierter tRNAs im vorangehenden Kapitel deutlich wurde. Das Auftreten von Transkripten, die am 3'-Ende gegenüber den korrekten Transkripten um ein oder zwei zusätzliche Nukleotide verlängert sind, wurde bereits ausführlich dokumentiert und wird als n+1-Aktivität oder Endheterogenität bezeichnet (Milligan et al. 1987, Samuelson et al. 1988, Kao et al. 1999). Bei den zusätzlichen Nukleotiden handelt es sich überwiegend um die Basen A oder C (Samuelson et al. 1988, Kholod et al. 1998). Ein kleinerer Teil der Transkripte kann am 3'-Ende ein zusätzliches G enthalten (Samuelson et al. 1988). In der vorliegenden Arbeit hatten entsprechende um ein oder zwei Nukleotide verlängerte Transkripte einen Anteil zwischen 30 und 80 % an der Gesamtmenge an Transkript (vgl. Abb. 22). Eine gebräuchliche Methode zur Herstellung von homogenen tRNA-Präparationen ist die Abtrennung der unkorrekten Transkripte über die Elution aus hochauflösenden denaturierenden Gelen. In der vorliegenden Arbeit wurden Gele mit einer Dimension von 0,5 x 30 x 40 cm für die präparative Aufarbeitung der Transkripte eingesetzt. Dennoch erwies sich die Kapazität dieser Methode unter anderem aufgrund der hohen benötigten Trennschärfe als äußerst begrenzt. Die Ausbeuten an homogenem Transkript lagen bei maximal 25% der eingesetzten Transkript-Menge, so daß aus einem präparativen Gel höchstens 150 µg (6000 pmol) Transkript gewonnen werden konnten.

Abb. 22



*Endheterogenität während der T7-Transkription von tRNAs mit unterschiedlichen 3'-Enden:*

Während der T7-Transkription von tRNAs ist das 3'-Ende der tRNA theoretisch durch die Lage der Restriktionsschnittstelle innerhalb der DNA-Matrize festgelegt. In der Praxis jedoch entstehen während der T7-Transkription von tRNAs auch Transkripte, die am 3'-Ende gegenüber den erwarteten Transkripten um ein oder zwei zusätzliche Nukleotide verlängert sind. Die Anwesenheit verlängerter Transkripte wird durch die Bezeichnung Endheterogenität umschrieben.

**A:** Die theoretisch zu erwartenden Enden der Akzeptorarme: Die in der vorliegenden Arbeit für die „run off“-Transkription von tRNAs verwendeten Plasmide wurden so konstruiert, daß je nach Wahl des Restriktionsenzym tRNAs mit vollständigem CCA-Ende (**tRNA-CCA**) oder tRNAs mit einem um zwei Nukleotide verkürzten CCA-Ende (**tRNA-C**) hergestellt werden konnten. tRNA-C entsteht durch die Transkription des mit FokI linearisierten PLasmids ptPheY, tRNA-CCA entsteht durch die Transkription des mit BstNI linearisierten PLasmids (vgl. auch Abb.19, Seite 86).

**B:** Auftrennung von Transkripten im denaturierenden Harnstoffgel: Die Ethidiumbromidfärbung des Gels zeigt, daß während der T7-Transkription zusätzlich zu den erwarteten Transkripten eine große Menge von solchen Transkripten entstanden, die gegenüber den korrekten Transkripten um ein oder zwei Nukleotide verlängert waren. **n-2:** Die während der Transkription des mit FokI linearisierten Plasmids (ptPheY(FokI)) entstehenden Transkripte (**tRNA-C**: tRNA mit erwarteter Länge, **tRNA-CN**: um ein Nukleotid verlängertes Transkript, **tRNA-CNN**: um zwei Nukleotide verlängertes Transkript); **n:** Die während der Transkription des mit BstNI linearisierten Plasmids (ptPheY(BstNI)) entstehenden Transkripte (**tRNA-CCA**: tRNA mit erwarteter Länge, **tRNA-CCAN**: um ein Nukleotid verlängertes Transkript). **N:** zusätzliches, im Gen nicht kodiertes Nukleotid

Eine Alternative zur Gelelution ist die Aufreinigung biologisch aktiver tRNAs über EF-Tu-Affinitätschromatographie (Kholod et al. 1998). Diese Methode verlangt allerdings eine vorhergehende Aminoacylierung der Transkripte und ist deswegen nicht auf tRNAs anwendbar, die nicht aminoacyliert werden können oder die für eine Ligation, beispielsweise mit chemisch aminoacyliertem Dinukleotid, vorgesehen sind. Die beste Möglichkeit besteht darin, die Transkriptionsbedingungen so zu wählen, daß um ein oder zwei Nukleotide verlängerte Transkripte erst gar nicht entstehen. Auf der Ebene der Matrizen ist dies über die Platzierung des tRNA-Gens innerhalb einer Ribozymkassette (Ferré-D'Amaré und Doudna 1996) oder über die Einführung von Terminator-Nukleosiden am 5'-Ende des nichtkodierenden DNA-Stranges (Moran et al. 1996, Kao et al.1999) möglich.

### 5.5.1 Der Einfluß der Temperatur auf die n+1-Aktivität zweier T7-RNA-Polymerasen

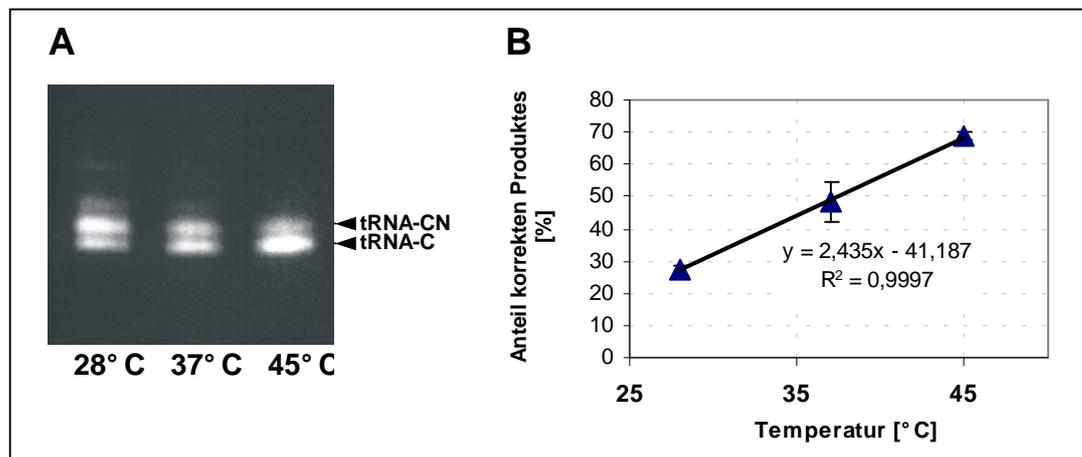
Im Hinblick auf eine Verringerung der während der T7-Transkription auftretenden Endheterogenität wurden verschiedene Parameter der Transkriptionsreaktion variiert. Als Modellsubstrat wurde ptPheY(FokI) ausgewählt. Dieses Plasmid dient – linearisiert mit dem Restriktionsenzym FokI - normalerweise der Herstellung von verkürzten Transkripten der für die chemische Aminoacylierung verwendeten *amber*-Suppressor-tRNA tPheY (vgl. Abb. 3,

Seite 5). Die verkürzten Transkripte dieser tRNA werden für die Ligation des chemisch aminoacylierten Dinukleotids (pCpA-Aminosäure) als Akzeptor verwendet. Durch die Ligation soll ein vollständiges aminoacyliertes CCA-Ende der tRNA erzeugt werden, so daß eine funktionale Aminoacyl-tRNA (tPheY-Aminosäure) entsteht. Da bei einer Ligation des Dinukleotids an unkorrekte Transkripte inaktive Aminoacyl-tRNAs entstehen würden, ist die Homogenität des 3'-Endes des Akzeptors bei der Herstellung dieser tRNA ganz besonders wichtig.

#### *Die n+1-Aktivität von T7-RNA-Polymerase ist temperaturabhängig*

Variationen der NTP-Konzentration, der GMP-Konzentration oder der Magnesiumkonzentration brachten keine Verringerung der n+1-Aktivität (nicht dargestellt). Auch eine Anwendung von in der Literatur beschriebenen Reaktionsbedingungen, die angeblich zu einer Verringerung der n+1-Aktivität führen sollten (Cload et al. 1996), zeigten nicht das erwartete Ergebnis (nicht dargestellt). Der einzige Reaktionsparameter, der eine deutliche Auswirkung auf die Homogenität der Transkriptionsprodukte zeigte, war die Reaktionstemperatur. In einem ersten Versuch wurden Transkriptionsreaktionen bei drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Zusammensetzung der synthetisierten Transkripte wurde anhand der elektrophoretischen Mobilität analysiert. Die Quantifizierung der einzelnen Reaktionsprodukte erfolgte anhand der Fluoreszenz mit SybrGold angefärbten, nicht radioaktiv markierten Transkripte. Eine

Abb. 23

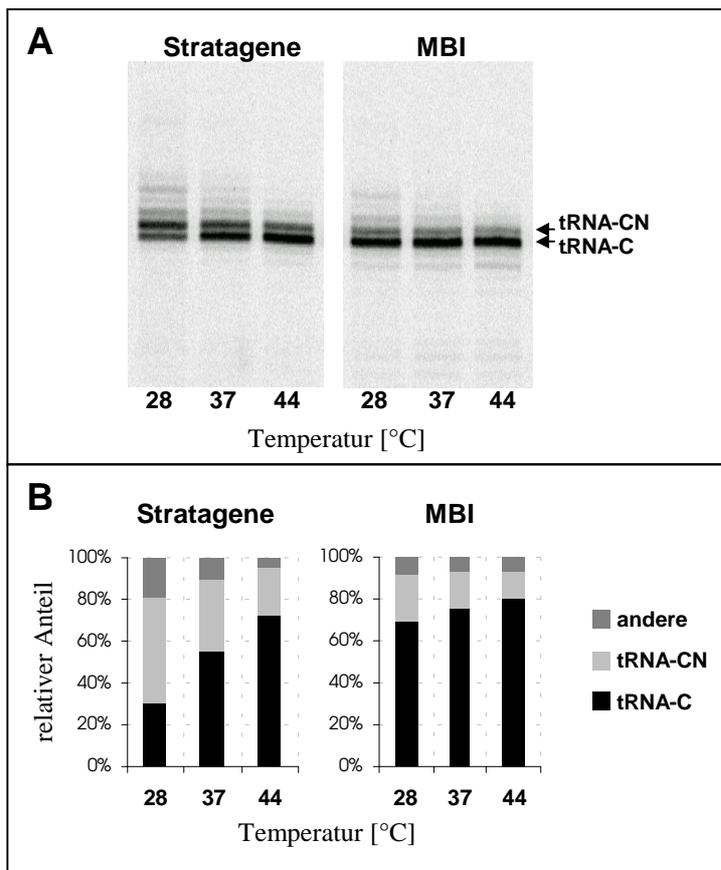


#### *Einfluß der Temperatur auf die n+1-Aktivität von T7-RNA-Polymerase:*

Eine um zwei Nucleotide verkürzte tRNA (tPheY-C) sollte mit T7-Polymerase (der Firma Stratagene) bei den angegebenen Temperaturen synthetisiert werden. (A) Die Transkripte wurden auf einem 8%-igem Harnstoff-PAA-Gel auf ein Nucleotid genau aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. **tRNA-C**: Transkripte mit korrektem CCA-Ende; **tRNA-CN**: um ein Nucleotid verlängertes Transkript; N: nicht im tRNA-Gen kodiertes Nucleotid (B) Anteil der korrekten Transkripte (tRNA-C) an der Gesamtmenge der in dem gezeigten Ausschnitt des Gels detektierbaren Transkripte. Zur Detektion der RNA wurde das Gel mit SybrGold angefärbt und die Banden mit dem PhosphorImager detektiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageQuant.

Sowohl das Gel als auch die grafische Auswertung des Gels zeigen eine deutliche Zunahme korrekter Transkripte mit zunehmender Temperatur.

Abb. 24



#### Temperaturabhängigkeit der n+1-Aktivität zweier T7-RNA-Polymerasen:

Die T7-Transkription von ptPheY(FokI) wurde wie unter Material und Methoden beschrieben bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt. Die Transkripte wurden über den Einbau von  $\alpha$ - $^{35}$ S-CTP radioaktiv markiert und in einem 6%-igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Sequenziergel auf ein Nukleotid genau aufgetrennt. Hiernach wurden die markierten Transkripte mit dem PhosphorImager detektiert und mit Hilfe des Programms ImageQuant quantifiziert.

**A:** PhosphorImage des Gels: **tRNA-C:** Transkript mit korrektem CCA-Ende, **tRNA-CN:** um ein Nukleotid verlängertes Transkript; **(B)** Zusammensetzung der in A gezeigten Transkripte: Die Gesamtheit der in dem gezeigten Ausschnitt des Gels detektierbaren Transkripte entspricht 100%.

Sowohl das Gel als auch die grafische Auswertung des Gels zeigen eine deutliche Zunahme korrekter Transkripte (tRNA-C) mit ansteigender Reaktionstemperatur bei beiden T7-RNA-Polymerasen. Die T7-Polymerase von Fermentas (MBI)

zeigt bei niedrigeren Temperaturen eine wesentlich geringere n+1-Aktivität als die T7-Polymerase von Stratagene. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 44°C bewirkt jedoch eine drastische Verringerung der n+1-Aktivität der Polymerase von Stratagene, so daß bei dieser Temperatur die n+1-Aktivitäten beider Polymerasen auf einem nahezu identischen Niveau liegen. Recht unterschiedlich ausgeprägt ist die Entstehung kürzerer Transkripte bei beiden Polymerasen. Während der Transkription mit der Polymerase von Fermentas (MBI) entstehen deutlich mehr Transkripte, die kürzer sind als das erwartete korrekte Transkript tRNA-C. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß diese Polymerase eine gegenüber der Polymerase von Stratagene verminderte Prozessivität aufweist.

Erhöhung der Reaktionstemperatur von 28°C über 37°C auf 45°C bewirkte eine nahezu lineare Zunahme des Produktes mit dem korrekten 3'-Ende (tRNA-C) und eine gleichzeitige Verringerung der um ein Nukleotid verlängerten Transkripte tRNA-CN (Abb.23).

#### Unterschiedliche Präparationen von T7-RNA-Polymerase zeigen verschieden starke n+1-Aktivitäten

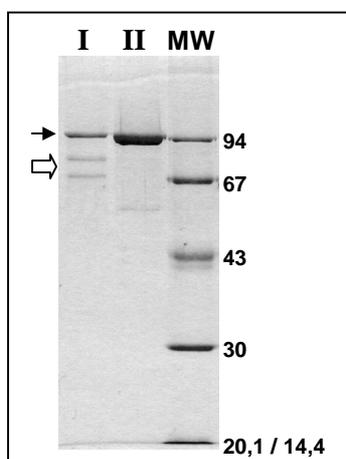
In weiteren Versuchen wurden Homogenität und Menge der bei verschiedenen Temperaturen synthetisierten Transkripte genauer analysiert. In die Versuche wurde eine weitere T7-RNA-Polymerase eines anderen Herstellers einbezogen, so daß die n+1-Aktivität von zwei käuflich erhältlichen T7-RNA-Polymerasen (der Firmen Stratagene und Fermentas (MBI)) miteinander verglichen werden konnte. Zugunsten einer besseren Detektierbarkeit und Quantifizierbarkeit wurden die Reaktionsprodukte mit  $\alpha$ - $^{35}$ S-CTP radioaktiv markiert und in 6%-igen DNA-Sequenziergelen analysiert. Der Einbau des Schwefelatoms verändert die entstehenden

Transkripte zwar chemisch, mit  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-CTP oder  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-ATP radioaktiv markierte Transkripte sind aber bekanntermaßen in biochemischen Reaktionen wie der Translation aktiv. Aus diesem Grund wurde nicht erwartet, daß sich die Anwesenheit der schwefelmodifizierten Nucleosidtriphosphate während der Transkription auf die n+1-Aktivität der Polymerasen auswirkt. In der Tat zeigte ein Vergleich von unmarkierten mit markierten Transkripten, daß der Einbau des radioaktiven Nucleotids keinen Einfluß auf die Entstehung verlängerter Transkripte hat (vergleiche Abb. 23 mit Abb. 24, Stratagene). Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-CTP stieg der Anteil des korrekten Produktes (tRNA-C) gleichermaßen von ca. 30% bei 28°C auf ca. 70% bei 45°C an. Erstaunlicherweise zeigte die zweite verwendete T7-RNA-Polymerase (MBI) schon bei niedrigeren Temperaturen eine wesentlich geringere n+1-Aktivität als Polymerase I. Der Anteil korrekten Produktes stieg bei dieser Polymerase von ca. 70% bei 28°C auf ca. 80% bei 45°C (Abb. 24, MBI).

*Ist eine niedrige n+1-Aktivität von T7-RNA-Polymerase auf die Anwesenheit von Spaltprodukten des Enzyms in der Präparation zurückzuführen?*

T7-RNA-Polymerase besteht aus einer einzigen Polypeptidkette aus 883 Aminosäuren (Molekulargewicht 98.856). Diese Polypeptidkette bildet zwei verschiedene Regionen: eine C-terminale 80kDa großen Domäne, die den T7-Promotor erkennt und nur kurze abortive Produkte mit einer Länge unter 8 Basen synthetisiert, und eine N-terminale 20 kDa große Domäne, die einzelsträngige RNA bindet und deren Anwesenheit erforderlich ist, um längere RNAs zu transkribieren. (Martin et al. 1988, Gardner et al. 1997 und dortige Referenzen). Die Zusammensetzung der beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Polymerasepräparationen wurde im denaturierenden SDS-Proteingel analysiert (Abb. 25). Beide Präparationen zeigten eine Hauptbande mit identischem Laufverhalten. Anhand der elektrophoretischen Mobilität der Markerproteine wurde das Molekulargewicht dieser Bande mit 97,2 kDa bestimmt, eine relativ gute Übereinstimmung mit dem für T7-RNA-Polymerase in der Literatur angegebenen Wert von 98,856 kDa. Dagegen war die Homogenität der beiden

Abb. 25



*Auftrennung zweier verschiedener Präparationen von T7-RNA-Polymerase im denaturierenden SDS-Gel*

Die Homogenität der beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten T7-RNA-Polymerasen wurde in einem 10%-igen SDS-Gel überprüft. Aufgetragen wurden identische Aktivitäten („Units“) laut Herstellerangaben.

**I:** T7-RNA-Polymerase der Firma Fermentas (MBI); **II:** T7-RNA-Polymerase der Firma Stratagene; Der Pfeil gibt die anhand des Molekulargewichtes von 98.956 erwartete Position des Enzyms an.

In der Polymerase I (MBI) sind unterhalb der Hauptbande zwei weitere Proteinbanden zu erkennen (Blockpfeil, Erläuterung siehe Text).

Polymerasen recht unterschiedlich. Während die Polymerase mit der größeren n+1-Aktivität (Stratagene) eine relativ homogene Zusammensetzung zeigte, ließen sich in der Präparation der zweiten Polymerase, der mit der niedrigeren n+1-Aktivität, zwei zusätzliche Banden mit einer höheren elektrophoretischen Mobilität als der des Holoenzym detektieren (Abb. 25, Blockpfeil).

Aus der Literatur ist bekannt, daß die beiden Domänen der Polymerase durch eine begrenzte Proteolyse voneinander getrennt werden können (Ikeda und Richardson 1987, Muller et al. 1988). Eine Spaltung des Enzyms tritt beispielsweise unter bestimmten Bedingungen bei der Präparation von T7-RNA-Polymerase auf (Ikeda und Richardson 1987). Durch eine Spaltung des Proteins zwischen den Resten 172 (Lysin) und 173 (Arginin) entstehen zwei Fragmente mit Molekulargewichten von etwa 75 kDa und 23 kDa (Ikeda und Richardson 1987). Eine Spaltung zwischen den Resten 179 (Lysin) und 180 (Lysin) liefert Fragmente mit Gewichten von 80 kDa und 20 kDa (Muller et al. 1988). Das gespaltene Protein bleibt aktiv, da die beiden Domänen über nichtkovalente Interaktionen miteinander verbunden bleiben, besitzt aber eine verminderte Prozessivität auf langen Matrizen, so daß vermehrt verkürzte Produkte synthetisiert werden (Ikeda und Richardson 1987, Muller et al. 1988).

Die Molekulargewichte der oben erwähnten zusätzlichen Banden mit erhöhter elektrophoretischer Mobilität als der des Holoenzym wurden anhand der elektrophoretischen Mobilität der Markerproteine mit 78,4 kDa bzw. 69,4 kDa bestimmt. Diese Molekulargewichte liegen in der Nähe der oben erwähnten aus der Literatur bekannten Molekulargewichte von Spaltprodukten der Polymerase, so daß die beiden Banden durchaus durch eine Spaltung von T7-RNA-Polymerase in der Verbindungsregion der beiden Domänen des Enzyms entstanden sein könnten. Führt eine solche Spaltung des Enzyms möglicherweise nicht nur zu einer verminderten Prozessivität sondern gleichzeitig auch zu einer verringerten n+1-Aktivität?

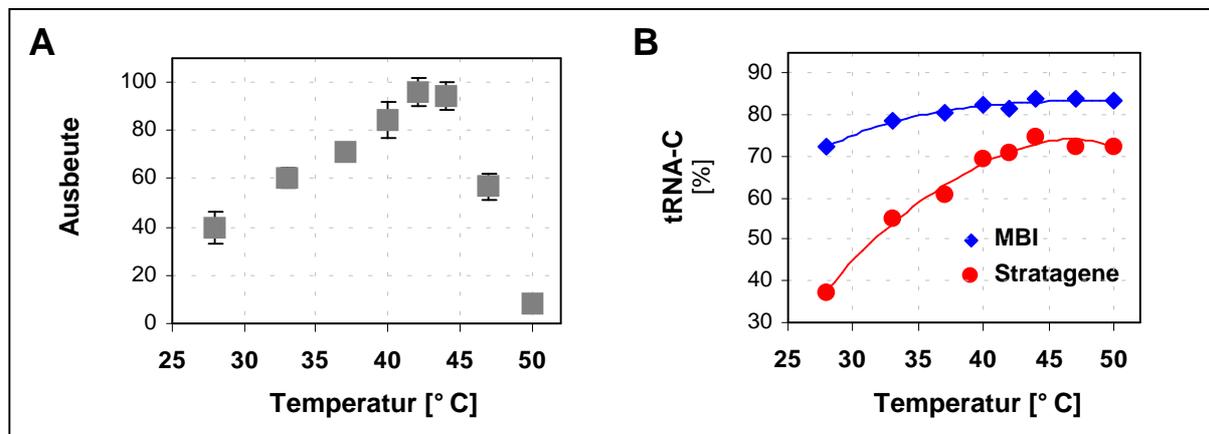
Die Prozessivität einer Polymerase beschreibt ihre Fähigkeit, nach einem Nukleotid das nächste in der Matrize kodierte Nukleotid an die wachsende Nukleotidkette anzuhängen. Insofern könnte die nicht in der Matrize kodierte Addition eines zusätzlichen Nukleotids am 3'-Ende des wachsenden RNA-Stranges, die zur Endheterogenität führt, als ein Sonderfall der Prozessivität angesehen werden. In einem solchen Fall sollte die Verringerung der n+1-Aktivität mit einem vermehrten Auftreten stärker verkürzter Transkriptionsprodukte korrelieren. Interessanterweise war eine solche Korrelation zwischen n+1-Aktivität und Prozessivität in der vorliegenden Arbeit festzustellen. Die Polymerase mit der verminderten Endheterogenität (MBI), in deren Präparation möglicherweise Spaltprodukte des Enzyms vorhanden waren, synthetisierte gleichzeitig mehr kürzere RNAs als die andere Polymerase, wie ein Blick auf das entsprechende Gel zeigt (Abb. 24). Unterhalb der Bande mit dem gewünschten Transkriptionsprodukt (tRNA-C) sind einige RNAs mit einer größeren

elektrophoretischen Mobilität zu erkennen. Somit ließe sich eine Hypothese aufstellen, nach der eine Spaltung der Polymerase in der Verbindungsregion der beiden Domänen neben einer verminderten Prozessivität bei der Synthese längerer RNAs auch zu einer verringerten n+1-Aktivität der entsprechenden Polymerase beiträgt. In Anbetracht des geringen Anteils an Proteinfragmenten in der Präparation der Polymerase erscheint eine solche Hypothese allerdings fraglich. Auch zeigte die andere Polymerase bei höheren Temperaturen eine drastisch verminderte n+1-Aktivität, ohne daß vermehrt verkürzte Produkte auftraten. Dies ist ein Argument gegen eine Verbindung von n+1-Aktivität und Prozessivität.

*Homogenität der Transkriptionsprodukte und Ausbeute weisen ein identisches Temperaturoptimum auf, das deutlich über der normalerweise für die Transkription mit T7-RNA-Polymerase gebräuchlichen Temperatur von 37°C liegt*

Das bemerkenswerteste Ergebnis dieses Kapitels besteht in der Temperaturabhängigkeit der n+1-Aktivität von T7-RNA-Polymerase. Der Anteil korrekter Produkte an der Gesamtmenge der synthetisierten RNAs war vor allen Dingen bei der Polymerase mit der größeren n+1-Aktivität bei Temperaturen oberhalb 37°C deutlich größer als bei 37°C, ohne daß vermehrt stärker verkürzte Produkte auftraten. Bei der optimalen Temperatur von 44°C unterschieden

Abb. 26



*Einfluß der Temperatur auf die Ausbeute an Transkripten und auf den Anteil korrekter Transkripte an der Gesamtmenge der während der T7-Transkription entstehenden Transkripte:*

Die T7-Transkription von ptPheY(FokI) wurde wie unter Material und Methoden beschrieben bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt. Für die Quantifizierung wurden die Transkripte über den Einbau von  $\alpha$ - $^{35}$ S-CTP radioaktiv markiert.

**A:** Ausbeute an Gesamttranskript in Abhängigkeit von der Temperatur: Nach der Transkription wurden die über den Einbau von  $\alpha$ - $^{35}$ S-CTP radioaktiv markierten Transkripte einer TCA-Fällung unterzogen und mittels Flüssigkeitsszintillationszählung quantifiziert. Für jede Versuchsreihe wurde der jeweils höchste Wert zu 100% gesetzt und hiernach ein Mittelwert aus den verschiedenen Versuchsreihen berechnet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Synthesen. **B:** Anteil korrekten Transkriptes (tRNA-C) an der Gesamtmenge an Transkript: Die Transkripte wurden in einem 6%-igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Sequenziergel auf ein Nukleotid genau aufgetrennt. Hiernach wurden die markierten Transkripte mit dem PhosphoImager detektiert und die einzelnen Banden mit Hilfe des Programms ImageQuant quantifiziert.

Für beide Polymerasen wurde das Optimum der Synthese bei einer Temperatur zwischen 42°C und 44°C erreicht. Homogenität des gewünschten Produktes (tRNA-C) und Menge der synthetisierten RNAs weisen somit ein nahezu identisches Temperaturoptimum auf.

sich die beiden Polymerase-Präparationen nur noch geringfügig in ihrer n+1-Aktivität. Die Zunahme korrekten Produktes mit ansteigender Reaktionstemperatur korrelierte mit einer deutlichen Zunahme an Gesamtprodukt (Abb. 26). Für beide Polymerasen wurde das Optimum der Synthese bei einer Temperatur zwischen 42°C und 44°C erreicht. Homogenität und Menge der bei der Transkription mit T7-RNA-Polymerase entstehenden RNAs weisen somit ein nahezu identisches Temperaturoptimum auf, welches deutlich über der normalerweise für die Durchführung der T7-Transkription gebräuchlichen Temperatur von 37°C liegt.

Eine ähnliche, aber temperaturunabhängige Korrelation zwischen verminderter n+1-Aktivität und zunehmender Ausbeute wie in der vorliegenden Arbeit findet sich bei Khao et al. (1999). Sie zeigten, daß die n+1-Aktivität von T7-RNA-Polymerase deutlich verringert werden kann, wenn das 5'-Ende des nichtkodogenen Stranges der DNA-Matrize Nukleotide mit einer 2'-O-Methylgruppe enthält. Auch hier stieg die absolute Ausbeute an RNA mit der zunehmenden Homogenität der Produkte an. Vermutlich ist die n+1-Aktivität von T7-RNA-Polymerase auf ein Verharren der Polymerase am 5'-Ende des nichtkodogenen DNA-Stranges zurückzuführen. Die Anwesenheit eines Terminatorknucleosids wie auch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur führen demnach möglicherweise zu einem schnelleren Abfallen der Polymerase von der DNA-Matrize.

*Die verminderte n+1-Aktivität von T7-RNA-Polymerase bei erhöhter Temperatur ist möglicherweise auf eine Beeinflussung des Carboxylterminus der Polymerase zurückzuführen*

In der vorliegenden Arbeit nahm die absolute Ausbeute an Produkt bei Temperaturen oberhalb von 44°C rapide ab (Abb. 26A). Dieses Resultat steht im Einklang mit der Thermostabilität von T7-RNA-Polymerase. Gardner et al. (1997) bestimmten den Schmelzpunkt ( $T_m$ ) von T7-RNA-Polymerase mit 48,5°C. Es ist somit nicht verwunderlich, daß bei dieser Temperatur in der vorliegenden Arbeit kaum noch Synthese stattfand. Das Aufschmelzen von T7-RNA-Polymerase ist ein kooperativer Prozeß, der sich über einen Temperaturbereich von 6°C erstreckt (Gardner et al. 1997). Dies würde bedeuten, daß Homogenität und Ausbeute der bei der T7-Transkription entstehenden RNAs ein Temperaturoptimum besitzen, bei dem das Aufschmelzen der Polymerase bereits im Gange ist.

Der Carboxylterminus von T7-RNA-Polymerase enthält die hydrophobe Aminosäuresequenz Phe-Ala-Phe-Ala<sup>883</sup> (FAFA). Man nimmt an, daß das C-terminale FAFA-Motiv in der Nähe des aktiven Zentrums der T7-RNA-Polymerase liegt. Wahrscheinlich geht das Motiv sowohl Wechselwirkungen mit dem initiierenden NTP als auch mit dem T7-Promotor ein (Gardner et al. 1997). Es wurde gezeigt, daß ein Austausch von Aminosäuren innerhalb des Motivs zu einer Veränderung des Aufschmelzverhaltens der Polymerase führen kann (Gardner et al. 1997). Gardner et al. untersuchten verschiedene Mutationen innerhalb des Carboxylterminus der Polymerase. Eine dieser Mutationen (FAAA<sup>883</sup>) bewirkte einen deutlich erniedrigten

Schmelzpunkt der Polymerase. Diese Mutante war zudem nicht dazu in der Lage, die RNA-Synthese über die Initiationsphase der Transkription hinaus fortzusetzen. Die Initiationsphase der Transkription wurde auch durch Martin et al. (1988) untersucht. Bei ihnen zeigte eine Erhöhung der Temperatur denselben Effekt wie die Mutation des Carboxylterminus bei Gardner et al.: Mit zunehmender Temperatur kam es zu einem verstärkten Abfallen der Polymerase während der Polymerisation der ersten acht Nukleotide und infolgedessen zu einer Zunahme von abortiven Transkripten. Mutationen innerhalb des Carboxylterminus von T7-RNA-Polymerase können sich auch auf die n+1-Aktivität auswirken. In der schon mehrmals erwähnten Studie von Gardner et al. (1997) zeigte eine Mutante mit dem Carboxylterminus AAFA<sup>883</sup> eine kaum nachweisbare n+1-Aktivität. Die geschilderten Verhältnisse machen eine Hypothese wahrscheinlich, nach der die in der vorliegenden Studie nachgewiesene Temperaturabhängigkeit der n+1-Aktivität von T7-RNA-Polymerase auf eine thermische Beeinflussung des Carboxylterminus zurückzuführen ist.

#### *Signifikanz der Untersuchungen zur Endheterogenität*

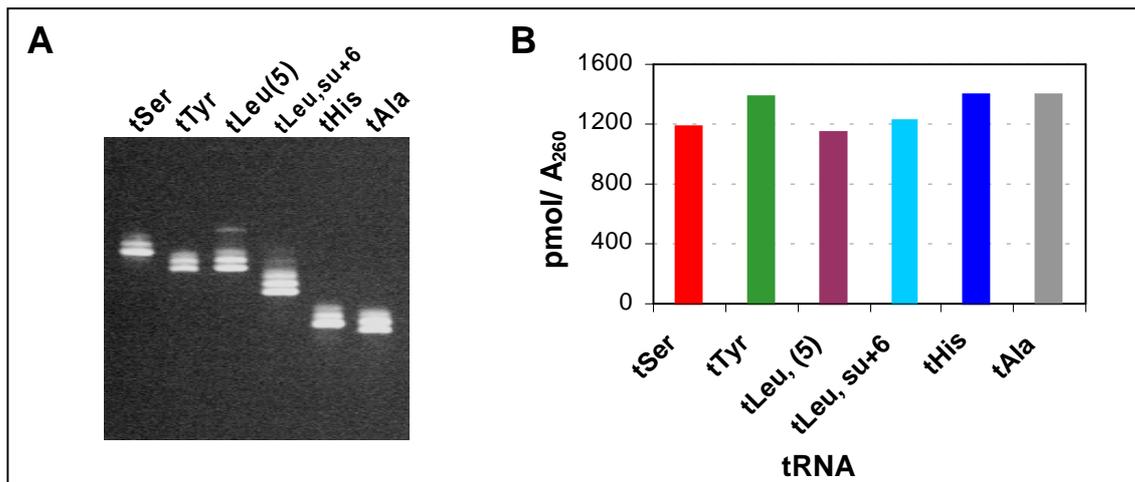
Das Anfügen eines zusätzlichen Nukleotids durch T7-RNA-Polymerase erschwert den Einsatz von mittels T7-Transkription generierten RNAs bei Anwendungen, die homogene Präparationen der entsprechenden RNA verlangen. Besonders bei Längen über 50 Nukleotide ist eine Abtrennung der um ein Nukleotid verlängerten unerwünschten Transkripte nur über eine Gelelektion möglich und äußerst mühsam. 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 homogener RNA-Populationen während der T7-Transkription. Die Anwendung höherer Temperaturen während der Transkription, möglicherweise in Kombination mit anderen Methoden, wie der Einführung eines Terminatorkleosids am 5'-Ende des nichtkodogenen Matrizenstranges (Khao et al. 1999), sollte letztendlich eine Aufreinigung von homogenen T7-Transkripten über einfachere Methoden – wie beispielsweise mittels HPLC – ermöglichen.

#### **5.5.2 Aminoacylierung und Prozessierung *in vitro* transkribierter endheterogener tRNAs**

*Die bei der T7-Transkription auftretende Endheterogenität wirkt sich nicht auf die Aminoacylierbarkeit von *in vitro* transkribierten tRNAs in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems aus*

In dieser Arbeit entstanden während der T7-Transkription *in vitro* neben tRNAs mit korrektem CCA-Ende größere Mengen von tRNA-Molekülen, die am 3'-Ende um ein oder zwei Nukleotide verlängert waren. Das Auftreten solcher verlängerter Transkripte während der T7-Transkription ist auch aus vielen anderen Untersuchungen bekannt (Milligan et al. 1987,

Abb. 27



*Einfluß der Endheterogenität auf die Aminoacylierbarkeit verschiedener T7-transkribierter tRNAs:*

Um den Einfluß der Endheterogenität auf die Aminoacylierbarkeit verschiedener T7-transkribierter tRNAs zu untersuchen, wurden heterogene Präparationen verschiedener tRNA-Spezies hergestellt. Hierzu wurden die tRNAs wie unter Material und Methoden beschrieben von linearisierten Plasmiden transkribiert und aus denaturierenden Gelen eluiert. Hiernach wurden die tRNAs in der S100-Enzymfraktion des Translationsystems aminoacyliert.

**A:** Gelelektrophoretische Auftrennung der Transkripte im denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel; Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des ethidiumbromidgefärbten Gels. Man beachte die ausgeprägte Heterogenität der verschiedenen Transkripte.

**B:** Aminoacylierbarkeit der verschiedenen in A gezeigten Transkripte; Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die Transkripte wie unter Material und Methoden beschrieben in Gegenwart der entsprechenden <sup>14</sup>C-Aminosäuren in der S100-Enzymfraktion des *in vitro* Translationsystems aminoacyliert. Nach der Aminoacylierung wurden die tRNAs mit kalter TCA gefällt und die fällbaren Aminosäuren mittels Flüssigkeitsszintillationszählung quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Menge der fällbaren Aminosäuren [pmol] im Verhältnis zu der für die Aminoacylierung eingesetzten Menge an Transkript [A<sub>260</sub>]. (Ein A<sub>260</sub> entspricht im Mittel 1600 pmol tRNA)

Der hohe Grad an Endheterogenität läßt einen hohen Anteil von Transkripten mit nicht korrekten CCA-Enden in der Präparation vermuten. Im Kontrast zu der großen Endheterogenität lassen sich die Transkripte hervorragend aminoacylieren.

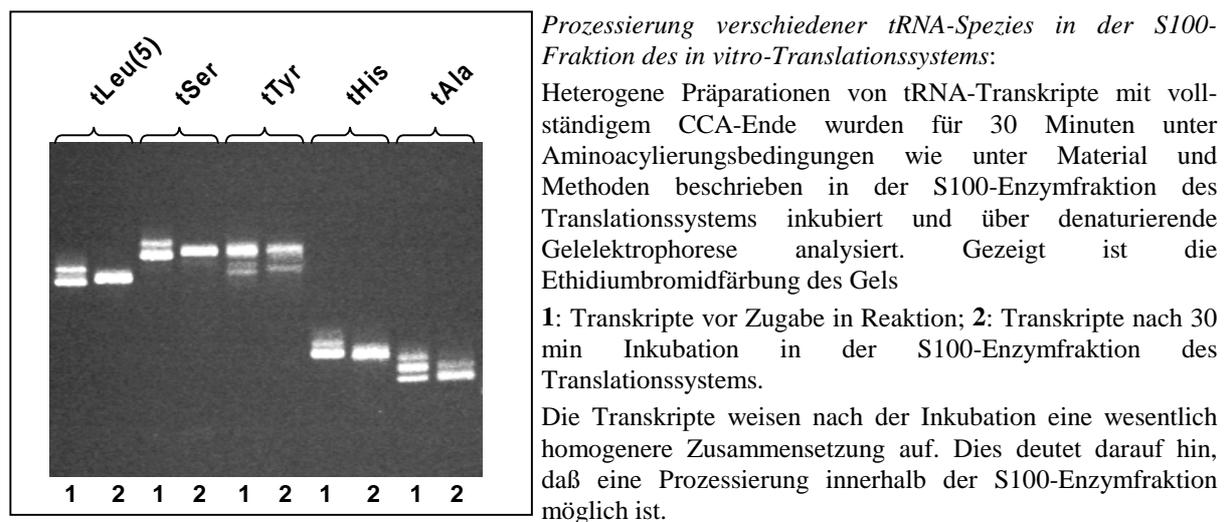
Sammuelson et al. 1988, Kholod et al. 1998). In einigen Fällen hatten entsprechende um ein oder zwei Nukleotide verlängerte Transkripte einen Anteil zwischen 30 und 70 % an der Gesamtmenge der Transkripte. Eine Möglichkeit, Homogenität und Reinheit von tRNA-Präparationen zu überprüfen, besteht in der Aminoacylierung der aufgereinigten tRNAs. Entsprechend wurde die Aminoacylierbarkeit von Transkripten der tRNA-Spezies tSer, tTyr, tLeu<sub>(5)</sub>, tLeu<sub>su+6</sub>, tHis und tAla in der S100-Enzymfraktion des *in vitro*-Translationsystems untersucht. Hierzu wurden die Transkripte aus denaturierenden Gelen eluiert, ohne sie auf ein Nukleotid genau aufzutrennen. Hiernach wurden die aufgereinigten tRNAs mit den entsprechenden <sup>14</sup>C-Aminosäuren aminoacyliert (Abb. 27). Der Einbau der radioaktiven Aminosäuren wurde über eine Präzipitation der Aminoacyl-tRNAs mittels TCA-Fällung quantifiziert und die fällbare Menge an Radioaktivität in Beziehung zu der eingesetzten Menge an Transkript gesetzt. Es zeigte sich, daß alle eingesetzten tRNAs sehr gut aminoacyliert werden konnten. Der Anteil der aminoacylierbaren Transkripte lag bei ca. 1200 bis 1400 pmol Aminoacyl-tRNA pro A<sub>260</sub> an eingesetztem Transkript. Dies bedeutet, daß

zwischen 75% und 90% der eingesetzten Transkriptmenge aminoacyliert werden konnte. Anhand des Gels (Abb. 27A) läßt sich abschätzen, daß der Anteil an Transkripten mit korrektem CCA-Ende bei einigen der untersuchten tRNA-Spezies weit unter 50% lag. Die sehr guten Aminoacylierungsraten korrelieren also nicht mit der starken Endheterogenität der Transkripte. Die bei der T7-Transkription auftretende Endheterogenität wirkt sich sehr wahrscheinlich nicht auf die Aminoacylierbarkeit der T7-Transkripte aus.

*Verlängerte Transkripte werden in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems prozessiert*

Die hervorragende Aminoacylierbarkeit extrem heterogener Populationen von tRNA-Transkripten brachte einen ersten Hinweis darauf, daß eine Prozessierung der verlängerten Transkripte zu tRNAs mit reifem CCA-Ende in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Extrakten möglich war. Die Prozessierung der verlängerten tRNAs zu Molekülen mit reifem CCA-Ende sollte anhand der elektrophoretischen Mobilität der Transkripte im denaturierenden Harnstoffgel vor und nach der Aminoacylierungsreaktion verfolgt werden

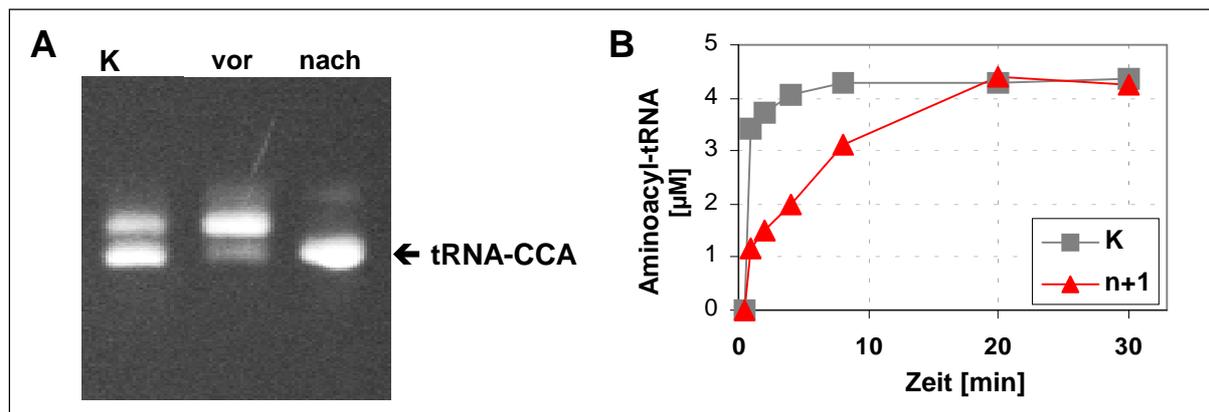
Abb. 28



können. Abbildung 28 zeigt verschiedene Aufarbeitungen von Transkripten vor und nach der Inkubation in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems. Nach der Aminoacylierung zeigen neben tLeu<sub>(5)</sub> auch tSer, tTyr, tHis und tAla eine homogenere Zusammensetzung. Mit größter Wahrscheinlichkeit können die in Anbetracht der Heterogenität der Transkripte sehr hohen Aminoacylierungsraten auf die Prozessierung der verlängerten Transkripte zurückgeführt werden.

Die Prozessierung von Transkripten, die um ein Nukleotid verlängert waren, wurde anhand von tLeu<sub>(5)</sub> genauer analysiert. Hierzu wurde das um ein Nukleotid verlängerte Transkript dieser tRNA-Spezies aus hochauflösenden Polyacrylamidgelen eluiert und aminoacyliert (Abb. 29). Erwartungsgemäß war das um ein Nukleotid verlängerte Transkript (tRNA-CCAN)

Abb. 29



Prozessierung und Aminoacylierung des um ein Nukleotid verlängerten Transkriptes von tLeu(5) in der S100-Enzymfraktion des *in vitro*-Translationssystems:

Prozessierung und Aminoacylierung einer am CCA-Ende um ein Nukleotid verlängerten tRNA sind am Beispiel von tLeu<sub>(5)</sub> gezeigt. Hierzu wurde das während der T7-Transkription entstehende um ein Nukleotid verlängerte Transkript (tRNA-CCAN) der tRNA aus einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel eluiert und in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems aminoacyliert.

**A:** Ethidiumbromidfärbung eines denaturierenden Gels mit den Transkripten: (**K**): Die bei der Transkription des mit BstNI linearisierten Plasmids entstehenden Transkripte von tLeu<sub>(5)</sub> zeigen eine heterogene Zusammensetzung. (**vor**): Die obere Bande aus K, die dem um ein Nukleotid verlängerten Transkript der tRNA entspricht, nach der Elution aus einem denaturierenden PAA-Gel und vor der Inkubation in der S100-Enzymfraktion, (**nach**): Dasselbe Transkript nach einer Inkubation von 20 Minuten in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems unter Aminoacylierungs-Bedingungen.

**B:** Kinetik der Aminoacylierung des um ein Nukleotid verlängerten Transkriptes (tLeu<sub>(5)</sub>-CCAN): 5 µM der homogenen Präparation des um ein Nukleotid verlängerten Transkriptes aus A (vor) wurden mit <sup>14</sup>C-Leucin bei einer S100-Konzentration von 0,2 µg S100 pro µl Reaktion aminoacyliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots der Reaktionen mittels TCA-Fällung und Szintillationszählung analysiert. n+1: Aminoacylierungskinetik des um ein Nukleotid verlängerten Transkriptes.

Das um ein Nukleotid verlängerte Transkript wird zwar etwas langsamer aminoacyliert als die Kontrolle, ist aber letztendlich genauso aminoacylierbar wie die Kontrolle, die vor der Inkubation einen wesentlich größeren Anteil an Transkripten mit korrektem CCA-Ende enthielt. Während der Inkubation wurde das Transkript offensichtlich um ein Nukleotid verkürzt und ein korrektes CCA-Ende generiert.

nahezu vollständig aminoacylierbar. Es wurde bei der verwendeten S100-Konzentration zwar etwas langsamer aminoacyliert als eine Kontrolle, die einen sehr großen Anteil von Transkripten mit korrektem CCA-Ende enthielt. Letztendlich erreichte die Aminoacylierung aber das gleiche Niveau wie in der Kontrolle (Abb. 29B). Das entsprechende Gel der Transkripte vor und nach der Aminoacylierung zeigt, daß die tRNA während der Inkubation im S100 um ein Nukleotid verkürzt wurde (Abb. 29A). Das zusätzliche endständige Nukleotid der tRNA-CCAN wurde während der Inkubation wahrscheinlich abgespalten, so daß ein aminoacylierbares CCA-Ende entstand. Die S100-Fraktion des in der Arbeit verwendeten *in vitro*-Translationssystems enthält offensichtlich eine genügend hohe Aktivität der an der tRNA-Reifung beteiligten Exonukleasen, um die heterogenen Enden von *in vitro* transkribierten tRNAs zu prozessieren.

Daß die Prozessierung von tRNA-Vorläufermolekülen zu reifen tRNAs *in vitro* möglich ist, ist im Prinzip schon sehr lange bekannt. Zum ersten Mal wurde die Prozessierung von tRNA-

Vorläufer-Molekülen *in vitro* anhand der *Escherichia coli* tRNA<sup>Tyr</sup>-Spezies (*amber-Suppressor-tRNA* su<sup>+</sup><sub>3</sub>) gezeigt. Diese tRNA kann über die Transfektion mit dem Phagen  $\phi 80\text{psu}^+$ <sub>3</sub>, der das entsprechende tRNA-Gen enthält, in *Escherichia coli* überexprimiert werden (Russel et al. 1967, Abelson et al. 1970). Mit tRNA-Vorläufer-Molekülen, die aus entsprechenden  $\phi 80$ - infizierten *Escherichia coli*-Zellen isoliert wurden, standen Substrate für Experimente in S100-Extrakten zur Verfügung, die zur Entdeckung der ersten an der Prozessierung von tRNAs beteiligten Enzymen führten (Robertson et al. 1972, Schedl et al. 1976). Die *in vitro* Transkription von tRNA-Vorläufermolekülen machte hiernach detailliertere Untersuchungen der Prozessierung möglich.

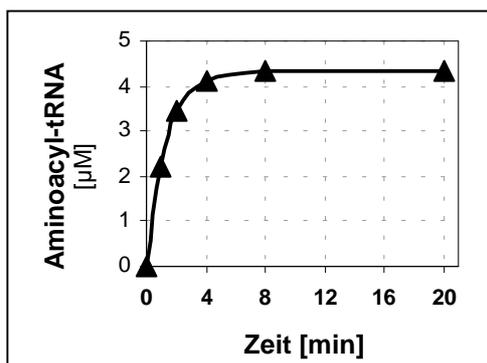
Die Prozessierung heterogener tRNA-Populationen in einer S100-Enzymfraktion ist offensichtlich eine hervorragende Alternative zur Aufreinigung homogener tRNAs über die Elution aus hochauflösenden Polyacrylamidgelen. In Anbetracht dieser Tatsache ist es erstaunlich, daß die Prozessierung der um ein oder zwei Nukleotide verlängerten Transkripte, wie sie in heterogenen Populationen von T7-Transkripten anzutreffen sind, zu tRNAs mit reifem CCA-Ende bisher in der Literatur nicht beschrieben ist. Es ist allerdings bekannt, daß um ein oder zwei Nukleotide verlängerte tRNAs als Zwischenprodukte während der Prozessierung längerer tRNA-Vorläufermoleküle auftreten (Cudny und Deutscher 1988, Li und Deutscher 1994). Diese Zwischenprodukte der Prozessierung können *in vitro* in ähnlichen S100-Extrakten, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, detektiert werden (Cudny und Deutscher 1988, Li und Deutscher 1994). Li und Deutscher (1994) führten Versuche mit *in vitro* transkribierten längeren tRNA-Vorläufern durch. Sie konnten zeigen, daß Prä-tRNA<sup>Tyr</sup> (su<sup>+</sup><sub>3</sub>) (+77 Nt's) in Extrakten, die aus *Escherichia coli* Wildtyp-Stämmen gewonnen wurden, bis zur reifen tRNA prozessiert wird: In Extrakten aus Zellstämmen, die defizient an bestimmten prozessierenden Enzymen waren, traten unter bestimmten Bedingungen Intermediate der Prozessierung auf. So akkumulierten in Extrakten aus RNasePH-defizienten Zellstämmen Intermediate, die um zwei Nukleotide verlängert waren. Im Gegensatz hierzu reicherten sich in Extrakten, die defizient an RNaseT waren, zusätzlich zu den +2-Intermediaten +1- Intermediate an. Während die +2-Intermediate nach der Zugabe von P<sub>i</sub> verschwanden, blieben die +1-Intermediate. Hierdurch konnten Li und Deutscher zeigen, daß RNasePH und RNaseT unterschiedliche Spezifitäten für verschieden lange Überhänge zeigen. Die erwähnten bei der Prozessierung längerer Vorläufertranskripte auftretenden Intermediate entsprechen im Prinzip höchstwahrscheinlich den um ein oder zwei Nukleotide verlängerten tRNA-Molekülen, wie sie in der vorliegenden Arbeit in heterogenen Präparationen von T7-transkribierten tRNAs anzutreffen waren.

#### *Der Einfluß der Aminoacylierung auf die Prozessierung in vitro transkribierter tRNAs*

Als nächstes wurde der Einfluß der Aminoacylierung auf die Prozessierung untersucht. Hierzu wurde die Prozessierbarkeit zweier tRNAs in An- und Abwesenheit von Aminosäure

miteinander verglichen: In tAla ist die Anwesenheit des Basenpaares G<sub>3</sub>-U<sub>70</sub> innerhalb des Akzeptorarms essentiell für die Erkennung durch Alanyl-tRNA-Synthetase (Hou und Schimmel 1988). Der Austausch von von U<sub>70</sub> gegen C<sub>70</sub> führt zu einer kompletten Abschaltung der Aminoacylierung (Park et al. 1989). Die beiden tRNAs tAla und tAla<sup>C70</sup> eignen sich somit hervorragend dazu, den Einfluß der Aminoacylierung auf die Prozessierung zu untersuchen.

Abb. 30



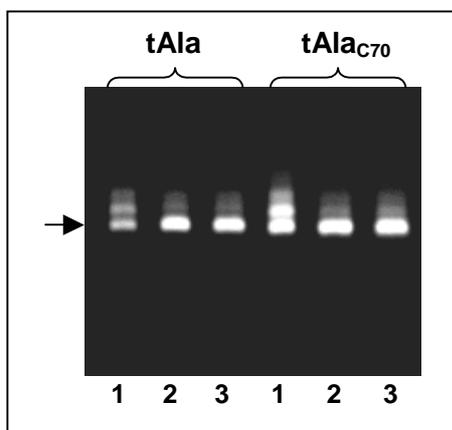
*Aminoacylierung von tRNA<sup>Ala</sup><sub>CUA</sub> (tAla) in der S100-Enzymfraktion des in vitro Translationssystems:*

Das Plasmid ptAla wurde mit BstNI linearisiert und die tRNA wie unter Material und Methoden beschrieben transkribiert. 5 µM geleluertes Transkript wurde mit <sup>14</sup>C-Alanin aminoacyliert. Zu verschiedenen Zeiten wurden der Reaktion Aliquots entnommen und über TCA-Fällung quantifiziert.

Das Transkript der tRNA ist nahezu vollständig aminoacylierbar.

Die Aufnahme der Aminoacylierungskinetik tAla („Wildtyp“) zeigte, daß diese tRNA in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems effektiv aminoacyliert werden konnte (Abb.30). Erwartungsgemäß war dies bei der tRNA mit abgeschalteter Aminoacylierung, tAla<sup>C70</sup>, nicht möglich. Beide tRNAs wurden hiernach sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Alanin in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems inkubiert. Das Gel der Transkripte vor und nach der Inkubation zeigt, daß die beiden tRNAs während der Inkubation effektiv prozessiert wurden (Abb. 31). Es ist keine Beeinträchtigung der Prozessierbarkeit der aminoacylierbaren „Wildtyp“-tRNA durch die Abwesenheit von Alanin festzustellen. Auch die Abschaltung der Aminoacylierung hat keinen Einfluß auf die Zusammensetzung der

Abb. 31



*Einfluß der Aminoacylierung auf die Prozessierung von tAla und tAla<sub>C70</sub> in An- und Abwesenheit von Alanin:*

Von den beiden tRNA-Spezies tAla und tAla<sub>C70</sub> wurden heterogene Transkripte mit vollständigem CCA-Ende hergestellt und in An- und Abwesenheit von Alanin für 30 Minuten in der S100-Enzymfraktion inkubiert. Die Prozessierung beider tRNA-Spezies wurde anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität analysiert. Gezeigt ist die Ethidiumbromidfärbung des denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgels.

1: Transkripte vor Zugabe in Reaktion; 2 und 3: Transkripte nach 30 min Inkubation im S100, 2: in Anwesenheit von 200 µM Alanin, 3: in Abwesenheit von Alanin. Der Pfeil markiert die Position der prozessierten tRNAs (tRNA-CCA).

Die Transkripte von tAla<sub>C70</sub>, deren Aminoacylierung abgeschaltet wurde, zeigen nach der Inkubation das gleiche Laufverhalten wie die der aminoacylierbaren "Wildtyp"-tRNA tAla. Auch die Abwesenheit von Alanin äußert sich nicht in einer Veränderung des Bandenmusters.

---

Transkripte nach der Prozessierung. Eine Aminoacylierung der tRNAs wirkt sich offensichtlich nicht auf die Effizienz der Prozessierung der Moleküle innerhalb des Systems aus. Die CCA-Enden der tRNAs scheinen auch ohne eine Stabilisierung durch Aminoacylierung sehr stabil zu sein. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, wenn man die große Stabilität auch anderer kleiner, nicht aminoacylierbarer RNA-Moleküle berücksichtigt. Die extreme Stabilität der tRNA-Moleküle (wie auch die anderer kleiner RNA-Moleküle) beruht zu einem großen Teil auf ihrer Struktur, die die reifen tRNAs zu einem äußerst schlechten Substrat für Exoribonukleasen macht (Li et al 1998). Die Ausbildung dieser Struktur macht zugleich die Prozessierung der während der Transkription der tRNA-Gene entstehenden langen Vorläufermoleküle zu reifen tRNAs erst möglich.

## 5.6 Prozessierung, Aminoacylierung und tRNA-Reparatur – ihr Einfluß auf die Aktivität zweier in Leucyl-amber-Suppressor-tRNAs in der *in vitro* Translation

*In vivo* sind tRNAs äußerst stabile Moleküle. Ihre Umsatzrate in *Escherichia Coli* ist wesentlich niedriger als die Generationszeit einer *Escherichia Coli*-Zelle (Pace et al. 1970). Die große Stabilität der tRNAs ist zum Teil eine Folge ihrer Struktur, die sie zu einem äußerst schlechten Substrat für die RNA-abbauenden Nukleasen macht. Erst diese den Angriff von Exonukleasen erschwerende Struktur macht die Prozessierung längerer Vorläufertranskripte zu reifen tRNAs möglich (Li et al. 1998). Dennoch sind die nicht aminoacylierten reifen CCA-Enden der tRNAs dem Angriff durch Exonukleasen, vor allen Dingen RNaseT, ausgesetzt (Deutscher et al. 1985). In *Escherichia coli* existiert ein Reparaturmechanismus für solche CCA-Enden, die durch den Angriff von Exonukleasen abgebaut worden sind. Entscheidend für die Reparatur des 3'-CCA-Endes der tRNA ist das Enzym ATP(CTP):tRNA-Nukleotidyl-Transferase. Es katalysiert die Regeneration des CCA-Endes von verkürzten tRNAs, indem es ein vollständiges CCA-Ende bei tRNAs synthetisiert, denen ein, zwei oder drei der terminalen Nukleotide fehlen (Sprinzl und Cramer 1979, Deutscher 1982, Reuven und Deutscher 1993). Man nimmt an, daß auf diese Weise das 3'-Ende von tRNAs in *Escherichia coli* einem ständigen Umsatz durch Abbau und Reparatur unterliegt (Reuven und Deutscher 1993).

Für die Bestimmung der Suppressionseffizienz einer tRNA ist eine genaue Kenntnis der Konzentration sowie des Aminoacylierungsgrades der jeweiligen tRNA essentiell. Aus diesem Grund wurde den verschiedenen Prozessen, die sich am 3'-Ende der tRNA abspielen und letztendlich in die Aminoacylierung der tRNA münden (Prozessierung, Degradation und Reparatur) innerhalb der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet. Im vorherigen Kapitel konnte bereits gezeigt werden, daß die in den heterogenen Präparationen von T7-transkribierten tRNAs anzutreffenden, um ein oder zwei Nukleotide verlängerten Transkripte innerhalb der S100-Enzymfraktion des Translationssystems effizient zu reifen tRNAs prozessiert werden. Eine interessante Frage aber ist es, wie sich die Anwesenheit solcher verlängerter Transkripte auf die Aktivität von tRNAs in der *in vitro* Translationsreaktion auswirkt. Daneben könnte die Effizienz der Reparatur verkürzter tRNAs im Falle einer Degradation reifer CCA-Enden einen großen Einfluß auf die Stabilität der tRNA-Moleküle innerhalb des Translationssystems und damit auf die Translationsaktivität haben. *In vivo* wurde gezeigt, daß *Escherichia coli*-Zellstämme, denen das Enzym tRNA-Nukleotidyl-Transferase fehlt, äußerst langsam wachsen. In solchen Zellstämmen enthalten 10-15% der gesamten tRNA-Menge unvollständige 3'-Enden (Zhu und Deutscher 1987). In den folgenden Kapiteln wird das in der vorliegenden Arbeit verwendete *in vitro* Translationssystem im Hinblick auf Prozessierung, Aminoacylierung und Reparatur der 3'-Enden *in vitro* transkribierter tRNAs anhand zweier Leucyl-tRNA-Spezies (tLeu<sub>(5)</sub> und tLeu<sub>su+6</sub>) charakterisiert.

Das in der vorliegenden Arbeit für die zellfreie Proteinbiosynthese verwendete fraktionierte System bietet hervorragende Voraussetzungen für die geplanten Untersuchungen. Es besteht im wesentlichen aus einer nukleinsäurefreien S100-Enzymfraktion, einer ribosomalen 70S-Fraktion und einer tRNA-Fraktion (vgl. Abb.9, Seite 62). Aminoacylierung, Prozessierung, Degradation oder Reparatur von tRNA-Molekülen lassen sich in der S100-Enzymfraktion, wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits zum Teil ausführlich belegt, sehr gut untersuchen. Da die S100-Enzymfraktion ein Bestandteil des Gesamtsystems ist, sollten die Untersuchungen von tRNAs in dieser Fraktion Rückschlüsse auf das Gesamtsystem erlauben.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen folgende Fragen: Funktioniert die tRNA-Reparatur verkürzter Transkripte *in vitro* und kann sie einen Beitrag zur Stabilität der Transkripte leisten? Wie groß ist der Umsatz des 3'-Endes *in vitro* transkribierter tRNAs in dem verwendeten System? Welchen Einfluß hat die Aminoacylierung der tRNAs auf den Umsatz des 3'-Endes und führt eine Aminoacylierung der tRNAs möglicherweise zu einer erhöhten Stabilität? Welche Prozesse sind limitierend für die Translationsaktivität der beiden tRNAs? Wirkt sich die in den vorangegangenen Kapiteln gezeigte Prozessierbarkeit der während der T7-Transkription entstehenden um ein oder zwei Nukleotide verlängerten Transkripte auf ihre Aktivität in der *in vitro* Translation aus?

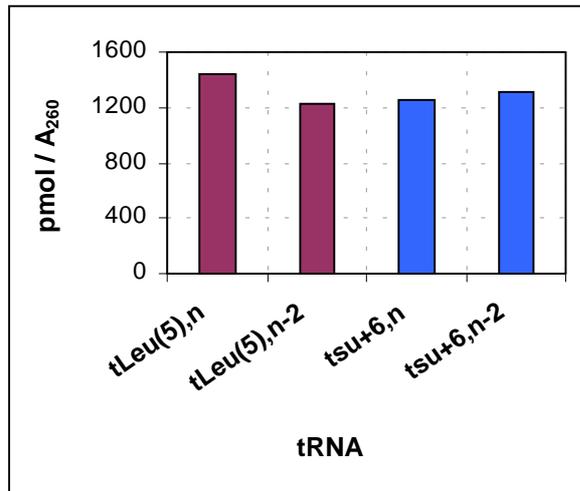
### 5.6.1 Untersuchungen in der S100-Enzymfraktion des Gesamtsystems

*Verkürzte Transkripte der amber-Suppressor-tRNAs tLeu(5) und tLeu<sub>su+6</sub> werden in der S100-Fraktion des in vitro Translationssystems effektiv aminoacyliert*

Von beiden Leucyl-tRNA-Spezies (tLeu<sub>(5)</sub> und tLeu<sub>su+6</sub>) wurden heterogene Präparationen von um zwei Nukleotide am CCA-Ende verkürzten Transkripten hergestellt. Die Aminoacylierbarkeit dieser Transkripte mit unvollständigem CCA-Ende wurde in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems überprüft. Zur Ermittlung der maximalen Aminoacylierungskapazität der tRNA-Präparation wurden Transkripte mit vollständigem CCA-Ende eingesetzt. Es zeigte sich, daß der Anteil aminoacylierbarer tRNAs an der Gesamtmenge der eingesetzten Transkripte bei den verkürzten Transkripten mit ca. 80% ebensogroß war wie bei den Transkripten mit vollständigem CCA-Ende (Abb.32). Dies war ein erster Hinweis darauf, daß eine Reparatur verkürzter Transkripte innerhalb des verwendeten Systems möglich war.

*Die Regeneration des CCA-Endes ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der Aminoacylierung verkürzter tRNAs*

Abb. 32



Aminoacylierungsrate von verkürzten und "full length"-Transkripten der beiden Leucyl-tRNA-Spezies:

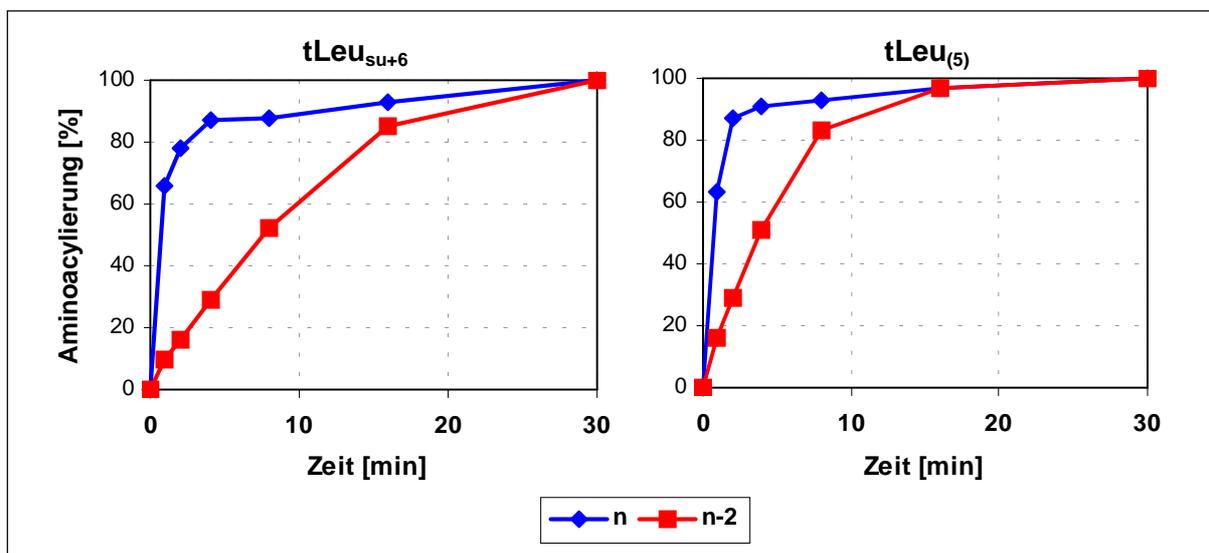
Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die Transkripte wie unter Material und Methoden beschrieben in Gegenwart der entsprechenden <sup>14</sup>C-Aminosäuren in der S100-Enzymfraktion des *in vitro* Translationsystems aminoacyliert. Nach der Aminoacylierung wurden die tRNAs mit kalter TCA gefällt und die fällbaren Aminosäuren mittels Flüssigkeitsszintillationszählung quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Menge der fällbaren Aminosäuren in pmol im Verhältnis zu der für die Aminoacylierung eingesetzten photometrisch bestimmten Menge an Transkript, wobei ein A<sub>260</sub> (Absorptionseinheit bei 260 nM) einer Menge von 1600 pmol tRNA entspricht

tLeu(5),n und tsu+6,n: tRNAs mit vollständigem CCA-Ende; tLeu(5),n-2 und tsu+6,n-2: tRNAs mit verkürztem CCA-Ende.

tRNAs mit verkürztem CCA-Ende werden genauso effektiv aminoacyliert wie tRNAs mit vollständigem CCA-Ende.

Die Aminoacylierung von Transkripten der Länge n und n-2 wurde anhand der fortschreitenden Markierung der tRNAs mit <sup>14</sup>C-Leucin im Laufe der Aminoacylierungs-

Abb. 33



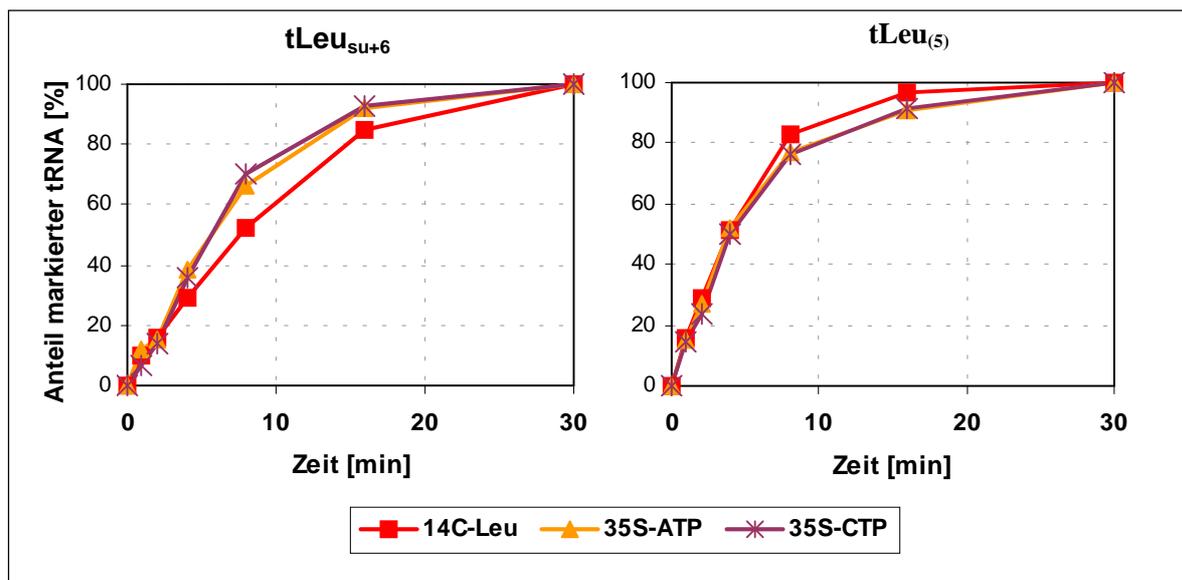
Aminoacylierung von verkürzten Transkripten und solchen mit vollständigem CCA-Ende in der S100-Enzymfraktion des Translationsystems:

Transkripte der beiden tRNA-Spezies tLeu<sub>su+6</sub> und tLeu(5) wurden wie unter Material und Methoden beschrieben in der S100-Enzymfraktion des Translationsystems mit <sup>14</sup>C-Leucin aminoacyliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots der Reaktionen mittels TCA-Fällung und Szintillationszählung analysiert.

n: bei der Transkription des mit BstNI linearisierten Plasmids entstehende Transkripte mit vollständigem CCA-Ende, n-2: bei der Transkription des mit Acc65I linearisierten Plasmids entstehende Transkripte mit verkürztem 3'-Ende.

Die Aminoacylierung von Transkripten mit vollständigem CCA-Ende verläuft bei beiden tRNA-Spezies schneller als die Aminoacylierung von verkürzten Transkripten.

Abb. 34



#### Regeneration und Aminoacylierung des 3'-Endes von verkürzten tRNAs:

Von tLeu<sub>su+6</sub> und tLeu<sub>(5)</sub> wurden Transkripte mit verkürztem 3'-Ende in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems unter Aminoacylierungsbedingungen inkubiert. Die Aminoacylierung der tRNAs wurde anhand des Einbaus von <sup>14</sup>C-Leucin verfolgt, die Regeneration des 3'-Endes anhand des Einbaus von α<sup>35</sup>S-ATP bzw. α<sup>35</sup>S-CTP. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots der Reaktionen entnommen, die tRNAs mittels TCA-Fällung präzipitiert und eingebaute Radioaktivität durch eine Szintillationszählung quantifiziert. Für jede Markierung wurde der nach 30 Minuten Inkubationszeit erreichte Wert zu 100% gesetzt.

**14C-Leu:** Markierung mit <sup>14</sup>C-Leucin, **35S-ATP:** Markierung mit α<sup>35</sup>S-ATP, **35S-CTP:** Markierung mit α<sup>35</sup>S-CTP.

Die Regeneration des CCA-Endes der verkürzten tRNAs, die anhand des Einbaus der beiden α<sup>35</sup>S-NTPs verfolgt wurde, verläuft mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Aminoacylierung des CCA-Endes mit <sup>14</sup>C-Leucin. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Regeneration des 3'-Endes von verkürzten tRNAs der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Aminoacylierung ist.

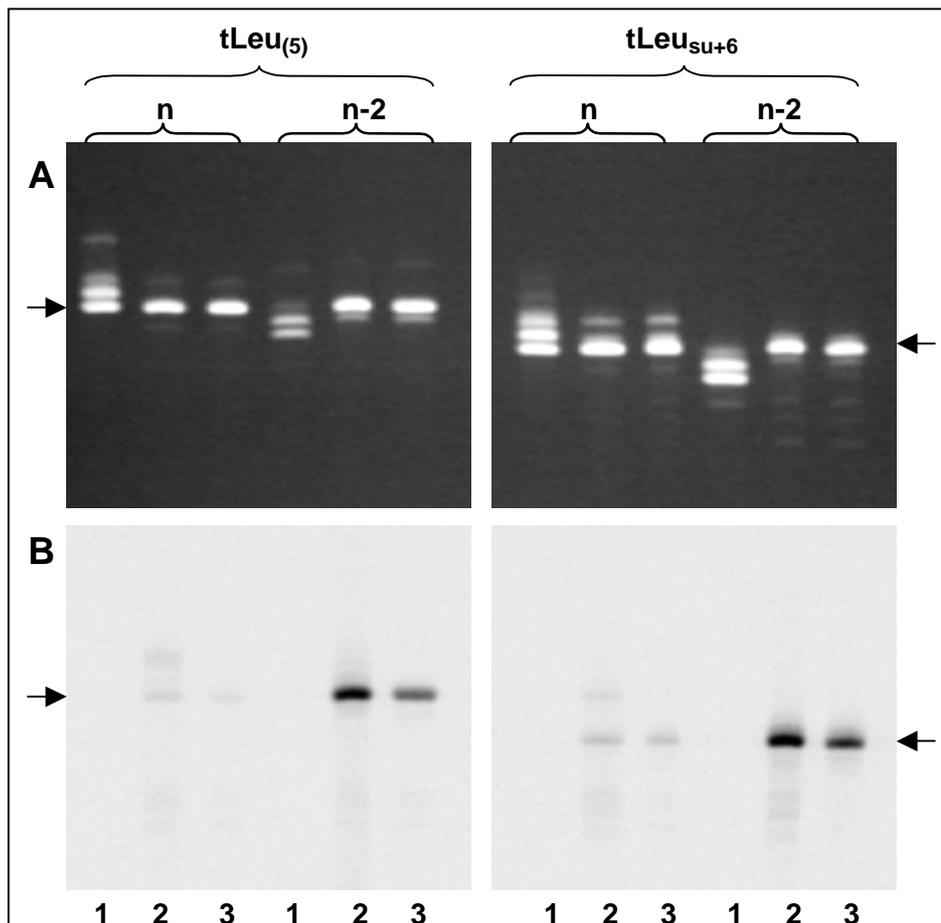
reaktion verfolgt. Es zeigte sich, daß die heterogene Präparation der Transkripte mit vollständigem CCA-Ende der Länge n wesentlich schneller aminoacyliert wurde als die Präparation der bis zu zwei Nukleotide verkürzten Transkripte der Länge n-2 (Abb.33). Möglicherweise stellte die Regeneration des vollständigen CCA-Endes der verkürzten Transkripte einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt während der Aminoacylierung dar. Die Aminoacylierung sollte in diesem Fall genauso schnell verlaufen wie die Addition der beiden endständigen, in den verkürzten Transkripten fehlenden Reste C und A. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Aminoacylierung der verkürzten Transkripte in Anwesenheit der radioaktiv markierten Nucleosidtriphosphate α<sup>35</sup>S-CTP bzw. α<sup>35</sup>S-ATP durchgeführt. Der Einbau der radioaktiv markierten Nucleotide in die verkürzten Transkripte wurde über eine TCA-Fällung der endmarkierten tRNAs verfolgt. Er verlief in der Tat mit exakt derselben Geschwindigkeit wie die Markierung der Transkripte mit der Aminosäure <sup>14</sup>C-Leucin (Abb.34). Nach ca. 10 Minuten waren etwa 80% der eingesetzten Transkripte radioaktiv markiert. Berücksichtigt man die wesentlich schnellere Aminoacylierungskinetik der Transkripte mit vollständigem CCA-Ende (Abb.33), wird deutlich, daß die Regeneration

des CCA-Endes in der Tat den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt während der Aminoacylierung der verkürzten Transkripte darstellte.

*Prozessierung und Reparatur führen zu einer homogenen Zusammensetzung der Transkripte beider tRNA-Spezies*

Anhand der elektrophoretischen Mobilität im denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel

Abb. 35



*Prozessierung und Reparatur der tRNAs  $tLeu_{(5)}$  und  $tLeu_{su+6}$  in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems:*

tRNA-Transkripte der Längen n (mit vollständigem CCA-Ende) und n-2 (mit verkürztem 3'-Ende) wurden unter Aminoacylierungsbedingungen für 30 Minuten in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems inkubiert und über denaturierende Gelelektrophorese analysiert. Zum Nachweis einer Regeneration oder Reparatur des CCA-Endes wurde den Ansätzen  $\alpha\text{-}^{35}\text{S-ATP}$  bzw.  $\alpha\text{-}^{35}\text{S-CTP}$  zugegeben.

**A:** Ethidiumbromidfärbung des Gels, **B:** Autoradiographie des Gels. **1:** Transkripte vor der Inkubation in der S100-Enzymfraktion; **2** und **3:** Transkripte nach 30 min Inkubation, **2:** in Anwesenheit von  $\alpha\text{-}^{35}\text{S-ATP}$ , **3:** in Anwesenheit von  $\alpha\text{-}^{35}\text{S-CTP}$ . Pfeile markieren die Position der tRNAs mit korrektem CCA-Ende.

Nach der Reaktion weisen sowohl Transkripte der Länge n als auch Transkripte der Länge n-2 eine homogene Zusammensetzung auf, wie die Ethidiumbromidfärbung (A) des Gels zeigt. Die 3'-Enden aller tRNAs wurden offensichtlich vollständig prozessiert bzw. regeneriert. Im Autoradiogramm des Gels (B) ist zu sehen, daß die verkürzten Transkripte der Länge n-2 durch die radioaktiv markierten Nukleotide CTP und ATP wesentlich stärker markiert wurden als die Transkripte der Länge n mit vollständigem CCA-Ende. Eine Markierung der tRNAs mit vollständigem CCA-Ende wäre dann zu erwarten, wenn die 3'-Enden dieser tRNAs degradiert und anschließend repariert worden sein sollten. Dies ist anscheinend nicht der Fall. Offensichtlich verläuft die Prozessierung von verlängerten Transkripten zum größten Teil nicht über verkürzte Zwischenprodukte. Die CCA-Enden der tRNAs scheinen innerhalb der S100-Enzymfraktion des Translationssystems außerordentlich stabil zu sein.

wurde die Homogenität der Transkripten vor und nach der Inkubation innerhalb der S100-Enzymfraktion des Translationssystems analysiert (Abb.35A). Das Gel zeigt eindrucksvoll, daß nach der Aminoacylierung alle Transkripte, unabhängig von der Ausgangslänge, ein identisches Laufverhalten aufweisen. Die tRNAs, die vor der Inkubation im S100 noch eine relativ große Endheterogenität aufwiesen, erschienen nun als einzelne homogene Bande. Der Einbau der radioaktiven Nukleotide  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-CTP bzw.  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-ATP in die verkürzten Transkripte während der Inkubation kann anhand der Autoradiographie des Gels belegt werden. Die große Homogenität der Transkripte nach der Inkubation korreliert mit der hohen Aminoacylierungsrate der Transkripte von ca. 80% (vgl. Abb.32). Hiermit ist bewiesen, daß neben einer effizienten Prozessierung verlängerter Transkripte auch eine effiziente Reparatur verkürzter Transkripte innerhalb der S100-Enzymfraktion des Translationssystems möglich war.

Interessanterweise verblieben nach der Prozessierung verlängerter Transkripte geringste Mengen von Transkripten, die um zwei Nukleotide verlängert waren. Aus der Literatur ist bekannt, daß die vollständige Prozessierung der 3'-Enden von tRNAs bis zur Entstehung des reifen CCA-Endes die kombinierte Aktion mehrerer verschiedener Exoribonukleasen verlangt, wobei jede RNase verschiedene Spezifitäten für die Prozessierung unterschiedlicher Bereiche der 3'-Überhänge zeigt (Li und Deutscher 1994, Li und Deutscher 1996). Ob eine mögliche schlechtere Prozessierbarkeit von n+2-Transkripten in der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Spezifitäten der verschiedenen an der Prozessierung beteiligten Exonukleasen steht, wäre zu untersuchen. Die verbliebenen um zwei Nukleotide verlängerten Transkripte fallen mengenmäßig allerdings nicht ins Gewicht.

*Der Umsatz des CCA-Endes von aminoacylierbaren tRNAs ist in der S100-Fraktion des Translationssystems unbedeutend*

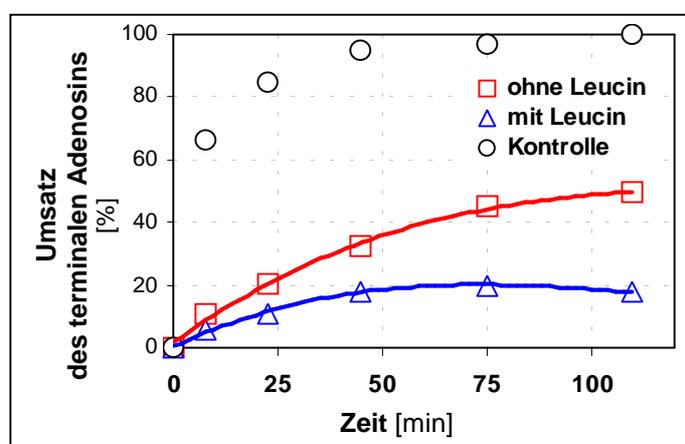
Für tRNAs wurde eine Degradation der 3'-endständigen Reste A und C des CCA-Endes von tRNA durch RNaseT nachgewiesen (Deutscher et al. 1985). Zudem wurde für die Prozessierung *in vitro* gezeigt, daß die Generierung des korrekten CCA-Endes von tRNAs zum Teil über Zwischenprodukte verläuft, die um ein Nukleotid verkürzt sind (Li und Deutscher 1994). Li und Deutscher bemerkten dies, indem sie die Prozessierung von längeren tRNA-Vorläufertranskripten in Extrakten durchführten, die frei von ATP waren. In solchen Extrakten traten verkürzte Zwischenprodukte auf, die nach der Zugabe von ATP wieder verschwanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Umsatz des 3'-Endes durch einen etwas anderen Versuchsansatz untersucht. Im Unterschied zu der Arbeit von Li und Deutscher wurden die Transkripte in Anwesenheit von  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-ATP bzw.  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-CTP inkubiert, so daß die tRNAs während eines möglichen Umsatzes der terminalen Reste des CCA-Endes radioaktiv markiert werden konnten. Als Kontrolle für den Einbau der radioaktiven Nukleotide wurden

Transkripte eingesetzt, die um zwei Nukleotide verkürzt waren. Das Autoradiogramm des Gels mit den mit  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -ATP bzw.  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -CTP markierten tRNAs zeigt, daß die als Kontrolle verwendeten verkürzten Transkripte während der Inkubation in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems effektiv markiert wurden. Demgegenüber wurden die beiden radioaktiv markierten NTPs nahezu gar nicht in die Transkripte mit vollständigem CCA-Ende eingebaut (Abb.35B). Dies wäre aber zu erwarten gewesen, wenn das 3'-Ende dieser tRNAs nach einem etwaigen Angriff durch Exonukleasen regeneriert worden wäre.

Der Einbau von  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -ATP während des Umsatzes des CCA-Endes von tLeu(5) wurde über eine TCA-Fällung quantifiziert (Abb.36). Diese Quantifizierung wurde sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Leucin durchgeführt und bestätigte den Eindruck des Autoradiogramms. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten waren in Anwesenheit von Leucin ca. 12% der eingesetzten Transkriptmenge radioaktiv markiert. Der Umsatz der terminalen Reste des CCA-Endes scheint also offensichtlich unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Auch *in vivo* ist der Umsatz des 3'-Endes möglicherweise nicht allzu stark. *Escherichia coli*-Stämme, denen das Enzym tRNA-Nukleotidyl-Transferase fehlt, sind durchaus lebensfähig, auch wenn sie

Abb. 36



*Einfluß der Aminoacylierung auf den Umsatz des terminalen Adenosins am 3'-Ende einer tRNA:*

Transkripte mit vollständigem CCA-Ende von tLeu(5) wurden in An- und Abwesenheit von Leucin in der S100-Fraktion des Translationssystems inkubiert. Um den Umsatz des terminalen Adenosins verfolgen zu können, wurde den Reaktionsansätzen  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -ATP zugesetzt. Zu bestimmten Zeiten wurden den Reaktionen Aliquots entnommen und mit TCA präzipitiert. Der Einbau der Radioaktivität wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung quantifiziert.

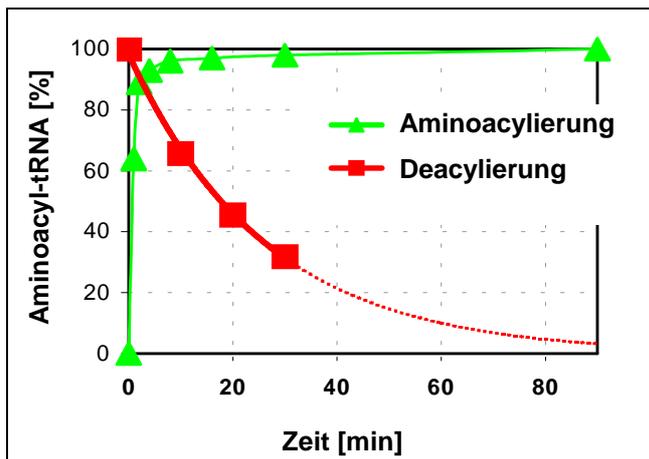
**ohne Leucin:** Reaktion in Abwesenheit von Leucin, **mit Leucin:** Reaktion in Anwesenheit von Leucin, **Kontrolle:** Einbau von  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -ATP in ein Transkript mit verkürztem CCA-Ende

Für eine Markierung von tRNAs mit vollständigem CCA-Ende ist die Abspaltung des endständigen Adenosins des CCA-Endes und die darauffolgende Regeneration des 3'-Endes durch tRNA-Nukleotidyl-Transferase Voraussetzung. Hierdurch wird das vor der Inkubation nichtmarkierte terminale Adenosin durch markiertes Adenosin ersetzt. Eine maximale Einbaurrate kann anhand von verkürzten Transkripten bestimmt werden, denen die beiden 3'-terminalen Reste A und C fehlten (Kontrolle). Diese Einbaurrate entspricht der theoretisch erreichbaren maximalen Markierbarkeit der tRNAs und wurde zu 100% gesetzt.

In Abwesenheit von Leucin ist die Markierung und somit der Umsatz des terminalen Adenosins stärker als in Anwesenheit von Leucin, wenn eine Aminoacylierung des CCA-Endes möglich ist. Gemessen an der theoretisch möglichen Markierbarkeit, die durch die Kontrolle reflektiert wird, ist die Markierung allerdings auch in Abwesenheit von Leucin relativ gering. Erst nach einer Inkubationszeit von über 100 Minuten liegt etwa die Hälfte der eingesetzten CCA-Enden markiert vor. Unter Berücksichtigung der großen Kapazität des Reparatursystems läßt sich dies dahingehend interpretieren, daß das terminale Adenosin der tRNA nur äußerst selten durch Exonukleasen angegriffen wird und das 3'-Ende in dem verwendeten System auch bei nicht erfolgter Aminoacylierung sehr stabil ist.

äußerst langsam wachsen. In tRNA-Nukleotidyl-Transferase-defizienten Stämmen enthalten nur 10-15% der gesamten tRNA-Menge unvollständige 3'-Enden (Zhu und Deutscher 1987). Allerdings ist zu bedenken, daß die Funktion von tRNA-Nukleotidyl-Transferase *in vivo* zu einem geringen Teil durch die kombinierte Aktion der Enzyme Poly(A)-Polymerase I und Polynukleotid Phosphorylase (PNPase) ersetzt werden kann (Reuven et al. 1997), so daß der

Abb. 37



*Aminoacylierung und Deacylierung von tRNA in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems anhand von tLeu<sub>(5)</sub>:*

**Aminoacylierung:** Transkripte von tLeu<sub>(5)</sub> wurden in Gegenwart von <sup>14</sup>C-Leucin in der S100-Enzymfraktion des *in vitro* Translationsystems aminoacyliert. Zu bestimmten Zeiten wurden den Reaktionen Aliquots entnommen und mit TCA präzipitiert. Der Einbau der Radioaktivität wurde mittels Flüssigkeitszintillationszählung quantifiziert.

**Deacylierung:** Zur Untersuchung der Deacylierung wurde die Aminoacylierung wie oben beschrieben zunächst mit <sup>14</sup>C-Leucin durchgeführt. Nach 8 Minuten wurde

der Reaktion nicht markiertes Leucin in zwanzigfachem Überschuß zugesetzt. Die Zugabe von kaltem Leucin entspricht im Diagramm dem Zeitpunkt Null. Durch Deacylierung und Reacylierung wird das <sup>14</sup>C-Leucin nach und nach durch kaltes Leucin ersetzt, so daß die Deacylierung durch eine TCA-Fällung nachweisbar wird.

Die Aminoacylierungsrate der tRNA erreicht schon nach sehr kurzer Zeit einen Plateau-Wert auf sehr hohem Niveau. Eine Betrachtung der Deacylierung beweist, daß sich hinter diesem konstanten Niveau ein ständiger Prozeß aus Deacylierung und Reacylierung verbirgt.

*in vivo* in Abwesenheit von tRNA-Nukleotidyltransferase zu detektierende Anteil an verkürzten tRNAs nicht unbedingt die wahre Aktivität tRNA-degradierender Enzyme widerspiegelt.

Der allgemeinen Ansicht nach unterbricht eine Aminoacylierung des CCA-Endes seinen Umsatz und schützt das 3'-Ende der tRNA vor einer Degradation. Die Halbwertszeit der Aminoacylbindung von tLeu<sub>(5)</sub> lag in der S100-Fraktion des Translationssystems bei ungefähr 20 Minuten (Abb.37). Die Aminoacylierung der tRNA scheint ein extrem effizienter Prozeß zu sein. Eine nahezu vollständige Aminoacylierung der eingesetzten tRNA wurde bereits nach einer Inkubationszeit von ca. 5 Minuten erreicht. (Abb.37). Man kann somit vermuten, daß nur ein geringer Teil der tRNAs während der Inkubation innerhalb der S100-Enzymfraktion deacyliert vorliegt. Es war somit in Abwesenheit von Aminosäure mit einer deutlichen Erhöhung des Umsatzes zu rechnen, sollte die Aminoacylierung des CCA-Endes eine essentielle Funktion bei seiner Stabilisierung haben. Bei fehlender Aminoacylierung der tRNA erwies sich der Umsatz des terminalen Adenosins als etwa doppelt so groß wie unter Bedingungen, in denen eine Aminoacylierung und somit ein Schutz des 3'-Endes gegen Degradation gewährleistet war (Abb.36). Doch selbst hier konnte nur bei einem relativ

geringen Anteil der tRNAs ein Umsatz des CCA-Endes nachgewiesen werden. Die Aminoacylierung spielt somit offensichtlich nur eine untergeordnete Rolle bei der Stabilisierung des 3'-Endes von tRNA. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, wenn man die große Stabilität auch anderer kleiner, nicht aminoacylierbarer RNA-Moleküle berücksichtigt. Die extreme Stabilität der tRNA-Moleküle (wie auch die anderer kleiner RNA-Moleküle) beruht zu einem großen Teil auf ihrer Struktur, die die reifen tRNAs zu einem äußerst schlechten Substrat für Exoribonukleasen macht (Li et al 1998). Die Ausbildung dieser Struktur macht zugleich die Prozessierung der während der Transkription der tRNA-Gene entstehenden langen Vorläufermoleküle zu reifen tRNAs erst möglich. Die relativ geringe Rate des Umsatzes nicht aminoacylierbarer tRNAs kann als eine Folge dieses Prinzips angesehen werden.

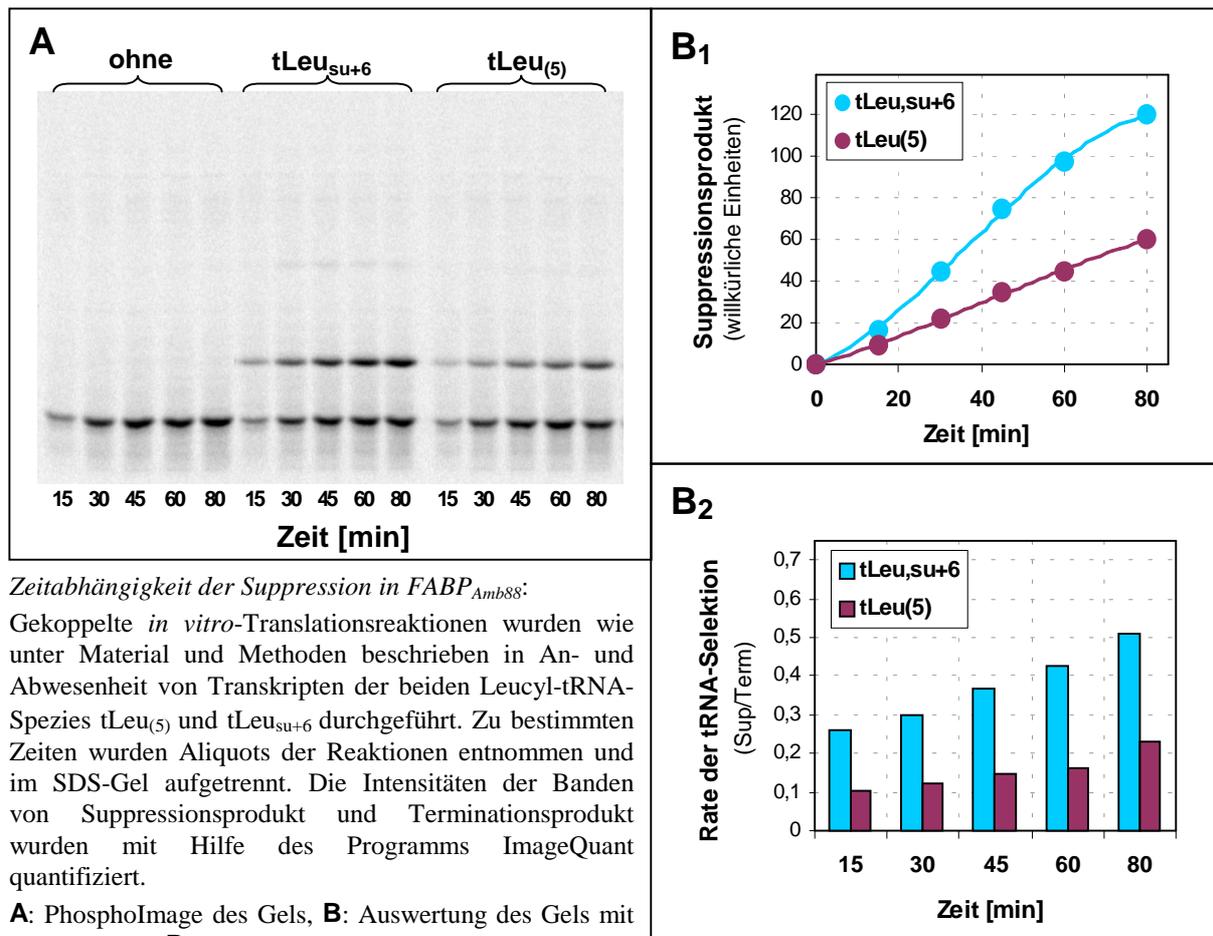
### 5.6.2 Charakterisierung des Gesamtsystems

In den vorhergehenden Kapiteln wurden die beiden Leucyl-tRNA-Spezies  $tLeu_{(5)}$  und  $tLeu_{su+6}$  in der S100-Fraktion des *in vitro* Translationsystems charakterisiert. Diese Untersuchungen brachten einige wichtige Erkenntnisse im Hinblick auf den Einsatz von *in vitro* transkribierten tRNAs innerhalb des Gesamtsystems. So wirkte sich die Endheterogenität von Transkripten nicht auf ihre Aminoacylierbarkeit aus. Sowohl die Prozessierung verlängerter als auch die Reparatur verkürzter Transkripte funktionierten innerhalb der S100-Enzymfraktion des Translationssystems hervorragend. Die Leucyl-tRNA-Synthetase war dazu in der Lage, die Aminoacylierung der Transkripte über einen sehr langen Zeitraum aufrecht zu erhalten. Da der für die Charakterisierung der Vorgänge Prozessierung, tRNA-Reparatur und Aminoacylierung verwendete S100 eine Teilkomponente des kompletten *in vitro*-Translationssystems darstellte, sollten die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten des S100 eine minimale Aktivität des Gesamtsystems reflektieren. Es war also zu erwarten, daß die genannten Vorgänge Prozessierung, tRNA-Reparatur und Aminoacylierung auch innerhalb des *in vitro*-Translationssystems funktionierten. Unklar war aber, wie sie sich auf die Aktivität der Transkripte in der *in vitro* Suppression auswirken würden. In diesem Zusammenhang sei noch einmal daran erinnert, daß die vorliegende Arbeit im Hinblick auf die Bestimmung der Suppressionseffizienz verschiedener tRNAs verfaßt wurde. Eine Beeinflussung der Translationsaktivität *in vitro* transkribierter tRNAs durch Vorgänge, die zur Aminoacylierung der tRNAs führen, sollte aus diesem Grund nach Möglichkeit ausgeschlossen werden.

#### *Die Kinetik der Bildung des Suppressionsproduktes ist annähernd linear*

Von beiden tRNA-Spezies wurden nun Transkripte mit vollständigem CCA-Ende in der gekoppelten Transkription/Translation von  $FABP_{Amb88}$  eingesetzt. Zunächst wurde eine

Abb. 38



#### Zeitabhängigkeit der Suppression in $FABP_{Amb88}$ :

Gekoppelte *in vitro*-Translationsreaktionen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben in An- und Abwesenheit von Transkripten der beiden Leucyl-tRNA-Spezies  $tLeu_{(5)}$  und  $tLeu_{su+6}$  durchgeführt. Zu bestimmten Zeiten wurden Aliquots der Reaktionen entnommen und im SDS-Gel aufgetrennt. Die Intensitäten der Banden von Suppressionsprodukt und Terminationsprodukt wurden mit Hilfe des Programms ImageQuant quantifiziert.

**A:** PhosphoImage des Gels, **B:** Auswertung des Gels mit ImageQuant. **B<sub>1</sub>:** Synthese des Suppressionsproduktes in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. **B<sub>2</sub>:** Abhängigkeit des molaren Verhältnisses zwischen Suppressions-

und Terminationsprodukt (Rate der tRNA-Selektion) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

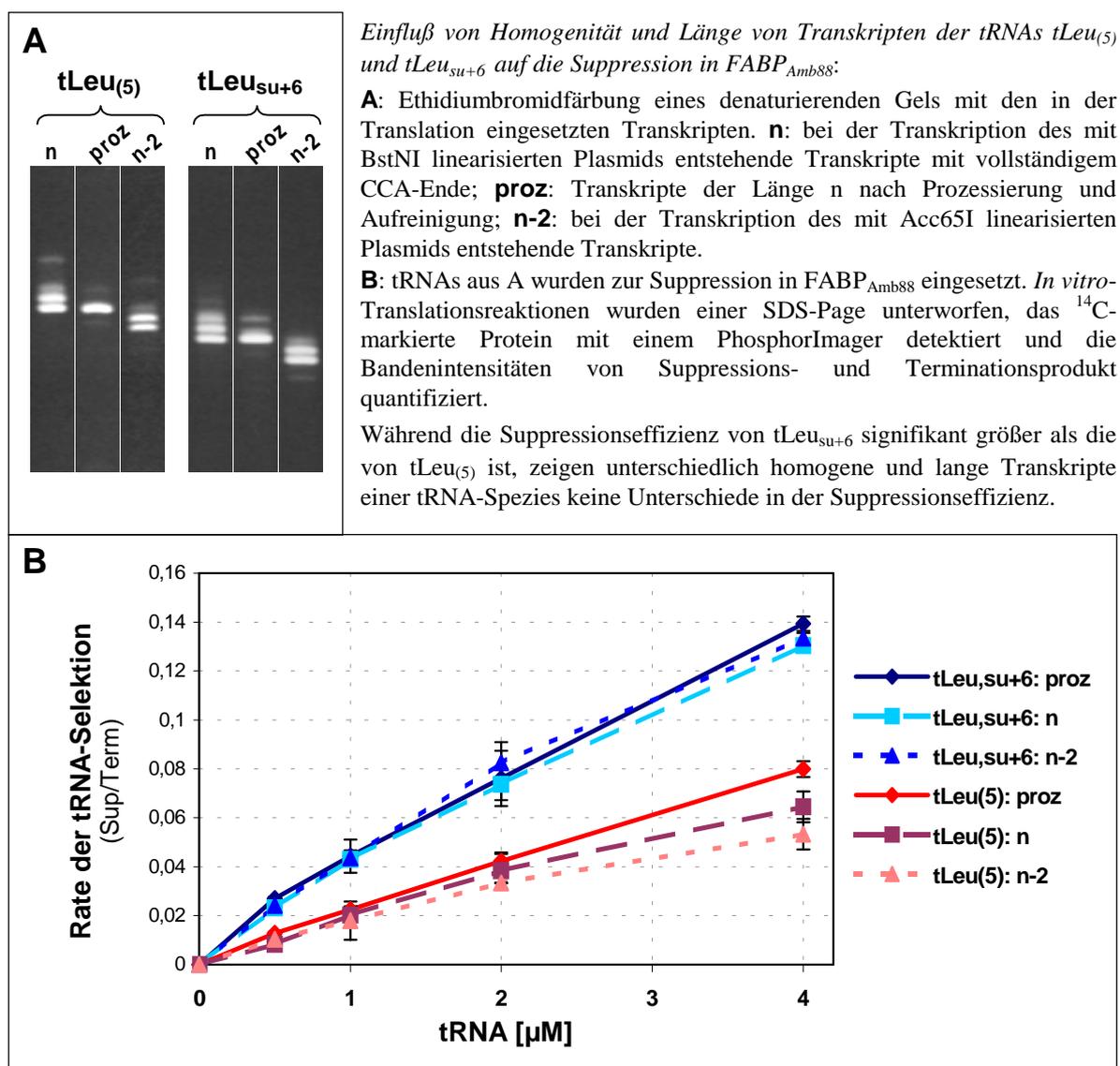
Im Gel ist in Abwesenheit von Suppressor ist eine einzige homogene Bande detektierbar, die dem Terminationsprodukt entspricht und deren Stärke im Verlauf der Reaktion zunimmt. Die Zugabe von Suppressor-tRNA führt zum Erscheinen einer zusätzlichen Bande mit höherem Molekulargewicht, die dem Suppressionsprodukt (FABP) entspricht. Während der Reaktion nimmt die Menge des Suppressionsproduktes nahezu linear zu. Hinter dieser annähernd linearen Zunahme des Suppressionsproduktes verbirgt sich eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen Suppressions- und Terminationsprodukt zugunsten der Suppression, wie die im Verlauf der Reaktion anwachsende Rate der tRNA-Selektion zeigt.

Reaktionskinetik aufgenommen (Abb.38). Die Synthese des „full-length“-Produktes (Suppressionsproduktes) wies eine nahezu lineare Kinetik auf. Dies ist überraschend, da die Syntheserate eines Proteins während der *in vitro*-Translation normalerweise nach einer starken Anfangsphase schnell eine Sättigung erreicht. Eine Bestimmung der Rate der tRNA-Selektion ergab, daß sich hinter der nahezu linearen Zunahme des Suppressionsproduktes eine Erhöhung der tRNA-Selektion, also eine Verschiebung der Synthese von Suppressions- und Terminationsprodukt zugunsten des Suppressionsproduktes, im Verlaufe der Reaktion verbarg. Die Eigenschaften des Systems scheinen sich somit hinsichtlich der Suppression mit zunehmender Zeitdauer zu verbessern. Dies könnte auf sich verändernde Eigenschaften der tRNAs oder des Translationssystems per se zurückzuführen sein. Eine Möglichkeit besteht in

einer Veränderung der Magnesiumkonzentration innerhalb des Systems im Verlauf der Reaktion.

In Kapitel 5.1 wurde bereits gezeigt, daß die Suppression stärker als die Synthese von „Wildtyp“-FABP von der Konzentration an Magnesiumionen abhängig ist. Mit zunehmender Magnesiumkonzentration erhöhte sich hierbei die Suppressionrate. Eine solche Korrelation zwischen Magnesiumkonzentration und Suppression ist auch aus der Literatur bekannt (Ma et al. 1993). Einen beträchtlichen Einfluß auf die Konzentration an freiem Magnesium innerhalb des Systems dürfte die temporale Konzentration an Nucleosidtriphosphaten (NTPs) haben, die am Anfang der gekoppelten Transkription/Translation bei 3 mM liegt. Vor allen Dingen durch entkoppelte Hydrolyse verringert sich die Konzentration der NTPs im Verlauf der Reaktion rapide (Spirin et al. 1988, Stiege – mündliche Mitteilung). Hierdurch wird mit zunehmender Reaktionszeit immer mehr vorher an NTP gebundenes Magnesium freigesetzt, so daß sich die Magnesiumkonzentration während der Reaktion erhöht.

Abb. 39

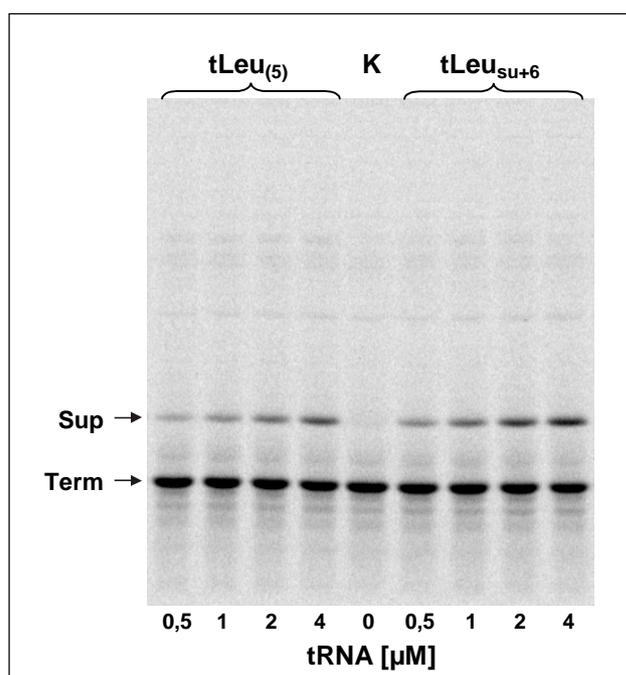


*Homogenität und Länge von tRNA-Transkripten wirken sich nicht auf die Aktivität der beiden Leucyl-tRNA-Spezies in der in vitro Translation aus*

Es wurden nun Präparationen verschiedener Transkripte mit unterschiedlicher Länge und Homogenität hergestellt und zur *in vitro* Translation des Proteins FABP<sub>Amb88</sub> eingesetzt (Abb.39A). Homogene Präparationen der tRNA-Spezies tLeu<sub>(5)</sub> und tLeu<sub>su+6</sub> wurden durch die Prozessierung von heterogenen Transkripten der Länge n erhalten. Hierzu wurden die tRNAs nach ihrer Prozessierung und Aminoacylierung in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems über eine präparative Gelelektion aufgereinigt. Daneben wurden auch heterogene Präparationen von Transkripten mit vollständigem CCA-Ende und verkürzter Transkripte – natürlich ebenfalls geleluert - in der Translation eingesetzt.

Die in Anwesenheit der beiden tRNA-Spezies entstehenden Translationsprodukte sind exemplarisch für homogene Transkripte in Abbildung 40 gezeigt. Die Aktivität der verschiedenen langen und homogenen Transkripte wurde über eine Quantifizierung der erhaltenen Mengen an Suppressions- und Terminationsprodukt bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß die Aktivität der Transkripte unabhängig von ihrer Ausgangslänge und auch unabhängig von ihrer Homogenität waren (Abb.39B). Homogene, verkürzte und verlängerte Transkripte einer bestimmten tRNA-Spezies zeigten identische Aktivitäten. Im Falle von tLeu<sub>(5)</sub> zeigten die verkürzten Transkripte bei der höchsten eingesetzten Konzentration zwar eine gegenüber den Transkripten mit vollständigem CCA-Ende eine geringfügig herabgesetzte Suppression (vgl. Abb.39B: tLeu<sub>(5)</sub>). Die Kapazität des Reparatursystems, die bei niedrigeren Konzentrationen noch für eine schnelle Regeneration des 3'-Endes ausreicht, ist ab einer bestimmten Konzentration offensichtlich überlastet. Bis zu einer bestimmten Konzentration

Abb. 40



*amber-Suppression in FABP<sub>Amb88</sub> in Gegenwart von tLeu<sub>(5)</sub> und tLeu<sub>su+6</sub>: Abhängigkeit der Suppression von der tRNA-Konzentration.*

*in vitro*-Translationsreaktionen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt. 12  $\mu$ l-Aliquots einer jeden Reaktion wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das <sup>14</sup>C-markierte Protein mit dem PhosphorImager detektiert.

**K:** Kontrollreaktion ohne Suppressor-tRNA; **Sup:** Suppressionsprodukt; **Term:** Terminationsprodukt.

aber wirkt sich die Regeneration des 3'-Endes der verkürzten tRNAs aber nicht auf die Aktivität der tRNAs aus. Dagegen war die Rate der tRNA-Selektion abhängig von der tRNA-Spezies. tLeu<sub>su+6</sub> zeigte eine doppelt so gute Suppression wie tLeu<sub>(5)</sub>.

*Prozessierung, tRNA-Reparatur und Aminoacylierung sind nicht limitierend für die Suppressionsaktivität der beiden Leucyl-tRNA-Spezies*

Rufen wir uns ins Gedächtnis, daß die Suppressionseffizienz einer tRNA sich auf die Fähigkeit der aminoacylierten tRNA bezieht, ein *amber*-Codon dekodieren zu können. Die Suppressionseffizienz korreliert dann mit den gemessenen Suppressionsraten, wenn eine Limitation der Suppression durch Vorgänge, die zur Bildung der Aminoacyl-tRNA führen, ausgeschlossen werden kann. Die entscheidende Frage in diesem Zusammenhang ist, mit welcher Geschwindigkeit die genannten Vorgänge verlaufen müssen, um eine Limitierung der Suppression ausschließen zu können. In der S100-Enzymfraktion des *in vitro*-Translationsystems war die Regeneration des 3'-Endes der tRNAs der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der Aminoacylierung. Die Reparatur von verkürzten tRNAs war dort ein wesentlich langsamerer Prozeß als Aminoacylierung oder Prozessierung. Dieser Vorgang sollte sich also innerhalb des Gesamtsystems am ehesten auf die gemessene Suppressionsaktivität auswirken. Daß selbst der langsamste am 3'-Ende der tRNA stattfindende Prozeß, die Reparatur des 3'-Endes, sich nicht auf die Aktivität der Transkripte der beiden Leucyl-tRNA-Spezies in der *in vitro* Translation auswirkt, zeigt, daß weder Prozessierung noch Aminoacylierung der beiden tRNAs limitierend für ihre Suppressionsaktivität sein dürften. Die Aktivitäten von tLeu<sub>(5)</sub> und tLeu<sub>su+6</sub> in der *in vitro* Suppression reflektieren somit mit größter Wahrscheinlichkeit die Suppressionseffizienz der beiden tRNA-Spezies.

### 5.7. Vergleich der Suppressionseffizienz von verschiedenen *in vitro* transkribierten *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies

Die Suppressionseffizienz einer *amber*-Suppressor-tRNA beruht auf ihren strukturellen Eigenschaften und reflektiert prinzipiell eine spezifische Suppressionsaktivität der Aminoacyl-tRNA. Die Konzentration der Aminoacyl-tRNA wiederum ist eine Funktion der Konzentration der nicht aminoacylierten tRNA und der Aktivität der entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetase. In den vorhergehenden Kapiteln wurden die beiden Leucyl-tRNA-Spezies tLeu<sub>(5)</sub> und tLeu<sub>su+6</sub> als *in vitro* Transkripte auf verschiedenen Funktionsebenen innerhalb des verwendeten *in vitro* Translationssystems charakterisiert. Hierbei war weder die Geschwindigkeit der Aminoacylierung noch die im Vergleich zur Aminoacylierung niedrigere Effizienz der Reparatur verkürzter tRNAs limitierend für die Suppressionsaktivität der beiden tRNA-Spezies. Auch eine größere Endheterogenität innerhalb der eingesetzten Transkripte zeigte keinen Einfluß auf die Aktivität der Transkripte in der *in vitro*-Suppression. Letztendlich konnte die unterschiedliche Suppressionsaktivität der beiden *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies tLeu<sub>(5)</sub> und tLeu<sub>su+6</sub> auf strukturelle Eigenschaften der entsprechenden Aminoacyl-tRNAs zurückgeführt werden.

Es wurden nun die Transkripte einer Anzahl weiterer *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies hergestellt und zusammen mit den beiden schon beschriebenen *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies tLeu<sub>(5)</sub> und tLeu<sub>su+6</sub> auf der Ebene von Aminoacylierung und Suppressionsaktivität charakterisiert. Untersucht wurden Transkripte der tRNA-Spezies tSer (tRNA<sup>Ser</sup><sub>CUA</sub> (su<sup>+</sup><sub>1</sub>)), tTyr (tRNA<sup>Tyr</sup><sub>CUA</sub> (su<sup>+</sup><sub>3</sub>)), tLeu<sub>su+6</sub> (tRNA<sup>Leu</sup><sub>CUA</sub> (su<sup>+</sup><sub>6</sub>)), tLeu<sub>(5)</sub> (tRNA<sup>Leu5</sup><sub>CUA</sub>), tLys (tRNA<sup>Lys</sup><sub>CUA</sub> (su<sup>+</sup><sub>5</sub>)), tArg (tRNA<sup>Arg</sup><sub>CUA</sub>), tGly (tRNA<sup>Gly1</sup><sub>CUA</sub>), tPheY (tRNA<sup>Phe</sup><sub>CUA</sub> aus *Saccharomyces cerevisiae*), tPheE.c. (tRNA<sup>Phe</sup><sub>CUA</sub> aus *Escherichia coli*), tAla (tRNA<sup>Ala</sup><sub>CUA</sub>) und tAla<sub>C70</sub> (tRNA<sup>Ala</sup><sub>CUA</sub> mit durch Einführung des Basenpaares G<sub>3</sub>-C<sub>70</sub> abgeschalteter Aminoacylierung). Eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der vorliegenden Arbeit hat die Bestimmung der Suppressionseffizienz von tAla: Aus der Literatur ist bekannt, daß tAla<sub>C70</sub>, eine Mutante von tAla, in der die Aminoacylierung durch die Einführung von C<sub>70</sub> abgeschaltet wurde, eine geringfügig höhere Effizienz bei der Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine zeigt als tPheY (Karginov et al. 1997). 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 tRNA auswirkt, sollte die Untersuchung der Suppressionsaktivität von tAla eine Einordnung der Suppressionseffizienz der zur Zeit für die Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine verwendeten tRNAs ermöglichen. Eine äußerst interessante Frage in diesem Zusammenhang war, ob möglicherweise einige der anderen untersuchten *amber*-Suppressor-tRNAs eine höhere Suppressionseffizienz aufwiesen als tAla. In einem solchen Fall könnten diese tRNAs als Ausgangspunkt für die Konstruktion neuer, effizienterer für die chemische Aminoacylierung geeigneter tRNAs dienen.

*Einige der untersuchten in vitro transkribierten amber-Suppressor-tRNAs lassen sich in der S100-Enzymfraktion des Translationsystems hervorragend aminoacylieren, andere sind nicht aminoacylierbar*

Als erstes wurde die Aminoacylierbarkeit der verschiedenen *amber*-Suppressor-tRNAs in der nukleinsäurefreien S100-Enzymfraktion des verwendeten *in vitro*-Translationsystems untersucht. Für die Untersuchung der Suppressionseffizienz einer tRNA ist natürlich, wie schon in den vorhergehenden Kapiteln erläutert, die Geschwindigkeit der Aminoacylierung wichtig. Auf diese wird in einem späteren Kapitel eingegangen werden. An dieser Stelle soll zunächst einmal nur die grundsätzliche Aminoacylierbarkeit der tRNAs betrachtet werden. Wie schon in Kapitel 5.5.2, S.99ff dargelegt, konnten die Transkripte der *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies tSer, tTyr, tLeu<sub>su+6</sub>, tLeu<sub>(5)</sub>, tHis und tAla innerhalb der S100-Enzymfraktion hervorragend aminoacyliert werden. Die Aminoacylierbarkeit lag bei den erwähnten Spezies bei mindestens 75% der eingesetzten Transkriptmenge (1200 pmol/A<sub>260</sub>). Für einige tRNA-Spezies jedoch, nämlich tPheY, tAla<sub>C70</sub>, tPheE.c., tArg, tLys, tGly oder tCys, konnte eine Aminoacylierung in der S100-Enzymfraktion des Translationsystems nicht nachgewiesen werden.

Im Falle von tPheY und tAla<sub>C70</sub> wurde die fehlende Aminoacylierbarkeit auch erwartet, da bei beiden tRNAs die Aminoacylierung abgeschaltet ist, um sie für die chemische Aminoacylierung verwenden zu können. Im Falle der Alanyl-tRNA ist das wichtigste Erkennungselement für die Alanyl-tRNA-Synthetase die Base U<sub>70</sub> im Akzeptorarm, die für die Abschaltung der Aminoacylierung gegen C<sub>70</sub> ausgetauscht wurde (McClain und Foss 1988, Hou und Schimmel 1988/1992). Alle anderen in der S100-Enzymfraktion nicht aminoacylierbaren tRNAs besitzen die wichtigsten Erkennungselemente für die entsprechende Aminoacyl-tRNA-Synthetase innerhalb ihres Anticodons. Für tPheE.c. 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). Das Transkript der entsprechenden "Wildtyp"-tRNA (tPhe<sub>GAA</sub>) ließ sich in der in der vorliegenden Arbeit verwendeten S100-Enzymfraktion hervorragend aminoacylieren (nicht dargestellt). Auch im Falle von tPheY führt die Einführung des Anticodons CUA zur Abschaltung der Aminoacylierung (Sampson et al. 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). Das entsprechende T7-Transkript der tRNA läßt sich noch einmal um Faktor sieben schlechter aminoacylieren. 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. Bereits das Fehlen der Modifikation mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U34 in der ersten Anticodon-Position der tRNA führt zu einer Verringerung der Aminoacylierungsaktivität um Faktor 140 (Tamura et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit ließ sich schon das Transkript der "Wildtyp"-tRNA (tLys<sub>UUU</sub>) in der

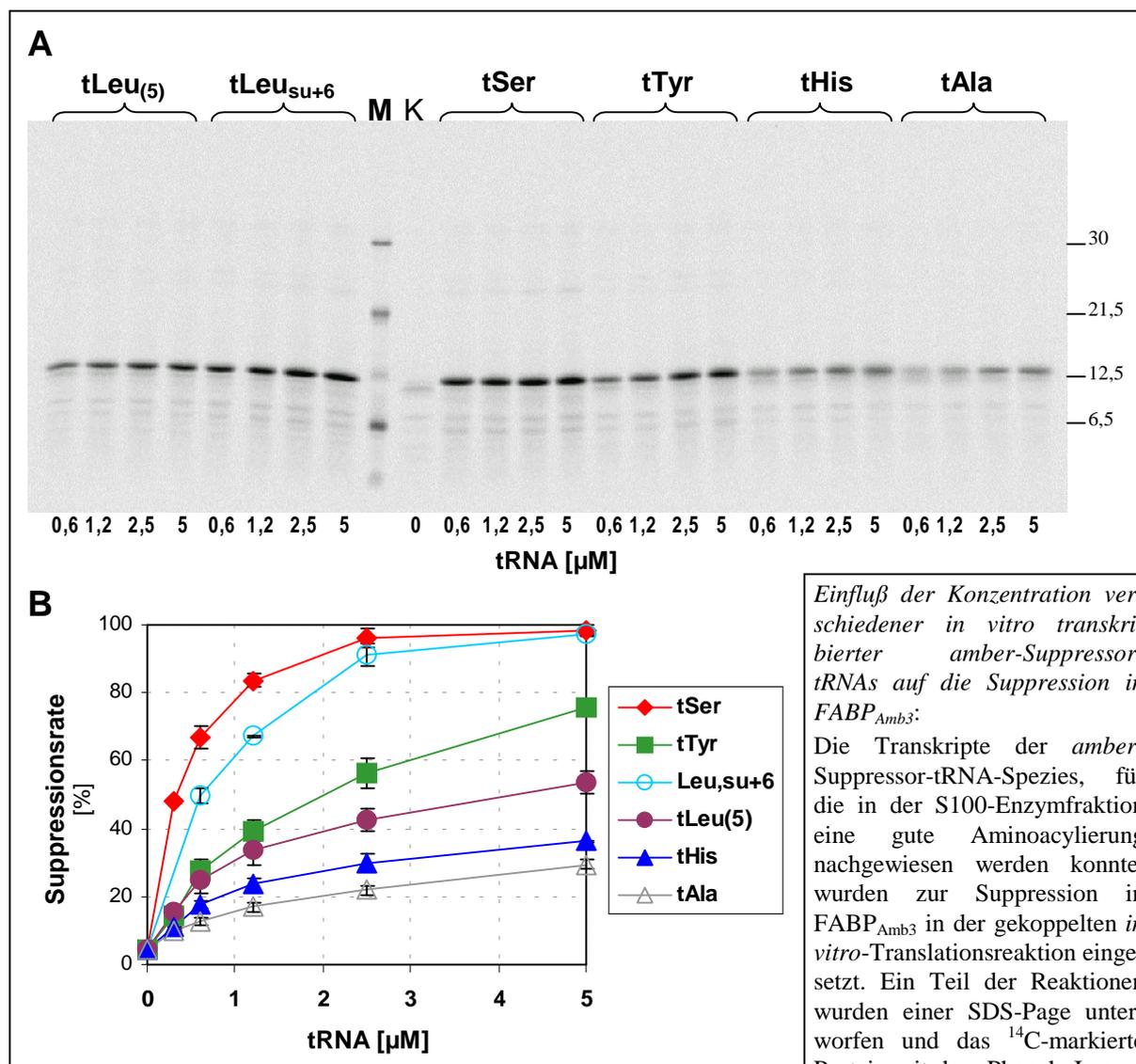
S100-Enzymfraktion nicht aminoacylieren (nicht dargestellt). Auch wesentliche Erkennungselemente der tRNAs tArg und tGly liegen innerhalb des Anticodons (tArg: McClain et al. 1990, Tamura et al. 1992, tGly: Cusack et al. 1998). Wie für tPhe und tLys wurde auch für tArg die entsprechende "Wildtyp"-tRNA transkribiert. Diese ließ sich in der vorliegenden Arbeit innerhalb der S100-Enzymfraktion hervorragend aminoacylieren (nicht dargestellt).

Einzig die beiden tRNAs tTyr und tHis wichen von dem Muster ab, daß tRNAs, in denen das Anticodon von der entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetase gebunden wird, als *amber*-Mutante in der S100-Enzymfraktion nicht aminoacyliert werden konnten. Beide *amber*-Suppressor-tRNAs ließen sich innerhalb der vorliegenden Arbeit vollständig aminoacylieren. In tTyr ist das wichtigste Erkennungselement die Base U<sub>35</sub> innerhalb des Anticodons (Hou 1997). Diese ist auch innerhalb des Anticodons der *amber*-Mutante enthalten. In Histidyl-tRNA-Synthetase gibt es zwar ebenfalls eine anticodonbindende Domäne (Cusack et al. 1998), das wesentliche Erkennungselement für Histidyl-tRNA-Synthetase besteht allerdings in dem ausschließlich in tHis enthaltenen Basenpaar G<sub>0</sub>-C<sub>73</sub> (Himeno et al. 1989, Francklyn und Schimmel 1990, Hou 1997). Der Vollständigkeit wegen soll noch erwähnt werden, daß keine der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen für die tRNAs tSer, tLeu und tAla, die allesamt in der S100-Enzymfraktion hervorragend aminoacyliert werden konnten, das Anticodon der entsprechenden tRNAs erkennt (Normanly et al. 1986/1992, Hou und Schimmel 1988/1992, Francklyn et al. 1992, Sampson und Saks 1993, Asahara et al. 1993/1994, Belrhali et al. 1994, Biou et al. 1994, Cusack et al. 1996).

*Einige der verschiedenen amber-Suppressor-tRNA-Spezies sind sehr aktiv, wie anhand der Expression von FABP<sub>Amb3</sub> gezeigt werden kann*

Die Suppressionsaktivität der verschiedenen *amber*-Suppressor-tRNAs wurde zunächst anhand der Expression von FABP<sub>Amb3</sub> untersucht (Abb.41 und Abb.42). Die Transkripte der *amber*-Suppressor-tRNAs tSer, tTyr, tLeu<sub>su+6</sub>, tLeu<sub>(5)</sub>, tHis und tAla, für die in der S100-Enzymfraktion eine ordentliche Aminoacylierung nachgewiesen werden konnte, zeigten eine klar nachweisbare Suppressionsaktivität (Abb.41). Ihr Einsatz in der *in vitro*-Translation führte zu einer in dem PhosphoImage des Gels mit den Translationsprodukten deutlich sichtbaren Synthese von FABP, während in Abwesenheit von Suppressor kein "full-length"-Produkt erscheint (Abb.41A, Spur K). Die beste Suppression zeigte tSer, die schlechteste Suppression tAla, die als Referenz-tRNA für die chemische Aminoacylierung gedacht war. Die Expression von "Wildtyp"-FABP wurde durch die Anwesenheit der verschiedenen *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies nicht beeinträchtigt (nicht dargestellt). Die Suppressionsraten der tRNAs mit der größeren Aktivität erreichen bei höheren Konzentrationen schnell eine Sättigung (Abb.41B). Die Unterschiede zwischen den Aktivitäten der einzelnen *amber*-Suppressor-tRNAs werden offensichtlich unterbetont, wenn

Abb. 41



detektiert. Ein anderer Teil der Reaktionen wurde mittels TCA-Fällung und Szintillationszählung analysiert.

**A:** PhosphoImage des Gels. **K:** Kontrollreaktion ohne Suppressor-tRNA. **B:** Graphische Auftragung der Suppressionsrate in Abhängigkeit von der tRNA-Konzentration. Die Suppressionsrate ist angegeben im Verhältnis zur Expression von  $FABP_w$  und wurde anhand von TCA-Werten ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Reaktionen mit unterschiedlichen Aufarbeitungen von Transkripten und Lysat.

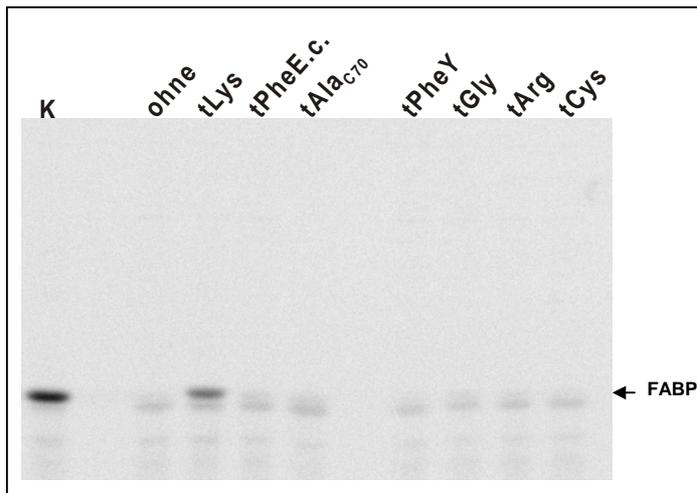
Die verschiedenen tRNA-Spezies zeigen sehr unterschiedliche Suppressionsraten. Bei höheren tRNA-Konzentrationen gehen die Suppressionsraten der aktiveren Suppressoren in eine Sättigung über.

ihre Aktivität - wie hier bei der Expression von  $FABP_{Amb3}$  - anhand eines Systems analysiert wird, in dem nur die Suppressionsprodukte erfaßt werden.

*In der Regel korreliert eine in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems nicht nachweisbare Aminoacylierbarkeit der Transkripte mit einer fehlenden Suppressionsaktivität innerhalb des Gesamtsystems*

Von den *amber*-Suppressor-tRNA-Transkripten, für die in der S100-Enzymfraktion keine Aminoacylierung nachgewiesen werden konnte, wies nur tLys eine deutlich sichtbare Suppressionsaktivität auf (Abb.42). Eine fehlende Aminoacylierung in der S100-

Abb. 42



Suppressionseffizienz von tRNA-Transkripten ohne nachweisbare Aminoacylierung in  $FABP_{Amb3}$ :

In *in vitro*-Translationsreaktionen wurden durchgeführt wie unter Material und Methoden beschrieben. Als Suppressor wurden die tRNAs eingesetzt, deren Aminoacylierung in der S100-Fraktion des Translationsystems nicht nachweisbar war (je 5  $\mu$ M Transkript). 15  $\mu$ l-Aliquots einer jeden Reaktion wurden einer SDS-Page unterworfen und das  $^{14}$ C-markierte Protein mit einem PhosphoImager detektiert.

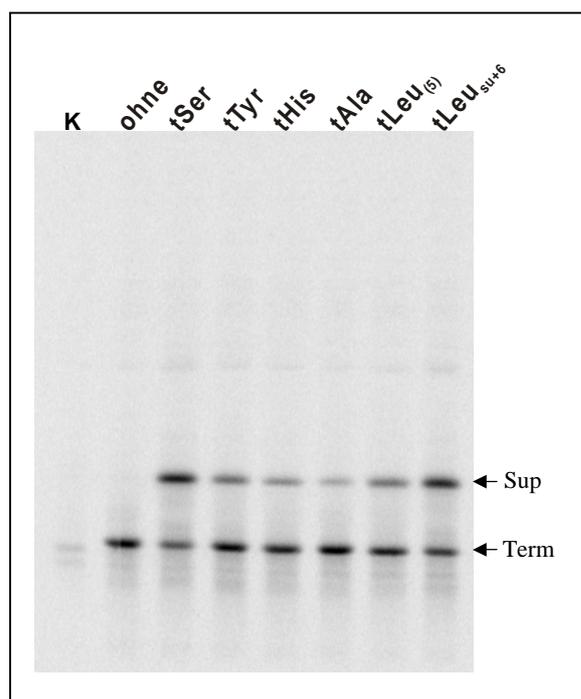
**K**: Die Kontrollreaktion mit tAla zeigt die Position des FABP; **ohne**: Reaktion in Abwesenheit von Suppressor

tLys zeigt als einzige der eingesetzten tRNAs eine deutliche Suppression.

Enzymfraktion des verwendeten *in vitro*-Translationsystems korreliert somit überwiegend mit einer fehlenden Suppressionsaktivität der entsprechenden Transkripte. Im Falle von tLys ist die Menge an aminoacylierter tRNA wahrscheinlich so gering, daß sie nur innerhalb des Gesamtsystems nachweisbar ist. Innerhalb des Gesamtsystems kann die extrem labile Aminoacylbindung während der Translation in die sehr stabile Peptidbindung umgewandelt werden, während innerhalb der S100-Enzymfraktion die Aminoacylierung der tRNA mit einer relativ starken spontanen Deacylierung der Aminoacyl-tRNA konkurriert.

Anhand der Expression von  $FABP_{Amb88}$  lassen sich die Suppressionsaktivitäten der Transkripte der amber-Suppressor-tRNAs tSer, tTyr, tLeu<sub>su+6</sub>, tLeu<sub>(5)</sub>, tHis und tAla genauer einstufen

Abb. 43

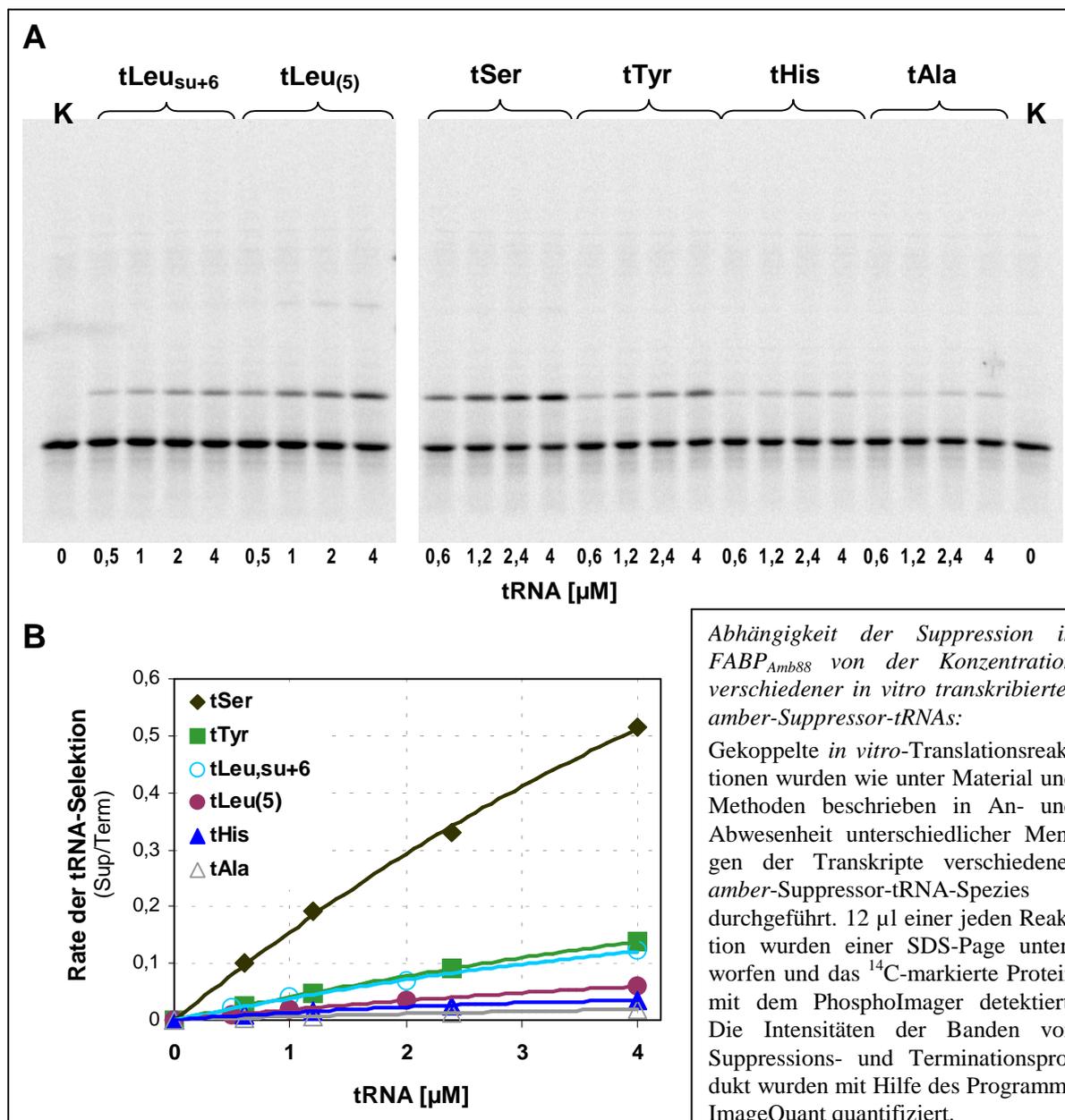


Vergleich der Suppressionseffizienz von sechs verschiedenen tRNA-Spezies im fraktionierten System anhand der Expression von  $FABP_{Amb88}$ :

Gekoppelte *in vitro*-Translationsreaktionen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben in An- und Abwesenheit von *in vitro* Transkripten der sechs tRNA-Spezies tSer, tTyr, tHis, tAla, tLeu<sub>(5)</sub> und tLeu<sub>su+6</sub> durchgeführt. 12  $\mu$ l einer jeden Reaktion wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das  $^{14}$ C-markierte Protein mit dem PhosphoImager detektiert. Die Konzentration der tRNAs betrug jeweils 2  $\mu$ M.

**K**: Kontrollreaktion in Abwesenheit von Plasmid und amber-Suppressor-tRNA; **ohne**: Reaktion in Anwesenheit von pHMFA<sub>Amb88</sub> aber ohne Suppressor-tRNA.

Abb. 44



**A:** PhosphoImage eines Gels. **K:** Kontrollreaktion ohne Suppressor-tRNA. **B:** Graphische Auftragung der anhand des molaren Verhältnisses von Suppressions- (obere der beiden Banden) und Terminationsproduktes (untere der beiden Banden) berechneten Rate der tRNA-Selektion in Abhängigkeit von der Konzentration.

Alle tRNAs zeigen eine nahezu lineare Zunahme der Rate der tRNA-Selektion. Das Transkript von tSer zeigt von allen untersuchten tRNAs die mit Abstand beste Suppression.

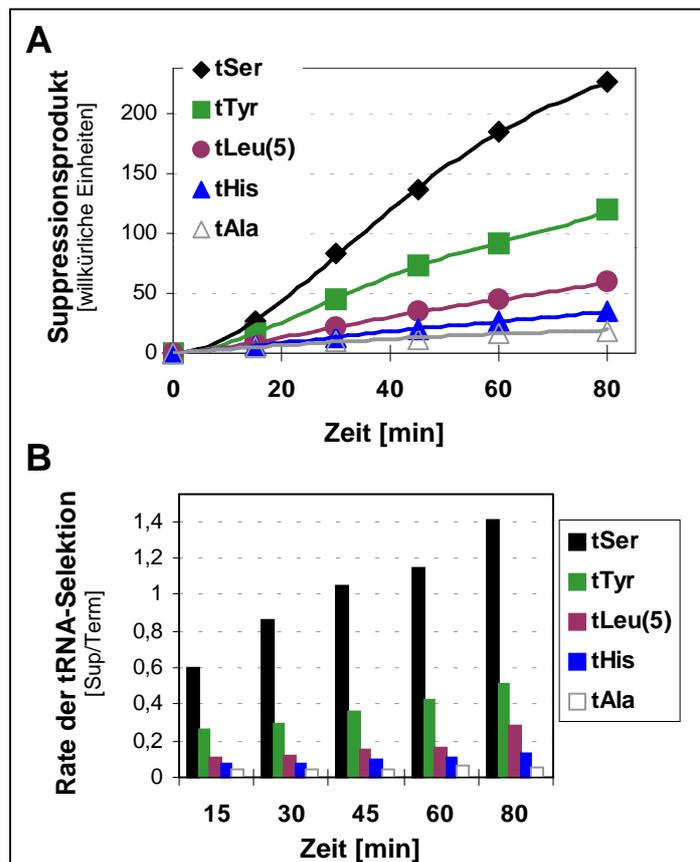
Die Transkripte der *amber*-Suppressor-tRNAs, die sich in der 100-Enzymfraktion aminoacylieren ließen, wurden nun anhand der Expression von FABP<sub>Amb88</sub> untersucht (Abb.43). Das PhosphoImage des Gels mit den während der gekoppelten Transkription/Translation von pHMFA<sub>Amb88</sub> entstehenden Translationsprodukten zeigt, daß in Abwesenheit von *amber*-Suppressor-tRNA ausschließlich das 78 Aminosäuren lange Terminationsprodukt gebildet wurde. Die Anwesenheit der unterschiedlichen *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies tSer, tTyr, tLeu<sub>su+6</sub>, tLeu<sub>(5)</sub>, tHis oder tAla äußert sich in einer mehr

oder weniger starken Synthese von Suppressionsprodukt ("full-length"-FABP). Ein gutes Maß für die Suppressionsaktivität der einzelnen *amber*-Suppressor-tRNAs ist die ribosomale Rate der tRNA-Selektion, die anhand des innerhalb einer einzelnen Reaktion entstandenen molaren Verhältnisses zwischen Suppressions- und Terminationsprodukt bestimmt werden kann (vgl. Kap.5.1, Abb.11, S.73). Bei allen tRNAs wächst die Rate der tRNA-Selektion mit zunehmender tRNA-Konzentration nahezu linear (Abb. 44B). Sättigungseffekte, wie noch bei der Expression von FABP<sub>Amb3</sub> im vorangegangenen Kapitel zu beobachten, finden sich während der Expression von FABP<sub>Amb88</sub> nicht. Deutlich wird nun, daß die Aktivität von tSer wesentlich höher ist als die der anderen tRNAs.

*Für alle untersuchten tRNAs ist die Kinetik der Bildung des Suppressionsproduktes bei der Expression von FABP<sub>Amb88</sub> annähernd linear*

Wie schon für die beiden Leucyl-tRNA-Spezies (vgl. Kap. 5.6.2, S.114ff) kann auch für die Transkripte der *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies tSer, tTyr, tHis und tAla eine Zunahme der Rate der tRNA-Selektion im Verlaufe der Reaktion gezeigt werden (Abb.45). Nach einer kurzen Anlaufphase der Proteinsynthese, wie vor allen Dingen bei der stärksten der untersuchten *amber*-Suppressor-tRNAs tSer sichtbar ist, geht die Synthese des Suppressionsproduktes in eine annähernd lineare Phase über. Es sind verschiedene Gründe für

Abb. 45



*Zeitabhängigkeit der Suppression in FABP<sub>Amb88</sub>:*

Gekoppelte *in vitro*-Translationsreaktionen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben in Anwesenheit von Transkripten verschiedener tRNA-Spezies (je 2  $\mu$ M) durchgeführt. Zu bestimmten Zeiten wurden Aliquots der Reaktionen entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Intensitäten der Banden von Suppressions- und Terminationsprodukt wurden für die graphische Auswertung mit Hilfe des Programms ImageQuant quantifiziert.

**A:** Synthese des Suppressionsproduktes in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. **B:** Abhängigkeit des molaren Verhältnisses zwischen Suppressions- und Terminationsprodukt (Rate der tRNA-Selektion) von der Reaktionszeit.

Während der Reaktion nimmt die Menge des Suppressionsproduktes nahezu linear zu. Hinter dieser annähernd linearen Zunahme des Suppressionsproduktes verbirgt sich eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen Suppressions- und Terminationsprodukt zugunsten der Suppression.

das verzögerte Einsetzen der Synthese denkbar. Anhand der beiden Leucyl-tRNA-Spezies wurden verschiedene Vorgänge, die sich auf der Ebene der tRNA-Moleküle am Anfang der Reaktion abspielen, charakterisiert (vgl. Kap. 5.6, S.106ff). Diese Untersuchungen zeigten eindeutig, daß das verzögerte Einsetzen der Synthese nicht auf die Aminoacylierung der zugegebenen *amber*-Suppressor-tRNAs zurückzuführen ist. Es erscheint plausibel, daß das verzögerte Einsetzen der Proteinsynthese mit der Bildung von mRNA am Anfang der gekoppelten Transkription/Translationsreaktion zusammenhängt.

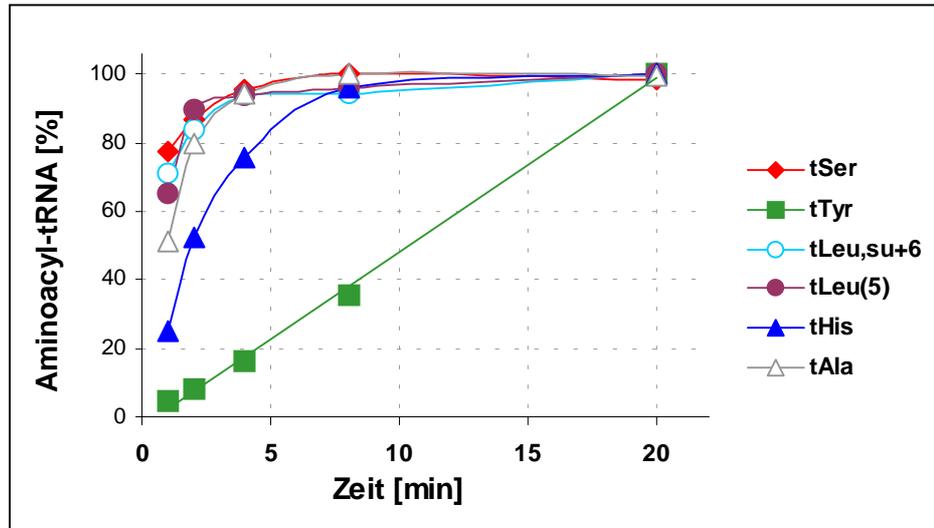
Die Zunahme der Rate der tRNA-Selektion belegt, daß sich die Eigenschaften des Systems hinsichtlich der Suppression mit zunehmender Zeitdauer verbessern. Hierfür sind eine Vielzahl von Gründen denkbar, beispielsweise eine Zunahme der Konzentration an freiem Magnesium, eine zunehmende Modifizierung der tRNAs oder ein Abnehmen der Aktivität von RF1 während der Reaktion. Die einzelnen Gründe sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erörtert werden; die gezeigte Kinetik der Suppression ist aber für die vorgenommenen Untersuchungen nur von Vorteil, da sie sehr lange Reaktionszeiten ermöglicht, ohne daß eine Sättigung erreicht wird. Zudem gibt das langsame Einsetzen der Proteinsynthese Vorgängen Zeit, die sich am Anfang der Translationsreaktion auf der Ebene der tRNA-Moleküle abspielen, beispielsweise Prozessierung und Aminoacylierung (vgl. Kap. 5.6.2, S.114ff).

*Die Aminoacylierung der amber-Suppressor-tRNAs Spezies tSer, tLeu<sub>su+6</sub>, tLeu<sub>(5)</sub>, tHis und tAla ist wahrscheinlich nicht limitierend für die gezeigten Suppressionsaktivitäten*

Die Suppressionseffizienz einer *amber*-Suppressor-tRNA beruht auf ihren strukturellen Eigenschaften und reflektiert prinzipiell eine spezifische Suppressionsaktivität der Aminoacyl-tRNA. Die Konzentration der Aminoacyl-tRNA wiederum ist eine Funktion der Konzentration der nicht aminoacylierten tRNA und der Aktivität der entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Die Suppressionsaktivität einer *amber*-Suppressor-tRNA entspricht dann der Suppressionseffizienz, wenn die Aminoacylierung der tRNA nicht limitierend für die Suppressionsaktivität ist.

Für die Transkripte der *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies tSer, tTyr, tLeu<sub>su+6</sub>, tLeu<sub>(5)</sub>, tHis und tAla wurde nun die Kinetik der Aminoacylierung in der S100-Enzymfraktion des Translationssystem analysiert. tSer, tLeu<sub>su+6</sub>, tLeu<sub>(5)</sub>, und tAla zeigten die schnellste Aminoacylierungskinetik (Abb.46). Bei diesen tRNAs wird bereits nach etwa vier Minuten ein Platteauwert erreicht. Die Aminoacylierung von tHis verläuft geringfügig langsamer; ein Platteauwert wird aber auch hier schon nach ca. acht Minuten erreicht. Einzig tTyr zeigt eine wesentlich langsamere Kinetik der Aminoacylierung. Unter den in diesem Kapitel untersuchten *amber*-Suppressor-tRNAs ist tTyr die einzige tRNA, für die eine größere Rolle

Abb. 46



Aminoacylierung verschiedener T7-transkribierter amber-Suppressor-tRNAs in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems:

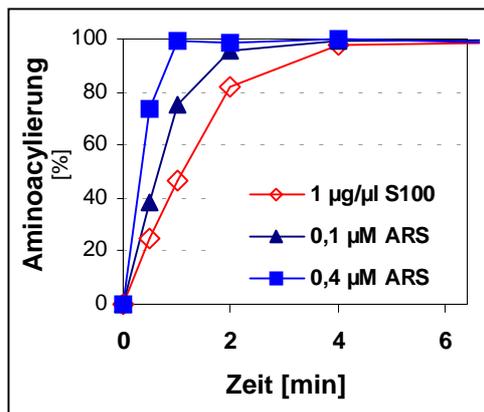
Die tRNAs wurden von BstNI-geschnittenen Plasmiden transkribiert, mittels denaturierender Gelelektrophorese auf ein Nukleotid genau aufgetrennt und gelabelt. Zur Aminoacylierung wurden jeweils 5  $\mu\text{M}$  Transkript mit der entsprechenden  $^{14}\text{C}$ -markierten Aminosäure eingesetzt. Zu verschiedenen Zeiten wurden den Reaktionen Aliquots entnommen und über TCA-Fällung quantifiziert. Der jeweils höchste Meßwert einer jeden Meßreihe entspricht 100% Aminoacyl-tRNA. Der Anteil der aminoacylierbaren Transkripte lag zwischen 1200 und 1400 pmol Aminoacyl-tRNA pro  $A_{260}$  des für die Aminoacylierungsreaktion eingesetzten Transkriptes (vgl. Abb.27, S.100).

des Anticodons bei der Aminoacylierung gezeigt wurde (Bedouelle 1990, Hou 1997). Dies könnte eine Erklärung für die langsamere Aminoacylierung von tTyr sein. Die Platteauwerte der Aminoacylierung, die in den der gezeigten Abbildung zugrundeliegenden Versuchen erreicht wurden, entsprechen Aminoacyl-tRNA-Konzentrationen von über 4  $\mu\text{M}$ . Demgegenüber lagen die während der *in vitro*-Translationsreaktion synthetisierten Mengen an Protein bei der Expression von FABP<sub>Amb88</sub> unter 2,5  $\mu\text{M}$  Protein in 90 Minuten, wobei unter den gewählten Bedingungen nur ein kleinerer Teil des synthetisierten Proteins auf das Suppressionsprodukt entfiel. Aus der hohen Aminoacylierungskapazität des Systems könnte man folglich ableiten, daß die Aminoacylierung nicht limitierend für die Suppressionsaktivität der tRNAs ist. Für die beiden Leucyl-tRNA-Spezies wurde ein Einfluß der Aminoacylierung auf die Suppressionsaktivität in einem der vorangegangenen Kapitel in der Tat ausgeschlossen (vgl. Kap. 5.6, S.106ff). Für diese beiden *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies konnte anhand kinetischer Untersuchungen gezeigt werden, daß Vorgänge, die sich zu Beginn der Translationsreaktion abspielen, keinen Einfluß auf die gezeigten Suppressionsaktivitäten haben. Die Raten der Aminoacylierung liegen für die tRNAs tSer und tAla auf einem ähnlichen Niveau wie für die beiden Leucyl-tRNAs, für tHis nur geringfügig niedriger. Dies läßt vermuten, daß die Aminoacylierung für die gezeigten Suppressionsaktivitäten dieser Spezies ebenfalls nicht limitierend ist.

Eine Erhöhung der Aktivität der Alanyl-tRNA-Synthetase innerhalb des *in vitro* Translationsystems bewirkt keine Steigerung der Suppressionsaktivität von tAla

Von den in der S100-Enzymfraktion aminoacylierbaren *amber*-Suppressor-tRNAs zeigte tAla die niedrigste Suppressionsaktivität. Um eine Limitation durch die Aminoacylierung ausschließen zu können, wurde die Suppressionsaktivität von tAla in An- und Abwesenheit

Abb. 47



Aminoacylierung von Alanyl-tRNA mit aufgereinigter Alanyl-tRNA-Synthetase (ARS) aus *Thermus thermophilus* bzw. mit der S100-Enzymfraktion des Translationsystems:

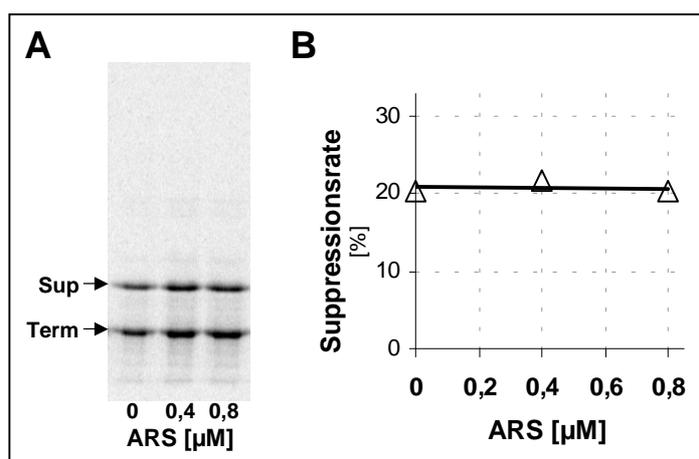
tRNA wurde wie unter Material und Methoden beschrieben mit  $^{14}\text{C}$ -Alanin aminoacyliert. Zu bestimmten Zeiten wurden den Reaktionen Aliquots entnommen, die tRNAs mit kalter TCA präzipitiert und die fällbare Radioaktivität mittels Szintillationszählung quantifiziert.

**S100:** S100-Enzymfraktion des Translationsystems; **ARS:** Alanyl-tRNA-Synthetase

Die Aktivität der eingesetzten ARS kann anhand der Aminoacylierung der Alanyl-tRNA nachgewiesen werden.

zusätzlicher Mengen an Alanyl-tRNA-Synthetase (ARS) untersucht. Wenn die Aminoacylierung von tAla keinen für die Suppression limitierenden Faktor darstellte, sollte die Zugabe zusätzlicher ARS in das Translationsystem nicht zu einer Zunahme der Suppressionsaktivität von tAla führen. Die Aktivität der für die Versuche verwendeten ARS wurde in Aminoacylierungsversuchen mit der Aktivität an ARS verglichen, die in der S100-Enzymfraktion des Translationsystems bereits vorhanden war (Abb.47). Die zur Verfügung stehende Präparation an ARS zeigte eine für die geplanten Versuche ausreichende Aktivität.

Abb. 48



Einfluß der Zugabe von Alanyl-tRNA-Synthetase (ARS) aus *Thermus thermophilus* auf die Suppressionsaktivität von tAla:

Anhand der Expression von FABP<sub>Amb88</sub> wurde untersucht, ob die Aktivität der Alanyl-tRNA-Synthetase innerhalb des Translationsystems möglicherweise limitierend für die Suppressionsaktivität von tAla ist. *in vitro*-Translationsreaktionen wurden in Anwesenheit steigender Mengen von ARS durchgeführt. 12 µl-Aliquots einer jeden Reaktion wurden einer SDS-Page unterworfen, das  $^{14}\text{C}$ -markierte Protein mit dem PhosphoImager detektiert und mit Hilfe des Programms ImageQuant quantifiziert.

**A:** PhosphoImage des Gels. **Sup:** Suppressionsprodukt, **Term:** Terminationsprodukt. **B:** Darstellung der Suppressionsrate in Abhängigkeit von der ARS-Konzentration.

Die Zugabe zusätzlicher Alanyl-tRNA-Synthetase in das System führt nicht zu einer Steigerung der Suppressionsrate. Die Aktivität der Alanyl-tRNA-Synthetase (ARS) ist offensichtlich nicht limitierend für die Suppressionsaktivität von tAla. Die für tAla ermittelten Suppressionsraten reflektieren somit die Suppressionseffizienz der tRNA.

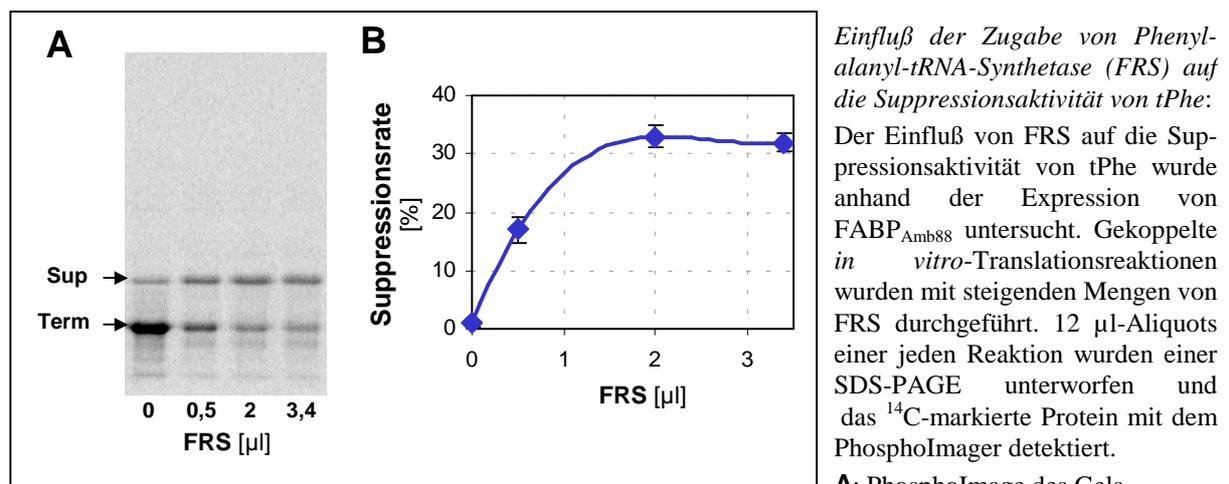
Hiernach wurden *in vitro*-Translationsreaktionen mit steigenden Mengen an ARS durchgeführt, wobei Mengen eingesetzt wurden, die die Aktivität der schon innerhalb des Translationssystems vorhandenen ARS übertrafen. Die Anwesenheit zusätzlicher Aktivitäten von ARS während der *in vitro* Suppression führte nicht zu einer Steigerung der Suppressionsaktivität von tAla (Abb.48). Die Aminoacylierung ist somit nicht limitierend für die Suppression. Die von tAla gezeigte Suppressionsaktivität entspricht der Suppressionseffizienz der tRNA.

Die Aktivitäten der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen für Serin und Histidin liegen auf einem vergleichbaren Niveau wie die der Alanyl-tRNA-Synthetase. Das Ergebnis des beschriebenen Versuchs ist somit ein weiteres Indiz dafür, daß auch im Fall von tSer und tHis, wie schon für tAla und auch für die beiden Leucyl-tRNA-Spezies gezeigt, die Aminoacylierung nicht limitierend für die Suppression ist.

*Durch eine Erhöhung der Aktivität der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase innerhalb des Translationssystems kann auch tPhe unter Bedingungen untersucht werden, bei denen die Aminoacylierung nicht limitierend für die Suppression ist*

Für Phenylalanyl-tRNA aus *Escherichia coli* 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). Das Transkript der *amber*-Suppressor-tRNA tPhe aus *Escherichia coli* war in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems auch nicht aminoacylierbar. Folgerichtig zeigte es

Abb. 49



*Einfluß der Zugabe von Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (FRS) auf die Suppressionsaktivität von tPhe:*

Der Einfluß von FRS auf die Suppressionsaktivität von tPhe wurde anhand der Expression von FABP<sub>Amb88</sub> untersucht. Gekoppelte *in vitro*-Translationsreaktionen wurden mit steigenden Mengen von FRS durchgeführt. 12 μl-Aliquots einer jeden Reaktion wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das <sup>14</sup>C-markierte Protein mit dem PhosphoImager detektiert.

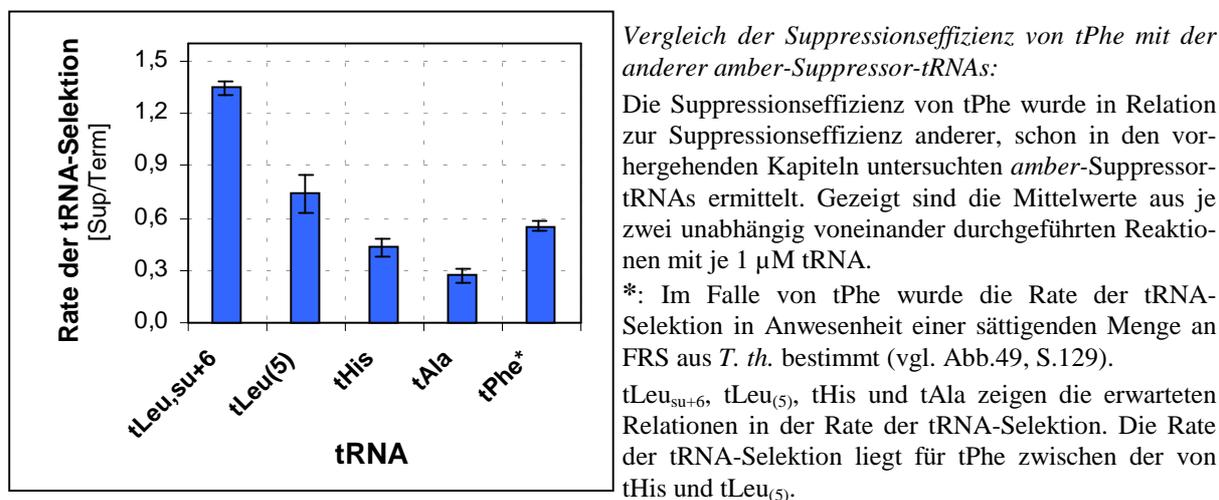
**A:** PhosphoImage des Gels.

**B:** Die Bandenintensitäten aus A wurden mit Hilfe des Programms ImageQuant quantifiziert. Aus den ermittelten Werten wurde unter Berücksichtigung der "Read through"-Rate in Abwesenheit von Suppressor-tRNA die Suppressionsrate berechnet und in Abhängigkeit von der FRS-Menge dargestellt. Die Werte wurden aus zwei verschiedenen Geln gemittelt.

Die Zugabe zusätzlicher Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (FRS) in das Translationssystem führt zu einer nun deutlich nachweisbaren Suppressionsaktivität von tPhe. Ab einer bestimmten Synthetasemenge wird ein Plateauwert erreicht, der die Suppressionseffizienz von tPhe reflektiert.

auch keine nachweisbare Suppressionsaktivität innerhalb des Translationssystems. Die mangelnde Aminoacylierung von tPhe innerhalb der S100-Enzymfraktion des Translationssystems führte zu der Schlußfolgerung, daß die Aminoacylierung den für die Suppression limitierenden Faktor darstellte. Die Zugabe zusätzlicher Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (FRS) in das Translationssystem sollte somit zu einer nachweislichen Suppressionsaktivität von tPhe führen. Dies war tatsächlich auch der Fall. Eine Zugabe von FRS in das Translationssystem führte zu einer deutlich nachweisbaren Suppression durch tPhe. Bei einer bestimmten Menge an FRS erreichte die Suppressionsrate einen Plateauwert (Abb.49). Die absolute Synthese an Protein nahm allerdings mit zunehmender Menge an FRS ab. Es bleibt unklar, worauf dies zurückzuführen ist. Möglicherweise wirken die gewaltigen Mengen an benötigter Synthetase oder eventuell vorhandene Unreinheiten in der Präparation des Enzyms inhibierend auf die Proteinsynthese. Die Relationen zwischen Suppressions- und Terminationsprodukt ergeben sich aus der Konkurrenz zwischen *amber*-Suppressor-tRNA und RF1. Sie sollten somit durch die absolute Ausbeute an Protein - in diesem Fall durch das Abfallen der Proteinsynthese mit zunehmender FRS-Menge - nicht beeinflußt werden. Man kann somit annehmen, daß der Plateauwert der Suppressionsrate die Suppressionseffizienz von tPhe reflektiert.

Abb. 50

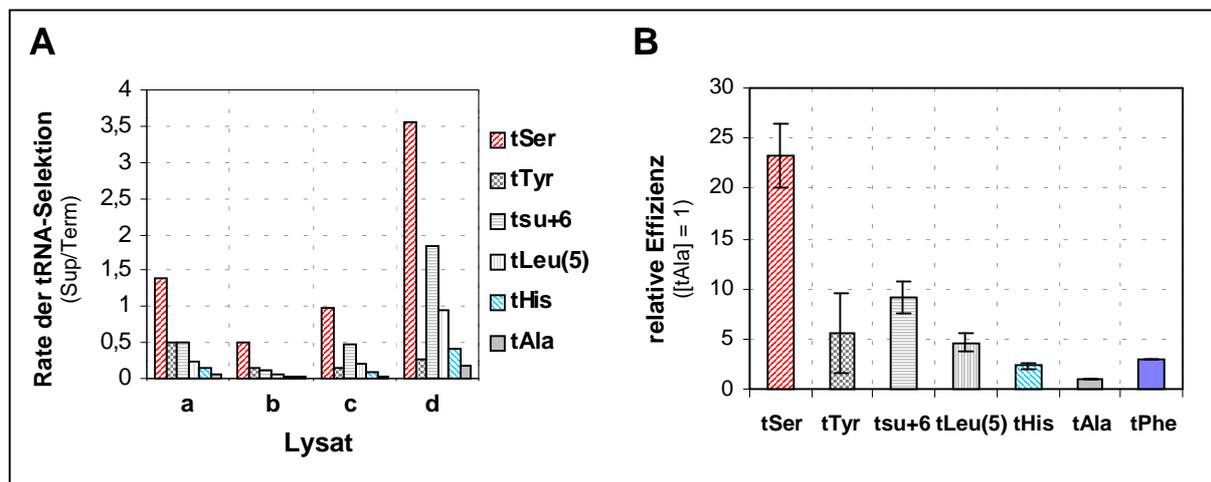


In weiteren Versuchen wurde die Suppressionseffizienz von tPhe in Relation zu der anderer *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies bestimmt. Die Suppressionsaktivitäten von Transkripten der *amber*-Suppressor-tRNAs tLeu<sub>su+6</sub>, tLeu<sub>(5)</sub>, tHis und tAla zeigten die aufgrund früherer Versuche erwarteten Relationen untereinander. Die Suppressionseffizienz von tPhe lag zwischen der von tLeu<sub>(5)</sub> und tHis (Abb.50).

Die relativen Effizienzen der amber-Suppressor-tRNAs *tSer*, *tTyr*, *tLeu<sub>su+6</sub>*, *tLeu<sub>(5)</sub>*, *tHis*, *tAla* und *tPhe*

Die Raten der tRNA-Selektion für eine bestimmte tRNA-Spezies waren in unterschiedlichen Lysataufarbeitungen extrem verschieden. In manchen Lysataufarbeitungen entfiel der größte Teil an synthetisiertem Protein auf das Suppressionsprodukt, in anderen Aufarbeitungen auf das Terminationsprodukt. Beispielsweise lagen die Raten der tRNA-Selektion für den stärksten untersuchten *amber*-Suppressor tRNA<sup>Ser</sup><sub>CUA</sub> (*tSer* (*su*<sup>+</sup><sub>1</sub>)) je nach Lysataufarbeitung zwischen 0,5 und 3,5. Dies entspricht Suppressionsraten zwischen 33 und 78 Prozent (vgl. Abb.51). Im Unterschied zu den absoluten Raten der tRNA-Selektion, die je nach Lysataufarbeitung sehr stark schwankten, scheinen die Relationen zwischen den Suppressionseffizienzen der verschiedenen tRNA-Spezies in unterschiedlichen Aufarbeitungen nahezu identisch zu sein. Beispielsweise ist in allen Aufarbeitungen *tSer* der effizienteste und *tAla* der schwächste Suppressor.

Abb. 51



Vergleich der relativen Effizienz der Transkripte von sieben verschiedenen *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies:

**A:** Die Raten der tRNA-Selektion für die Transkripte der *amber*-Suppressor-tRNAs *tSer*, *tTyr*, *tLeu<sub>su+6</sub>*, *tLeu<sub>(5)</sub>*, *tHis* und *tAla* (jeweils von links nach rechts) in verschiedenen Lysataufarbeitungen. Die Raten der tRNA-Selektion wurden anhand der Expression von FABP<sub>Amb88</sub> ermittelt.

**a, b, c, d:** verschiedene Aufarbeitungen von Lysaten; **tSer:** tRNA<sup>Ser</sup><sub>CUA</sub> (*su*<sup>+</sup><sub>1</sub>), **tTyr:** tRNA<sup>Tyr</sup><sub>CUA</sub> (*su*<sup>+</sup><sub>3</sub>), **tsu+6** (=tLeu<sub>su+6</sub>): tRNA<sup>Leu</sup><sub>CUA</sub> (*su*<sup>+</sup><sub>6</sub>), **tLeu<sub>(5)</sub>:** tRNA<sup>Leu</sup><sub>CUA</sub>, **tHis:** tRNA<sup>His</sup><sub>CUA</sub>, **tAla:** tRNA<sup>Ala</sup><sub>CUA</sub>, **tPhe:** tRNA<sup>Phe</sup><sub>CUA</sub>.

Während die absoluten Raten der tRNA-Selektion für eine bestimmte *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies in verschiedenen Lysataufarbeitungen sehr unterschiedlich ausfallen, ähneln sich die Relationen zwischen den einzelnen Spezies innerhalb der verschiedenen Aufarbeitungen. Beispielsweise ist immer *tSer* der effizienteste und *tAla* der schlechteste Suppressor. Die einzige tRNA, die von diesem Muster stärker abweicht, ist *tTyr*.

**B:** Die Tatsache, daß sich die Relationen zwischen den einzelnen *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies innerhalb der verschiedenen Aufarbeitungen ähneln, ermöglicht die Angabe einer für jede *amber*-Suppressor-tRNA spezifischen Kenngröße, der relativen Effizienz einer *amber*-Suppressor-tRNA. Diese ist unabhängig von den Eigenschaften der jeweiligen Aufarbeitung und gibt die Suppressionseffizienz einer bestimmten *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies im Verhältnis zu *tAla* an: Bei der Ermittlung der relativen Effizienz der verschiedenen *amber*-Suppressor-tRNAs diente die mit *tAla* erzielte Rate der tRNA-Selektion als Standard. Diese Rate wurde für jede Aufarbeitung gleich 1 gesetzt. Die relative Effizienz entspricht somit dem Quotienten aus der für die jeweilige *amber*-Suppressor-tRNA in einer bestimmten Lysataufarbeitung ermittelten Rate der tRNA-Selektion und der Rate der tRNA-Selektion von *tAla* in der gleichen Aufarbeitung.

Die in B gezeigten relativen Effizienzen sind Mittelwerte aus den in A gezeigten Lysataufarbeitungen. Einzig *tPhe* wurde in nur einem Lysat untersucht.

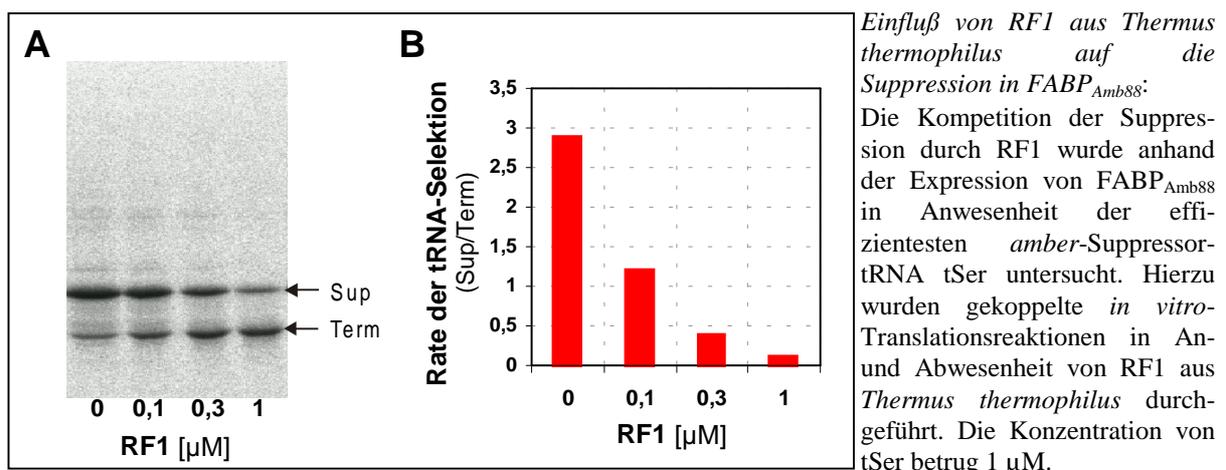
Hiervon weicht nur tTyr ab. Die Rate der tRNA-Selektion von tTyr ist in manchen Lysaten so hoch wie die von tLeu<sub>su+6</sub>, in anderen liegt sie unter der von tHis. In den vorangegangenen Kapiteln war tTyr die einzige *amber*-Suppressor-tRNA, für die eine Limitation der Suppressionsaktivität durch die Aminoacylierung nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Schwankungen der Rate der tRNA-Selektion von tTyr in unterschiedlichen Lysataufarbeitungen könnten ein Indiz dafür sein, daß die Aminoacylierung für die Suppressionsaktivität von tTyr in manchen Aufarbeitungen eventuell einen limitierenden Faktor darstellt.

Der Eindruck, daß die Relationen zwischen den Raten der tRNA-Selektion im wesentlichen nicht von der Aufarbeitung des jeweiligen Lysates abhängig sind, wird durch die Einführung einer für jede *amber*-Suppressor-tRNA spezifischen Kenngröße bestätigt, die unabhängig von den Eigenschaften der jeweiligen Aufarbeitung des Lysates ist, der relativen Effizienz (Abb.51B). Die für die einzelnen *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies aufgeführten relativen Effizienzen stellen Mittelwerte aus mehreren verschiedenen Lysataufarbeitungen dar. Die Standardabweichung von diesen Mittelwerten ist mit Ausnahme von tTyr für die meisten *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies relativ gering. Der effizienteste Suppressor ist tSer, deren relative Effizienz über 20 mal so groß ist wie die von tAla.

#### *Der Terminationsfaktor RF1 bewirkt eine starke Inhibition der Suppression*

Warum sind die absoluten Raten der tRNA-Selektion in unterschiedlichen Lysataufarbeitungen so verschieden, während die Relationen zwischen den einzelnen *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies gleich bleiben? Als mögliche Ursache kommt wahrscheinlich am ehesten der Terminationsfaktor RF1 in Frage. Innerhalb des in der vorliegenden Arbeit

Abb. 52



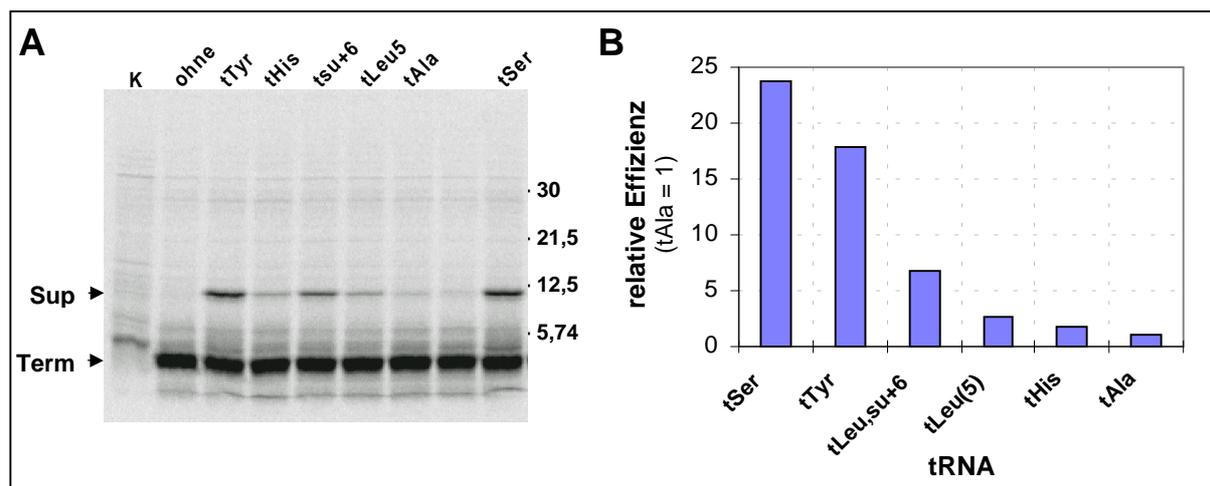
**A:** PhosphoImage des Gels. **Sup:** Suppressionsprodukt, **Term:** Terminationsprodukt. **B:** Die Intensitäten der Banden von Suppressions- und Terminationsprodukt aus A wurden quantifiziert und zur Berechnung der Rate der tRNA-Selektion herangezogen.

In Abwesenheit von RF1 entfällt der größte Teil der Synthese auf das Suppressionsprodukt. Die Anwesenheit von RF1 äußert sich in einer starken Abnahme an Suppressionsprodukt.

verwendeten fraktionierten Systems stammen Ribosomen und RF1 aus unterschiedlichen Fraktionen. Die größten Aktivitäten von RF1 finden sich in der S100-Enzymfraktion (Tate WP, mündliche Mitteilung). Wie sehr Schwankungen in der Aktivität von RF1 zu einer Beeinflussung der tRNA-Selektion führen können, zeigt ein Wettbewerbsversuch zwischen tSer und RF1 (Abb.52). Es ist somit durchaus wahrscheinlich, daß die extremen Unterschiede in den absoluten Raten der tRNA-Selektion auf Schwankungen in der Aktivität von RF1 in unterschiedlichen Lysataufarbeitungen zurückzuführen sind.

Anhand der Expression eines weiteren Proteins,  $RBD_{Amb43}$ , können die bei der Expression von  $FABP_{Amb88}$  gezeigten Relationen zwischen den Suppressionseffizienzen der amber-Suppressor-tRNAs tSer, tLeu<sub>su+6</sub>, tLeu<sub>(5)</sub>, tHis und tAla bestätigt werden - die Suppressionsaktivität von tTyr steigt dagegen auf das Niveau von tSer

Die Suppressionsaktivitäten der amber-Suppressor-tRNAs tAla und tPhe wurden bereits in Anwesenheit sättigender Mengen der entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen untersucht. Für die beiden Leucyl-tRNA-Spezies tLeu<sub>su+6</sub> und tLeu<sub>(5)</sub> konnte anhand Abb. 53



Gekoppelte Transkription/Translation von  $pHMRBD_{Amb43}$  in An- und Abwesenheit von Transkripten verschiedener amber-Suppressor-tRNAs:

Die Suppressionseffizienz der amber-Suppressor-tRNAs tSer, tTyr, tLeu<sub>su+6</sub> (tsu+6), tLeu<sub>(5)</sub>, tHis und tAla wurde anhand der Expression eines weiteren Proteins,  $RBD_{Amb43}$ , untersucht. Gekoppelte *in vitro*-Translationsreaktionen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben in An- und Abwesenheit unterschiedlicher Mengen der Transkripte der einzelnen amber-Suppressor-tRNA-Spezies durchgeführt. 12 µl einer jeden Reaktion wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das <sup>14</sup>C-markierte Protein mit dem PhosphoImager detektiert. Die Intensitäten der Banden von Suppressions- und Terminationsprodukt wurden mit Hilfe des Programms ImageQuant quantifiziert und für die Berechnung der relativen Effizienz herangezogen. Bei der Ermittlung der relativen Effizienz der verschiedenen amber-Suppressor-tRNAs wurde die mit tAla erzielte Rate der tRNA-Selektion gleich 1 gesetzt.

**A:** PhosphoImage eines Gels. **Sup:** Suppressionsprodukt, **Term:** Terminationsprodukt; **K:** Reaktion ohne Plasmid-Matrize, **ohne:** Expression von  $pHMRBD_{Amb43}$  in Abwesenheit von Suppressor.

**B:** Graphische Auftragung der anhand der Expression von  $RBD_{Amb43}$  für jede tRNA-Spezies ermittelten relativen Effizienz.

In dem hier verwendeten System sind die Suppressionsraten offensichtlich sehr niedrig. Dennoch entsprechen die relativen Effizienzen der einzelnen tRNAs bei der Expression von  $RBD_{Amb43}$  in etwa denen bei der Expression von  $FABP_{Amb88}$ , mit einer Ausnahme: tTyr zeigt relativ zu den anderen amber-Suppressor-tRNAs nun eine wesentlich höhere Effizienz.

ausführlicher kinetischer Untersuchungen eine Limitierung der gemessenen Suppressionsaktivitäten durch die Aminoacylierung ausgeschlossen werden. Die Aminoacylierung der tRNAs tSer und tHis verlief mit ähnlicher Geschwindigkeit wie die Aminoacylierung der erwähnten tRNAs tAla, tLeu<sub>su+6</sub> und tLeu<sub>(5)</sub>. Auch für diese beiden tRNAs war somit die Aminoacylierung sehr wahrscheinlich nicht limitierend für die Suppression.

Einzig im Falle von tTyr blieben Zweifel. Die Kinetik der Aminoacylierung verlief wesentlich langsamer als die der anderen *amber*-Suppressor-tRNAs. Die gemessenen Suppressionsaktivitäten waren in unterschiedlichen Lysataufarbeitungen extrem verschieden. Aus diesem Grund wurde ein anderes Protein in die Untersuchungen miteinbezogen. Von dem Protein RBD (die RAS-Bindende Domäne des RAS-bindenden Proteins) wurde durch die Einführung eines *amber*-Codons an Aminosäureposition 43 eine entsprechende *amber*-Mutante hergestellt. Während der gekoppelten Transkription/Translation des entsprechenden Plasmids pRBD<sub>Amb43</sub> zeigten die Transkripte der *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies tSer, tLeu<sub>su+6</sub>, tLeu<sub>(5)</sub>, tHis und tAla relative Effizienzen, die denen während der Expression von FABP<sub>Amb88</sub> vergleichbar waren (vgl. Abb.53 mit Abb.51, S.131). Die einzige Ausnahme machte tTyr, die nun eine in Relation zu den anderen *amber*-Suppressor-tRNAs wesentlich höhere Aktivität zeigte (Abb.53). tTyr erreichte in RBD<sub>Amb43</sub> eine Suppressionsaktivität, die mit der von tSer vergleichbar war.

	FABP		RBD	
	Term	"full-lenght"	Term	"full-lenght"
<b>Serin</b>	5	6	3	4
<b>Tyrosin</b>	1	2	0	0
<b>Leucin</b>	4	9	4	10
<b>Histidin</b>	0	2	0	9
<b>Alanin</b>	3	5	1	5

Tab.18: Anzahl der Reste ausgewählter Aminosäuren in den Proteinen FABP und RBD sowie in den Terminationsprodukten der entsprechenden *amber*-Varianten FABP<sub>Amb88</sub> bzw. RBD<sub>Amb43</sub>: (Term: Terminationsprodukt; "full-length": vollständig translatiertes Protein)

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Proteinen FABP und RBD ist, daß RBD kein Tyrosin enthält (vgl. Tab.18). Eine Möglichkeit für die bei der Expression von RBD<sub>Amb43</sub> gegenüber der Expression von FABP<sub>Amb88</sub> erhöhte Suppressionsaktivität von tTyr könnte somit sein, daß die *in vitro* transkribierte *amber*-Suppressor-tRNA tTyr neben dem *amber*-Codon UAG auch eines der beiden Tyrosin-Codons UAC und UAU lesen kann. Die Fähigkeit zur Ausbildung solcher Fehlpaarungen wurde für tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub> aus *Nicotiana* gezeigt. Diese tRNA kann, abhängig vom Grad der Modifikation des Anticodons, neben den Tyrosin-Codons UAC und UAU auch die Terminations-Codons UAG und UAA lesen (Zerfaß und Beier 1992, Schüll und Beier 1994). Eine andere, einfachere Erklärung für die bei der Expression von

---

RBD<sub>Amb43</sub> erhöhte Suppressionsaktivität von tTyr wäre, daß während der Translation von RBD für die Aminoacylierung von tTyr eine niedrigere Aktivität der Tyrosyl-tRNA-Synthetase ausreichend ist. Da RBD keine Tyrosin-Codons enthält, müssen die "Wildtyp"-Tyrosyl-tRNAs wahrscheinlich nicht so häufig aminoacyliert werden. Dies könnte bedeuten, daß mehr Synthetasekapazität für die Aminoacylierung von tTyr zur Verfügung steht. Die Ursache für die bei der Expression von RBD<sub>Amb43</sub> erhöhte Suppressionsaktivität von tTyr ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr zu klären. Auf jeden Fall zeigen die Untersuchungen an RBD<sub>Amb43</sub>, daß tTyr unter bestimmten Bedingungen dazu in der Lage ist, hervorragende Suppressionsraten zu erzielen.