

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. Einleitung</b>                                                                                      | 1  |
| 1.1. <i>in vitro</i> Translation                                                                          | 4  |
| 1.2. Die Einführung unnatürlicher oder modifizierter Aminosäuren in Proteine                              | 6  |
| 1.3. Struktur und Funktion der tRNA                                                                       | 10 |
| 1.3.1. Vom tRNA-Gen zur Aminoacyl-tRNA - Die Biogenese der tRNA im Überblick                              | 11 |
| 1.3.1.1. Die Rolle der Modifikation in tRNAs                                                              | 14 |
| 1.4. Die tRNA im Kontext der Translation                                                                  | 16 |
| 1.4.1. Der ternäre Komplex – Aminoacyl-tRNA*EF-Tu*GTP                                                     | 16 |
| 1.4.2. Translation                                                                                        | 17 |
| 1.4.2.1. Initiation                                                                                       | 17 |
| 1.4.2.2. Elongation                                                                                       | 18 |
| 1.4.2.3. Termination                                                                                      | 22 |
| 1.5. <i>amber</i> -Suppression                                                                            | 23 |
| 1.5.1. Suppressionseffizienz – mögliche Mechanismen                                                       | 25 |
| <b>2. Problemstellung</b>                                                                                 | 28 |
| <b>3. Material</b>                                                                                        | 29 |
| 3.1. Chemikalien, Biochemica, Lösungsmittel                                                               | 29 |
| 3.2. Radiochemikalien                                                                                     | 30 |
| 3.3. Nukleinsäuren, Proteine, Enzyme                                                                      | 30 |
| 3.4. Kits                                                                                                 | 31 |
| 3.5. Sonstige Materialien und Geräte                                                                      | 31 |
| 3.6. Zellstämme                                                                                           | 33 |
| <b>4. Methoden</b>                                                                                        | 34 |
| 4.1. <i>Escherichia coli</i> -Zellkulturen                                                                | 34 |
| 4.1.1. Zellanzucht in Flüssigkultur                                                                       | 34 |
| 4.1.2. Zellanzucht von Einzelkolonien                                                                     | 34 |
| 4.1.3. Anzucht und Ernte von <i>amber</i> -Suppressor-Zellstämmen                                         | 35 |
| 4.1.4. Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen                                            | 36 |
| 4.2. Methoden für die Herstellung, Aufreinigung und Analytik von Nukleinsäuren                            | 36 |
| 4.2.1. Ethanol- und Isopropanol-Präzipitation                                                             | 36 |
| 4.2.2. Phenolextraktion                                                                                   | 37 |
| 4.2.3. Präparation von Plasmid-DNA                                                                        | 38 |
| 4.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren                                          | 38 |
| 4.2.5. Gelelektrophoresemethoden für Nukleinsäuren                                                        | 39 |
| 4.2.5.1. Agarose Gelelektrophorese von DNA und RNA                                                        | 39 |
| 4.2.5.2. Gelelution von DNA aus nativen Agarosegelen                                                      | 40 |
| 4.2.5.3. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)                                            | 41 |
| 4.2.5.4. Polyacrylamid-Gele für die DNA-Sequenzierung und die Auftrennung von radioaktiv markierten tRNAs | 42 |
| 4.2.5.5. Ethidiumbromidfärbung                                                                            | 43 |
| 4.2.6. Behandlung von Nukleinsäurelösungen mit Proteinase K                                               | 43 |
| 4.2.7. DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)                                            | 44 |
| 4.2.7.1. Standard PCR                                                                                     | 44 |
| 4.2.7.2. Mutagenese von Plasmid mittels Vektor-PCR                                                        | 45 |
| 4.2.8. <i>In vitro</i> DNA-Rekombination - Klonierung                                                     | 46 |
| 4.2.8.1. Verschiedene für die Klonierung von DNA benötigte Methoden                                       | 47 |

|                                                                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.8.2. Vorbereitung von Vektoren für die <i>in vitro</i> Rekombination von DNA.....                                                                                            | 49        |
| 4.2.8.3. Klonierung von tRNA-Genen.....                                                                                                                                          | 49        |
| 4.2.8.4. Transformation von Escherichia coli JM109-Zellen.....                                                                                                                   | 50        |
| 4.2.9. DNA-Sequenzierung.....                                                                                                                                                    | 51        |
| 4.2.9.1. Zyklische Sequenzierung von DNA („Cycle-Sequencing“) .....                                                                                                              | 52        |
| 4.2.10. <i>In vitro</i> Transkription.....                                                                                                                                       | 52        |
| 4.2.10.1. Aufarbeitung von Transkriptionsansätzen.....                                                                                                                           | 54        |
| 4.2.11. Gelelektion von tRNA aus denaturierenden Polyacrylamidgelen.....                                                                                                         | 54        |
| 4.2.12. Aufarbeitung von Bulk-tRNA aus Escherichia coli.....                                                                                                                     | 55        |
| 4.2.12.1. Aufarbeitung von Bulk-tRNA aus einem S100-Überstand mittels<br>Phenolextraktion.....                                                                                   | 56        |
| 4.2.12.2. Aufarbeitung von Bulk-tRNA über Anionenaustauscherchromato-<br>graphie.....                                                                                            | 56        |
| 4.2.13. Gelfiltration.....                                                                                                                                                       | 58        |
| 4.2.14. "Annealing" von <i>in vitro</i> transkribierten tRNA.....                                                                                                                | 58        |
| 4.2.15. Aminoacylierung, Prozessierung und Reparatur von tRNA in der S100-<br>Fraktion des fraktionierten Systems.....                                                           | 58        |
| 4.2.16. Chemische Aminoacylierung von tRNA (nach Schulz et al. 1995) .....                                                                                                       | 60        |
| 4.2.17. Behandlung von N <sup>α</sup> -geschützter chemisch aminoacylierter tRNA.....                                                                                            | 61        |
| 4.3. <i>In vitro</i> Translation.....                                                                                                                                            | 61        |
| 4.3.1. Herstellung der Komponenten für das fraktionierte System.....                                                                                                             | 61        |
| 4.3.2. Durchführung einer <i>in vitro</i> Translationsreaktion.....                                                                                                              | 64        |
| 4.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970).....                                                                                                        | 66        |
| 4.5. TCA-Fällung von Protein und RNA.....                                                                                                                                        | 67        |
| 4.6. Detektion von β-Strahlung.....                                                                                                                                              | 68        |
| 4.6.1. Autoradiographie.....                                                                                                                                                     | 68        |
| 4.6.2. Szintillationszählung.....                                                                                                                                                | 68        |
| 4.7. Quantifizierung der spezifischen Aktivität von Chloramphenicol-Acetyl-<br>Transferase (CAT-Assay) .....                                                                     | 69        |
| <b>5. Ergebnisse.....</b>                                                                                                                                                        | <b>71</b> |
| 5.1. Aufbau und Charakterisierung von <i>amber</i> -Suppressions-Assays.....                                                                                                     | 72        |
| 5.1.1. Berechnung der Suppressionseffizienz.....                                                                                                                                 | 75        |
| 5.1.2. Der Einfluß der Magnesiumkonzentration auf Translation und Suppression<br>am Beispiel von FABP <sub>W</sub> und FABP <sub>Amb3</sub> .....                                | 76        |
| 5.2. Vergleich der Suppressionsaktivität von Gesamt-tRNA-Präparationen aus<br>verschiedenen Escherichia coli- <i>amber</i> -Suppressor-Zellstämmen.....                          | 78        |
| 5.2.1. Simulation von " <i>in vivo</i> -Verhältnissen" in einem <i>in vitro</i> -Translationssystem..                                                                            | 81        |
| 5.3. Konstruktion von Plasmiden für die T7-Transkription von tRNAs.....                                                                                                          | 86        |
| 5.4. Einsatz einer chemisch aminoacylierten <i>amber</i> -Suppressor-tRNA<br>(ε-DnsLys-tPheY) .....                                                                              | 87        |
| 5.5. Untersuchungen zur Endheterogenität von T7-transkribierten tRNAs .....                                                                                                      | 91        |
| 5.5.1. Der Einfluß der Temperatur auf die n+1-Aktivität zweier T7-RNA-<br>Polymerasen.....                                                                                       | 92        |
| 5.5.2. Aminoacylierung und Prozessierung <i>in vitro</i> transkribierter endheterogener<br>tRNAs.....                                                                            | 99        |
| 5.6. Prozessierung, Aminoacylierung und tRNA-Reparatur – ihr Einfluß auf die<br>Aktivität zweier in Leucyl- <i>amber</i> -Suppressor-tRNAs in der <i>in vitro</i> Translation .. | 106       |
| 5.6.1. Untersuchungen in der S100-Enzymfraktion des Gesamtsystems.....                                                                                                           | 107       |
| 5.6.2. Charakterisierung des Gesamtsystems.....                                                                                                                                  | 114       |

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.7. Vergleich der Suppressionseffizienz von verschiedenen <i>in vitro</i> transkribierten<br><i>amber</i> -Suppressor-tRNA-Spezies..... | 119 |
| <b>6. Diskussion</b> .....                                                                                                               | 136 |
| 6.1. Suppression <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....                                                                                | 137 |
| 6.2. Struktur der Aminoacyl-tRNA und Suppressionseffizienz.....                                                                          | 142 |
| 6.3. Konsequenzen der Untersuchungen zur Suppressionseffizienz für den Einsatz<br>chemisch aminoacylierter tRNAs.....                    | 149 |
| 6.4. Ausblick .....                                                                                                                      | 152 |
| <b>7. Zusammenfassung / Summary</b> .....                                                                                                | 154 |
| <b>8. Abkürzungen</b> .....                                                                                                              | 158 |
| <b>9. Literatur</b> .....                                                                                                                | 161 |
| 9.1. Eigene Publikationen.....                                                                                                           | 180 |
| <b>10. Anhang</b> .....                                                                                                                  | 181 |
| 10.1. Nummerierung der Nukleotide in tRNAs (nach Sprinzl et al. 1996).....                                                               | 181 |
| 10.2. Sequenzen der <i>amber</i> -Suppressor-tRNA-Gene.....                                                                              | 182 |
| 10.3. Sequenz des Expressions-Vektors pHMFA <sub>Amb88</sub> .....                                                                       | 184 |
| 10.3.1. Sequenz von mFA <sub>Amb88</sub> .....                                                                                           | 185 |
| 10.3.2. DNA-Sequenz des kodierenden Bereichs und Aminosäuresequenz<br>von FABP.....                                                      | 185 |
| 10.4. Sequenz des Expressions-Vektors pRBD-02.....                                                                                       | 186 |
| 10.4.1. DNA-Sequenz des proteinkodierenden Bereichs und Aminosäuresequenz<br>von RBD.....                                                | 187 |
| 10.5. Restriktionskarte und Sequenz des Vektors pACYC184 (pCAT <sub>w</sub> ).....                                                       | 189 |
| Lebenslauf.....                                                                                                                          | 191 |
| Danksagung.....                                                                                                                          | 192 |