

7. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Wege aufzuzeigen, die die gezielte Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine mit der Methodik des Einsatzes chemisch aminoacylierter *amber*-Suppressor-tRNAs verbessern. Um die besonderen Bedingungen beim Einsatz von *amber*-Suppressor-tRNAs in der zellfreien Proteinbiosynthese zu beleuchten, wurden sowohl *in vivo* exprimierte als auch *in vitro* transkribierte *amber*-Suppressor-tRNAs auf unterschiedlichen Funktionsebenen innerhalb eines *Escherichia coli in vitro*-Translationssystems charakterisiert. Letztendlich ermöglichten die Untersuchungen eine Einstufung der Suppressionseffizienz von sieben verschiedenen *in vitro* transkribierten *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies.

Die zielgerichtete Insertion einer unnatürlichen Aminosäure in ein Protein konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit anhand der Insertion von ϵ -Dansyl-Lysin in FABP demonstriert werden. Nicht unerwartet war der Einbau der unnatürlichen Aminosäure äußerst ineffizient. Als eine weitere Limitation der dem Einbau unnatürlicher Aminosäuren zugrunde liegenden Methodik erwies sich die Aufreinigung größerer Mengen an homogenen *in vitro* transkribierten verkürzten tRNAs, die für die Herstellung der mit der unnatürlichen Aminosäure beladenen tRNA eine unabdingbare Voraussetzung ist. Die Aufreinigung homogener tRNAs war aufgrund der starken 3'-Endheterogenität der Transkriptionsprodukte äußerst problematisch. Sowohl die Homogenität der tRNA als auch die absolute Ausbeute ließen sich deutlich verbessern, indem die normalerweise für die Transkription mit T7-RNA-Polymerase gebräuchliche Temperatur von 37°C auf ein Optimum von 44°C erhöht wurde. Zudem zeigten unterschiedliche Präparationen von T7-RNA-Polymerase verschieden starke n+1-Aktivitäten.

Zur Untersuchung der Aktivitäten *in vivo* exprimierter *amber*-Suppressor-tRNAs, wurden Gesamt-tRNA-Präparationen aus insgesamt 10 verschiedenen, bei Kleina et al. (1990) beschriebenen *Escherichia coli-amber*-Suppressor-Zellstämmen in der *in vitro*-Translation eingesetzt. Die Relationen in den Suppressionsaktivitäten der *amber*-Suppressor-tRNAs für Leucin, Histidin, Tyrosin und Serin entsprachen denen *in vivo*. Die geringere Suppressionsaktivität anderer untersuchter *amber*-Suppressor-tRNAs *in vitro* gibt möglicherweise einen Hinweis darauf, daß die Aktivität einiger Aminoacyl-tRNA-Synthetasen im *in vitro* Translationssystem reduziert ist.

Prozessierung, Reparatur und Aminoacylierung *in vitro* transkribierter tRNAs und ihre Beziehung untereinander wurden eingehend untersucht. Homogene tRNA-Präparationen mit korrektem CCA-Ende konnten durch eine Prozessierung oder durch die Regeneration des 3'-Endes der *in vitro* transkribierten tRNAs in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems erhalten werden. Die Prozessierung verlängerter tRNAs und die Reparatur verkürzter tRNAs innerhalb des Gesamtsystems erwiesen sich als nicht limitierend für die Proteinbiosynthese.

Letztendlich konnte die unterschiedliche Suppressionsaktivität der Transkripte von sieben *amber*-Suppressor-tRNA-Spezies ($tRNA^{\text{Ser}}_{\text{CUA}}\{\text{su}^+_1\}$, $tRNA^{\text{Tyr}}_{\text{CUA}}\{\text{su}^+_3\}$, $tRNA^{\text{Leu}}_{\text{CUA}}\{\text{su}^+_6\}$, $tRNA^{\text{Leu}^5}_{\text{CUA}}$, $tRNA^{\text{Phe}}_{\text{CUA}}$, $tRNA^{\text{His}}_{\text{CUA}}$ und $tRNA^{\text{Ala}^1}_{\text{CUA}}$) auf strukturelle Eigenschaften der entsprechenden Aminoacyl-tRNAs zurückgeführt werden. Als Maß für die Suppressionseffizienz diente die Häufigkeit der ribosomalen tRNA-Selektion im Vergleich zur Häufigkeit der Selektion von RF1. Alle untersuchten *amber*-Suppressor-tRNAs enthielten die als ideal für die Suppression beschriebene Nukleotidfolge $5'\text{C}_{34}\text{U}_{35}\text{A}_{36}\text{A}_{37}\text{A}_{38}3'$ innerhalb ihrer Anticodonschleife. Auch in Anwesenheit dieser Sequenz unterschieden sich die Suppressionseffizienzen der einzelnen *amber*-Suppressor-tRNAs sehr stark. Die Rate der tRNA-Selektion des stärksten Suppressors, $tRNA^{\text{Ser}}_{\text{CUA}}$, war über 20 mal so hoch wie die Rate der tRNA-Selektion für $tRNA^{\text{Ala}^1}_{\text{CUA}}$, die die Suppressionseffizienz der zur Zeit für die Einführung unnatürlicher Aminosäuren verwendeten *amber*-Suppressor-tRNAs repräsentiert. Generell war die Suppressionseffizienz um so besser, je mehr die Sequenz der ursprünglichen Wildtyp-tRNA der Sequenz der aus ihr abgeleiteten *amber*-Suppressor-tRNA ähnelte. Mit zunehmender Anzahl der Mutationen, die nötig waren, die Sequenz $5'\text{C}_{34}\text{U}_{35}\text{A}_{36}\text{A}_{37}\text{A}_{38}3'$ innerhalb der Anticodon-Schleife zu erhalten, nahm die Suppressionseffizienz der tRNAs ab. Insofern unterstützen die Ergebnisse die Theorie des "Extended Anticodon" (Yarus 1982). Die beiden mit Abstand besten Suppressoren $tRNA^{\text{Ser}}_{\text{CUA}}$ und $tRNA^{\text{Tyr}}_{\text{CUA}}$ enthalten die Base C_{32} innerhalb der Anticodon-Schleife. Wichtige Strukturelemente für die Suppression liegen möglicherweise auch außerhalb des Anticodon-Armes. Es ergaben sich Hinweise darauf, daß eine TypII-Struktur der tRNA die Suppression begünstigt.

Die im Rahmen der Biotechnologie bedeutendste Konsequenz aus der vorliegenden Arbeit ist, daß die zur Zeit für die Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine verwendeten *amber*-Suppressor-tRNAs relativ schwache *amber*-Suppressoren sind. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollte die Konstruktion wesentlich verbesserter *amber*-Suppressoren und damit eine sehr viel effizientere Insertion unnatürlicher Aminosäuren in Proteine möglich sein.