

**Funktion und Effizienz von *amber*-Suppressor-tRNAs  
in der zellfreien Proteinbiosynthese**



**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Michael Gerrits**

**Berlin, Februar 2001**

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1995 bis Februar 2001 am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt. Der Verfasser versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.



**1. Gutachter: Professor Dr. Volker A. Erdmann**

**2. Gutachter: Professor Dr. Dr. med. Manfred Schweiger**

**Tag der Disputation: 05. November 2001**

*"... Die (m)RNA bietet vor allen Dingen eine Folge von Stellen, an denen Wasserstoffbrücken gebildet werden können. Man kann daher annehmen, daß alles, was sich mit der Matrize in spezifischer Weise verbindet, dies über Wasserstoffbrücken tut. Es ist deshalb eine naheliegende Hypothese, daß die Aminosäure durch ein Adaptermolekül zu der Matrize transportiert wird und daß dieser Adapter der Teil ist, der zu der RNA paßt. In der einfachsten Form würde man 20 Adapter brauchen, für jede Aminosäure einen."*

Francis Crick, 1958

## 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 Phenolextraktion.....	56
4.2.12.2. Aufarbeitung von Bulk-tRNA über Anionenaustauscherchromato- 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- 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- 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 am Beispiel von FABP <sub>W</sub> und FABP <sub>Amb3</sub> .....	76
5.2. Vergleich der Suppressionsaktivität von Gesamt-tRNA-Präparationen aus 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 (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- Polymerasen.....	92
5.5.2. Aminoacylierung und Prozessierung <i>in vitro</i> transkribierter endheterogener tRNAs.....	99
5.6. Prozessierung, Aminoacylierung und tRNA-Reparatur – ihr Einfluß auf die 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 <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 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 von FABP.....	185
10.4. Sequenz des Expressions-Vektors pRBD-02.....	186
10.4.1. DNA-Sequenz des proteinkodierenden Bereichs und Aminosäuresequenz von RBD.....	187
10.5. Restriktionskarte und Sequenz des Vektors pACYC184 (pCAT <sub>w</sub> ).....	189
Lebenslauf.....	191
Danksagung.....	192



## 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  $\epsilon$ -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  $\text{C}_{32}$  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.

## 7. Summary

The introduction of unnatural amino acids into proteins can be achieved by the use of an *amber* suppressor tRNA, that has been chemically acylated with the desired amino acid and that is not a substrate for the natural aminoacyl tRNA synthetases. The addition of the charged *amber* suppressor tRNA to the protein biosynthesis reaction results in site specific incorporation of the amino acid into the protein. However very often the usually applied methodology does not lead to sufficient amounts of mutant protein. The goal of this work was to expand our knowledge of *in vitro* *amber* suppression expecting that the strategy mentioned above can be applied more general.

Within the presented work the site specific incorporation of an unnatural amino acid could be demonstrated by the introduction of  $\epsilon$ -dansyl lysine into FABP (fatty acid binding protein). As expected the incorporation of the unnatural amino acid was very inefficient. A further limitation of the methodology proved to be the preparation of large amounts of shortened tRNA molecules, which are necessary to produce the chemically acylated tRNA. The high level of 3'-end heterogeneity of the *in vitro* transcription products strongly impedes the purification of homogenous tRNA. The homogeneity and the amount of the tRNAs during T7-transcription could clearly be improved by increasing the reaction temperature from 37°C to an optimum temperature of 44°C. Additionally, various preparations of T7-RNA-Polymerase showed different n+1-activities.

To investigate the activities of *amber* suppressor tRNAs expressed *in vivo*, total tRNA from 10 different *Escherichia coli* *amber* suppressor strains (Kleina et al. 1990) was prepared and employed in cell-free translation. The relations between the suppression activities of the *amber* suppressors for leucine, histidine, tyrosine and serine *in vitro* corresponded to the *in vivo* results of other authors. In contrast to those four the suppression activities of other *amber* suppressors were decreased *in vitro* indicating that the activities of the corresponding amino acyl tRNA synthetases may be reduced.

Processing, repair and aminoacylation of *in vitro* transcribed tRNAs and the relation of these processes to each other were investigated in-depth. Incubation of 3'-shortened or 3'-prolonged heterogenous *in vitro* transcription products in the S100 enzyme fraction of the total translation system resulted in homogenous tRNA populations with correct 3'-terminal CCA-ends. Processing of prolonged tRNAs and repair of shortened tRNAs in the whole translation system were shown not to be limiting for protein biosynthesis *in vitro*.

The suppression activities of the transcripts of seven different *amber* suppressor tRNA species ( $\text{tRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Ser}} \{\text{su}^+_1\}$ ,  $\text{tRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Tyr}} \{\text{su}^+_3\}$ ,  $\text{tRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Leu}} \{\text{su}^+_6\}$ ,  $\text{tRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Leu5}}$ ,  $\text{tRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Phe}}$ ,  $\text{tRNA}_{\text{CUA}}^{\text{His}}$  and  $\text{tRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Ala1}}$ ) were shown not to be limited by aminoacylation. Therefore the suppression activities of these tRNAs reflects structural properties of their aminoacylated

counterparts. Suppression efficiency was defined as the frequency of ribosomal tRNA selection divided by the frequency of RF1 selection. The anticodon loops of all tRNAs contained the sequence  ${}^5\text{C}_{34}\text{U}_{35}\text{A}_{36}\text{A}_{37}\text{A}_{38}{}^3$  which is ideal for efficient suppression as known from other studies. Still, in the presence of this sequence suppression efficiencies varied over a large range. The rate of tRNA selection was 20 times higher for the strongest suppressor,  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{\text{CUA}}$ , compared to the efficiency of the weakest one,  $\text{tRNA}^{\text{Ala}1}_{\text{CUA}}$ , which represents the suppression efficiency of the actual tRNAs used for chemical aminoacylation. In general the more the sequence of the *amber* suppressor tRNA reflected the sequence of the original wild type tRNA, from which it was deviated, the better the suppression efficiencies became. With increasing number of nucleotide exchanges, that were necessary to get the sequence  ${}^5\text{C}_{34}\text{U}_{35}\text{A}_{36}\text{A}_{37}\text{A}_{38}{}^3$  into the anticodon loop of the *amber* suppressor, suppression efficiencies decreased, indicating that tRNA sequences have been evolved to support optimal interaction between codon and anticodon, as it is postulated in the "Extended Anticodon" (Yarus 1982). The two best *amber* suppressors by far,  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{\text{CUA}}$  and  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}_{\text{CUA}}$ , both contain the base C<sub>32</sub> inside their anticodon loop. There is also some evidence, that certain structural features important for suppression are localized outside the anticodon arm and that these structural features are found mainly in typeII-tRNAs.

The most important conclusion resulting from this work within the field of biotechnology is, that the actual *amber* suppressor tRNAs used for chemical aminoacylation are comparably weak suppressors. A logical step from this work is the construction of new *amber* suppressor tRNAs with highly improved suppression efficiencies for chemical aminoacylation. Therefore the present work should allow a much improved incorporation of unnatural amino acids into proteins in the future.