

1. Einleitung

Die Bildung von Proteinen wird in allen Zellen durch die in der DNA gespeicherte Information gesteuert. Hierbei ist die Reihenfolge der Aminosäuren innerhalb eines Polypeptids durch den genetischen Code (Abb.1) festgelegt. Jeweils drei aufeinander folgende Nukleotide innerhalb des Proteingens bilden eine Dreierfolge, die als Codon bezeichnet wird. Aus den theoretisch möglichen Kombinationen der vier verschiedenen Nukleotide ergeben sich 64 verschiedene Codons, von denen normalerweise 61 die verschiedenen Aminosäuren kodieren und drei für Kettentermination stehen. Diese drei Codons (TAG, TAA und TGA) werden traditionell als *amber-*, *ochre-* bzw. *opal-*Codon bezeichnet.

Die Synthese der Proteine verläuft in allen Organismen während der Genexpression nach den gleichen Mechanismen. Zunächst wird die in der DNA kodierte genetische Information in Botenribonukleinsäure (mRNA) umgeschrieben. Die mRNA ist eine genaue Kopie der DNA, die alle Signale für die Synthese der Polypeptidkette enthält. Sie wird während der Translation an den Ribosomen dem genetischen Code entsprechend in Proteine übersetzt. Hierbei entspricht die Reihenfolge der Aminosäuren in der wachsenden Peptidkette der Reihenfolge der Codons auf der mRNA.

Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) spielen die Rolle des Adapters zwischen mRNA und Aminosäuren, wobei es in *Escherichia coli* für die - inklusive Selenocystein - 21 verschiedenen proteinogenen Aminosäuren 45 unterschiedliche tRNAs gibt (Sprinzl 1999). Die tRNAs tragen jeweils eine Aminosäure in energiereicher Bindung und weisen ein für die Aminosäure spezifisches Basentriplett (Anticodon) auf, das komplementär zu dem passenden Codon der mRNA ist und mit ihm in Basenpaarung tritt. Für die korrekte Übersetzung einer mRNA-Sequenz in ein Protein sind zwei Adaptermechanismen entscheidend, die Verknüpfung der tRNA mit der dazugehörigen Aminosäure (Aminoacylierung) und die Erkennung des zu der entsprechenden Aminosäure passenden Codons auf der mRNA durch die tRNA. Die Aminoacylierung wird durch entsprechende Enzyme, die Aminoacyl-tRNA Synthetasen, katalysiert. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sind hochspezifisch für die jeweilige Aminosäure und tRNA. Dies ist äußerst wichtig, da während der Translation die tRNA nur über das Anticodon erkannt wird, so daß Änderungen in der Aminosäurebeladung der tRNA zu Änderungen der Aminosäuresequenz in den entstehenden Proteine führen. Die Erkennung des richtigen Codons auf der mRNA durch die tRNA wird durch die Ausbildung von Basenpaarungen zwischen mRNA-Codon und dem tRNA-Anticodon ermöglicht.

Die Grundprinzipien der Interaktion zwischen mRNA und tRNA wurden schon 1958 durch Francis Crick in der Adapterhypothese formuliert und im Jahr 1962 durch Chapeville in einem eleganten Experiment bestätigt. Chapeville et al. überführten den Cysteinrest einer Cystein-tRNA^{Cys} durch reduktive Desulfhydrierung mit Raney Nickel in Alanin. Die durch die

Abb. 1

Erste Base (5'-Ende)	Zweite Base				Dritte Base (3'-Ende)
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA <i>ochre</i>	UGA <i>opal</i>	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG <i>amber</i>	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

Der genetische Code

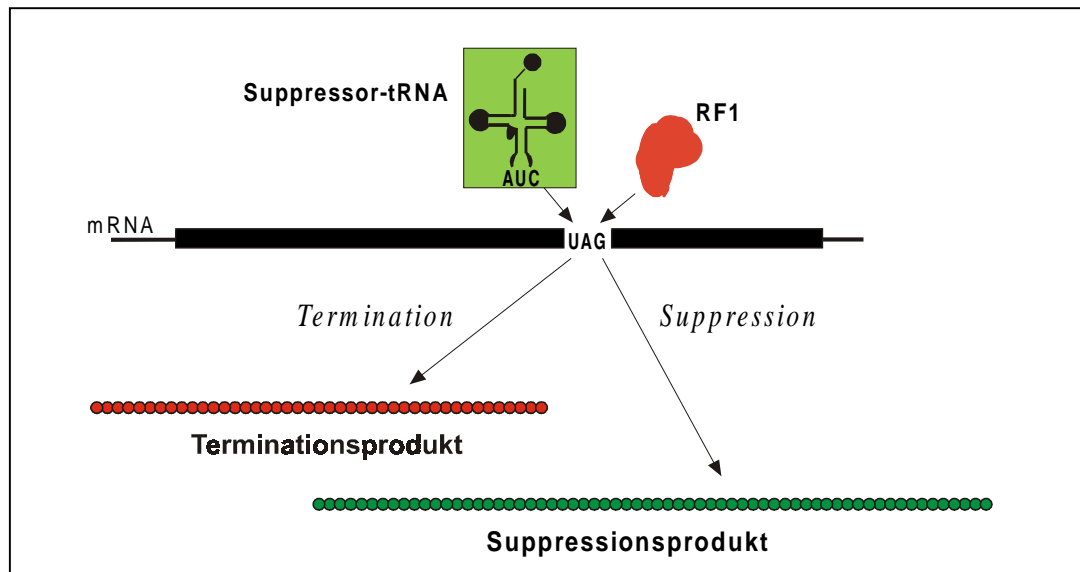
Desulfhydrierung des Cysteinrestes entstandene Alanyl-tRNA^{Cys} war in der Lage, Alanin an der Stelle eines Cysteincodons in ein kurzes Peptid einzubauen. Dieses Experiment zeigte, daß während der Translation die tRNA nur über das Anticodon erkannt wird und daß Änderungen in der Aminosäurebeladung der tRNA zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz der entstehenden Proteine führen. Im Prinzip war mit dieser Entdeckung der Grundstein für eine Synthese veränderter Proteine mit Hilfe biotechnologisch konstruierter tRNA-Moleküle gelegt, bei denen Aminosäurebeladung oder Anticodon verändert sind.

Im Allgemeinen gibt es in *Escherichia coli* oder anderen Organismen keine tRNAs, die die drei für Peptidkettentermination stehenden Codons UAG (*amber*), UAA (*ochre*) oder UGA (*opal*) erkennen können. Diese Codons werden von besonderen Proteinfaktoren, den sogenannten Freisetzungsfaktoren (Release Factor: RF1, RF2, RF3) erkannt. RF1 erkennt UAG und UAA, RF2 UGA und UAA. Beim Erreichen eines Stop-Codons wird in Anwesenheit der entsprechenden Freisetzungsfaktoren die fertige Peptidkette aus dem ribosomalen Komplex entlassen. Dieser Vorgang wird Termination genannt. Nun können aber unter besonderen Umständen durch sogenannte Suppressor-Mutationen tRNAs entstehen, die die für Peptidkettentermination stehenden Codons lesen können (Garen et al. 1965, Gorini und Beckwith 1966). Bestimmte Mutationen in den tRNA-Genen führen zu den tRNA-Anticodons CUA, UUA oder UCA, die normalerweise nicht in tRNAs vorkommen und charakteristisch für Suppressor-tRNAs sind.

Eine tRNA mit dem zu UAG komplementären Anticodon CUA wird als *amber*-Suppressor-tRNA bezeichnet. Die Anwesenheit einer solchen *amber*-Suppressor-tRNA während der

Biosynthese eines Peptids führt dazu, daß das entstehende Peptid nicht an der dem *amber*-Codon UAG entsprechenden Stelle beendet und freigesetzt wird, sondern verlängert werden kann (Abb.2). Das Codon UAG codiert somit in diesem Fall nicht mehr für Peptidkettentermination, sondern für die entsprechende Aminosäure, mit der die *amber*-Suppressor-tRNA beladen ist. Den Vorgang einer solchen Verlängerung nennt man *amber*-Suppression.

Abb. 2



Schema der Suppression:

amber-Suppressor-tRNA und RF1 konkurrieren um die Dekodierung des *amber*-Codons auf der mRNA. Im Falle eines Suppressionsereignisses entsteht ein verlängertes Protein, das Suppressionsprodukt. Die Termination führt zur Entstehung eines kürzeren Peptids.

Innerhalb des Translationssystems konkurrieren *amber*-Suppressor-tRNAs mit RF1 um die Dekodierung des *amber*-Codons auf der mRNA. Die Gegenwart eines mit der Translation konkurrierenden Ereignisses macht sie zu empfindlichen Reportern für die verschiedensten Mechanismen der Proteinbiosynthese, so daß sich seit der Entdeckung von *amber*-Suppressor-tRNAs Anfang der 60er-Jahre eine Vielzahl von Wissenschaftlern mit ihnen befaßt hat. Eine besondere Bedeutung im Rahmen der Biotechnologie bekamen *amber*-Suppressor-tRNAs, als Ende der 80er-Jahre deutlich wurde, daß mit ihrer Hilfe die ortsgerichtete Einführung zusätzlicher in der Natur nicht vorkommender Aminosäuren in Proteine möglich ist. In dieser Zeit wurde ein besonderes, auf der Kombination von chemischen und enzymatischen Methoden beruhendes Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe tRNAs mit speziellen unnatürlichen oder modifizierten Aminosäuren verknüpft werden können. Die Insertion der entsprechenden Aminosäure in ein Protein kann über eine Injektion der beladenen tRNA in eine Zelle oder mit Hilfe der zellfreien Proteinbiosynthese erfolgen, der sogenannten *in vitro* Translation (Rothschild und Gite 1999).

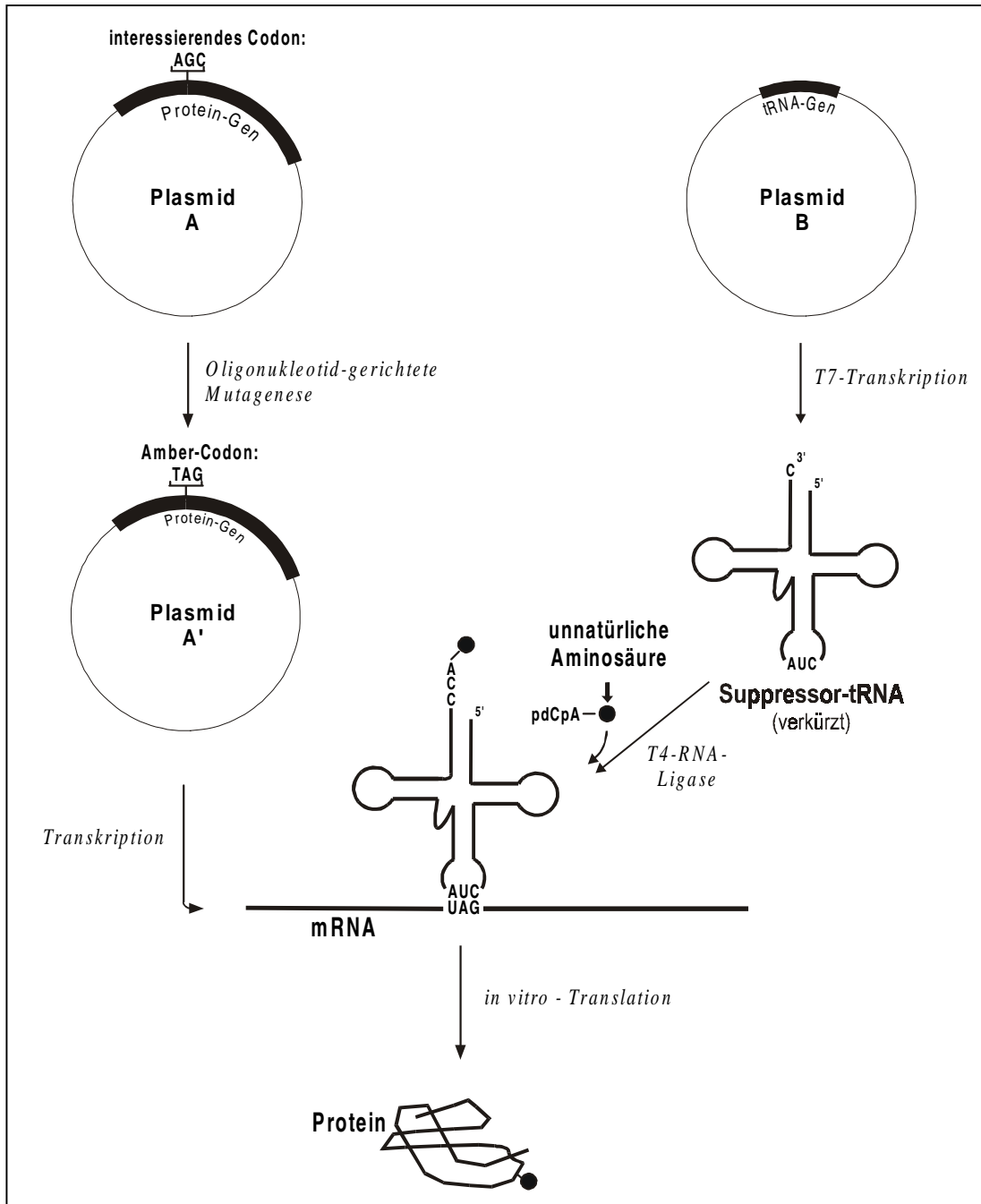
1.1. *in vitro* Translation

Die Proteinbiosynthese ist in ihrer Komplexität eine der faszinierendsten Vorgänge innerhalb der Biochemie überhaupt. Ein wichtiges Werkzeug bei der Aufklärung ihrer Prinzipien sind sogenannte *in vitro* Translationssysteme, in denen eine Synthese von Proteinen außerhalb lebender Zellen möglich ist. Solche zellfreien Systeme werden nach der Fraktionierung des Zellinhaltes durch die gezielte Kombination bestimmter, für die Biosynthese der Proteine benötigter Komponenten hergestellt (Herrlich und Schweiger 1974, Cronenberger und Erdmann 1975, Spirin et al. 1988, Stiege und Erdmann 1995). Anders als lebende Zellen, deren Untersuchung und Manipulation oft durch die Anwesenheit einer Zellwand eingeschränkt werden, können *in vitro* Translationssysteme sehr viel leichter manipuliert werden. So können in ein *in vitro* Translationssystem auch Moleküle gegeben werden, die normalerweise nicht von lebenden Zellen aufgenommen werden. Beispielsweise lassen sich aufgereinigte mRNAs oder tRNAs in das System geben.

Die ersten *in vitro* Translationssysteme wurden schon in den 60er Jahren zur Untersuchung der Grundprinzipien der Proteinbiosynthese verwendet (Nirenberg und Matthaei 1961, Chapeville et al. 1962). Zunächst ausschließlich für analytische Zwecke gedacht, wurde zunehmend das große Potential zellfreier Systeme innerhalb der Biotechnologie deutlich. Die Zahl der möglichen Anwendungen von *in vitro* Translationssystemen steigt mit der in den letzten Jahren zunehmend besser werdenden Effizienz der Systeme. Während die Syntheseraten in zellfreien Systemen noch vor wenigen Jahren relativ niedrig waren (ca. $40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Protein, Spirin et al. 1988, Resto et al. 1992), sind mittlerweile Syntheseraten im Bereich von einem Milligramm Protein in einem Milliliter Reaktion möglich (Yabuki et al. 1998, Stiege 1999 - mündliche Mitteilung). Mit Hilfe von *in vitro* Translationssystemen können Proteine synthetisiert werden, deren Herstellung in lebenden Zellen nicht oder nur sehr schwer möglich ist. Hierzu gehören beispielsweise toxische Proteine oder solche Proteine, die in der lebenden Zelle stark reguliert werden oder instabil sind (Stiege und Erdmann 1995).

Eine herausragende Perspektive der zellfreien Proteinbiosynthese besteht in der Herstellung von Proteinen, die an definierten Positionen bestimmte unnatürliche oder modifizierte Aminosäuren enthalten (Noren et al. 1989, Bain et al. 1991, Ellman et al. 1991, Robertson et al. 1991, Judice et al. 1993, High et al. 1993, Cornish et al. 1994, Cload et al. 1996, Karginov et al. 1997, Steward et al. 1997). Solche Proteine können mit Hilfe biotechnologisch hergestellter ("engineerter") *amber*-Suppressor-tRNA-Moleküle synthetisiert werden, die mit Hilfe spezieller Methoden mit den gewünschten Aminosäuren beladen und in das System gegeben wurden (Abb. 3). Hierbei ermöglicht die Verwendung von *amber*-Suppressor-tRNAs die Nutzung eines Codons für die Einführung der Aminosäure, das für keine der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren steht.

Abb. 3



Das Prinzip der ortsgerechten Mutagenese eines Proteins mit Hilfe einer chemisch aminoacylierten amber-Suppressor-tRNA:

Zur ortsgerechten Mutagenese eines Proteins mit Hilfe einer chemisch aminoacylierten tRNA müssen verschiedene Methoden miteinander kombiniert werden. Innerhalb des Proteingens (auf Plasmid A) muß zunächst das für die entsprechende Aminosäure stehende Codon gegen das *amber*-Codon UAG ausgetauscht werden. Der nächste Schritt besteht in der Bereitstellung einer mit der gewünschten unnatürlichen Aminosäure acylierten tRNA. Da eine direkte Aminoacylierung der *amber*-Suppressor-tRNA mit der gewünschten unnatürlichen Aminosäure nicht möglich ist, bedient man sich zur Aminoacylierung der tRNA einer indirekten zweistufigen Methode, der chemischen Aminoacylierung von tRNA (Noren et al. 1989, Bain et al. 1991, Schulz et al. 1995). Eine *amber*-Suppressor-tRNA, deren 3'-Ende um die beiden terminalen Nucleotide A und C verkürzt ist, wird mit Hilfe der T7-Transkription von einem entsprechenden Plasmid (Plasmid B) transkribiert. Ein Dinucleotid pCpA, das das Ende des Akzeptorarms der tRNA darstellt, wird chemisch synthetisiert, mit einer N^α-geschützten Aminosäure acyliert und dann enzymatisch an die am 3'-Akzeptorstamm verkürzte tRNA gebunden, so daß eine tRNA mit einem aminoacylierten CCA-Ende entsteht.

Die mit der unnatürlichen Aminosäure acylierte tRNA kann nun für die *in vitro* Translation des gewünschten modifizierten Proteins verwendet werden.

1.2. Die Einführung unnatürlicher oder modifizierter Aminosäuren in Proteine

Proteine mit neuen, veränderten oder maßgeschneiderten Eigenschaften lassen sich mit Methoden der DNA-Rekombination konstruieren. Proteinmutanten mit nur einer einzigen veränderten Aminosäure können mit Hilfe der gerichteten ortsspezifischen DNA-Mutagenese leicht hergestellt werden. Für viele Fragestellungen reicht es allerdings nicht aus, eine bestimmte Aminosäure innerhalb eines Proteins gegen eine der zwanzig anderen natürlich vorkommenden Aminosäuren auszutauschen. Untersuchungen, die sich mit der Faltung von Proteinen, ihrer Struktur, mit der Dynamik biochemischer Prozesse oder mit Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anderen Molekülen befassen, lassen sich vielmehr oft nur dann durchführen, wenn fluoreszierende, spinmarkierte oder reaktive Aminosäureseitengruppen mit besonderen chemischen Eigenschaften an genau definierten Positionen innerhalb der Proteine zur Verfügung stehen.

Eine Methode solche besonderen Seitengruppen einzuführen besteht darin, bestimmte reaktive Aminosäurereste innerhalb der Proteine - beispielsweise Cystein oder Lysin - auf chemischem Weg posttranslational zu modifizieren (Eftink 1991; Brunner 1993; Paetzel et al. 1997). In der Regel finden sich allerdings mehrere gleichartige reaktive Aminosäurereste innerhalb des Proteins, die mit den entsprechenden chemischen Methoden dann alle auf einmal verändert werden. Ein Protein mit nur einer einzigen modifizierten Seitengruppe auszustatten, ist über posttranslationale Methoden meist nur dann möglich, wenn das Protein nur eine einzige reaktive Aminosäure enthält.

Eine vielversprechende Alternative zu den erwähnten posttranslational eingeführten Modifikationen reaktiver Aminosäurereste besteht darin, tRNAs als Adapter zwischen gewünschter Aminosäureseitengruppe und fertigem Protein zu nutzen. In der Natur finden sich einige Beispiele für Mechanismen, die modifizierte Aminosäuren auf der Basis prätranslationaler Modifikationen einbauen: Für die Translationsinitiation in den meisten Prokaryoten wird eine spezielle formylierte Initiator-tRNA ($fMet$ -tRNA^{fMet}) benötigt. Diese wird synthetisiert, indem die α -Aminogruppe des an die tRNA^{fMet} gebundenen Methionins durch das Enzym N¹⁰-Formyl-Tetrahydrofolat-Formyltransferase kovalent modifiziert wird (Kahn et al. 1980). Durch einen anderen biologischen Mechanismus wird Selenocystein als 21. Aminosäure ortsspezifisch in Selenoproteine eingeführt (Zinoni et al. 1986, Leinfelder et al. 1988). Hierbei wird der Serinrest einer speziellen mit Serin beladenen Suppressor-tRNA (tRNA^{Sec}) zu Selenocystein modifiziert (Leinfelder et al. 1989). Sec-tRNA^{Sec} erkennt ein *opal*-Codon, das normalerweise für Kettentermination steht. In den beiden genannten Fällen liegen die entsprechenden Codons in einem besonderen Kontext innerhalb der mRNA. fMet wird nur in Startcodons (in der Nähe der Shine-Dalgarno-Region) eingebaut, während im Falle von Selenocystein eine besondere Sequenz innerhalb der mRNA, das sogenannte SECIS-Element (selenocystein inserting sequence), für die Unterscheidung zwischen Elongation und Termination sorgt (Zinoni et al.

1990). In beiden Fällen wird die entsprechende tRNA zunächst mit einer der zwanzig natürlich vorkommenden, aktivierbaren Aminosäuren beladen und erst dannach die Aminosäureseitengruppe der Aminoacyl-tRNA modifiziert.

Innerhalb der Biotechnologie wurde eine ähnliche Strategie im Prinzip schon 1962 mit der reduktiven Desulphydrierung des Cysteinrestes einer Cysteinyl-tRNA^{Cys} mit Raney Nickel erfolgreich umgesetzt. Die durch die Desulphydrierung des Cysteinrestes entstehende Alanyl-tRNA^{Cys} war in der Lage, Alanin an der Stelle eines Cysteinocodons in ein kurzes Peptid einzubauen (Chapeville et al. 1962). Mit diesem Experiment konnte die Adapterhypothese von Crick zum ersten Mal bestätigt werden. Ein weiteres Beispiel ist der Einbau von Biotin in Proteine durch eine an der ϵ -Aminogruppe biotinierte Lysyl-tRNA^{Lys} (Kurzchalia et al. 1988). In beiden Fällen wird die modifizierte Aminosäure an mehreren Stellen des Proteins eingebaut, wenn mehrere gleichartige Codons in der mRNA vorkommen. Daneben führt die Reacylierung der tRNAs durch die innerhalb des Expressionssystems vorhandenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zu einer Konkurrenz natürlicher Aminosäuren mit den gewünschten modifizierten Aminosäuren um die Insertionsstelle innerhalb des Proteins.

Eine Alternative zu den oben beschriebenen Methoden besteht in der chemischen Aminoacylierung von *amber*-Suppressor-tRNAs. Diese Methode wurde vor ca. 10 Jahren unabhängig voneinander von den Gruppen um Hecht und um Schultz entwickelt. Die Einführung unnatürlicher oder modifizierter Aminosäuren in Proteine mit Hilfe der *in vitro* Translation wurde letztendlich durch zwei parallel stattfindende Entwicklungen innerhalb der Biochemie möglich:

- Ende der 80er Jahre wurde von den Gruppen um Hecht und um Schultz ein relativ aufwendiges chemisches Verfahren entwickelt, mit dem eine Aminoacylierung von tRNAs mit unnatürlichen oder modifizierten Aminosäuren möglich wurde, die chemische Aminoacylierung von tRNAs (Payne et al. 1987, Noren et al. 1989, Bain et al. 1991, Ellman et al. 1991). Mit der chemischen Aminoacylierung von *in vitro* transkribierten *amber*-Suppressor-tRNAs war zum ersten Mal eine Aminoacylierung solcher tRNAs möglich, die nicht durch die natürlich vorkommenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erkannt werden können. Erst durch die Verwendung solcher nicht enzymatisch aminoacylierbarer tRNAs wurde es möglich, eine Konkurrenz natürlicher Aminosäuren mit den gewünschten Aminosäuren um die Insertionsstelle innerhalb des Proteins auszuschließen.
- Durch die Verwendung von Phagen-RNA-Polymerasen wurde es Mitte der 80er Jahre möglich, ausgehend von klonierter DNA nahezu jede beliebige RNA-Sequenz herzustellen (Melton et al. 1984, Schenborn und Mierendorf 1985). Zur *in vitro* Transkription werden RNA-Polymerasen verwendet, die durch die Bakteriophagen SP6 (aus *Salmonella typhimurium*) oder T3 und T7 (aus *Escherichia coli*) kodiert werden. Mit der T7-

Transkription von tRNAs steht heute eine hocheffiziente Methode zur Verfügung, mit der die riesigen Mengen an verkürzten tRNAs, die für die chemische Aminoacylierung benötigt werden, hergestellt werden können (Milligan et al. 1987, Sampson und Uhlenbeck 1988, Samuelsson et al. 1988).

Die Möglichkeit, mit Hilfe chemisch aminoacylierter *amber*-Suppressor-tRNAs Proteinvarianten herzustellen, die ortsspezifisch eingebaute modifizierte oder unnatürliche Aminosäuren enthalten, ohne daß natürlich vorkommenden Aminosäuren mit den gewünschten Aminosäuren um die Insertionsstelle konkurrieren, ist in der Literatur gut dokumentiert (z. B.: Robertson et al. 1991, Judice et al. 1993, High et al. 1993, Cornish et al. 1994, Cload et al. 1996, Karginov et al. 1997, Steward et al. 1997).

Judice et al. (1993) substituierten beispielsweise Aminosäuren im aktiven Zentrum von Staphylokokken-Nuklease mit verschiedenen unnatürliche Aminosäuren und untersuchten die enzymatische Aktivität der veränderten Proteine. High et al. (1993) führten eine photoaktivierbare Gruppe in die Signalsequenz von Präprolaktin ein, um die Interaktion von N-terminalen, zentralen und C-terminalen Bereichen der Signalsequenz mit Proteinen des endoplasmatischen Retikulums zu untersuchen. Nach der *in vitro*-Translation des Proteins in Weizenkeim-Extrakten wurden ER-Membranen in Form von Mikrosomen zugegeben und photochemisch mit den translatierten Proteinen vernetzt. Die Vernetzung wurde gelelektrophoretisch nachgewiesen.

Für die ortsspezifische Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine mit Hilfe chemisch aminoacylierter *in vitro* transkribierter tRNAs stehen in der Literatur mehrere *amber*-Suppressor-tRNAs zur Verfügung: tRNA^{Phe}_{CUA} aus *S. cerevisiae* ((tPheY) Noren et al. 1989), tRNA^{Gly}_{CUA} aus *E. coli* (Bain et al. 1991) und tRNA^{Ala^{C70}}_{CUA} aus *E. coli* ((tAla^{C70}) Karginov et al. 1997). tRNA^{Phe}_{CUA} aus *S. cerevisiae* wurde ursprünglich von den meisten Autoren favorisiert. Zur Zeit ist die beste zur Verfügung stehende tRNA für diesen Zweck anscheinend die nicht aminoacylierbare Alanyl-Suppressor-tRNA-Mutante aus Karginov et al. (1997). Unglücklicherweise sind die Mengen an veränderten Proteinen, die mit der Methode "Einführung von unnatürlichen oder modifizierten Aminosäuren mit Hilfe chemisch aminoacylierter *amber*-Suppressor-tRNAs" hergestellt werden können, äußerst gering. Während für Untersuchungen, die auf enzymatischen oder gelelektrophoretischen Nachweismethoden basieren, im Prinzip schon Nanogramm-Mengen an Protein ausreichend sind, verlangen andere Fragestellungen, beispielsweise Strukturuntersuchungen an isotope markierten Proteinen oder der Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Proteins in der Biosensorik, wesentlich größere (Milligramm-) Mengen an Protein. Interpretiert man die in der Literatur vorhandenen Erfolgsmeldungen (z.B.: Judice et al. 1993, High et al. 1993, Turcatti et al. 1996), muß man davon ausgehen, daß in der Regel nur wenige Mikrogramm

(eher Nanogramm) Protein synthetisiert wurden. Es war zu Beginn dieser Arbeit äußerst unklar, worauf die deprimierenden Ausbeuten an veränderten Proteinen zurückzuführen sind.

Ein Weg, die Ausbeuten veränderter Proteine zu erhöhen, ist die Suche nach *amber*-Suppressoren mit höherer Effizienz. In der Literatur gibt es eine Vielzahl von *in vivo* Untersuchungen zur Suppressionaktivität unterschiedlichster *amber*-Suppressor-tRNAs. (Bossi und Roth 1980, Miller und Albertini 1983, Normanly et al. 1986, Kleina et al. 1990, Ericson und Björk 1991, Pedersen und Curran 1991). Mittlerweile wurden mehr als 20 verschiedene natürlich vorkommende und gentechnisch konstruierte *amber*-Suppressor-tRNAs *in vivo* charakterisiert. Einige der *in vivo* untersuchten tRNAs sind hervorragende *amber*-Suppressoren, während andere relativ niedrige Aktivitäten aufweisen.

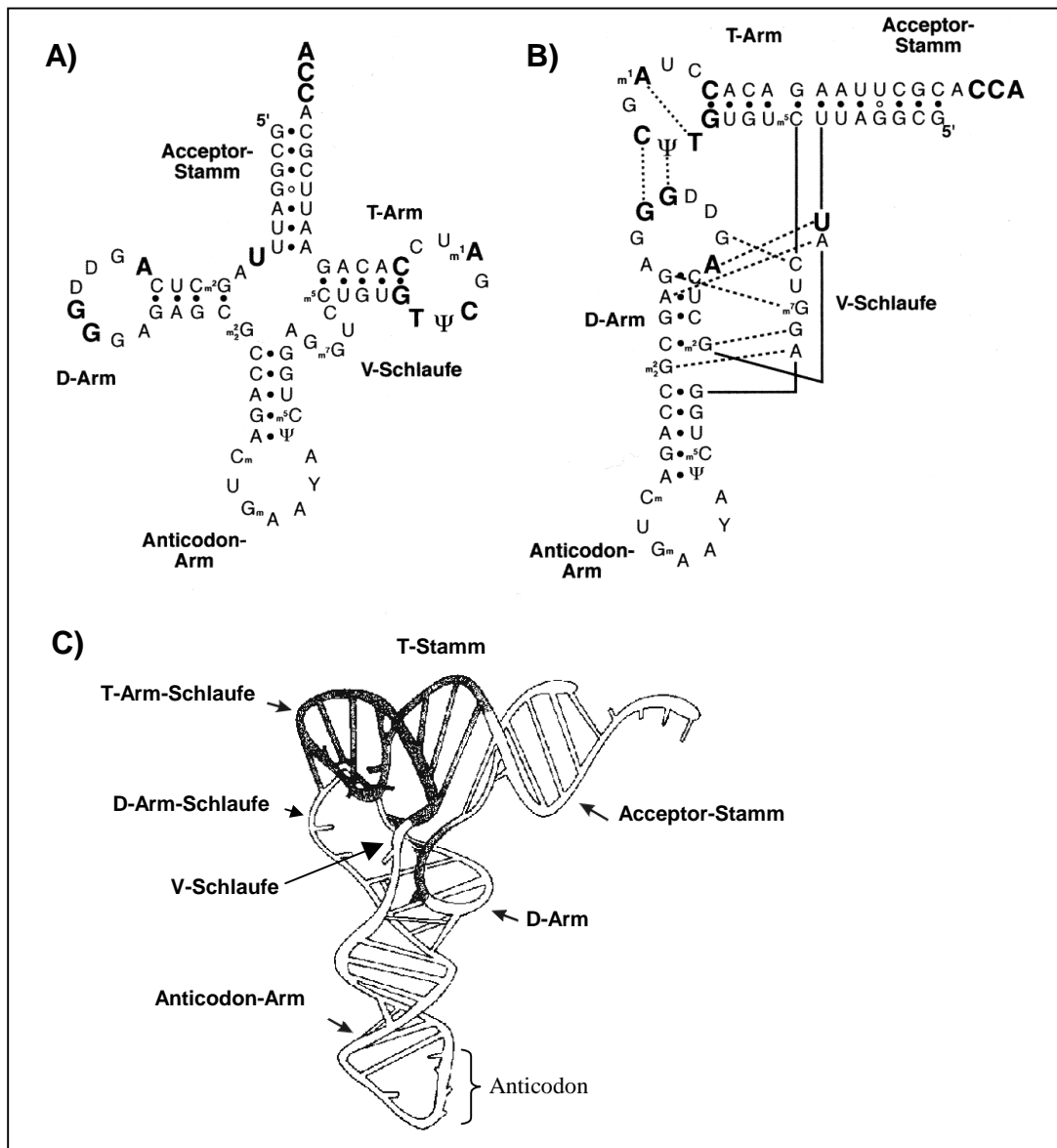
Einen Anhaltspunkt für die Suppressionseffizienz der in der Literatur für die chemische Aminoacylierung verwendeten *amber*-Suppressor-tRNAs bietet eine Untersuchung der Gruppe Miller (Kleina et al. 1990). In dieser Studie wurden über 20 verschiedene *amber*-Suppressor-tRNAs mit einander verglichen. Mit Hilfe Plasmid codierter tRNAs wurden in dieser Studie neue Zellstämme konstruiert, in denen die *amber*-Suppressor-tRNA-Gene unter der Kontrolle der Promotor-Sequenz des Lipoprotein-Gens aus *Escherichia coli* stehen. Unter den neu konstruierten *amber*-Suppressor-tRNAs war auch tRNA^{Ala}_{CUA}. tRNA^{Ala}_{CUA} unterscheidet sich von der von Karginov et al. (1997) für die Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine favorisierten tRNA nur durch eine einzige veränderte Base innerhalb des Akzeptorarms und reflektiert somit höchstwahrscheinlich deren Suppressionseffizienz. In der *in vivo*-Studie von Kleina et al. besaß tRNA^{Ala}_{CUA} eine nur mittlere Aktivität. Somit könnte man aus der *in vivo*-Studie von Kleina et al. ableiten, daß die zur Zeit für die Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine *in vitro* verwendeten tRNAs relativ schlechte Suppressoren sind. Eine entscheidende Frage in diesem Zusammenhang ist es, ob Daten zur Suppression *in vivo* ohne weiteres auf die Verhältnisse *in vitro* übertragen werden können.

Bis zur Erstellung der vorliegenden Arbeit lagen in Kontrast zu dem umfangreichen Wissen über die Suppression *in vivo* nur sehr wenige Daten zur Suppression *in vitro* vor. Die vorliegende Arbeit ist die erste vergleichende Studie zur Suppressionseffizienz verschiedener *in vitro* transkribierter tRNAs in der *in vitro* Translation. Sie wurde mit dem Ziel verfaßt, in der Arbeitsgruppe die mit der Nutzung von *amber*-Suppressor-tRNAs für die Proteinsynthese *in vitro* verbundenen Methoden zu etablieren, die augenblicklichen Limitationen der Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine zu erkennen und Wege für die Verbesserung der entsprechenden Methoden zu erschließen.

1.3. Struktur und Funktion der tRNA

tRNAs sind multifunktionale Moleküle, die im Laufe ihres Daseins an verschiedenen Prozessen innerhalb der Zelle teilnehmen (vgl. Abb.5, S.12). Die Teilnahme der tRNAs an gemeinsamen, grundlegenden Reaktionen (beispielsweise Prozessierung, Modifikation und

Abb. 4



Die Struktur der tRNA:

Die verschiedenen Strukturebenen der tRNA sind am Beispiel einer typischen tRNA vom Typ I (tRNA^{Phe} aus Hefe) dargestellt: **(A)** Nukleotidsequenz, Modifikationen und Sekundärstruktur der tRNA^{Phe} in der klassischen Kleeblattstruktur-Darstellung. Watson-Crick-Basenpaare sind durch gefüllte Kreise, das G-U-Wobble-Basenpaar ist durch einen offenen Kreis symbolisiert. Nukleotide, die in allen tRNAs konserviert sind, sind durch Fettdruck hervorgehoben. Ψ: Pseudouracil, D: Dihydrouridin. V-Schleife: variable Schleife (Extra-Arm). Die Sekundärstruktur der tRNA kann in drei Haarnadelschleifen, den D-, den T- und den Anticodon-Arm, und den Acceptor-Stamm aufgegliedert werden. **(B)** Die tertiären Wechselwirkungen der tRNA^{Phe} in einer modifizierten Darstellung der Sekundärstruktur, die die dreidimensionale Struktur widerspiegelt. Tertiäre Wechselwirkungen zwischen den Basen sind durch gestrichelte Linien symbolisiert. **(C)** Klassische Darstellung der Tertiärstruktur von tRNA^{Phe} in der aus der Kristallstruktur der tRNA (PDB-Hinterlegungsnummer: 6TNA) abgeleiteten L-Form. (A und B sind aus Batey et al. (1999) entnommen, C aus Knippers)

Translation) äußert sich im Vorhandensein einer größeren Zahl konservierter Nukleotide innerhalb der tRNAs (Abb.4, S.10). Diese konservierten Nukleotide (in Abb.4, A und B durch Fettdruck gekennzeichnet) gehören alle einer von zwei unterschiedlichen Gruppen an: Die erste Gruppe besteht in den Nukleotiden mit biologischer Funktion, wie die Folge CCA am 3'-Ende des Aminoacyl-Acceptorarms, die für Aminoacylierung und Erkennung der Aminoacyl-tRNA durch EF-Tu entscheidend ist. Die zweite Gruppe umfaßt Nukleotide, die für den Aufbau der Gesamtstruktur von Bedeutung sind, beispielsweise die konservierten Nukleotide in der D und der T-Schleife. Beim Aufbau der Gesamtfaltung des tRNA-Moleküls spielen tertiäre Wechselwirkungen eine maßgebliche Rolle (B und C). Die konservierten Nukleotide, die hauptsächlich an diesen tertiären Wechselwirkungen beteiligt sind, sind in einem tRNA-Bereich konzentriert, der für die Bildung der Gesamtstruktur verantwortlich ist, der sogenannten Core-Region. In der dreidimensionalen Struktur der tRNA sind die Stämme des D- und des Anticodon-Arms ebenso coaxial aufeinander gestapelt wie die Stämme des T- und des Aminoacylacceptor-Arms. Die beiden coaxialen Stapel sind durch tertiäre Wechselwirkungen zwischen den Schleifen des D- und des T-Arms senkrecht zueinander orientiert, wodurch die L-Form des Gesamtmoleküls entsteht. Die L-Form der tRNA wird durch weitere Wechselwirkungen stabilisiert.

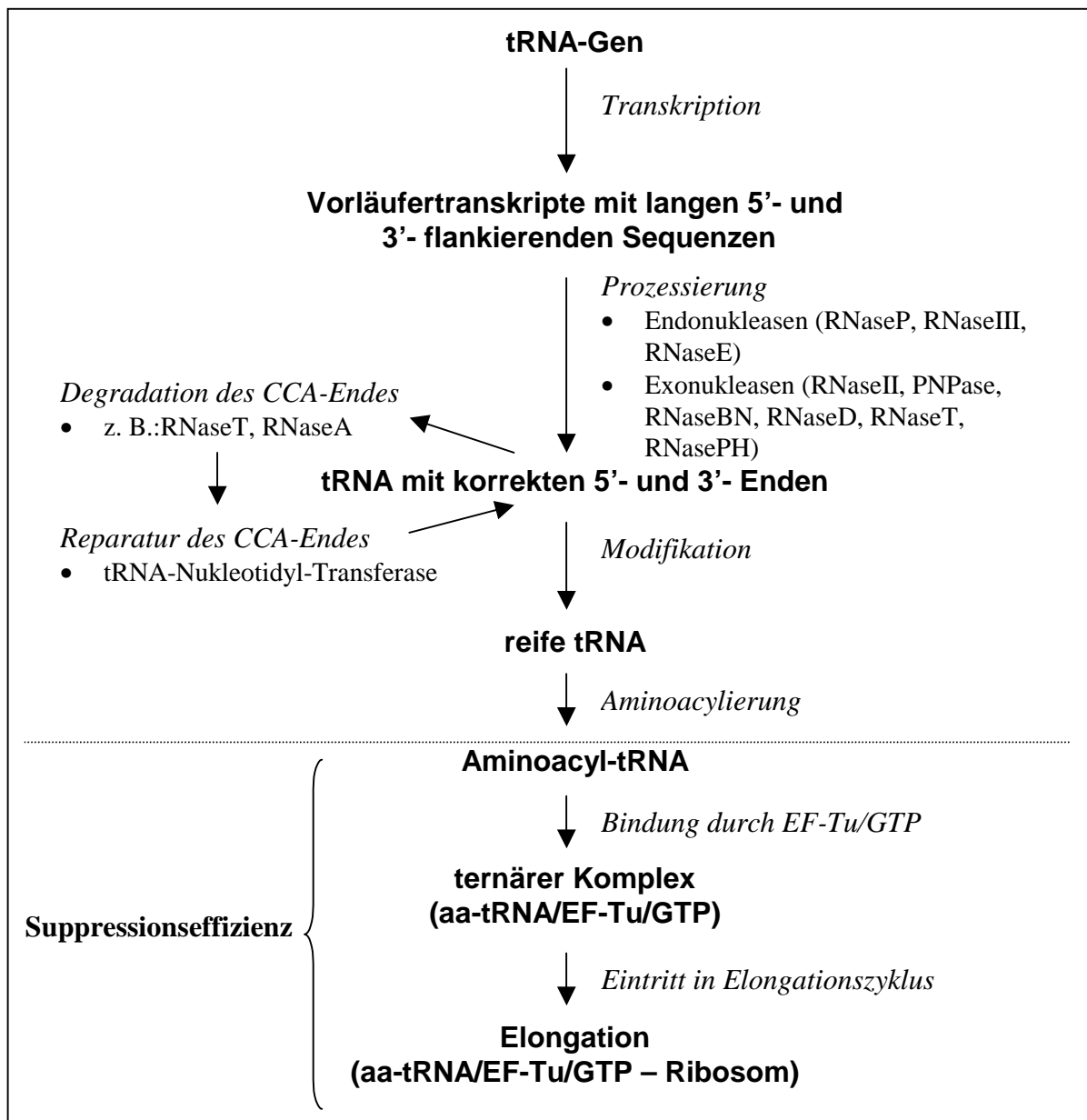
1.3.1. Vom tRNA-Gen zur Aminoacyl-tRNA - Die Biogenese der tRNA im Überblick

Die Synthese funktionaler tRNA-Moleküle *in vivo* ist ein komplexer Prozeß, an dem viele Enzyme beteiligt sind. Die verschiedenen Schritte der Biogenese der tRNA (Abb.5, S12) haben letztendlich ein Ziel, den Einbau einer bestimmten Aminosäure in die wachsende Polypeptidkette.

Während ihrer Biosynthese in *Escherichia coli* werden alle tRNA-Moleküle von größeren zusammenhängenden Geneinheiten transkribiert. Hierbei liegen 26% der tRNA-Gene in rRNA-Operons, 42% in multicystronischen Operons, die ausschließlich tRNA-Gene enthalten, 19% liegen in monocystronischen Operons und 13 % kommen in Operons vor, die sowohl Protein codierende Gene als auch tRNA-Gene enthalten (King et al. 1986).

Die Primär-Transkripte dieser Geneinheiten enthalten an den 5'- und 3'-Enden der tRNAs längere Nukleotidfolgen, die nicht zu den tRNAs gehören. Damit funktionale tRNA-Moleküle entstehen können, müssen diese Sequenzen durch Ribonukleasen entfernt werden. Die Entfernung der 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen von tRNA-Vorläufer-Molekülen verlangt ein ausgeklügeltes Zusammenspiel verschiedenster Endo- und Exonukleasen. Das 5'-Ende aller reifen tRNAs wird endonukleolytisch durch RNaseP erzeugt (Robertson et al. 1972, Schedl und Primakoff 1973, Altman 1981, Hardt et al. 1993, Frank und Pace 1998). Im Gegensatz zur Reifung des 5'-Endes der tRNA, die mit RNaseP nur ein einziges Enzym benötigt, ist die Entstehung des reifen CCA-Endes wesentlich komplexer. Die Prozessierung

Abb. 5



Vom tRNA-Gen zur Translation:

Die Synthese funktionaler tRNA-Moleküle *in vivo* ist ein komplexer Prozeß, an dem viele Enzyme beteiligt sind. Die Abbildung zeigt die verschiedenen Schritte, die – angefangen mit der Transkription der tRNAs - zur Bildung der Aminoacyl-tRNA und letztendlich während der Translation (Elongation) zum Einbau einer bestimmten Aminosäure in die wachsende Polypeptidkette führen.

des 3'-Endes von tRNAs wird eingeleitet durch einen endonukleolytischen Schnitt, wodurch die 3'-flankierende Sequenz auf einige wenige Nukleotide verkürzt wird (Bikoff et al. 1975, Bikoff und Gefter 1975, Li und Deutscher 1994). Diese Nukleotide werden dann durch Exonukleasen bis zur Entstehung des reifen 3'-CCA-Endes entfernt. Bisher sind sechs Exonukleasen bekannt, die Nukleotide am 3'-Ende von tRNA-Vorläufern entfernen können (Reuven und Deutscher 1993): RNaseD, RNaseBN, RNaseT, RNasePH, RNaseII und PNPase. Die Spezifitäten dieser Exonukleasen überlappen, so daß Zellen auch lebensfähig

sind, wenn ihnen eine oder mehrere dieser Exonukleasen fehlen (Cudny und Deutscher 1988, Li und Deutscher 1996). Verschiedene Exonukleasen besitzen unterschiedliche Spezifitäten sowohl für verschieden lange 3'-flankierende Sequenzen als auch für verschiedene tRNA-Spezies (Li und Deutscher 1994/1996).

Wie das 3'-Ende von tRNAs werden auch die 3'-Enden der anderen in *Escherichia coli* vorkommenden kleinen, stabilen RNAs durch Exonukleasen auf die richtige Länge gebracht. Die Prozessierung der kleinen RNAs in *Escherichia coli* (tRNAs, 5S RNA, M1 RNA, 10Sa RNA, 6S RNA oder 4,5S RNA) gehorcht wahrscheinlich einem allgemeinen, strukturabhängigen Muster. Alle diese kleinen, stabilen RNAs besitzen in der reifen Form Strukturmerkmale, die sie zu schlechten Substraten für RNA-abbauende Enzyme machen (Li et al. 1998). 5'- und 3'-Ende bilden in der Regel eine helikale Struktur mit einem zwei bis vier Nukleotide langen, einzelsträngigen 3'-Überhang. Diese 3'-Überhänge entstehen, ähnlich wie bei der oben beschriebenen Reifung der tRNAs, durch die Prozessierung längerer 3'-flankierender Sequenzen mit verschiedenen Exonukleasen. Der Abbau des 3'-Endes kommt zum Erliegen, wenn eine bestimmte Länge des Überhanges erreicht ist. Die Überhänge selbst sind sehr schlechte Substrate für RNA abbauende Exonukleasen, so daß die Enden sehr langlebig sind. Gut untersucht ist in diesem Zusammenhang neben der Reifung des CCA-Endes von tRNAs auch die Reifung der 5S RNA, bei der RNaseT eine essentielle Rolle spielt (Li und Deutscher 1995).

Auch wenn tRNAs sehr schlechte Substrate für die meisten der RNA-degradierenden Enzyme sind, so können die 3'-endständigen Reste AMP und CMP der tRNA doch durch Exonukleasen angegriffen werden. Die größte Gefahr hierbei scheint von RNaseT auszugehen (Deutscher et al. 1985). In *Escherichia coli* existiert ein Reparaturmechanismus für solche CCA-Enden, die durch den Angriff von Exonukleasen abgebaut worden sind. Das Enzym ATP(CTP):tRNA-Nukleotidyl-Transferase 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, Reuven und Deutscher 1993, Reuven et al. 1997). Zu einem äußerst geringen Teil kann die Funktion von tRNA-Nukleotidyl-Transferase möglicherweise durch die Enzyme Poly(A)-Polymerase I und Polynukleotid Phosphorylase (PNPase) ersetzt werden (Reuven et al. 1997). Während in *Escherichia coli* das Enzym tRNA-Nukleotidyl-Transferase Teil des Reparaturmechanismus für verkürzte tRNAs ist, stellt die Regeneration des CCA-Endes in vielen Organismen (Eukaryonten, einige Archaeobakterien und mehrere Eubakterien), in denen das CCA-Ende nicht codiert ist, einen essentiellen Schritt während der Biosynthese der tRNAs dar (z.B.: Cheng et al. 1997, Reichert et al. 1998).

Prozessierung und Reparatur der tRNA-Enden münden in die Aminoacylierung der tRNA. Die korrekte Aminoacylierung der tRNA mit der richtigen Aminosäure durch eine der 20

verschiedenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ist für die Genauigkeit der Proteinbiosynthese essentiell. Hierbei müssen die Synthetasen zwischen den strukturell sehr ähnlichen tRNA-Molekülen die richtige tRNA auswählen. Um dies möglich zu machen, enthält jede tRNA-Spezies spezifische Elemente, die zur Erkennung und Diskriminierung der tRNA durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen führen. In der Regel wird die korrekte Beladung durch bestimmte Basen innerhalb der tRNA-Sequenz gewährleistet, die durch die entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erkannt werden. Basen, die zur Erkennung und Diskriminierung der tRNA beitragen, können in jedem Bereich der tRNA (Akzeptorarm, D-Arm, TΨC-Arm, Anticodon-Arm oder Extra-Arm) liegen. Ein prominentes Beispiel ist die Erkennung der Alanyl-tRNAs. Hier ist die Aminoacylierung durch Alanyl-tRNA-Synthetase abhängig von der Anwesenheit des Basenpaares G₃-U₇₀ innerhalb des Akzeptorarms der tRNA (Hou und Schimmel 1988). Der Austausch von U70 gegen C hat eine Abschaltung der Aminoacylierung der tRNA zur Folge (Park et al. 1989). Andererseits führt die Einführung des Merkmals in andere tRNA-Spezies zu einer Fehlbeladung dieser tRNAs mit Alanin (Hou und Schimmel 1988). Sehr oft jedoch sind Basen innerhalb des Anticodons essentiell für die Erkennung der tRNA durch die entsprechende Synthetase (Rould und Steitz 1991, Peterson und Uhlenbeck 1992, Komatsoulis und Abelson 1993, Cusack et al. 1996). Durch den Austausch des Wildtyp-Anticodons der tRNA gegen CUA kann die Rate der Aminoacylierung einiger tRNAs drastisch verringert werden (Hou 1997). Gleichzeitig führt die Anwesenheit des Anticodons CUA bei vielen tRNAs zu einer Änderung der Aminosäurespezifität (Normanly et al. 1990, Martin et al. 1996). Auch die sogenannte dem CCA-Ende der tRNA direkt benachbarte Diskriminatorbase N73 ist oft ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal (Hou 1997).

1.3.1.1. Die Rolle der Modifikation in tRNAs

Da viele biologisch aktive tRNAs posttranskriptional modifiziert werden, spiegelt die DNA-Sequenz oft nicht die tatsächliche Primärstruktur wider. *In vivo* sind bis zu 20 Prozent der Nukleoside in tRNAs modifiziert (Holley et al 1965, Goodman et al 1968, Björk 1995). Die Modifikation einzelner Nukleoside in tRNAs stellt einen wichtigen Vorgang während der tRNA-Reifung *in vivo* dar. Der Reifungsschritt Modifikation steht in Abbildung 5 zwar zwischen den Vorgängen Prozessierung und Aminoacylierung, tRNAs können aber möglicherweise auch an anderen Stellen während der tRNA-Reifung modifiziert werden, beispielsweise auf der Ebene der Primärtranskripte oder erst nach der Aminoacylierung. Besonders im Hinblick auf die Verwendung *in vitro* transkribierter tRNAs in der vorliegenden Arbeit darf die Anwesenheit modifizierter Nukleotide in allen natürlich vorkommenden tRNA-Molekülen nicht unerwähnt bleiben.

Das Fehlen von Modifikationen in tRNAs wirkt sich je nach tRNA-Spezies unterschiedlich aus. Viele Vorgänge innerhalb der Proteinbiosynthese, beispielsweise die Bildung des

ternären Komplexes oder die Elongation, funktionieren im Wesentlichen auch mit unmodifizierten tRNAs (Sammuellson et al. 1988, Noren et al. 1989, Kudlicki et al. 1993, Arnez und Steitz 1994, Takai et al. 1996). Effizienz und Genauigkeit einiger tRNAs während der Elongation oder in der Aminoacylierung werden jedoch durch das Vorhandensein von Modifikationen beeinflusst. Einige Reaktionen innerhalb der Proteinbiosynthese finden mit unmodifizierten tRNAs sogar erst gar nicht statt.

Die Bedeutung von Modifikationen in tRNAs für die Translation wurde zum ersten Mal anhand des *amber*-Suppressors su^+_3 (tTyr), gezeigt (Gefer und Russell 1969). Diese tRNA kann in *Escherichia coli*-Zellen, die mit dem Phagen $\Phi 80psu^+_3$ infiziert wurden, überexprimiert werden. Nach Aufarbeitung der überexprimierten tRNAs über Reverse-Phase-Chromatographie zeigten sich drei verschiedene Tyrosyl-tRNA-Peaks. Den verschiedenen Fraktionen konnten nach Hydrolyse der tRNAs und Auftrennung der Nukleotide mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie drei in unmittelbarer Nähe des Anticodons verschieden stark modifizierte tTyr-Formen zugeordnet werden. Die Fähigkeit der verschiedenen tTyr-Formen, ein *amber*-Codon im Hüllprotein des Phagen f2 (*sus4A*) zu dekodieren, wurde in einem *in vitro*-Translationssystem untersucht. Hierbei zeigten tRNAs, die eine Modifikation innerhalb des Anticodon-Armes enthielten, eine verbesserte Suppression.

Position 37 unmittelbar 3' des Anticodons ist in 78% aller *in vivo* exprimierten tRNA-Spezies modifiziert (Björk 1995). Dies betrifft alle häufigen tRNAs mit Ausnahme der $tRNA^{fMet}$, die Codons lesen, die mit einem A oder U beginnen. In *amber*-Suppressor-tRNAs konnten die Modifikationen i^6A_{37} , $ms^2i^6A_{37}$ oder $ms^2io^6A_{37}$ nachgewiesen werden. An der Entstehung der Modifikation sind mindestens vier Enzyme beteiligt, die Produkte der Gene *miaA* (EC 2.5.1.8: Isopentenyl-tRNA:A37-Transferase), *miaB*, *miaC* und *miaD* sind. Donoren für die Synthese sind Isopentenyl-Pyro-Phosphat, Cystein, S-Adenosylmethionin bzw. S-adenosylhomocystein (Björk 1995, Leung et al. 1997). Für die Erkennung der tRNA durch Isopentenyl-tRNA:A37-Transferase, die zur Formierung von i^6A_{37} führt, ist die Anwesenheit der Sequenz $A_{36}A_{37}A_{38}$ innerhalb der Anticodon-Schleife entscheidend (Yarus et al. 1986, Motorin et al. 1997). Zusätzlich wurde eine Abhängigkeit des Enzyms von Nukleotiden innerhalb der Anticodon-Helix nachgewiesen (Motorin et al. 1997). Hierbei kann die Aktivität des Enzyms durch ein GU-Basenpaar am Ende der Helix oder die Folge mehrerer CG-Basenpaare entscheidend verringert werden. Man nimmt an, daß für eine optimale Funktion des Enzyms der Anticodon-Arm eine normale helikale Struktur ausbilden muß. Die Funktion der Modifikation $ms^2i^6A_{37}$ ist ausgiebig *in vivo* und *in vitro* studiert worden. Es wird angenommen, daß die Modifikation die Basenstapelung zwischen dem 3' vom Anticodon liegenden Nukleotid und dem Komplex aus Codon und Anticodon verbessert. (Ericson und Björk 1991, Pederson und Curran 1991). Hierdurch werden Interaktionen zwischen mRNA-Codon und tRNA-Anticodon stabilisiert.

Auch Faltung und Struktur von tRNAs können durch Modifikationen beeinflusst werden. Das Fehlen von Modifikationen kann sich in einer erhöhten Abhängigkeit der biologischen Aktivität der tRNAs von der Konzentration an zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} auswirken (Sampson und Uhlenbeck 1988, Harrington et al. 1993, Yue et al. 1994, Madore et al. 1999). Einige tRNAs bilden in der unmodifizierten Form Sekundärstrukturen aus, die stark von der normalen Kleeblattstruktur abweichen und zu biologisch inaktiven tRNA-Molekülen führen (Derrick und Horwitz 1993, Helm et al. 1998/1999). Seltener ist eine Beeinflussung der Aminoacylierung durch Modifikationen. Bei einigen tRNAs jedoch können Modifikationen innerhalb des Anticodons essentiell für die Aminoacylierung sein. So ist die Aminoacylierung von $tRNA^{Lys}_{UUU}$ abhängig von der Modifikation $mnm^5s^2U_{34}$ in der ersten Anticodon-Position der tRNA (Tamura et al. 1992). Die unmodifizierte tRNA wird äußerst schlecht aminoacyliert. Die Methylgruppe in m^1G_{37} von $tRNA^{Arg}_{UCU}$ scheint wichtig zu sein für die Diskriminierung der tRNA gegen $tRNA^{Asp}$ durch Arginyl-tRNA-Synthetase (Pütz et al. 1994). Ein weiteres Beispiel ist die Aminoacylierung einer Isoleucyl-tRNA-Spezies ($tRNA^{Ile2}$) aus *Escherichia coli* (Muramatsu et al. 1988). Diese tRNA enthält an Position 34 Lysisidin. Dies erwies sich als essentiell für die Erkennung der tRNA durch Isoleucyl-tRNA-Synthetase und für die Diskriminierung der tRNA durch Methionyl-tRNA-Synthetase.

1.4. Die tRNA im Kontext der Translation

Die Suppressionseffizienz einer tRNA ist ein Maß für die Fähigkeit der *aminoacylierten* tRNA, in den Elongationszyklus einzutreten. Sie entspricht somit einer spezifischen Aktivität der jeweiligen Aminoacyl-tRNA. Besonders im Zusammenhang mit dem Einsatz von chemisch aminoacylierten *amber*-Suppressor-tRNAs sind die Vorgänge innerhalb der Proteinbiosynthese interessant, die auf der Ebene der aminoacylierten tRNA stattfinden. Diese Vorgänge bestehen in der Bildung des ternären Komplexes aus Aminoacyl-tRNA und EF-Tu*GTP und der nachfolgenden Elongation am Ribosom während der Translation.

1.4.1. Der ternäre Komplex – Aminoacyl-tRNA*EF-Tu*GTP

Alle aminoacylierten tRNAs mit Ausnahme der Initiator-tRNA $Met-tRNA^{fMet}$ und der für Selenocystein spezifischen $Sec-tRNA^{Sec}$ treten in einem ternären Komplex in die Elongation ein, der aus Aminoacyl-tRNA und EF-Tu*GTP besteht, (Allende et al. 1964, Baron und Böck 1991, Nissen et al. 1995/ 1996/ 1999). Mittlerweile konnte die dreidimensionale Struktur des ternären Komplexes aus Aminoacyl-tRNA und EF-Tu*GTP gelöst werden (Nissen et al. 1995/1999). Die Bindung der aminoacylierten tRNA durch EF-Tu*GTP beruht auf der Erkennung von Strukturelementen, die in allen Elongator-tRNAs konserviert sind. Diese durch EF-Tu*GTP erkannten Elemente liegen ausschließlich in Akzeptor-Arm und T-

Arm der tRNAs (Nissen et al. 1996). Erstaunlich ist die Fähigkeit des Elongationsfaktors zwischen aminoacylierten und unbeladenen tRNA zu unterscheiden. Die Unterscheidung beruht offensichtlich auf der speziellen Struktur des Akzeptorarms der aminoacylierten tRNA. Durch die Knüpfung der Esterbindung zwischen der Aminosäure und dem terminalen Adenosinrest A₇₆ des CCA-Endes der tRNA wird die Basenstapelung von A₇₆ mit den benachbarten Basen aufgehoben. Das terminale Adenin kann so durch eine spezifische Bindungstasche innerhalb des Proteins gebunden werden. Gleichzeitig bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen der Aminoesterbindung und der Peptidhauptkette von EF-Tu aus (Nissen et al. 1995, Nissen et al. 1996).

Die Bindungskonstanten des Komplexes aus Aminoacyl-tRNA und EF-Tu*GTP liegen je nach tRNA-Spezies zwischen $1,9 * 10^{-10}$ M und $1020 * 10^{-10}$ M (Ott et al. 1990), so daß das Gleichgewicht der Dissoziation zwischen freien Aminoacyl-tRNAs und ternärem Komplex weit auf Seiten des ternären Komplexes liegt. (Louie und Jurnak 1985: $1,3 * 10^{-9}$ M; Louie et al. 1984: 10^{-8} M bis 10^{-9} M; Abrahamson et al. (1985): $0,72 * 10^{-9}$ M bis $7,7 * 10^{-9}$ M). Die Affinität von EF-Tu*GDP zur Aminoacyl-tRNA ist extrem niedrig. Als typisches G-Protein oszilliert EF-Tu zwischen einer aktiven GTP- und einer inaktiven GDP-Form.

1.4.2. Translation

Die Translation findet an großen Multienzymkomplexen statt, die aus RNA und Proteinen bestehen, den Ribosomen. Die Ribosomen vermitteln die Interaktion zwischen mRNA-Codon und dem entsprechenden tRNA-Anticodon und katalysieren die Knüpfung der Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren. In den beiden Untereinheiten des Ribosoms (in Prokaryonten 50S und 30S) finden sich drei verschiedene ribosomale RNAs (rRNA): die 23S rRNA und die 5S rRNA in der großen Untereinheit, sowie die 16S rRNA in der kleinen Untereinheit. Nach dem mittlerweile allgemein anerkannten Dreistellenbindungsmodell enthalten die Ribosomen drei verschiedene Bindungsstellen für tRNAs, die mit A (Aminoacyl), P (Peptidyl) und E (Exit) bezeichnet werden (Nierhaus 1990). Analog zur Transkription werden drei Phasen der Translation unterschieden: Initiation, Elongation und Termination.

1.4.2.1. Initiation

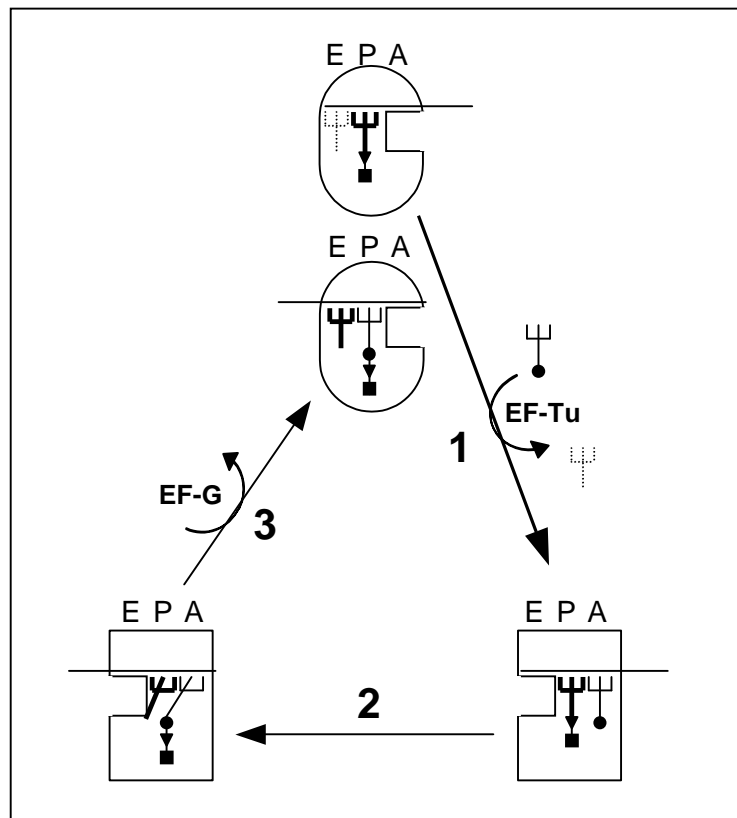
Der Start (Initiation) der Translation ist ein sehr komplexer Prozeß, an dem mehrere Proteine als Initiations und Regulationsfaktoren beteiligt sind. Für die Translationsinitiation in *Escherichia coli* wird eine spezielle formylierte Initiator-tRNA (fMet-tRNA^{fMet}) benötigt. Diese wird synthetisiert, indem die α -Aminogruppe des an die tRNA^{fMet} gebundenen Methionins durch das Enzym N¹⁰-Formyl-Tetrahydrofolat-Formyltransferase kovalent modifiziert wird (Kahn et al. 1980). Die Initiation beginnt mit der Bildung eines 30S-Initiationskomplexes, der aus der kleinen ribosomalen Untereinheit, dem Startcodon AUG (seltener GUG) auf der

mRNA, einer Initiator-tRNA und den Initiationsfaktoren IF1, IF2 und IF3 besteht (Hershey 1987). Die Ribosomenbindung erfolgt an spezifischen Nukleotidsequenzen, den Ribosomenbindungsstellen (Shine-Dalgarno-Sequenz), in unmittelbarer Nähe des Startcodons, wobei dieses Codon in die P-Stelle der kleinen ribosomalen Untereinheit eingepaßt wird (Shine und Dalgarno 1974, Ringquist et al. 1992). Durch Anlagerung der großen Ribosomen-Untereinheit wird das Ribosom vervollständigt und die zweite Phase der Translation, die Kettenverlängerung (Elongation), kann beginnen.

1.4.2.2. Elongation

Die Elongation ist ein mehrstufiger zyklischer Prozeß, in dem das Ribosom nach dem allosterischen Dreistellenbindungsmodell zwischen zwei Hauptkonformationszuständen, einem

Abb. 6



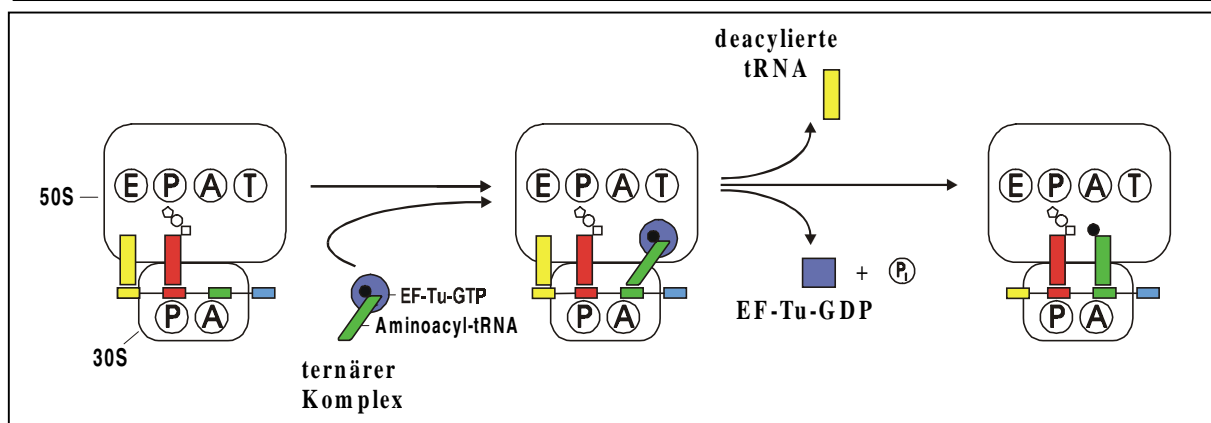
Modell des Elongationszyklus (nach Nierhaus 1993):

(1) Die Elongation beginnt mit dem Eintritt des ternären Komplexes in die A-Stelle des Ribosoms. Das Ribosom befindet sich zu diesem Zeitpunkt in einem posttranslokationales Konformationszustand, in dem die A-Stelle eine niedrige Affinität zu tRNA hat. Die P-Stelle ist mit der Peptidyl-tRNA besetzt, die E-Stelle mit der deacylierten tRNA aus dem vorhergehenden Zyklus. Die Ausbildung der korrekten Codon-Anticodon-Wechselwirkung zwischen tRNA und mRNA am Ribosom löst die Hydrolyse von EF-Tu*GTP und den Übergang des ribosomalen Komplexes in den nächsten, den prätranslokationales Konformationszustand aus. Die deacylierte tRNA wird hierbei aus der E-Stelle des Ribosoms entlassen, EF-Tu*GDP freigesetzt und die eintretende Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle des Ribosoms gebunden. (2) In einer zweiten Reaktion kommt es zur Übertragung des Peptidylrestes der Peptidyl-tRNA auf den Aminoacylrest der Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle des Ribosoms. Diese Reaktion wird durch die Peptidyl-Transferase auf der großen Untereinheit des Ribosoms katalysiert. (3) Mit dem nächsten Schritt, der Translokation, wird der Elongationszyklus vollendet und das Ribosom gelangt wieder in den Ausgangszustand. Während der Translokation verschiebt sich die mRNA relativ zum Ribosom um drei Nucleotide, wobei die um eine Aminosäure verlängerte Peptidyl-tRNA von der A-Stelle in die P-Stelle, und die deacylierte tRNA in die E-Stelle des Ribosoms gelangt.

prätranslokationalen und einem posttranslokationalen, oszilliert (Nierhaus 1993, vgl. Abb.6). Im elongierende Ribosom sind nach dem allosterischen Dreistellenbindungsmodell ständig zwei der drei tRNA-Bindungsstellen mit tRNAs besetzt. Zwischen A-Stelle und E-Stelle des Ribosoms liegt eine allosterische Kopplung im Sinne einer negativen Kooperativität vor: Wenn die E-Stelle besetzt ist, besitzt die A-Stelle eine niedrige Affinität für tRNA. Eine Besetzung der A-Stelle mit tRNA bewirkt umgekehrt eine niedrige Affinität der E-Stelle für tRNA. Die beiden Hauptkonformationszustände des Ribosoms sind durch eine hohe Energiebarriere (mehr als 80 kJ/mol) voneinander getrennt und lassen sich unter bestimmten Bedingungen experimentell voneinander trennen. Die Übergänge zwischen den beiden Hauptkonformationszuständen des Ribosoms werden durch zwei G-Proteine, EF-Tu und EF-G katalysiert.

Ein verfeinertes Modell der Elongation schlägt zusätzlich zu den klassischen tRNA-Bindungsstellen A, P und E eine Bindungsstelle für den EF-Tu an der 50S-Untereinheit des Ribosoms vor, die mit T bezeichnet wird. Nach diesem Elongationsmodell existieren neben den beiden Hauptkonformationszuständen noch verschiedene zusätzliche Übergangszustände (Abel und Journak 1996, vgl. Abb. 7).

Abb. 7



Der Eintritt des ternären Komplexes in die Elongation:
(verändert nach Abel und Journak 1996)

Vor dem Eintritt des ternären Komplexes befindet sich das Ribosom in der posttranslokationalen Konformation, in der E- und P-Stelle des Ribosoms mit tRNAs besetzt sind. Wenn der ternäre Komplex in das Ribosom eintritt, nimmt das Ribosom einen Intermediats-Zustand ein, in dem vorübergehend drei tRNAs an das Ribosom gebunden sind (Die Konformation des Ribosoms kann durch E, P/P, T/A beschrieben werden.) Die durch die Interaktion des ternären Komplexes mit der T-Stelle des Ribosoms vermittelte GTP-Hydrolyse löst die Dissoziation von EF-Tu*GDP und der deacylierten tRNA aus; das Ribosom erreicht den prätranslokationalen Zustand.

Die beiden verschiedenen Modelle zusammen ergeben folgendes Bild der Elongation: Vor dem Eintritt des ternären Komplexes befindet sich das Ribosom in der posttranslokationalen Konformation, in der E- und P-Stelle des Ribosoms mit tRNAs besetzt sind. Eine erste Interaktion zwischen ternärem und ribosomalem Komplex findet zunächst auf der Ebene einer Codon-Anticodon-Wechselwirkung zwischen mRNA und tRNA statt. Die Interaktion wirkt

sich über die Anticodon-Helix der tRNA auf die Positionierung des ternären Komplexes relativ zur T-Stelle des Ribosom aus. Eine korrekte Codon-Anticodon-Paarung und eine korrekte Positionierung des ternären Komplexes relativ zur T-Stelle des Ribosoms löst die T-Stellen vermittelte GTP-Hydrolyse des EF-Tu aus. Hiernach verläßt EF-Tu*GDP den ribosomalen Komplex und die Aminoacyl-tRNA wird fest in der A-Stelle des Ribosoms positioniert, wobei das Ribosom in die nächste Konformation übergeht. In einer zweiten Reaktion kommt es zur Übertragung des Peptidylrestes der Peptidyl-tRNA auf den Aminoacylrest der Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle des Ribosoms. Diese Reaktion wird durch die Peptidyl-Transferase auf der großen Untereinheit des Ribosoms katalysiert. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß der Peptidyltransfer im Prinzip auch unabhängig von ribosomalen Proteinen alleine an der 23S-rRNA der großen ribosomalen Untereinheit funktionieren könnte (Zhang und Cech 1998). Die 23S-rRNA wäre somit ein Beispiel für ein Ribozym. Mit dem nächsten Schritt, der Translokation, wird der Elongationszyklus vollendet und das Ribosom gelangt wieder in den Ausgangszustand. Die Translokation wird nach neueren Erkenntnissen durch den Elongationsfaktor EF-G unter GTP-Hydrolyse in der Art eines typischen Motorproteins vorangetrieben (Rodnina et al. 1997).

Der Aufbau des Elongationsfaktors EF-G hat große Ähnlichkeit mit dem ternären Komplex aus EF-Tu*GTP*Aminoacyl-tRNA. EF-G gliedert sich im Prinzip in einen C-terminalen mit dem mRNA-Codon wechselwirkenden Bereich (\rightarrow tRNA) und einen GTP-bindenden Bereich (\rightarrow EF-Tu). Die Ähnlichkeit der beiden in die A-Stelle des elongierenden Ribosoms eintretenden Komplexe wird auch als molekulares Mimikri bezeichnet (Mikuni et al. 1994, Liljas 1996, Nyborg et al. 1996, Ito et al. 1996, Clark und Nyborg 1997).

tRNA-Selektion

Die Polymerisationsgeschwindigkeit während der Elongation liegt bei ca. 10 bis 20 Peptidbindungen pro Sekunde pro Ribosom (Kennell und Riezman 1977, Bremer und Dennis 1987) bei Fehlerraten, die nach Bouadloun et al. (1983) bei 10^{-3} , nach Wagner et al. (1982) sogar bei nur 10^{-4} falsch eingebauten Aminosäuresten liegen. Die große Genauigkeit der Proteinbiosynthese auf der Ebene der Elongation ist bisher noch wenig verstanden. Es gibt in *Escherichia coli* 46 verschiedene ternäre Komplexe, die um die ribosomale A-Stelle konkurrieren (Björk 1995). Die Selektion des richtigen ternären Komplexes durch das Ribosom beruht nach allgemeiner Ansicht in erster Linie auf der Interaktion zwischen tRNA-Anticodon und dem entsprechenden Codon auf der mRNA. Die Dissoziationskonstanten von tRNA-Anticodonbereichen und Nukleotidtripletts, freien Aminoacyl-tRNAs und Ribosomen oder ternärem Komplex und Ribosom wurden von verschiedenen Autoren bestimmt (z. B.: Uhlenbeck et al. 1970, Thompson und Karim 1982, Schilling-Bartetzko et al. 1982). Die Ergebnisse dieser Messungen differieren je nach Autor sehr stark. Eine wesentliche Aussage kann jedoch gemacht werden: Die Affinität des ternären Komplexes zur A-Stelle des Ribosoms ist um mindestens zwei Größenordnungen höher als die der freien Aminoacyl-

tRNA (Nierhaus 1993). Die Affinität des tRNA-Anticodons zu den entsprechenden Nukleotidtripletts ist nochmals wesentlich niedriger als die Affinität der freien Aminoacyl-tRNA zum ribosomalen Komplex aus mRNA und Ribosom. Dies bedeutet, daß nur ein sehr kleiner Teil der Bindungsenergie zwischen Ribosom und ternärem Komplex auf die Wechselwirkung zwischen Codon und Anticodon entfällt.

Die Mechanismen, die zur Selektion der richtigen, zum jeweiligen Anticodon passenden tRNA durch das Ribosom führen, werden zur Zeit noch kontrovers diskutiert. Das oben beschriebene Modell der Elongation mit den drei tRNA-Bindungsstellen A, P und E, sowie der T-Stelle, die die GTP-Hydrolyse auslöst, eröffnet die Möglichkeit, daß auch Bereiche außerhalb des tRNA-Anticodons an der Diskriminierung der tRNA durch das elongierende Ribosom teilhaben. Beispielsweise könnte der Winkel zwischen Akzeptor-Helix*EF-Tu*GTP und Anticodon-Helix, also die Positionierung des ternären Komplexes relativ zum Ribosom, für die Auslösung der GTP-Hydrolyse und somit für den Eintritt der Aminoacyl-tRNA in die A-Stelle des Ribosoms maßgeblich sein. Die richtige Positionierung würde in diesem Fall durch viele unterschiedliche tRNA-Merkmale beeinflusst. Mutationen außerhalb des Anticodons könnten Struktur und Flexibilität der tRNA und auf diese Weise die Dekodierung des Codons auf der mRNA beeinflussen.

Es werden zwei Korrekturlese-Mechanismen diskutiert, die die Genauigkeit der Translation während der Elongation erhöhen: Während der Elongation ist die EF-Tu abhängige GTP-Hydrolyse ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt, wodurch nach allgemeiner Ansicht die Genauigkeit der Translation entscheidend beeinflusst wird (Ruusala et al. 1982, Thompson et al. 1986, Wiborg et al. 1996). Der größte Teil der falschen ternären Komplexe bildet hiernach erst gar keine Wechselwirkungen mit dem Codon aus oder dissoziiert vor der EF-Tu katalysierten GTP-Hydrolyse wieder vom ribosomalen Komplex weg (Nierhaus 1993). Dieser Mechanismus ist konsistent mit dem allosterischen Dreistellenbindungsmodell, nach dem die A-Stelle des Ribosoms in der prätranslokationalen Konformation des Ribosoms nur eine niedrige Affinität zum ternären Komplex hat (s.o.). Ein Teil der falschen ternären Komplexe tritt jedoch offensichtlich erst nach der GTP-Hydrolyse wieder aus dem ribosomalen Komplex aus. Ruusala et al. (1982) bestimmten den Einbau von Phenylalanin und Leucin durch Phe-tRNA^{Phe} (Anticodon GAA) und Leu-tRNA^{Leu2} (Anticodon GAG) in der Poly(U)-abhängigen Peptidsynthese. In diesem Experiment benötigte der Einbau von Leucin eine im Vergleich zum Einbau von Phenylalanin um Faktor 50 erhöhte EF-Tu abhängige GTP-Hydrolyse. Die Ergebnisse dieses Experimentes wurden in einem anderen Ansatz durch Thompson et al. (1986) bestätigt. Der Leser möge selbst entscheiden, ob dieses Resultat mit dem allosterischen Dreistellenbindungsmodell kompatibel ist, nachdem die GTP-Hydrolyse den Übergang in den nächsten Konformationszustand des ribosomalen Komplexes und eine verstärkte Bindung der Aminoacyl-tRNA auslöst. In diesem Zusammenhang ist möglicherweise die Frage wichtig, ob ein oder zwei EF-Tu-Moleküle pro Elongationszyklus benötigt werden und wieviele GTP-Moleküle während eines Elongationszyklus hydrolysiert werden: In *Escherichia coli* gibt es

zwei verschiedene EF-Tu-Gene, *tufA* und *tufB* (Jaskunas et al 1975). In einer interessanten Studie wurden *Escherichia coli*-Zellstämme verwendet, in denen simultan auftretende Mutationen in beiden EF-Tu-Genen (EF-Tu_{A_R} und EF-Tu_{B₀}) zum Phänotyp eines Nonsense-Suppressors führten (Vijgenboom et al. 1985). Zellstämme, die nur eine der beiden mutierten EF-Tu-Spezies exprimierten, zeigten keine Suppressor-Aktivität. Der Phänotyp Nonsense-Suppressor benötigte die Anwesenheit beider EF-Tu-Mutanten. Lippmann et al. (1993) wiesen zwei posttranslationale Modifikationen des EF-Tu in Form zweier Phosphorylierungen nach. Auch diese Modifikationen könnten eine Rolle im Hinblick auf ein vollständigeres Modell des Elongationszyklus spielen.

1.4.2.3. Termination

Die Termination der Proteinsynthese findet statt, wenn in der A-Stelle des elongierenden Ribosoms eines der drei Stop-Codons positioniert wird. Die drei für Peptidkettentermination stehenden Codons UAG (*amber*), UAA (*ochre*) oder UGA (*opal*) werden durch die Terminationsfaktoren RF1 und RF2 erkannt. Hierbei ist RF1 spezifisch für UAG und UAA, während RF2 UGA und UAA erkennt. Beim Erreichen eines Stop-Codons wird in Anwesenheit der entsprechenden Freisetzungsfaktoren die fertige Peptidkette aus dem ribosomalen Komplex entlassen. RF1 und RF2 sind, ähnlich wie die tRNAs, dazu in der Lage, die Sequenz des Stop-Codons durch direkte Interaktion zu erkennen (Prescott et al. 1991, Brown und Tate 1994). Ein weiterer Terminationsfaktor (RF3) stimuliert die Aktivität von RF1 und RF2. Wie die beiden Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G ist RF3 ein typisches G-Protein. Möglicherweise bildet RF3*GTP mit RF1 (bzw. RF2) einen ternären Komplex. Dieser Komplex ähnelt dann dem ternären Komplex aus EF-Tu*GTP*Aminoacyl-tRNA, wobei RF1 (bzw. RF2) den Part der tRNA spielt und RF3 den von EF-Tu (Nakamura et al. 1996). Für die Dissoziation von Ribosom, mRNA und tRNA nach der Freisetzung des Peptides ist mit dem Ribosome Recycling Factor (RRF) noch ein weiteres Protein wichtig. Die biologische Funktion der beiden Proteine RF3 und RRF war sehr lange unbekannt und ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Klar ist, daß die Teilnahme eines Ribosoms an einer neuen Initiation (das „Recycling“ des Ribosoms) wesentlich schneller verläuft, wenn beide Faktoren in genügender Menge vorhanden sind. Ist die Konzentration eines der beiden Faktoren zu niedrig, wird die Termination geschwindigkeitsbestimmend für die Proteinbiosynthese. Nach Janoshi et al. (1996) wird der nach der Freisetzung des Peptides verbliebene Komplex aus deacylierter tRNA, mRNA und Ribosom möglicherweise mit Hilfe von EF-G und dem mit GTP assoziierten Ribosome Recycling Factor unter GTP-Hydrolyse dissoziiert. Dem interessierten Leser seien in diesem Zusammenhang folgende Artikel empfohlen: Janoshi et al. (1996), Pavlov et al. (1997) und Pel et al. (1998). Nach der Termination bleiben die ribosomalen Untereinheiten zunächst als inaktives 70S-Ribosom assoziiert. Der Initiationsfaktor IF-3 dissoziiert dann die ribosomalen Unterheiten mit Hilfe von IF-1 und eine neue Translationsrunde kann beginnen.

Für die Effizienz der Termination ist die Base, die auf das Stop-Codon folgt, ein äußerst wichtiges Signal (Poole et al. 1995/1997). Über die statistische Analyse der *E. coli* Gene wurde eine nicht zufällige Verteilung des direkt auf das Stop-Codon folgenden Nukleotids festgestellt (Tate & Brown 1992, Poole et al. 1995). Für das *amber*-Codon UAG, das in *Escherichia coli* relativ selten vorkommt, lautet die Reihenfolge der Terminations-Effizienz $G > U = A > C$ (Poole et al. 1995). Die Affinität von RF-1 zu UAAU ist etwa doppelt so groß wie zu UAAC (Pavlov et al. 1998). Die Effizienz der Termination kann weiterhin durch die Natur der tRNA an der P-Stelle des Ribosoms oder durch die letzten beiden Aminosäuren innerhalb des naszierenden Polypeptids beeinflusst werden (Arkov et al. 1993, Zhang et al. 1996, Björnsson et al. 1996, Mottagui-Tabar et al. 1994).

1.6. *amber*-Suppression

Die ersten *amber*-Suppressor-tRNAs wurden mit Hilfe von *Escherichia coli* Zellstämmen entdeckt, die ein defektes Gen für das Enzym Alkaline Phosphatase besaßen (Garen et al. 1965). In einigen dieser Phosphatase defizienten Zellstämmen führte das Vorhandensein einer *amber*-Mutation zum vorzeitigen Abbruch der Peptidsynthese und zur Bildung von inaktiven verkürzten Proteinen. Ausgehend von diesen Zellstämmen isolierten Garen et. al Phosphatase-positive Revertanten. Einige dieser Phosphatase-positiven Revertanten waren in der Lage, trotz der *amber*-Mutation innerhalb des Gens für alkaline Phosphatase funktionale Proteine zu bilden. Durch die genetische Charakterisierung dieser Mutanten wurden die ersten *amber*-Suppressor-tRNAs entdeckt. (su^+_1 (Ser), su^+_2 (Gln), su^+_3 (Tyr)).

Dieses auf der Aktivität von alkaliner Phosphatase basierende System erlaubte im Prinzip schon eine Quantifizierung der Suppressor-Aktivität der entsprechenden Zellstämmen. Eine vergleichende Analyse verschiedener *amber*-Suppressor-tRNAs wurde allerdings durch mehrere Punkte erschwert. Die Anzahl an charakterisierten *amber*-Mutationen war niedrig, die Technologie, Punktmutationen in Proteingene einzuführen, noch nicht effizient genug entwickelt. Daneben erschwerte die Kopplung von Suppression und enzymatischer Aktivität eine genaue Zuordnung der beobachteten Effekte, da die enzymatische Aktivität neben der Suppressionseffizienz von der Natur der eingeführten Aminosäure abhängig war.

In den 70er-Jahren wurden schließlich genügend Mutationen für erste systematische Untersuchungen des Phänomens Suppression charakterisiert. Im Gen des lac-Repressors (*lacI*) konnten Nonsense-Mutationen an über 80 unterschiedlichen Codon-Positionen innerhalb der mRNA beschrieben werden (Miller et al. 1978). Ausgehend von dieser Arbeit führten Bossi and Roth (1980) erste Codonkontext-Untersuchungen durch. Hierbei zeigte sich, daß ein bestimmter Suppressor (*supE*, (su^+_2 , Gln)) je nach dem Kontext, in dem das *amber*-Codon auf der mRNA lag, unterschiedliche Suppressionsraten zeigte.

Eine erster Durchbruch zu einer genaueren Betrachtung der Suppression wurde durch die Verwendung eines hybriden β -Galaktosidase-Gens (*lacI-Z*) ermöglicht, in dem das Ende des *lacI*-Gens mit dem Anfang des *lacZ*-Gens fusioniert ist (Miller and Albertini 1983). Das entsprechende Genprodukt ist ein Fusionsprotein aus β -Galaktosidase und lac-Repressor, dem die letzten 4 Reste des lac-Repressors und die ersten 23 Reste der β -Galaktosidase fehlen. Das Fusionsprotein hat normale β -Galaktosidase-Aktivität und benötigt den lacI-Teil nicht für die enzymatische Aktivität. Somit können in den lacI-Teil des Fusionsgens beliebige Mutationen eingeführt werden. Durch die Einführung eines *amber*-Codons in diesen Teil des Proteingens wird die Expression von aktivem Protein verhindert. In Anwesenheit einer Suppressor-tRNA kann das enzymatisch aktive Protein gebildet werden. Die bei Suppression des *amber*-Codons entstehende β -Galaktosidase Aktivität kann somit leicht quantifiziert werden.

Miller und Albertini führten in den LacI-Teil des *lacI/lacZ*-Fusionsgens an 42 Positionen *amber*-Codons ein und bestimmten die Effizienz von vier verschiedenen, chromosomal kodierten *amber*-Suppressoren (*supD* (tSer, tRNA^{Ser}_{CUA}, su⁺₁), *supE* (tGln, tRNA^{Gln}_{CUA}, su⁺₂), *supF* (tTyr, tRNA^{Tyr}_{CUA}, su⁺₃) und *supP* (tLeu_{su+6}, tRNA^{Leu}_{CUA}, su⁺₆)) in den unterschiedlichen Kontexten. Diese Untersuchungen führten zu mehreren wesentlichen Aussagen, die in den folgenden Jahren von anderen Autoren bestätigt werden konnten (Bossi 1983, Stormo et al. 1986, Kleina et al 1990, Pederson und Curran 1991):

1. Die Aktivität einer bestimmten *amber*-Suppressor-tRNA ist stark von der Umgebung des *amber*-Codons innerhalb der mRNA abhängig (Codonkontext).
2. Verschiedene *amber*-Suppressor-tRNAs zeigen an demselben Codon sehr unterschiedliche Suppressionsraten.
3. Die Relationen zwischen verschiedenen *amber*-Suppressoren sind mit einigen Einschränkungen unabhängig vom Codonkontext. Dies bedeutet, der stärkste *amber*-Suppressor ist in jedem Kontext am stärksten, der schwächste in jedem Kontext am schwächsten.

Eine grundsätzliche Schwierigkeit bei der Interpretation von *in vivo* Daten ist häufig die Korrelation der erhaltenen Werte mit den verschiedenen Vorgängen während der tRNA-Reifung. tRNAs sind multifunktionale Moleküle, die im Laufe ihrer Biogenese an einer Vielzahl von Reaktionen teilnehmen (vgl. Abb.5). Im Prinzip kann die Suppression durch alle Vorgänge beeinflusst werden, die zur Bildung der Aminoacyl-tRNA führen. Unterschiedliche Suppressionsraten können beispielsweise aus Veränderungen der Aminoacylierungsrate, der Stabilität, des Expressionsniveaus von tRNAs und entsprechenden Synthetasen oder der tRNA-Modifikation resultieren. Im Hinblick auf einen Einsatz chemisch aminoacylierter tRNAs wäre es wünschenswert, wenn die gemessenen Suppressionsraten die Fähigkeit der aminoacylierten tRNA widerspiegeln würden, in die Translation einzutreten. Aus diesem

Grund orientiert sich die Definition der Suppressionseffizienz in der vorliegenden Arbeit an der Verwendung chemisch aminoacylierter *amber*-Suppressor-tRNAs. Suppressionseffizienz wird folgendermaßen definiert: Die Suppressionseffizienz einer tRNA ist ein Maß für die Fähigkeit der *aminoacylierten* tRNA, in den Elongationszyklus einzutreten. Sie entspricht somit einer spezifischen Aktivität der Aminoacyl-tRNA.

1.6.1. Suppressionseffizienz – mögliche Mechanismen

Essentiell für die Interaktion zwischen tRNA und mRNA ist nach allgemeiner Ansicht die Energie des Codon-Anticodonkomplexes. Schon die ersten Codonkontextuntersuchungen führten zu der Hypothese, daß die Stapelung benachbarter Basen auf dem Codon-Anticodon-Komplex einen wesentlichen Einfluß auf die Suppression hat. Diese Möglichkeit wurde zum ersten Mal durch Bossi und Roth (1980) diskutiert, die feststellten, daß die Effizienz des *amber*-Suppressors *supE* (Gln) stark anstieg, nachdem die innerhalb der mRNA 3' auf das Codon folgende Base A gegen C ausgetauscht wurde. Pederson und Curran (1991) wiesen eine Korrelation zwischen der Energie der Basenstapelung des 3'-folgenden Nukleotids und des *amber*-Codons mit der Suppressionseffizienz der *amber*-Suppressoren tSer (su^+_1), tTyr (su^+_3) und tLeu (su^+_6) nach. Die relativen Effizienzen dieser tRNAs waren für alle Codonkontexte dieselben, wobei tLeu der beste Suppressor war, gefolgt von tTyr und tSer. Die Suppression war am stärksten, wenn auf das *amber*-Codon innerhalb der mRNA ein A folgte. Das zweitbeste Nukleotid war G, gefolgt von U und C, die in etwa gleich stark waren. Nicht unerwähnt bleiben darf in diesem Zusammenhang, daß Codonkontexteffekte möglicherweise auch durch Interaktionen zwischen den beiden tRNAs in A- und P-Stelle des Ribosoms vermittelt werden (Smith und Yarus 1989c). Auch die Natur der letzten beiden Aminosäurereste innerhalb des naszierenden Peptids hat möglicherweise einen Einfluß auf die Suppression über eine Beeinflussung der Termination (Mottagui-Tabar et al. 1994).

Im Prinzip kann die Aktivität von *amber*-Suppressor-tRNAs sowohl durch Sequenzmerkmale der mRNA als auch der tRNA beeinflusst werden. Im Hinblick auf die Suppressionseffizienz sind alleine Sequenz und Struktur der tRNA von Bedeutung. Theoretische Betrachtungen der Nukleotidfolgen der Anticodonarme unterschiedlicher tRNAs führten Anfang der 80er-Jahre zu dem Konzept des "erweiterten Anticodons" ("extended anticodon", Yarus 1982). Hiernach besteht eine Beziehung der dem Anticodon benachbarten Nukleotide und denen des Anticodons selbst. Innerhalb der Anticodon-Schleife der tRNA scheinen besonders die beiden Basen, die 3' direkt auf das Anticodon folgen (Position 37 und 38), bedeutend zu sein. So enthalten nahezu alle tRNAs, die mit einem U beginnende Codons dekodieren und somit ein A in der dritten - "kardinalen" - Position des Anticodons besitzen, in den Positionen 37 und 38 AA. Für *amber*-Suppressor-tRNAs wurde gezeigt, daß eine für die Suppressionseffizienz optimale Nukleotidsequenz der Anticodonschleife in der Folge ${}^5\text{CUAAA}{}^3$ besteht, wobei CUA die Nukleotide des Anticodons umschreibt (Bradley et al. 1981, Yarus et al. 1986,

Raferty und Yarus 1987, Kleina et al 1990). Auch andere Mutationen innerhalb des Anticodon-Armes der tRNA können zu Veränderungen der Suppression führen (Yarus et al. 1986a/b, Schultz und Yarus 1994a/b). Eine *amber*-Suppressor-tRNA (su^{+7}_{G36}) enthält beispielsweise statt des Anticodons CUA das Anticodon GUA (Schultz und Yarus 1994a/b). Somit ist zur Dekodierung des *amber*-Codons UAG die Ausbildung einer normalerweise „verbotenen“ G-U Basenpaarung an der ersten Position des Anticodons notwendig. Die tRNA mit der Wildtyp-Sequenz ist ein relativ schlechter *amber*-Suppressor. Smith und Yarus führten sättigende Mutationen des oberen Basenpaares der Anticodon-Helix durch. Die Fähigkeit zur Ausbildung des Wobbles an der ersten Anticodon-Position wurde durch einige Mutationen des Basenpaares C₂₇-G₄₃ an der oberen Basis des Anticodon-Arms drastisch erhöht. Hierbei hatten auch Mutationen einen positiven Effekt, durch die die Basenpaarung aufgehoben wurde. Der beste Suppressor entstand durch die Einführung von G₂₇-A₄₃ (Suppressionsrate 10%). Dieser Suppressor war um Faktor 2,5 besser als der nächstbeste Suppressor mit den Basen C₂₇-A₄₃ (Suppressionsrate 4%). Auch die Umkehrung des Basenpaares C₂₇-G₄₃ in G₂₇-C₄₃ führte zu einer Steigerung der Suppressionsrate von 0,5% auf 3%. Schultz und Yarus nehmen an, daß die Mutationen den Winkel zwischen Akzeptorhelix und Anticodonhelix beeinflussen oder (und) die Flexibilität der L-Form der tRNA erhöhen.

Die Interaktion zwischen mRNA-Codon und Anticodon bestimmter tRNA-Spezies kann durch Modifikationen in Nukleosiden des Anticodon-Armes der tRNA stark beeinflusst werden (Gefter und Russell 1969, Petrullo et al. 1983, Elseviers et al. 1984, Bouadloun et al. 1986, Wilson und Roe 1989, Ericson und Björk 1991, Takai et al. 1996, Tomita et al. 1999). Die Funktion der Modifikation $ms^{2,6}A_{37}$ innerhalb der Anticodon-Schleife ist ausgiebig *in vivo* und *in vitro* studiert worden. Es wird angenommen, daß die Modifikation die Basenstapelung zwischen dem 3' vom Anticodon liegenden Nukleotid und dem Komplex aus Codon und Anticodon verbessert. (Ericson und Björk 1991, Pederson und Curran 1991). Hierdurch werden Interaktionen zwischen mRNA-Codon und tRNA-Anticodon stabilisiert. Das Fehlen der Modifikation in *Escherichia coli*-Zellstämmen, in denen das *miaA*-Gen defekt ist, kann große Auswirkungen auf Translationseffizienz, Codonkontext-Sensitivität und Genauigkeit der Translation haben (Petrullo et al. 1983, Bouadloun et al. 1986, Wilson und Roe 1989, Ericson und Björk 1991). Eine Modifikation der betreffenden Position ist unter anderem nachgewiesen für tLeu (su^+_6), tSer (su^+_1), tTyr (su^+_3) und tGln (su^+_2) (Eggertsson und Söll 1988). Die Suppressionseffizienz einiger dieser *amber*-Suppressor-tRNAs kann durch das Fehlen der Modifikation an dieser Position erheblich reduziert werden (Gefter und Russell 1969, Petrullo et al. 1983, Bouadloun et al. 1986, Ericson und Björk 1991).

Außerhalb des Anticodon-Armes werden Einflüsse der Sequenz des D-Armes auf die Suppressionseffizienz diskutiert. Die Wildtyp-tRNA für Tryptophan enthält im D-Arm das Basenpaar U₁₁-G₂₄. Die entsprechende *amber*-Suppressor-tRNA ist nach Austausch von G₂₄ in A dazu in der Lage, *ochr*-Codons zu dekodieren (Raferty et al. 1986). Hierzu ist die

Ausbildung eines Wobbles zwischen tRNA-Anticodon (CUA) und mRNA-Codon (UAA) nötig. Der Austausch von G₂₄ in A resultiert in einer relaxierten Lesegenauigkeit an der Wobble-Position des Codons (Smith und Yarus 1989a/b). Möglicherweise hat auch die Länge des Extraarmes einen Einfluß auf die Suppressionseffizienz. Curran et al. (1995) wiesen eine verminderte 3'-Contextsensitivität von tRNAs mit einem langen Extraarm nach.