

Der Translationsfaktor SelB

Mechanismus der UGA-Dekodierung und Funktion in der Regulation der Genexpression

DISSERTATION

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE

DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

vorgelegt von

Martin Rudolf Thanbichler

im September 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Cremer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. November 2002

Publikationen

Originalarbeiten:

- Thanbichler, M., Neuhierl, B. und Böck, A. (1999) S-methylmethionine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **181**, 662-665.
- Neuhierl, B., Thanbichler, M., Lottspeich, F. und Böck, A. (1999) A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5407-5414.
- Thanbichler, M., Böck, A. und Goody, R. S. (2000) Kinetics of the interaction of translation factor SelB from *Escherichia coli* with guanosine nucleotides and selenocysteine insertion sequence RNA. *J. Biol. Chem.*, **275**, 20458-20466.
- Thanbichler, M. und Böck, A. (2002) Selenoprotein biosynthesis: purification and assay of components involved in selenocysteine biosynthesis and insertion in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, **347**, 3-16.
- Thanbichler, M. und Böck, A. (2002) The function of SECIS RNA in translational control of gene expression in *Escherichia coli*. *EMBO J.* (im Druck).
- Thanbichler, M., Malamoussi, A. und Böck, A. Mutational analysis of the tRNA-binding specificity of elongation factor SelB from *Escherichia coli*. (in Vorbereitung).

Übersichtartikel:

- Thanbichler, M. und Böck, A. (2001) Selen: Biologie eines Spurenelements. *Einsichten*, **19**, 10-13.
- Thanbichler, M. und Böck, A. (2001) Funktional analysis of prokaryotic SELB proteins. *Biofactors*, **14**, 53-59.
- Böck, A., Thanbichler, M., Rother, M. und Resch, A. (2002) Selenocysteine, In Ibba, M., Cusack, C. S. und Franckly, S. (eds.), *Aminoacyl-tRNA synthetases*. Landes Bioscience, Georgetown, USA (im Druck)

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
1. Selenmetabolismus in <i>Escherichia coli</i>	2
2. Die GTPase-Superfamilie	6
3. GTPasen des bakteriellen Translationsapparats	8
Initiationsfaktor 2.....	9
Elongationsfaktor Tu.....	10
Elongationsfaktor G.....	12
Terminationsfaktor 3.....	13
Elongationsfaktor SelB.....	14
4. Ziele dieser Arbeit	17
MATERIAL UND METHODEN	18
1. Stämme und Plasmide	18
2. Medien und Supplemente	21
3. Oligonukleotide	22
4. Chemikalien, biologisches Material und Enzyme	24
5. Mikrobiologische Methoden	24
Anzucht von Bakterien.....	24
Test auf Gasproduktion.....	25
6. Genetische Methoden	25
Transformation.....	25
Homologe Rekombination.....	26
Genetische Manipulation und lysogene Integration von λ -Phagen.....	26
7. Molekulargenetische Methoden	27
Isolierung von Plasmid-DNA.....	27
Isolierung von chromosomaler DNA.....	27
Standardmethoden.....	27
Assemblierung von Oligonukleotiden.....	27
Polymerase-Kettenreaktion.....	28
Sequenzierung von DNA.....	28
8. Methoden zur Analyse von RNA	28
Isolierung von Gesamt-RNA.....	28
<i>in vitro</i> -Transkription von RNA.....	28
Reinigung von tRNA ^{Sec}	29
5'-Markierung von RNA.....	29

Faltung von SECIS-Elementen.....	30
Bestimmung der Konzentration von RNA-Oligonukleotiden	30
9. Reinigung und Quantifizierung von Proteinen	31
Reinigung der Seryl-tRNA Synthetase	31
Reinigung der Selenophosphat Synthetase	32
Reinigung des Elongationsfaktors SelB	33
Reinigung von SelB _{His}	34
Reinigung von SelB _{His} -Varianten	34
Reinigung von SelB ₄₇₂₋₆₁₄	34
Reinigung von SelB ₃₇₉₋₆₁₄	35
Bestimmung der Konzentration von Proteinen.....	35
10. Elektrophoretische Methoden.....	36
Elektrophorese von DNA	36
Elektrophorese von RNA.....	36
Elektrophorese von Proteinen.....	36
11. Western Blot	37
12. Spektroskopische Methoden	37
CD-Spektroskopie	37
Fluoreszenz-Spektroskopie.....	38
Stopped-Flow Analysen.....	38
13. Biochemische Methoden	39
Limitierte Proteolyse.....	39
Bestimmung von β -Galactosidase-Aktivitäten.....	39
Aminoacylierung von tRNA ^{Sec}	39
Konversion von Seryl-tRNA ^{Sec} zu Selenocystyl-tRNA ^{Sec}	40
Hydrolyseschutz-Experimente.....	40
Quantifizierung von radioaktiv markierter Aminoacyl-tRNA.....	40
Analyse von SelB-Liganden Interaktionen im Gelretardations-Assay	41
S1-Nukleaseschutz-Experimente.....	41
14. Bioinformatische Methoden	42
Auswertung von CD-Spektren.....	42
Bildverarbeitung	42
Darstellung von 3D-Strukturen.....	43
Sequenzanalysen.....	43
Analyse von Autoradiogrammen	43
Analyse mathematischer Daten	43
ERGEBNISSE	44
1. System zur effizienten Charakterisierung von mutierten SelB-Proteinen	44
Vorbereitende Klonierungen.....	44
<i>Konstruktion von pT7SelBH6</i>	45
<i>Konstruktion von pMT7 und pMB</i>	46
Reinigung des SelB _{His} -Fusionsproteins	48

Charakterisierung des SelB _{His} -Fusionsproteins	49
<i>Biologische Aktivität</i>	49
<i>Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur</i>	50
Limitierte Proteolyse	50
CD-Spektroskopie	51
<i>Analyse der biochemischen Eigenschaften</i>	51
Bindung von Guanodin-Nukleotiden	52
Interaktion mit SECIS-Elementen	52
Interaktion mit Selenocysteyl-tRNA ^{Sec}	53
2. Determinanten der Aminosäurespezifität von SelB	54
Gerichtete Mutagenese der Aminoacyl-Bindetasche von SelB	54
<i>Einführen der Mutationen</i>	56
<i>Aktivität der mutierten SelB-Proteine in vivo</i>	57
Isolierung und Charakterisierung von SelB-Varianten mit veränderter Aminosäurespezifität	60
<i>Selektion</i>	60
<i>Aktivität der selektierten SelB-Varianten</i>	61
<i>Reinigung der SelB-Varianten</i>	63
<i>Biochemische Charakterisierung der SelB-Varianten</i>	64
Analyse der Tertiärstruktur	64
Interaktion mit SECIS-Elementen	65
Interaktion mit Seryl- und Selenocysteyl-tRNA ^{Sec}	66
3. Quantitative Analyse der Interaktion von SelB mit seinen Liganden	68
Präparation von Enzymen und RNA-Substraten	69
<i>Reinigung von Proteinen</i>	70
Optimierung der Reinigung von SelB	70
Reinigung von SelB ₃₇₉₋₆₁₄	71
Reinigung weiterer Enzyme	73
<i>Präparation von Selenocysteyl-tRNA^{Sec}</i>	74
<i>Präparation und Faltung von SECIS-Elementen</i>	74
Einfluss der Ligandenbindung auf die Sekundärstruktur von SelB	76
Prinzip der Stopped-Flow-Methode	77
Analyse der Interaktion von SelB mit Guanodin-Nukleotiden	78
<i>Interaktion mit mantdGTP und GTP</i>	78
<i>Interaktion mit mantGDP und GDP</i>	82
Analyse der Interaktion von SelB mit SECIS-Elementen	84
<i>Kinetische Charakterisierung der Interaktion mit der fdhF-Minihelix</i>	84
<i>Einfluss der Struktur des SECIS-Elements auf die Affinität für SelB</i>	88
Koorperativität der Liganden-Bindung durch SelB	89
<i>Interaktion zwischen der Nukleotid- und der SECIS-Bindetasche</i>	89
<i>Interaktion zwischen der SECIS- und der tRNA^{Sec}-Bindetasche</i>	90
<i>Interaktion zwischen der Nukleotid- und der tRNA^{Sec}-Bindetasche</i>	92
4. Regulation der Selenocystein-Biosynthese	94
Organisation des <i>selAB</i> -Transkripts	94
Interaktion von SelB mit dem SECIS-ähnlichen Element	95
Regulation der Expression von <i>sel</i> -Genen	99
<i>Konstruktion von Stämmen mit Deletionen in sel-Genen</i>	99
<i>Regulation der Expression von selA, selB und selD</i>	100

<i>Regulatorische Funktion des SECIS-ähnlichen Elements</i>	101
Konstruktion von Reporter-gen-Fusionen	101
Einfluss des SECIS-ähnlichen Elements auf die Expression von <i>selA</i> und <i>selB</i>	103
Effekt des SECIS-ähnlichen Elements auf die Synthese und Stabilität der <i>selAB</i> -mRNA	105
<i>Funktionalität des SECIS-ähnlichen Elements</i>	107
DISKUSSION	109
1. Biochemie der Ligandenbindung durch SelB	109
Mechanismus der Selenocystein-Spezifität	109
<i>Rolle der Aminoacyl-Bindetasche</i>	110
<i>Selektion von Selenocysteyl-tRNA^{Sec}: Ein komplex regulierter Prozess</i>	110
Kinetik der Interaktion mit Guanosin-Nukleotiden	113
Interaktion mit dem SECIS-Element	115
Kooperativität der Ligandenbindung	115
2. Regulation der Selenocystein-Biosynthese durch SelB: Ein neuartiger Mechanismus translationeller Kontrolle	118
Eigenschaften des SECIS-ähnlichen Elements	118
Mechanismus der Regulation	120
Modell des regulatorischen Netzwerks	121
ZUSAMMENFASSUNG	125
LITERATURVERZEICHNIS	127

Abkürzungsverzeichnis

A-	Aminoacyl-tRNA-
Ap	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
Cm	Chloramphenicol
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E-	Exit-
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
FRET	Fluoreszenz-Resonanztransfer
x g	x-fache Erdbeschleunigung
GDPNP	Guanosin-5'-(β , γ -Imido)Triphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HNS	Haarnadelstruktur
IDA	Iminodiessigsäure
IF	Initiationsfaktor
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktosid
Km	Kanamycin
mant	3'-Methylantraniloyl-
N-	Amino-
nt	Nukleotid(e)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
P-	Peptidyl-tRNA-
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIPES	Piperazin-1,4-Bis(2-Ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	pounds / inch ²

Abkürzungsverzeichnis

x ^R	Resistenz gegen das Antibiotikum x
RF	Terminationsfaktor
rpm	Umdrehungen / min
SelB _{His}	mit einem C-terminalen Hexahistidin-Affinitätspeptid fusioniertes SelB
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SECIS	Selenocystein-Insertionssequenz
SL-Element	SECIS-ähnliches Element
SRP	Signal Recognition Particle
TCA	Trichloressigsäure
TIR	Translations-Initiationsregion
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Vol.	Volumen bzw. Volumina
XGal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

Internationale Standardabkürzungen wurden nach den Empfehlungen der IUBMB verwendet (*Eur. J. Biochem.* **251**, 6-7; 1998).

Einleitung

Das Spurenelement Selen, das 1817 von dem schwedischen Chemiker J. J. Berzelius entdeckt wurde, ist nach Sauerstoff und Schwefel das dritthäufigste Chalkogen. Es ist sehr selten und nimmt an der Erdkruste nur einen Gewichtsanteil von $8 \times 10^{-5} \%$ ein. In seinen chemischen Eigenschaften weist es eine große Ähnlichkeit zu Schwefel auf und tritt daher in der Natur meist in Verbindung mit Schwefelmineralien auf.

Seine Bedeutung für biologische Prozesse wurde erstmals im Jahr 1954 durch Untersuchungen an Vertretern der Familie Enterobacteriaceae erkannt (Pinsent, 1954) und in den folgenden Jahren durch Arbeiten an höheren Eukaryonten (Patterson *et al.*, 1957; Schwarz und Foltz, 1957) bestätigt. Die Aufklärung der biologischen Funktion von Selen begann mit der Beobachtung, dass das Element eng mit Proteinen assoziiert ist (Andreesen und Ljungdahl, 1973; Flohé *et al.*, 1973; Rotruck *et al.*, 1973; Turner und Stadtman, 1973). Seine exakte chemische Form blieb jedoch bis zur Sequenzierung des ersten Selenoproteins (Cone *et al.*, 1976), die zur Entdeckung der bis dahin unbekanntes Aminosäure Selenocystein führte, unklar. Der Einbau von Selenocystein wurde zuerst auf die posttranslationale Modifikation von selenfreien Vorläuferproteinen zurückgeführt. Diese Hypothese wurde jedoch durch das Konzept eines kotranslationellen Einbaus ersetzt, als die Isolierung und Sequenzierung der ersten Selenoprotein-Gene zeigte, dass Selenocystein-Reste durch UGA-Kodons auf der mRNA repräsentiert werden (Chambers *et al.*, 1986; Zinoni *et al.*, 1987).

Selenoproteine wurden mittlerweile in zahlreichen bakteriellen, archaeellen und eukaryontischen Organismen nachgewiesen (Low und Berry, 1996; Stadtman, 1996; Rother *et al.*, 2001). Es handelt sich bei ihnen überwiegend um redoxaktive Enzyme, die häufig zentrale Funktionen im Stoffwechsel erfüllen. Ihr katalytischer Mechanismus ist auf das niedrige Redoxpotential und die starke Nukleophilie von Selenocystein angewiesen. Wird dieses durch die chemisch sehr ähnliche Aminosäure Cystein ersetzt, so kommt es in der Regel zu einer drastischen Reduktion der Umsatzrate oder zu einer vollständigen Einbuße der Aktivität (Axley *et al.*, 1991; Zhong und Holmgren, 2000).

Das System, das für die Biosynthese von Selenoproteinen verantwortlich ist, wurde weitgehend durch Arbeiten an *Escherichia coli* aufgeklärt. Es zeigte sich aber, dass die mit diesem Bakterium erhaltenen Ergebnisse grundsätzlich auch auf archaeelle und eukaryontische Organismen übertragbar sind.

1. Selenmetabolismus in *Escherichia coli*

In *E. coli* existieren drei Gene für selenabhängige Formiat Dehydrogenasen, die entweder konstitutiv (*fdoG*) oder nur unter anaeroben Bedingungen (*fdhF*, *fdnG*) exprimiert werden (Zinoni *et al.*, 1986; Berg *et al.*, 1991; Sawers *et al.*, 1991). Für die Biosynthese von Selenocystein und seinen Einbau in diese Proteine wird die Funktion von mindestens vier Faktoren benötigt. Als Adaptermolekül, das die Dekodierung von UGA als Selenocystein vermittelt, dient tRNA^{Sec} (SelC).

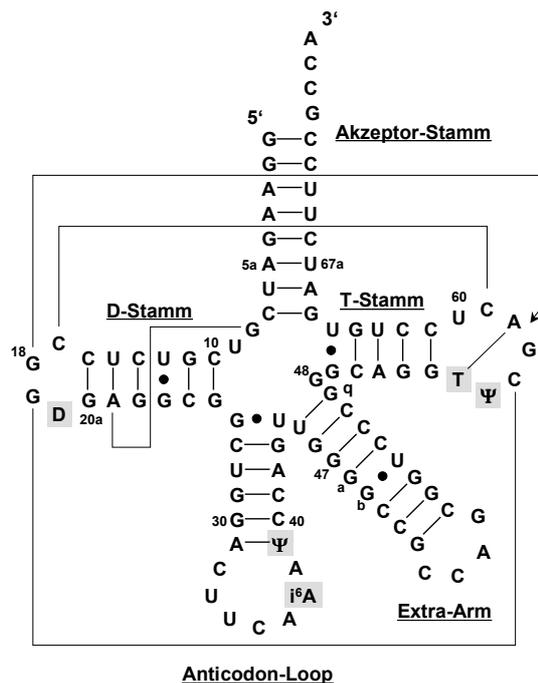


Abbildung 1. Sekundärstruktur von tRNA^{Sec}. Die modifizierten Nucleotide Dihydrouridin (D), Isopentenyladenosin (i⁶A), Pseudouridin (Ψ) und Ribothymidin (Schön *et al.*, 1989) sind grau hinterlegt. Tertiäre Interaktionen, die auf Basenpaarung beruhen, sind durch Linien dargestellt, Interkalation wird durch einen Pfeil angedeutet (Baron *et al.*, 1993b).

Sie weicht in einer Reihe von Merkmalen von der Konsensusstruktur kanonischer tRNAs ab (Abbildung 1). Neben Basenaustauschen an üblicherweise strikt konservierten Positionen und neuartigen tertiären Interaktionen weist sie einen auf sechs Basenpaare verlängerten D-Stamm, welcher mit einer Verkleinerung des D-Loops einhergeht, einen ungewöhnlich langen Extra-Arm und einen auf acht Basenpaare verlängerten Akzeptor-Stamm auf. Diese Charakteristika sind auch in tRNA^{Sec}-Spezies anderer Bakterien stark konserviert (Tormay *et al.*, 1994).

Trotz ihrer ungewöhnlichen Eigenschaften wird tRNA^{Sec} von Seryl-tRNA Synthetase (SerS) akzeptiert und mit Serin verestert (Abbildung 2), wobei die Reaktion im Vergleich zur Beladung der kanonischen Serin-Isoakzeptoren aber mit einer 100-fach verringerten katalytischen Effizienz erfolgt (Baron und Böck, 1991).

Seryl-tRNA^{Sec} wird anschließend von Selenocystein Synthase (SelA), einem Homodekamer aus 50 kD Untereinheiten (Forchhammer *et al.*, 1991a), zu Selenocysteyl-tRNA^{Sec} umgesetzt. Die Monomere des Enzyms sind in zwei pentameren Ringen angeordnet, die insgesamt fünf Moleküle Seryl-tRNA^{Sec} binden können (Engelhardt *et al.*, 1992). Der erste Schritt der Reaktion besteht in der Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen der Amino-Gruppe des Seryl-Rests und der Formyl-Gruppe des Pyridoxalphosphat-Kofaktors von SelA. Es folgt eine Dehydratisierungsreaktion, die zur Generierung eines stabilen, enzymgebundenen Aminoacrylyl-Intermediats führt. Dieses geht schließlich nach dem nukleophilen Angriff von [Se²⁻] in Selenocysteyl-tRNA^{Sec} über (Forchhammer und Böck, 1991).

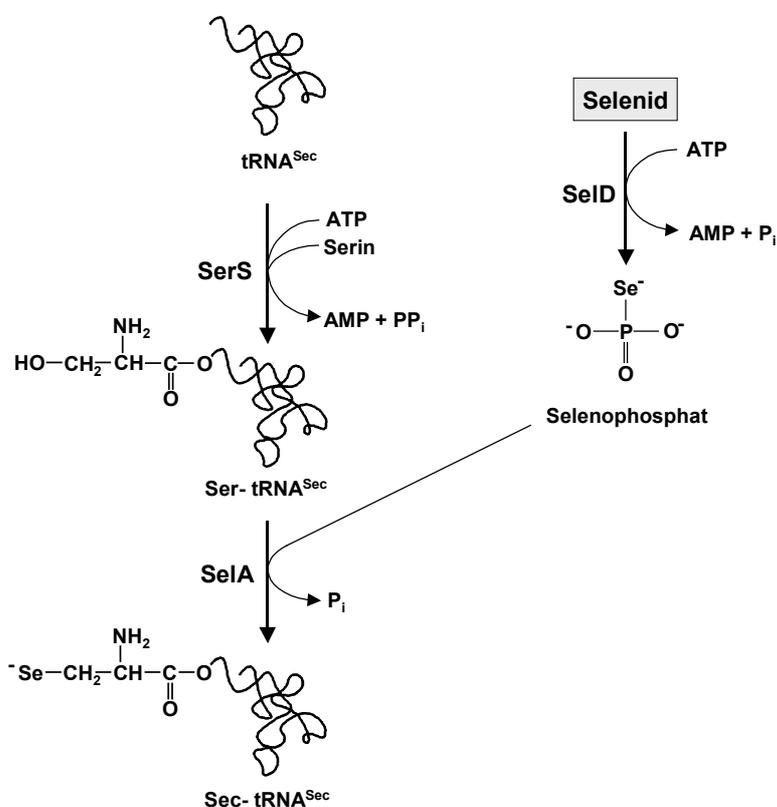


Abbildung 2. Biosynthese von Selenocystein. Eine genaue Beschreibung der Reaktionen wird im Text gegeben. Enzymbezeichnungen: SerS, Seryl-tRNA Synthetase; SelD, Selenophosphat Synthetase; SelA, Selenocystein Synthase.

Als Selendonor für diese Reaktion dient Selenophosphat (Glass *et al.*, 1993), das von Selenophosphat Synthetase (SelD) aus Selenid und ATP generiert wird (Ehrenreich *et al.*, 1992; Veres *et al.*, 1994). In dieser ungewöhnlichen Reaktion werden beide Phosphoanhydrid-Bindungen von ATP gespalten. Das β -Phosphat wird als Orthophosphat freigesetzt, während das γ -Phosphat nach intermediärer Übertragung auf einen Aminosäure-Rest von SelD mit Selenid

reagiert (Ehrenreich *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1998). *E. coli* besitzt zudem die Möglichkeit, neben Selenid auch freies Selenocystein als Selenquelle zu nutzen. Dieses wird durch Selenocystein Lyase in Alanin und ein enzymgebundenens Selenid-Intermediat gespalten, welches dann auf Selenophosphat Synthetase übertragen werden kann (Mihara *et al.*, 2002). Selenophosphat findet nicht nur in der Selenoprotein-Biosynthese Verwendung, sondern es dient auch als Selendonor für die Synthese des modifizierten Nukleotids 5-Methylamino-methyl-2-Selenouridin, das die Wobbleposition im Antikodon von tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln} und tRNA^{Lys} einnimmt (Leinfelder *et al.*, 1990; Veres und Stadtman, 1994).

Auf Grund ihres verlängerten Akzeptor-Arms besitzen Seryl- und Selenocysteyl-tRNA^{Sec} im Vergleich zu kanonischen Aminoacyl-tRNAs eine stark verringerte Affinität für EF-Tu (Baron und Böck, 1991; Förster *et al.*, 1990). Es existiert jedoch ein spezialisierter Elongationsfaktor (SelB), der mit der selenocysteylierten Form von tRNA^{Sec} interagiert und deren Insertion in die mit einem UGA-Kodon programmierte ribosomale Aminoacyl-tRNA-Bindetasche vermittelt. Neben Selenocysteyl-tRNA^{Sec} bindet SelB Guanosin-Nukleotide und eine Sekundärstruktur von Selenoprotein-mRNAs, die als SECIS-Element bezeichnet wird (Abbildung 3).

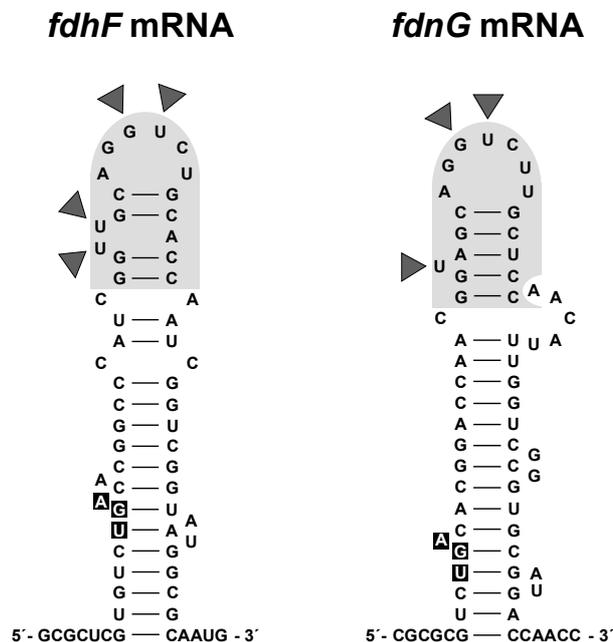


Abbildung 3. SECIS-Elemente der *fdhF*- und *fdnG*-mRNAs von *E. coli*. Die für Selenocystein kodierenden UGA-Kodons sind schwarz hinterlegt. Die minimalen SelB-Binderegionen der SECIS-Elemente (Ringquist *et al.*, 1994) sind durch Graufärbung gekennzeichnet. Basen, die durch die Bindung von SelB gegen chemische Modifikation geschützt werden (Hüttenhofer *et al.*, 1996b), sind durch Dreiecke gekennzeichnet. Das SECIS-Element der *fdoG*-mRNA ist mit dem der *fdnG*-mRNA identisch.

Diese liegt in Bakterien unmittelbar stromabwärts des im Leserahmen liegenden UGA-Kodons und ist für dessen Rekodierung als Selenocystein essentiell (Zinoni *et al.*, 1990). Die apikale Region des SECIS-Elements (Minihelix) ist für die Bindung und Funktion von SelB ausreichend (Ringquist *et al.*, 1994; Kromayer *et al.*, 1996), wobei die Interaktion vor allem durch ein GU-Duplett in der Loopregion und einen ungepaarten Uridin-Rest im helikalen Anteil der Struktur vermittelt wird (Hüttenhofer *et al.*, 1996b; Li *et al.*, 2000). Mutationen im basalen Bereich führen zu keiner Veränderung der SelB-Aktivität, solange der Abstand von elf Nukleotiden zwischen dem UGA-Kodon und der Minihelix erhalten bleibt (Heider *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998).

Nur wenn sich der quaternäre Komplex aus SelB, GTP, Selenocysteyl-tRNA^{Sec} und dem SECIS-Element gebildet hat (Abbildung 4), nimmt SelB vermutlich eine Konformation an, die es ihm ermöglicht, mit dem herannahenden Ribosom zu interagieren und gleichzeitig eine Termination der Translation durch Terminationsfaktor 2 (RF2) zu verhindern (Hüttenhofer und Böck, 1998; Klug *et al.*, 1999). Auf diese Weise wird die Aktivität des Proteins auf definierte UGA-Kodons in Selenoprotein-mRNAs beschränkt und ein unspezifisches Durchlesen von gewöhnlichen Stopp-Kodons verhindert.

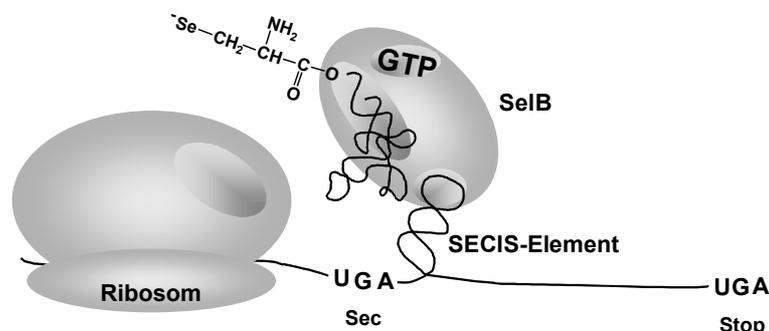


Abbildung 4. Schematische Darstellung des quaternären Komplexes. Eine Beschreibung der Abbildung wird im begleitenden Text gegeben.

Die Effizienz des durch SelB vermittelten Dekodierungsprozesses ist gering, denn nur in 4 - 5 % der Fälle kann der quaternäre Komplex erfolgreich mit RF2 um die Bindung an das Ribosom konkurrieren. Ähnlich wie bei programmierten Leserahmen-Verschiebungen kommt es dabei zu einem langen Pausieren (~ 12 s) des Ribosoms vor der komplexierten SECIS-Struktur, das zu einer signifikanten Reduktion der Translationsrate führt (Suppmann *et al.*, 1999).

2. Die GTPase-Superfamilie

Auf Grund seiner strukturellen und funktionellen Eigenschaften kann der Elongationsfaktor SelB zu den G-Proteinen gezählt werden, einer diversen Gruppe von GTPasen, die in allen drei Organismenreichen verschiedenste Funktionen in der Regulation von Protein-Biosynthese, Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Signaltransduktion erfüllt. Die Vertreter dieser Proteinfamilie besitzen ein konserviertes Strukturelement (G-Domäne), das für die Bindung und Hydrolyse von GTP verantwortlich ist. Sie zeigen ferner eine signifikante Übereinstimmung in definierten Bereichen ihrer Sequenzen, weshalb sie vermutlich auf einen gemeinsamen Ursprung zurückgeführt werden können (Bourne *et al.*, 1990; Kjeldgaard *et al.*, 1996).

G-Proteine weisen sehr niedrige intrinsische GTPase-Aktivitäten auf, da sie im Gegensatz zu Enzymen mit einer hohen katalytischen Effizienz sowohl mit ihrem Substrat als auch mit den resultierenden Produkten GDP und P_i stabile Komplexe bilden. Diese unterscheiden sich im Hinblick auf ihre Konformation und biologische Aktivität stark voneinander (Bourne *et al.*, 1991): Durch Bindung von GTP geht das Protein in der Regel in einen aktivierten Zustand über, der eine produktive Interaktion mit seinen Zielstrukturen erlaubt. Die Hydrolyse des Nukleotids und die Freisetzung von P_i induziert anschließend eine drastische Konformationsänderung, die mit dem Verlust der regulatorischen Eigenschaften einhergeht. Dieser Zustand bleibt nach Freisetzung von GDP erhalten, bis der Faktor durch erneute Assoziation von GTP in einen weiteren Reaktionszyklus eintritt. Die zyklische Abfolge reziproker Konformationsänderungen ermöglicht es G-Proteinen, in der Zelle als molekulare Schalter zu dienen. Ihre Aktivität unterliegt dabei in vielen Fällen einer Kontrolle durch akzessorische Proteine (Sprang, 1997). So wird der Übergang von der aktiven in die inaktive Konformation häufig nicht allein durch die intrinsische GTPase-Aktivität bestimmt, sondern durch Interaktion mit GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) oder einer definierten Konformation der Zielstruktur induziert. Die Dissoziation von GDP kann in entsprechender Weise durch Nukleotid-Austauschfaktoren (NEFs) stimuliert oder aber durch Guanosinnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) verhindert werden. Da auch die Aktivität der Effektoren wieder einer Regulation unterliegen kann und viele G-Proteine mit mehreren Zielstrukturen interagieren, ermöglicht dieses System die Ausbildung komplexer regulatorischer Netzwerke, die für die Koordination zellulärer Prozesse essentiell sind.

Das zentrale Element aller GTPasen ist die G-Domäne, deren Faltung beim Vergleich verschiedener Proteine kaum Variabilität zeigt (Sprang, 1997). Sie umfasst etwa 200 Aminosäuren und besteht aus einem zentralen sechssträngigem β -Faltblatt, das von α -Helices umgeben

ist (Jurnak, 1985; la Cour *et al.*, 1985). Trotz des hohen Grads an struktureller Übereinstimmung sind die Sequenzen der G-Domänen verschiedener GTPasen sehr variabel. Sie weisen jedoch drei stark konservierte Motive (G1, G3 und G4) auf, die in definierten Abständen zueinander angeordnet sind und als Signatur der G-Protein-Superfamilie dienen (Dever *et al.*, 1987). Zwei weitere Motive (G2 und G5) sind schwächer konserviert und nur bei Vertretern der gleichen GTPase-Unterfamilie identisch. Die invariablen Bereiche entsprechen Loop-Regionen in der 3D-Struktur von G-Domänen, die für die Ausbildung der GTP-Bindetasche verantwortlich sind (Abbildung 5). Die Motive G1 (GXXXXGK[S/T]) und G3 (DXXG) sind mit den Walker A und B Motiven (Walker *et al.*, 1982) identisch, die auch bei vielen nukleotidbindenden Proteinen, die keine explizite G-Domäne besitzen, vorhanden sind. Sie sind für die Koordination des α - und β -Phosphats von GTP bzw. die Quervernetzung der Regionen, die mit Mg^{2+} und dem γ -Phosphat von GTP interagieren, zuständig. Das Ringsystem des gebundenen Nukleotids wird unter anderem vom G4-Motiv (NKXD) erkannt. Das variable G2-Motiv enthält einen konservierten Threonin-Rest, der an der Bindung des Mg^{2+} -Kofaktors beteiligt ist. Es spielt zudem eine Rolle für die Interaktion mit Effektoren und wird daher auch als Effektor-Loop bezeichnet. Die G5-Box ([T/G][C/S]A) nimmt in der Regel keinen direkten Kontakt zum Liganden auf und trägt zur Stabilisierung der GTP-Bindetasche bei.

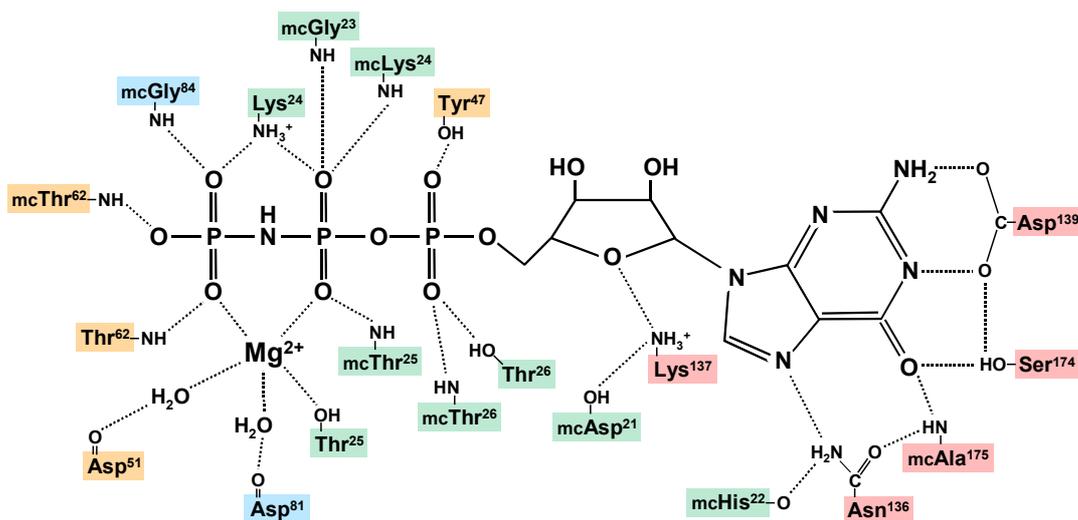


Abbildung 5. Koordination von GDPNP durch EF-Tu aus *Thermus thermophilus*. Aminosäure-Reste sind entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den Motiven G1 (grün), G2 (orange), G3 (blau) und G4 (rot) farbig hinterlegt und bei Kontakten zum Proteinrückgrat durch den Zusatz „mc“ gekennzeichnet. Wasserstoffbrücken-Bindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Das Schema basiert auf der Kristallstruktur von EF-Tu-GDPNP aus *Thermus thermophilus* (Berchtold *et al.*, 1993).

Die Hydrolyse von GTP entzieht dem G2- und G3-Loop die Koordinationssphären des Mg^{2+} -Kofaktors und des γ -Phosphats, was zu einer Reorientierung dieser Elemente und in der Folge zu einer signifikanten Konformationsänderung der gesamten G-Domäne führt (Berchtold *et al.*, 1993). Diese wird häufig durch nachfolgende Strukturumlagerungen in anderen Domänen des Proteins erheblich verstärkt und wirkt sich so auf die strukturellen Eigenschaften des gesamten Moleküls aus.

Der Mechanismus der Hydrolysereaktion konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Durch Isotopenmarkierung wurde jedoch gezeigt, dass die Spaltung der Phosphodiester-Bindung über einen S_N2 -Mechanismus erfolgt. Das γ -Phosphat wird dabei nach Ausbildung eines pentakovalenten Übergangszustandes unter Inversion der Konfiguration am Phosphor direkt auf H_2O übertragen (Eccleston und Webb, 1982; Feuerstein *et al.*, 1989).

Die universelle Konservierung der G-Domäne spricht für einen gemeinsamen Ursprung der GTPasen. Die meisten ihrer Vertreter, die Orthologe in allen drei Organismenreichen besitzen, übernehmen Aufgaben in der Translation und im Transport von Proteinen (Leipe *et al.*, 2002). Ein typisches Merkmal für diese Proteine ist ihre Interaktion mit RNA-Molekülen (tRNA, mRNA, rRNA) oder Ribonukleinsäurepartikeln (Ribosom, SRP), die als Relikte einer RNA-katalysierten Welt angesehen werden (Jeffares *et al.*, 1998). Sie entwickelten sich daher vermutlich sehr früh in der Evolution und dienten ursprünglich als Chaperone, die die Struktur von Ribozymen stabilisierten. Erst im Lauf der Evolution übernahmen sie dann sukzessive regulatorische und katalytische Aufgaben.

3. GTPasen des bakteriellen Translationsapparats

Der Vergleich von Genomsequenzen zeigte, dass nur elf GTPasen existieren, die in allen bakteriellen Organismen vorkommen (Caldon *et al.*, 2001). Zu diesen gehören neben den Komponenten des SRP-Sekretionswegs (FtsY, Ffh) und einer Reihe von Proteinen mit noch weitgehend unbekannter Funktion (LepA, Era, Obg, ThdF, EngA, YchF) die Translationsfaktoren IF2, EF-Tu und EF-G, die zu einer eigenen GTPase-Unterfamilie zusammengefasst werden und essentielle Funktionen in der Protein-Biosynthese erfüllen. Zur selben Unterfamilie werden auch der für Selenocystein spezifische Elongationsfaktor SelB und der Terminationsfaktor 3 (RF3) gerechnet, die allerdings nur eine beschränkte Verbreitung aufweisen.

Initiationsfaktor 2

IF2 katalysiert zusammen mit IF1 und IF3 die Assemblierung eines funktionellen 70S-Komplexes am Startkodon einer mRNA (Gualerzi *et al.*, 2000). Durch limitierte Proteolyse konnte gezeigt werden, dass das Protein aus drei Domänen aufgebaut ist (Gualerzi *et al.*, 1991). Die N-terminale Region ist in ihrer Sequenz und Länge nicht konserviert und ihre Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Möglicherweise stimuliert sie aber die Interaktion von IF2 mit der 30S- und 50S-Untereinheit des Ribosoms (Moreno *et al.*, 1999). Der zentrale Teil umfasst die G-Domäne (Vachon *et al.*, 1990) sowie die Bindestelle für die 50S-Untereinheit und er weist in isolierter Form eine Restaffinität für die 30S-Untereinheit auf (Gualerzi *et al.*, 1991). Die C-terminale Region setzt sich aus zwei Subdomänen zusammen, von denen die zweite alle Determinanten besitzt, die für die Erkennung und Bindung von Formylmethionyl-tRNA^{fMet} nötig sind (Guenneugues *et al.*, 2000). Die Affinität von IF2 zur Initiator-tRNA wird dabei nicht vom Nukleotidstatus der G-Domäne beeinflusst (Petersen *et al.*, 1979).

Die Initiation der Proteinsynthese verläuft in mehreren Schritten, die zur Assoziation der ribosomalen 30S-Untereinheit mit der mRNA, der Initiator-tRNA und den drei Initiationsfaktoren führen. IF1 interagiert mit der A-Site des Ribosoms und verhindert möglicherweise die frühzeitige Bindung von Aminoacyl-tRNA (Brock *et al.*, 1998). Es stimuliert zudem die Bindung von IF2 (Zucker und Hershey, 1986) und ist an der nachfolgenden Assoziation der ribosomalen Untereinheiten beteiligt (van der Hofstad *et al.*, 1978). Die Rekrutierung der Initiator-tRNA an die Peptidyl-tRNA-Bindestelle erfolgt durch IF2, während IF3 für eine Destabilisierung von aberranten Initiationskomplexen sorgt (Hartz *et al.*, 1989; La Teana *et al.*, 1993). Da die Interaktion von IF2 mit Formylmethionyl-tRNA^{fMet} nicht von der Gegenwart der ribosomalen 30S-Untereinheit abhängig ist (Petersen *et al.*, 1979), interagiert der Faktor möglicherweise in freier Form mit seinem Liganden und transportiert diesen zum Initiationskomplex. Ein alternatives Modell nimmt dagegen an, dass IF2 bereits vor seiner Assoziation mit der Initiator-tRNA an die 30S-Untereinheit bindet und erst im Komplex mit dieser aktiv wird (Gualerzi und Wintermeyer, 1986). In einem zweiten Schritt kommt es zur Anlagerung der 50S-Untereinheit, die zur Freisetzung von IF1 sowie IF3 und zur Induktion der GTP-Hydrolyse durch IF2 führt. Nach der anschließenden Freisetzung von IF2 wird der Akzeptor-Arm von Formylmethionyl-tRNA^{fMet} im Peptidyltransferase-Zentrum des Ribosoms positioniert und der 70S-Komplex dadurch in einen Zustand versetzt, der seine Interaktion mit Mediatoren der Elongationsreaktion zulässt (Gualerzi *et al.*, 2000).

Die Rolle der GTPase-Aktivität von IF2 ist noch weitgehend ungeklärt, da sowohl die Bildung des 30S-Initiationskomplexes als auch die Assoziation der 50S-Untereinheit und die Dissoziation von IF2 beim Übergang von der Initiations- in die Elongationsphase in Abwesenheit von GTP mit identischer Effizienz erfolgen.

Elongationsfaktor Tu

EF-Tu vermittelt die Interaktion von kanonischen Aminoacyl-tRNAs mit dem Ribosom. Er interagiert jedoch nicht mit aminoacylierten Formen von tRNA^{Sec} (Baron und Böck, 1991) und tRNA^{fMet} (Fischer *et al.*, 1985). Die Kristallstruktur des Proteins, die im binären Komplex mit GDP (Song *et al.*, 1999) sowie GDPNP (Berchtold *et al.*, 1993; Kjeldgaard *et al.*, 1993) und im ternären Komplex mit GDPNP und Phenylalanyl-tRNA^{Phe} (Nissen *et al.*, 1995) gelöst wurde, lässt eine Untergliederung in drei Domänen erkennen: Die N-terminale Region weist die typischen Struktur motive einer G-Domäne auf. In der GTP-Form stellt sie Kontakt zur kleinen und großen Furche der gebundenen tRNA her und bildet zusammen mit Domäne 2 die Bindetasche für das 3'-CCA-Ende sowie den Aminoacyl-Rest aus. Der 5'-Terminus der tRNA wird durch Reste von Domäne 1 und 3 komplexiert. Abgesehen von Kontakten mit den beiden Enden der tRNA tragen vor allem noch Interaktionen von EF-Tu mit dem T-Stamm zur Stabilisierung des Komplexes bei. Diese werden ausschließlich durch Komponenten von Domäne 3 vermittelt. Viele der Reste von Domäne 1, die an der Bindung der tRNA beteiligt sind, sind in den GTPase-Motiven G2 (Switch I) und G3 (Switch II) lokalisiert. Diese nehmen nach Hydrolyse von GTP stark veränderte Konformationen an und induzieren dadurch ein Rearrangement des gesamten Moleküls. Die Domänen 2 und 3 rotieren hierbei um 90° relativ zu Domäne 1, was zu einer vollständigen Maskierung der Aminoacyl-tRNA-Bindetasche führt.

Die Funktion von EF-Tu beruht auf einer zyklischen Modulation seiner Affinität für Aminoacyl-tRNAs (Abbildung 6). In der GTP-Form bildet das Protein mit seinen tRNA-Liganden Komplexe (*Schritt I*) mit Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich (Ott *et al.*, 1989) und einer Konformation, die eine Interaktion mit der A-Site des Ribosoms ermöglicht. Nach ihrer Assoziation entscheidet der Grad der Komplementarität von Kodon und Antikodon über den weiteren Verlauf der Reaktion (Rodnina *et al.*, 2000). Ist keine oder nur eine unvollständige Basenpaarung möglich, dann diffundiert der ternäre Komplex unmittelbar wieder vom Ribosom ab. Bei Paarung aller drei Basen des Antikodons kommt es dagegen zu einer Stabilisierung der Interaktion, deren Grundlage allerdings noch unklar ist (*Schritt II*). Footprint- und Mutationsanalysen deuten auf Konformationsänderungen in der ribosomalen 30S- (Lodmell und Dahlberg, 1997) und 50S-Untereinheit (Moazed *et al.*, 1988; Tapprich und Dahlberg, 1990) hin,

die zu einer Umstrukturierung der Bindestelle von EF-Tu führen könnten. Ein anderes Modell geht jedoch davon aus, dass die Kodon-Antikodon-Paarung zu einer Veränderung der tRNA-Struktur führt, die sich direkt auf die Konformation von EF-Tu auswirkt (Yarus und Smith, 1995).

Die intrinsische GTPase-Aktivität von EF-Tu ist mit einer Umsatzrate von $10^{-4} - 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ sehr niedrig (Parmeggiani und Sander, 1981). Durch die Stabilisierung des ternären Komplexes in der A-Site geht das Protein aber in einen aktivierten Zustand über, der die Hydrolyserate auf 500 s^{-1} ansteigen lässt (Pape *et al.*, 1998). Nach Spaltung von GTP und Freisetzung von P_i nimmt EF-Tu die GDP-Konformation an, die sich durch eine geringe Affinität für Aminoacyl-tRNAs auszeichnet (Pingoud *et al.*, 1982). Diese Umlagerung führt zur Freisetzung der Aminoacyl-tRNA (*Schritt III*), so dass diese nach ihrer Akkomodation an die A-Site in die Peptidyltransferase-Reaktion eintreten kann, während EF-Tu·GDP vom Ribosom abdissoziiert (Pape *et al.*, 1998).

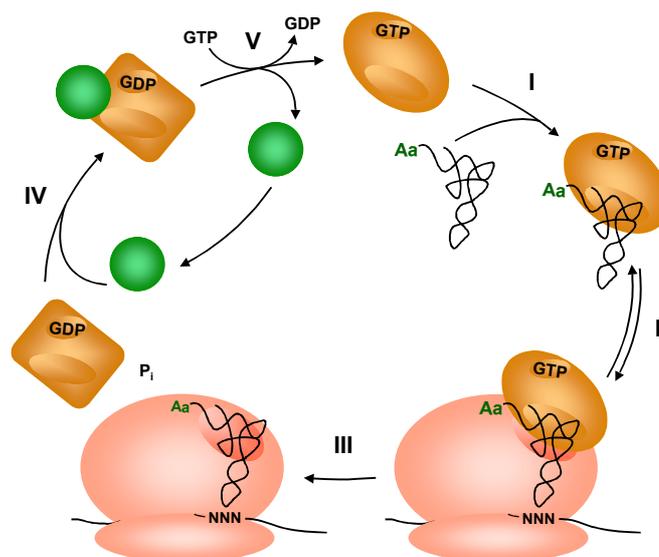


Abbildung 6. Reaktionszyklus von EF-Tu. Eine Beschreibung der Abbildung wird im begleitenden Text gegeben. Farbkodierung: orange, SelB; rot, Ribosom; grün, EF-Ts.

EF-Tu aus *E. coli* weist für GDP und GTP weitgehend identische Affinitäten auf ($K_D \sim 1 \text{ nM}$). Da die intrazelluläre Konzentration von GTP die von GDP weit übertrifft (Neuhard und Nygaard, 1987), könnte der für die Reaktivierung des Proteins nötige Nukleotidaustausch daher grundsätzlich spontan ablaufen. Auf Grund der niedrigen Dissoziationsgeschwindigkeit ($k_{dis} = 0,002 \text{ s}^{-1}$) von GDP würde die Äquilibrierung allerdings viel zu lange dauern, um die für Bakterien typische Protein-Syntheserate von zehn Aminosäuren pro Sekunde aufrecht erhalten zu

können. EF-Tu besitzt daher einen spezifischen Nukleotid-Austauschfaktor (EF-Ts), der durch seine Bindung (*Schritt IV*) die Struktur der G-Domäne verändert und so die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von GDP auf 125 s^{-1} erhöht, wodurch eine rasche Einstellung des Gleichgewichts (*Schritt V*) ermöglicht wird (Gromadski *et al.*, 2002).

Elongationsfaktor G

EF-G katalysiert die Translokation des Ribosoms, mit der nach der Peptidyltransferase-Reaktion die deacylierte tRNA freigesetzt und die neugebildete Peptidyl-tRNA in die P-Site überführt wird. Seine Struktur, die bisher nur im nukleotidfreien Zustand (AEvarsson *et al.*, 1994) und im Komplex mit GDP (Czworkowski *et al.*, 1994; al-Karadaghi *et al.*, 1996) gelöst wurde, weist eine große Ähnlichkeit zur Struktur des ternären EF-Tu·GDPNP·Phe-tRNA^{Phe}-Komplexes auf. Dieses als „Molecular Mimicry“ bezeichnete Phänomen deutet darauf hin, dass beide Faktoren in bestimmten Phasen des katalytischen Prozesses in ähnlicher Weise mit dem Ribosom interagieren (Nissen *et al.*, 1997). EF-G ist aus insgesamt fünf Domänen aufgebaut. Die G-Domäne nimmt wie bei EF-Tu eine N-terminale Position ein, weicht jedoch von der Konsensus-Struktur durch die Insertion einer 90 Aminosäuren langen Subdomäne, deren Funktion noch nicht geklärt wurde, ab. Die Faltung von Domäne 2 erinnert an Domäne 2 von EF-Tu und an die C-terminalen Domäne von IF2. Die übrigen drei Domänen ahmen in ihrer Form, ihrer räumlichen Anordnung und der Verteilung ihrer negativen Ladungen den Antikodon-Arm von Aminoacyl-tRNA im ternären Komplex mit EF-Tu und GTP nach und weisen strukturelle Ähnlichkeit zu den ribosomalen Proteinen S6 (Domäne 3 und 5) und S5 (Domäne 4) auf. Mit Hilfe von Kleinwinkel-Röntgenstreuung wurde gezeigt, dass diese für EF-G·GDP typische Konformation auch nach Bindung von GTP weitgehend erhalten bleibt (Czworkowski und Moore, 1997).

Das Ribosom liegt nach dem Peptidyltransfer in einem Hybridzustand vor, in dem sich die Akzeptor-Enden der Peptidyl-tRNA und der deacylierten tRNA bereits in der P- bzw. E-Site befinden, während die Antikodon-Enden noch in der A- bzw. P-Site lokalisiert sind (Moazed und Noller, 1989b; Moazed und Noller, 1989a). Die anschließende Translokation kann mit sehr geringer Rate allein durch Brown'sche Bewegung erfolgen. Durch die Aktivität von EF-G wird jedoch eine starke Beschleunigung der Reaktion erreicht, die für die Aufrechterhaltung hoher Protein-Biosyntheseraten essentiell ist (Spirin, 1985). Die Affinität von EF-G für den Prätranslokations-Komplex ist unabhängig von der Art des gebundenen Nukleotids und es wurde gezeigt, dass auch die GDP-Form eine signifikante katalytische Wirkung zeigt. Maximale Translokationsraten werden jedoch nur nach der Hydrolyse von GTP erreicht, die unmittelbar

nach Assoziation von EF-G·GTP induziert wird (Rodnina *et al.*, 1997). Diese führt nach Freisetzung von P_i zu einer Konformationsänderung in der G-Domäne, die sich auf die anderen Domänen des Moleküls fortsetzt und über Kontakte von Domäne 4 mit der S4-Binderegion der ribosomalen 30S-Untereinheit indirekt strukturelle Veränderungen in der Dekodierungsregion der 16S-rRNA einleitet (Rodnina *et al.*, 1999). Es kommt in der Folge vermutlich sowohl in der A- als auch in der P-Site zu einer Destabilisierung der 16S-rRNA·Kodon·Antikodon-Komplexe, die zusammen mit Konformationsänderungen in anderen Bereichen der 30S-Untereinheit die Aktivierungsenergie der Translokation deutlich verringert. Nach dem spontanen Übergang der deacylierten tRNA und der Peptidyl-tRNA in ihre Posttranslokations-Positionen inseriert Domäne 4 von EF-G, die ein Strukturhomolog der Antikodon-Region von tRNAs darstellt, in die A-Site des Ribosoms und verhindert so eine Rückreaktion, solange sich das Ribosom in dem entkoppelten Übergangszustand befindet (Agrawal *et al.*, 1998). Die ursprünglichen Kontakte von EF-G mit der 30S-Untereinheit gehen dabei verloren, so dass das Ribosom in seinen Grundzustand zurückkehrt und einen stabilen Komplex mit der Peptidyl-tRNA ausbildet. Die deacylierte tRNA wird daraufhin freigesetzt und EF-G nimmt seine GDP-Konformation an, die es ihm ermöglicht, nach Interaktion mit der 50S-Untereinheit vom Ribosom abzu dissoziieren (Agrawal *et al.*, 1998; Agrawal *et al.*, 1999; Ban *et al.*, 1999).

Terminationsfaktor 3

Die letzte Partialreaktion der Protein-Biosynthese besteht in der Hydrolyse der Esterbindung der Peptidyl-tRNA und der Freisetzung des gebildeten Proteins. Sie wird durch ein Stopp-Kodon in der A-Site eines Posttranslokations-Komplexes eingeleitet und beruht auf der Assoziation der Terminationsfaktoren RF1 oder RF2 (Klasse I), die spezifisch die Kodons UAA und UAG bzw. UAA und UGA erkennen (Scolnick *et al.*, 1968). Die Sequenz beider Proteine weist Ähnlichkeit zur Sequenz der Domänen 3-5 von EF-G auf. Da diese als molekulares Mimikry einer tRNA angesehen werden (Nissen *et al.*, 1997), könnten Terminationsfaktoren mit der ribosomalen A-Site ähnliche Kontakte wie Aminoacyl-tRNAs ausbilden (Ito *et al.*, 1996). Mutationsanalysen zeigten in Übereinstimmung mit dieser Hypothese, dass die Kodon-Spezifität von RF1 und RF2 nur durch die Sequenz eines Tripeptids bestimmt wird, das als Analogon zum Antikodon von tRNA angesehen wird (Ito *et al.*, 2000). Auch die Kristallstruktur von RF2 erinnert an die typische L-Form von tRNA-Molekülen. Sie zeigt aber auch, dass das postulierte Tripeptid-Antikodon nicht in einer Region des Proteins liegt, die als Strukturhomolog der Antikodon-Region von tRNA in Frage kommt (Vestergaard *et al.*, 2001). Der exakte Mechanismus der Stoppkodon-Erkennung bleibt daher unklar.

Die Dissoziation von RF1 und RF2, die nach Freisetzung des Polypeptids mit geringer Rate auch spontan erfolgt, wird durch den Terminationsfaktor RF3 (Klasse II) erheblich stimuliert (Freistroffer *et al.*, 1997). Das Protein, dessen Aktivität nicht essentiell ist (Grentzmann *et al.*, 1994), weist in seiner Sequenz die für G-Domänen typischen Motive auf (Laalami *et al.*, 1996) und interagiert mit Guanosin-Nukleotiden. Da seine Affinität für GDP um drei Größenordnungen höher liegt als für GTP, findet nach Beendigung eines Reaktionszyklus kein spontaner Austausch des Nukleotids statt. Im Gegensatz zu anderen Translationsfaktoren interagiert RF3 jedoch in der GDP-Form mit seinen ribosomalen Zielstrukturen (Zavialov *et al.*, 2001). Unmittelbar nach Assoziation mit dem Terminationskomplex, der als Nukleotid-Austauschfaktor von RF3 fungiert, kommt es zur Freisetzung von GDP und zur Bildung eines stabilen, nukleotidfreien Komplexes aus RF3 und dem in der A-Site gebundenen Terminationsfaktor (Freistroffer *et al.*, 1997; Pel *et al.*, 1998). Diese Interaktion ermöglicht RF3 die Bindung von GTP, welche eine Konformationsänderung des Proteins induziert und zur Freisetzung von RF1 bzw. RF2 führt. Der Terminationsfaktor RF3 bleibt jedoch weiter stabil an das Ribosom gebunden und geht erst nach Hydrolyse des Nukleotids wieder in seine Ausgangsform über, die eine niedrige Affinität für die unbesetzte A-Site aufweist und vom Ribosom abdissoziieren kann.

Das Recycling des Postterminations-Komplexes wird anschließend durch die Bindung von RRF (ribosome recycling factor) in die A-Site eingeleitet (Hirokawa *et al.*, 2002). Dieses Protein besitzt eine große strukturelle Ähnlichkeit zu tRNA-Molekülen (Selmer *et al.*, 1999) und katalysiert zusammen mit EF-G die Dissoziation des 70S-Ribosoms in die 30S- und 50S-Untereinheiten. Der resultierende 30S·mRNA·tRNA-Komplex wird anschließend unter Mitwirkung von IF3 aufgelöst, so dass die 30S-Untereinheit wieder für eine neue Initiationsreaktion zur Verfügung steht (Karimi *et al.*, 1999).

Elongationsfaktor SelB

Der Elongationsfaktor SelB wurde bisher in einer Reihe verschiedener Bakteriengattungen nachgewiesen (Kromayer *et al.*, 1996). Seine N-terminale Region (AS 1 – 342) ist homolog zu EF-Tu und ein Strukturmodell auf Grundlage der Koordinaten von EF-Tu aus *Thermus thermophilus* zeigt, dass sie sich ebenfalls in drei Domänen mit vermutlich identischer Funktion falten lässt (Hilgenfeld *et al.*, 1996).

SelB weist jedoch fünf charakteristische Deletionen auf (Abbildung 7), die vor allem die Struktur der G-Domäne signifikant beeinflussen. So ist sein N-terminales Ende um elf Aminosäuren verkürzt, was zu einer Labilisierung der Interaktion zwischen den Domänen 1 und 2 führt und

zusammen mit dem Fehlen von Teilen des Effektor-Loops eine Öffnung der Aminoacyl-Bindetasche bewirkt. Viele Bereiche der G-Domäne, die in EF-Tu als Kontaktstellen für EF-Ts dienen, sind in SelB nicht vorhanden, so dass vermutlich keine Interaktion mit diesem Nukleotid-Austauschfaktor stattfindet. Die Architektur der Nukleotid-Bindetasche von SelB stimmt weitgehend mit der von EF-Tu überein. Auf Grund der Deletion der G5-Region, die in EF-Tu eine hydrophobe Interaktion mit dem Guanin-Ringsystem eingeht, kann aber eine Veränderung der Nukleotid-Bindeeigenschaften von SelB erwartet werden.

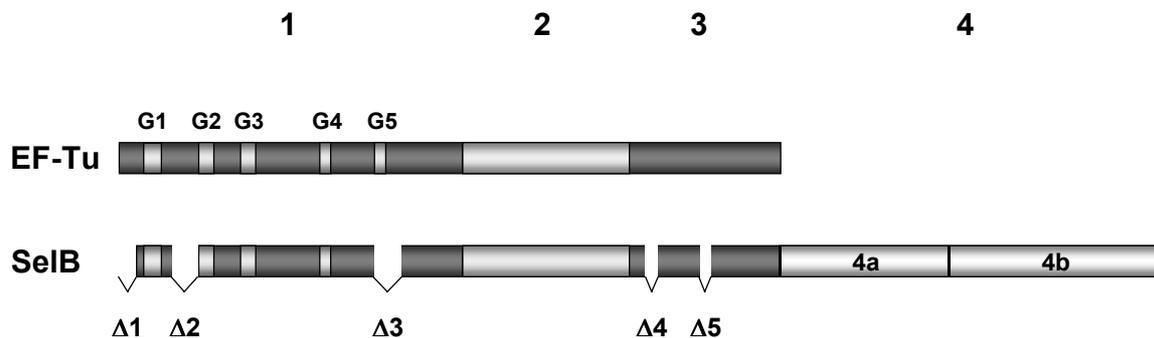


Abbildung 7. Vergleich der Primärstrukturen von EF-Tu und SelB. Die Nummerierung der einzelnen Domänen und die Position der GTPase-Motive G1 – G5 ist angegeben. Die charakteristischen Deletionen in SelB sind durch Klammern gekennzeichnet (Hilgenfeld *et al.*, 1996).

SelB unterscheidet sich von EF-Tu durch eine C-terminale Extension von 272 Aminosäuren (Domäne 4), die keine Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen aufweist und auch unter bakteriellen SelB-Homologen nur schwach konserviert ist. Biochemische und genetische Untersuchungen zeigten, dass sie sich in zwei Regionen mit unterschiedlicher Funktion unterteilen lässt: Die C-terminale Domäne 4b umfasst alle Determinanten, die für eine spezifische Bindung des SECIS-Elements nötig sind, und bildet auch in isolierter Form stabile Komplexe mit seinem Liganden aus (Kromayer *et al.*, 1996). Die Funktion von Domäne 4a ist dagegen noch weitgehend ungeklärt. Mutationsanalysen deuten jedoch auf eine Rolle in der Regulation der SECIS-Bindung hin (Kromayer *et al.*, 1999).

Die Kristallstruktur der Domäne 4 von SelB aus *Moorella thermoacetica* (Abbildung 8) lässt einen Aufbau aus vier Subdomänen erkennen, die trotz ihrer vollkommen unterschiedlichen Sequenzen eine fast identische Tertiärstruktur aufweisen (Selmer und Su, 2002). Die Subdomänen I und II bzw. III und IV bilden dabei kompakte Einheiten, die den funktionellen Domänen 4a und 4b entsprechen und über einen flexiblen Loop miteinander verbunden sind. Eine eindeutige Definition der Regionen, die für die Interaktion mit dem SECIS-Element

verantwortlich sind, war bisher nicht möglich. Mutationen, die einen Einfluss auf die Spezifität der Ligandenbindung ausüben, sind jedoch überwiegend in Subdomäne IV lokalisiert (Kromayer *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000).

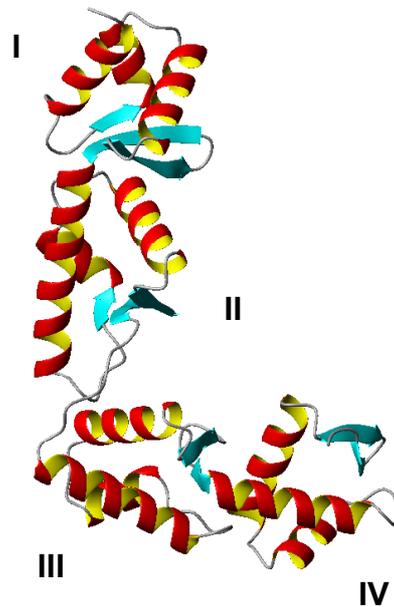


Abbildung 8. Struktur der Domäne 4 von SelB aus *Moorella thermoacetica*. Römische Ziffern bezeichnen die einzelnen Subdomänen des Moleküls (Selmer und Su, 2002).

Die biochemischen Eigenschaften von SelB und EF-Tu weisen trotz der partiellen Homologie beider Proteine signifikante Unterschiede auf. So liegen die Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von SelB mit GDP ($K_D = 10 \mu\text{M}$) und GTP ($K_D = 1,7 \mu\text{M}$) im mikromolaren Bereich und somit um drei Größenordnungen höher als bei EF-Tu (Forchhammer *et al.*, 1989). SelB interagiert zudem ausschließlich mit Selenocysteyl-tRNA^{Sec}, während dessen serylierte Vorstufe und alle kanonischen Aminoacyl-tRNA-Spezies, die das Substrat von EF-Tu darstellen, nicht erkannt werden (Forchhammer *et al.*, 1989; Baron und Böck, 1991). Die Komplexierung von mRNA stellt eine Eigenschaft von SelB dar, die EF-Tu völlig fehlt. Es wurde gezeigt, dass die Assoziation des SECIS-Elements zu einer Stabilisierung des SelB·GTP·Sec-tRNA^{Sec}-Komplexes führt (Baron *et al.*, 1993a), was für eine Interaktion zwischen Domäne 4 und dem N-terminalen Teil von SelB spricht. Die Affinität von EF-Tu für Aminoacyl-tRNA wird dagegen allein durch den Nukleotid-Status der G-Domäne reguliert. Im Gegensatz zu EF-Tu nimmt SelB schließlich nicht schon nach Bildung eines ternären Komplexes mit GTP und tRNA, sondern erst nach der zusätzlichen Assoziation des SECIS-Elements eine Konformation an, die seine Interaktion mit der ribosomalen A-Site ermöglicht (Hüttenhofer *et al.*, 1996a).

4. Ziele dieser Arbeit

Über die molekularen Mechanismen, die der Aktivität von SelB zu Grunde liegen, war zu Beginn dieser Arbeit noch wenig bekannt. Das galt insbesondere auch für die Fähigkeit des Proteins zur spezifischen Erkennung des Aminoacyl-Rests von tRNA^{Sec}, die eine elementare Voraussetzung für die Zuverlässigkeit des Selenocystein inkorporierenden Systems darstellt. Die Determinanten dieser Selektivität sollten daher durch Mutationsanalyse von SelB identifiziert und in ihrer Funktion charakterisiert werden.

Voraussetzung für ein generelles Verständnis der Funktion von SelB war ferner eine detaillierte biochemische Analyse der Interaktion von SelB mit seinen Liganden und der gegenseitigen Beeinflussung der drei Liganden-Bindestellen untereinander. Diese sollte einen Einblick in die Konformationsänderungen erlauben, die mit der Assemblierung des quaternären Komplexes verbunden sind und letztlich die Interaktion von SelB mit dem Ribosom ermöglichen.

SECIS-Elemente liegen in Bakterien generell innerhalb des Leserahmens von Selenoprotein-Genen. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine SECIS-ähnliche Sekundärstruktur in der 5'-untranslatierten Region des *selAB*-Transkripts identifiziert. Eine Analyse ihrer Interaktion mit SelB sowie der daraus resultierenden Effekte auf die Expression des *selAB*-Operons sollte zur Klärung ihrer Funktion beitragen.

Material und Methoden

1. Stämme und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind mit ihrem Genotyp und der zugehörigen Referenz in Tabelle 1 aufgeführt. Es handelt sich dabei mit Ausnahme von BL21(DE3) ausschließlich um Derivate von *E. coli* K-12. Alle Plasmide, die im Laufe dieser Arbeit eingesetzt bzw. konstruiert wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet, alle Phagen in Tabelle 3.

TABELLE 1. Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>hsdS</i> , <i>gal</i> , λDE3	Studier und Moffat, 1986
JM109	F' [<i>traD36</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , Δ(<i>lacZ</i>)M15], <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), e14 ⁻ , λ ⁻	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
JM109(DE3)	JM109, λDE3	Promega
DH5α	F ⁻ , <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>glnV44</i> , <i>deoR</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, [Φ80dΔ(<i>lacZ</i>)M15]	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
XL1-Blue MRF'	F' [<i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , Δ(<i>lacZ</i>)M15 Tn5 (Kn ^R)], <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> , Δ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR-mrr</i>)173	Stratagene
WA321	F ⁻ , <i>thr-1</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , Δ(<i>gpt-proA</i>)62, <i>lacY1</i> , <i>tsx-33</i> , <i>supE44</i> , <i>galK2</i> , <i>rac</i> ⁻ , <i>hisG4</i> , <i>rfbD1</i> , <i>mgl-51</i> , <i>rpsL31</i> , <i>kdgK51</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl</i> - <i>1</i> , <i>argE3</i> , <i>thi-1</i> , λ ⁻ , <i>dam-4</i>	Dreiseikelmann <i>et al.</i> , 1979
CSH26	F ⁻ , Δ(<i>lac proAB</i>), <i>thi</i> , <i>ara</i>	Miller, 1972
KL19	Hfr, PO67, λ ⁺	Low, 1968
MC4100	F ⁻ , <i>araD193</i> , Δ(<i>argF-lac</i>)U169, <i>ptsF25</i> , <i>relA1</i> , <i>deoC1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>rpsL150</i> , λ ⁻	Casadaban und Cohen, 1979
PT90422	F ⁻ , <i>araD139</i> , Δ(<i>argF-lac</i>)U169, <i>ptsF25</i> , <i>deoC1</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>rpsE</i> ⁺ , <i>strA1</i>	P. Tormay, unveröffentlicht
MTA1	PT90422, Δ <i>selA</i>	diese Arbeit
MTA2	PT90422, Δ <i>selC</i>	diese Arbeit
MTA3	PT90422, Δ <i>selB</i>	diese Arbeit
MTA12	PT90422, Δ <i>selA</i> , Δ <i>selC</i>	diese Arbeit
AF90422	PT90422, Δ(<i>selAB</i>)	A. Friebel, unveröffentlicht
MTA123	PT90422, Δ(<i>selAB</i>), Δ <i>selC</i>	diese Arbeit

Fortsetzung von TABELLE 1.

PT91300	PT90422, Φ (<i>srl-recA</i>)::Tn10, Δ <i>selB300</i> :: <i>kan</i>	Tormay <i>et al.</i> , 1996
FM460	MC4100, Δ <i>selC400</i> :: <i>neo</i>	Sawers <i>et al.</i> , 1991
WL400	MC4100, Δ <i>selD204</i> :: <i>cat</i>	Leinfelder <i>et al.</i> , 1990
EMG29 (NCIB 10241)	F ⁻ , <i>proC23</i> , <i>trp-30</i> , <i>his-51</i> , <i>lac-28</i> , <i>rpsL101</i> , λ^+	NCIB
GY01	EMG29, <i>selA160</i>	Mandrand-Berthelot <i>et al.</i> , 1978
MB08	EMG29, <i>selD165</i>	Graham, 1980

TABELLE 2. Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pUBS520	ColE1 <i>ori</i> , Km ^R , <i>lacI^q</i> , <i>dnaY</i>	Brinkmann <i>et al.</i> , 1989
pUC19	ColE1 <i>ori</i> , Ap ^R , <i>lac'IPOZ'</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUKB	ColE1 <i>ori</i> , Km ^R , <i>lac'IPOZ'</i>	Neuhierl <i>et al.</i> , 1999
pACYC184	p15 <i>ori</i> , Cm ^R , Tc ^R	Chang und Cohen, 1978
pT7-7	ColE1 <i>ori</i> , Ap ^R , T7 Φ 10, Ribosomen-Bindestelle	Tabor und Richardson, 1985
pKO3	pSC101 ^{ts} <i>ori</i> , Cm ^R , <i>sacB</i>	Link <i>et al.</i> , 1997
pRS551	ColE1 <i>ori</i> , Km ^R , Ap ^R , <i>lacZYA</i>	Simons <i>et al.</i> , 1987
pRS552	ColE1 <i>ori</i> , Km ^R , Ap ^R , <i>lac'ZYA</i>	Simons <i>et al.</i> , 1987
pMT7	p15A <i>ori</i> , Cm ^R , <i>tetP</i> , T7 Φ 10	diese Arbeit
pCB2013	pUC19-Derivat, Ap ^R , <i>selC</i>	Baron und Böck, 1991
pMN340	ColE1 <i>ori</i> , Ap ^R , T7 Φ 10, <i>selD</i>	Leinfelder <i>et al.</i> , 1990
pMN73	p15A <i>ori</i> , Cm ^R , <i>selC</i>	Leinfelder <i>et al.</i> , 1988b
pSerS2	ColE1 <i>ori</i> , Ap ^R , <i>serS</i>	Härtlein <i>et al.</i> , 1987
pWT	ColE1 <i>ori</i> , Ap ^R , (<i>lacZ-fdhF</i>)42 <i>lacYA</i>	Heider <i>et al.</i> , 1992
pMB	pMT7-Derivat, Cm ^R , <i>selB_{His}</i>	diese Arbeit
pWL107	pACYC184-Derivat, Cm ^R , <i>selAB</i>	Leinfelder <i>et al.</i> , 1988a
pWL187	ColE1 <i>ori</i> , Ap ^R , T7 Φ 10, <i>selA</i>	Forchhammer <i>et al.</i> , 1991b
pWL194	ColE1 <i>ori</i> , Ap ^R , T7 Φ 10, <i>selB</i>	Forchhammer <i>et al.</i> , 1990
pMselA	pMT7-Derivat, Cm ^R , <i>selA</i>	diese Arbeit
pT7HIAS1414-1842	ColE1 <i>ori</i> , Ap ^R , T7 Φ 10, <i>selB(1414-1842)</i>	Kromayer <i>et al.</i> , 1996
pT Δ selA	pWL187-Derivat, Δ <i>selA</i>	diese Arbeit
pT7-7 _{NcoI}	pT7-7-Derivat, Ap ^R , mit ATG-Startkodon überlappende <i>NcoI</i> -Schnittstelle	Schmidt-Eisenlohr <i>et al.</i> , 2001
pT7SBD4	pT7-7 _{NcoI} -Derivat, Ap ^R , <i>selB(1135-1842)</i>	diese Arbeit

Fortsetzung von TABELLE 2.

pT7SelBH6	pWL194-Derivat, Ap ^R , Fusion von <i>selB</i> mit Sequenz für C-terminalen Hexahistidin-Tag	diese Arbeit
pUAB	pUC19-Derivat, Ap ^R , <i>selAB</i>	diese Arbeit
pUSL	pUC19-Derivat, Ap ^R , <i>selA</i> -Upstream-Region	diese Arbeit
pKΔselA	pKO3-Derivat, Cm ^R , Δ <i>selA</i>	diese Arbeit
pKΔselB	pKO3-Derivat, Cm ^R , Δ <i>selB</i>	diese Arbeit
pKΔselC	pKO3-Derivat, Cm ^R , Δ <i>selC</i>	diese Arbeit
pRL1	pRS552-Derivat, Kn ^R , Ap ^R , Φ(<i>selA</i> '-' <i>lacZ</i>), <i>lacYA</i>	diese Arbeit
pRL12	pRS552-Derivat, Kn ^R , Ap ^R , Φ(<i>selA</i> '-' <i>lacZ</i>), <i>lacYA</i> , Mutation im Loop-Bereich des SL-Elements	diese Arbeit
pRLAB	pRS552-Derivat, Kn ^R , Ap ^R , Φ(<i>selAB</i> '-' <i>lacZ</i>), <i>lacYA</i>	diese Arbeit
pRLΔAB	pRS552-Derivat, Kn ^R , Ap ^R , Φ(<i>selA</i> _{Δ(490-936)} <i>B</i> '-' <i>lacZ</i>), <i>lacYA</i>	diese Arbeit
pRC1	pRS551-Derivat, Kn ^R , Ap ^R , <i>selA</i> ', <i>lacZYA</i>	diese Arbeit
pRC12	pRS551-Derivat, Kn ^R , Ap ^R , <i>selA</i> ', <i>lacZYA</i> , Mutation im Loop-Bereich des SL-Elements	diese Arbeit
pWA	pWT-Derivat, Ap ^R , <i>fdhF</i> -SECIS Element ersetzt durch das SL-Element	diese Arbeit

TABELLE 3: Verwendete Phagen

Phage	Genotyp	Referenz
λRS45	<i>lacZYA</i> , <i>imm</i> ^{2I} , <i>ind</i> ⁺	Simons <i>et al.</i> , 1987
λRL	λRS45-Derivat, Kn ^R , <i>lacZYA</i>	diese Arbeit
λRL1	λRS45-Derivat, Kn ^R , (<i>selA</i> '-' <i>lacZ</i>), <i>lacYA</i>	diese Arbeit
λRL12	λRS45-Derivat, Kn ^R , (<i>selA</i> '-' <i>lacZ</i>), <i>lacYA</i> , Mutation im Loop-Bereich des SL-Elements	diese Arbeit
λRLAB	λRS45-Derivat, Kn ^R , (<i>selAB</i> '-' <i>lacZ</i>), <i>lacYA</i>	diese Arbeit
λRLΔAB	λRS45-Derivat, Kn ^R , (<i>selA</i> _{Δ(490-936)} <i>B</i> '-' <i>lacZ</i>), <i>lacYA</i>	diese Arbeit
λRC	λRS45-Derivat, Kn ^R , <i>lacZYA</i>	diese Arbeit
λRC1	λRS45-Derivat, Kn ^R , <i>selA</i> ', <i>lacZYA</i>	diese Arbeit
λRC12	λRS45-Derivat, Kn ^R , <i>selA</i> ', <i>lacZYA</i> , Mutation im Loop-Bereich des SL-Elements	diese Arbeit

2. Medien und Supplemente

Für die Anzucht von Bakterien und die Vermehrung von Bakteriophagen wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Nährmedien eingesetzt.

TABELLE 4. Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
2x LB-Medium	2 % Pepton, 1 % Hefeextrakt, 1 % NaCl
LB-Agar	1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 1,5 % Agar
Gastest-Medium	1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 0,8 % Glucose
MS-Agar	M9-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989), 1 % Pepton, 0,6 mM Lactose, 0,004 % X-Gal, 1,5 % Agar
TP-Medium (Heider <i>et al.</i> , 1992)	1 % Pepton, 0,5 % (v/v) Glycerol, 100 mM Kaliumphosphat (pH 7,0), 1 mM MgCl ₂ , 0,1 mM CaCl ₂ , 0,5 mM IPTG, 1 μM Natriumselenit, 0,1 % (v/v) SL-6
TP2-Medium	1 % Pepton, 0,6 % Glucose, 100 mM Kaliumphosphat (pH 7,0), 1 mM MgCl ₂ , 0,1 mM CaCl ₂ , 1 μM Natriumselenit, 0,1 % (v/v) SL-6
MacConkey-Agar	50 g/l Fertigaragar (Life Technologies, Eggenstein)

Supplemente wurden, soweit nicht anders beschrieben, in den in Tabelle 5 aufgeführten Endkonzentrationen eingesetzt.

TABELLE 5: Medienzusätze

Antibiotika:	
Ampicillin	100 μg/ml
Kanamycin	50 μg/ml
Chloramphenicol	50 μg/ml, bei Verwendung von pKO3-Derivaten: 20 μg/ml
Spurenelemente:	
SL-6 (Neidhardt <i>et al.</i> , 1974)	400 μM H ₃ BO ₃ , 30 μM CoCl ₂ , 10 μM CuSO ₄ , 10 μM ZnSO ₄ , 80 μM MnCl ₂ , 10 mM FeCl ₃
Sonstiges:	
IPTG	100 μM

3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in ihre Anwendungsgebiete untergliedert in Tabelle 6 zusammengefasst. Ihre Synthese wurde von MWG Biotech (Ebersberg), ThermoHybaid (Ulm) und Eurogentec (Köln) durchgeführt.

TABELLE 6: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
Sequenzierung:	
SSB-1	5'- TGGCGGGCGTTGGTGGTATCGATC -3'
SSB-2	5'- GCCGATGTGCCGCCAGAGCCGTTTC -3'
SSB-3	5'- GCTGGCAGCGGAAAATTCTCGACA -3'
pMT7-uni	5'- CATCGTCATCCTCGGCACCGTCAC -3'
<i>in-vitro</i> Transkription:	
T7-promoter	5'- TAATACGACTCACTATAG -3'
<i>fdnG</i> -sl	5'- GCGACCAAATGTTGGAGCAAGACTTGCTACCGTTGGTCCTATAGTGAGTC- GTATTA -3'
<i>fdhF</i> -sl	5'- GACCGATTGGTGCAGACCTGCAACCGATGGGCCTATAGTGAGTCGTATTA -3'
<i>fdnG</i> -mh	5'- GGAGCAAGACTTGCTACCTATAGTGAGTCGTATTA -3'
SLE-wt	5'- TCAAGGCCCTCTCACACGGAGAAGGGCGTTTAACATAACCTATAGTGAGT- CGTATTA -3'
SLE-aa	5'- TCAAGGCCCTCTCATATGGAGAAGGGCGTTTAACATAACCTATAGTGAGT- CGTATTA -3'
S1-Nukleaseschutz :	
S1-selA1	5'- GCTCGCCCAAGGTTGGTATGCAGCAC -3'
S1-selA2	5'- CGACCAATCACCGGCACTGGCAATTC -3'
Assemblierung von Nukleotidsequenzen:	
HisTag-1	5'- TATGCATCACCATCACCATCACTCTATCGAGGGAAGGCCTG -3'
HisTag-2	5'- AATTCAGGCCTTCCTCGATAGAGTGATGGTGGTGGTATGCA -3'
T7-MCS-1	5'- TGTATAATACGACTCACTATAGGGC -3'
T7-MCS-2	5'- CCTCGAGCTCAGATCTGTAGGCCTGCAGGTGCACGTGGTGGTACC -3'
T7-MCS-3	5'- GGTACCACCACGTGCACCTGCAGGC -3'
T7-MCS-4	5'- CTACAGATCTGAGCTCGAGGGCCCTATAGTGAGTCGTATTA -3'
TER-1	5'- TCGACATCCATGATATCTGTAGTTT -3'
TER-2	5'- TTTTCAAATAAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAG -3'

Fortsetzung von TABELLE 6.

TER-3	5'- ACTGGGCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTG -3'
TER-4	5'- GATCCGACAAACAACAGATAAAAAC -3'
TER-5	5'- GAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCT -3'
TER-6	5'- TTCGTTTTATTTGAAAAAACTAACAGATATCATGGATG -3'
SLE-uni1	5'- AGCTTTTGAATGATAAACGCCCTTCTCCGTGTGAGAG -3'
SLE-uni2	5'- GGCCTTGTTCTTTTTG -3'
SLE-rev1	5'- GATCCAAAAAGAACAAGGCCCTCTCACACGGAGAAG -3'
SLE-rev2	5'- GGCGTTTATCATTCAA -3'
PCR-Primer:	
SelBH6-uni	5'- GGAAATGATTAATTAAGTTTTAAAATA -3'
SelBH6-rev	5'- TTAGTGATGGTATGGTATGTGAAGACCTCCCTCGATTTTTCCGGAA- ATAATAATGC -3'
SelB-Y42H-uni	5'- CACGCCTACTGGCCGAG C -3'
SelB-Y42H-rev	5'- GCCGAGATCGATGGTC -3'
SelB-D180E-uni	5'- GAACGCGCATTTACCGTAAAAG -3'
SelB-R181D-uni	5'- GACGATGCATTTACCGTAAAAGGTGC -3'
SelB-DR-uni	5'- GAAGATGCATTTACCGTAAAAG -3'
SelB-DRF-rev	5'- AATCGCGAGGCGGAAACT -3'
SelB-R236N-uni	5'- CGGGCAGAACATCGCGCTTAAC -3'
SelB-R236-rev	5'- GCATTGGCGGTTTCTGTTG -3'
MSB-A416V	5'- GTCGCCCCTGGCAGCGGAAAATT -3'
MSB-A417V	5'- GCCGTCCCTGGCAGCGGAAAATTC -3'
MSB-inv2	5'- AACCGGCGCATTCAACAAGCTATAACC -3'
FSAL-1	5'- GGAATTCCTGGAAGGATATCTGGTCGATG -3'
FSAL-rev	5'- CGGGATCCGAACGCGTTTCGGTTGTCAT -3'
FSAL-4	5'- CGGGATCCACTTCTCGCGCTTCGTCG -3'
FSAL-7	5'- GCGGATCCAGGAAACCTGGCTGATCAAGGCCCTCTC -3'
FSB-1	5'- CTGAAGCGTGCATTACGC -3'
FSB-3	5'- CGTTGCATGCGGATCCCCGGCAGTCGCAATAATCA -3'
DSA-1	5'- GCCCGCTGCAAAGCCAC -3'
DSA-2	5'- GGCCGCCAACATCAATAACACC -3'
DSB-1	5'- GCGGATCCATGATTATTGCGACTGCCGGACACG -3'
DSB-2	5'- ATATACGCGTCGGCTGCGGCCAGTAGGCATAGC -3'
DSB-3	5'- GCTGGCAGCGGAAAATTCTCGACA -3'
DSB-4	5'- GAATTCGAGCTCGCC -3'
DSC-1	5'- GCATCATCAGAACAGTAGAAAGC -3'

Fortsetzung von TABELLE 6.

DSC-2	5'- GCGAATTCCGCGCCTCGATTGCTAC -3'
DSC-3	5'- GCGAATTCCAAAATGCCTCTCCTGAC -3'
DSC-4	5'- GCGGATCCGACGGGCTTTCAGTTCATC -3'

4. Chemikalien, biologisches Material und Enzyme

Die verwendeten Standardchemikalien waren generell analysenrein und wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Imidazol wurde von Merck geliefert, Ribonukleotide von Roche Biochemicals (Mannheim). Natrium-[⁷⁵Se]Selenit stammte von Amersham Biosciences (Freiburg) und vom RISØ National Laboratory (Roskilde, Dänemark), alle anderen Radiochemikalien von NEN Life Science Products (Köln). Materialien zur säulenchromatographischen Auftrennung von Proteinen wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Amersham Biosciences hergestellt.

Die Synthese der (3',5'-Dipivaloylfluoresceinyl)-6-carboxamidohexyl-markierten *fdhF*-Minihelix erfolgte durch ThermoHybaid (Ulm). Unmarkierte *fdhF*-Minihelix wurde von M. Kromayer zur Verfügung gestellt. Gesamt-tRNA aus Bäckerhefe war von Roche Biochemicals. Methylantraniloyl-markierte Guanosinnukleotide wurden freundlicherweise von R. S. Goody bereitgestellt.

Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Frankfurt), Roche Biochemicals und Promega (Mannheim) bezogen. *Pfu*-Polymerase war von Promega und MBI Fermentas, DynNAzyme II von Biometra (Göttingen). *Taq*-Polymerase, gereinigt nach Saiki *et al.* (1988), wurde von T. Maier zur Verfügung gestellt, T7-RNA-Polymerase, gereinigt nach Wyatt *et al.* (1991), von S. Leonhartsberger und SelA, gereinigt nach Forchhammer *et al.* (1991b), von P. Tormay. RNase P1 stammte von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), anorganische Pyrophosphatase aus Hefe von Sigma und Rinder-Serumalbumin von Roche Biochemicals.

5. Mikrobiologische Methoden

Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte üblicherweise in Reagenzröhrchen oder Erlenmeyer-Kolben, die zu einem Zehntel ihres Nennvolumens mit Medium gefüllt waren. Die Kulturen wurden bei 37 °C in einem Rollodrum (New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA) bzw. auf einem

Schüttler (B. Braun HT, B. Braun, Melsungen, 200 rpm) inkubiert. Für größere Anzuchten wurden 5 l-Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen verwendet, die 2 - 2,5 l Medium enthielten und bei 130 rpm auf einem Schüttler bewegt wurden. Zur Gewinnung großer Zellmengen erfolgte die Kultivierung in 12 l- und 70 l-Fermentoren (B. Braun, Melsungen), die mit 8 l bzw. 30 - 50 l Medium gefüllt waren und bei einer Temperatur von 37 °C, einer Rührergeschwindigkeit von 450 - 500 rpm und einer Belüftungsrate von 0,6 N m³ h⁻¹ betrieben wurden.

Für die Vermehrung von Bakterien auf Festmedium wurden Agar-Platten verwendet, die im Brutschrank bei 37 °C inkubiert wurden.

Bei der Anzucht von Zellen, die von pKO3 abgeleitete Plasmide mit einem temperatursensitiven Replikationsursprung enthielten, wurde die Inkubationstemperatur auf 30 °C verringert.

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigmedium wurde durch Messung der optischen Dichte der Suspension bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt.

Test auf Gasproduktion

Die bei *E. coli* unter Gärungsbedingungen zu beobachtende Bildung von H₂ und CO₂ aus Glucose wurde in Reagenzröhrchen verfolgt, die mit 10 ml Gastest-Medium gefüllt waren. Das produzierte Gasgemisch wurde in mit der Öffnung nach unten orientierten Durham-Röhrchen aufgefangen. Die Auswertung der Versuche erfolgte nach Übergang in die stationäre Wachstumsphase.

6. Genetische Methoden

Transformation

Die Transformation von *E. coli* K-12-Derivaten mit superhelikal gewundener DNA erfolgte nach der TSS-Methode (Chung *et al.*, 1989) oder nach der Methode von Inoue *et al.* (1990), falls eine hohe Transformationseffizienz erzielt werden sollte. Für Klonierungszwecke und bei Verwendung des schwer transformierbaren Stamms BL21(DE3) wurde der Transfer von DNA mittels Elektroporation (Fiedler und Wirth, 1988) bei 2000 V, 25 µF und 800 Ω durchgeführt. Die Selektion von Transformanten erfolgte auf LB-Agar, dem geeignete Antibiotika zugesetzt worden waren. Für die Propagation von Plasmiden zu Klonierungszwecken wurden die *recA*-defizienten Stämme DH5α, JM109 und XL1-Blue MRF' eingesetzt.

Homologe Rekombination

Die gezielte Einführung von Deletionen in das Genom von *E. coli* erfolgte durch homologe Rekombination nach der Methode von Link *et al.* (1997). Ein chromosomales DNA-Fragment, in das die gewünschte Mutation eingebracht worden war, wurde hierzu in den Vektor pKO3 kloniert. Dieser zeichnet sich durch einen temperatursensitiven Replikationsursprung und das *sacB*-Gen, dessen Expression für *E. coli* in Gegenwart von Saccharose im Medium letal ist, aus. Nach Transformation des resultierenden Plasmids in den Rezipientenstamm wurde bei einer Temperatur von 45 °C und in Gegenwart von Chloramphenicol auf die Ausbildung von Co-integraten selektiert. Die Auflösung der isolierten Cointegrate und die Selektion auf den Verlust des Plasmids erfolgte anschließend bei 30 °C auf LB-Platten, denen 5 % Saccharose beigefügt worden war. Erhaltene Klone wurden einmal gereinigt und anschließend mittels PCR auf das Vorliegen des gewünschten Genotyps getestet.

Genetische Manipulation und lysogene Integration von λ -Phagen

Zur Integration von Reporterkonstrukten in das Genom des Phagen λ wurde das von Simons *et al.* (1987) beschriebene Verfahren angewandt. Der regulatorische Bereich des zu untersuchenden Gens wurde dazu als Transkriptions- bzw. Translationsfusion mit dem *lacZ*-Gen in die Vektoren pRS551 bzw. pRS552 kloniert. Nach der Transformation des Stamms MC4100 (*recA*⁺) mit den resultierenden Plasmiden und nachfolgender Infektion mit λ RS45 (Silhavy *et al.*, 1984) wurden die durch die Lyse der Zellen freigesetzten Phagen isoliert. Bakteriophagen, die das Reporterkonstrukt durch homologe Rekombination in ihr Genom aufgenommen hatten, konnten durch erneute Infektion von MC4100 mit dem gewonnenen Lysat und Screening auf kanamycin-resistente, ampicillinsensitive lysogenisierte Zellen identifiziert werden. Nach dreimaliger Reinigung der erhaltenen Klone wurde durch UV-Induktion des integrierten Prophagen (Silhavy *et al.*, 1984) eine homogene Phagenlinie erhalten, die für die lysogene Infektion geeigneter Teststämme Verwendung fand. Das korrekte Vorliegen des Fusionskonstrukts auf dem Chromosom der lysogenisierten Reporterstämme wurde anschließend nach dreimaliger Reinigung der erhaltenen Klone mittels PCR und durch Plattieren auf McConkey-Agar überprüft.

7. Molekulargenetische Methoden

Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmide wurden im kleinen Maßstab aus 5 ml einer stationären Kultur in 2x LB-Medium mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid-Kits der Firma Macherey & Nagel (Düren) isoliert. Größere Präparationen erfolgten aus 60 - 100 ml einer stationären Kultur in LB-Medium unter Verwendung des NUCLEOBOND AX-Kits (Macherey & Nagel, Düren)

Isolierung von chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus *E. coli* wurde nach alkalischer Lyse der Zellen durch intensive Behandlung des Lysats mit Proteinase K und RNase sowie anschließende fraktionierte Präzipitation der erhaltenen Nukleinsäuren nach Neuhierl (1998) präpariert.

Standardmethoden

Bei der Anwendung molekularbiologischer Standardmethoden wie der Restriktion, Phosphorylierung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA wurde nach Angabe der Hersteller der verwendeten Enzyme oder nach Ausubel *et al.* (1997) sowie Sambrook *et al.* (1989) verfahren. Das Glätten von überhängenden DNA-Enden erfolgte durch Behandlung mit Klenow-Polymerase in Gegenwart aller vier Desoxyribonukleotide nach Vorschrift des Herstellers. Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der QIAquick Gel Extraction-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

Assemblierung von Oligonukleotiden

Für die Assemblierung von Oligonukleotiden zur Generierung von Genabschnitten *in vitro* wurden 0,5 µmol eines jeden verwendeten Oligonukleotids in Gegenwart von 1 mM ATP mit 10 U Polynukleotid Kinase in 10 µl Polynukleotid Kinase-Puffer A (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) für 2 h bei 37 °C phosphoryliert. Anschließend wurden die Ansätze vereinigt und durch Zugabe von 1 Vol. H₂O verdünnt. Die Anlagerung von zueinander komplementären Oligonukleotiden erfolgte durch Erhitzen der Lösung auf 80 °C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur. Ein Aliquot des Ansatzes wurde mit einem in geeigneter Weise restringierten Vektor gemischt und direkt in die Ligationsreaktion eingesetzt.

Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifizierung von DNA mittels PCR (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988) erfolgte in der Regel nach Vorgabe des Herstellers der jeweils verwendeten DNA-Polymerase in dem mit dem Enzym mitgelieferten Mg^{2+} -supplementierten Puffer. Zu Klonierungszwecken wurde *Pfu*-Polymerase eingesetzt, zum Test auf das korrekte Vorliegen eines bestimmten Genotyps nach Ligations- oder Rekombinationsereignissen dagegen DyNAzyme II und *Taq*-Polymerase. Sollte das resultierende PCR-Produkt für Klonierungen verwendet werden, dienten entweder chromosomale DNA in einer Konzentration von 1 - 10 $\mu\text{g/ml}$ oder präparierte Plasmide in einer Konzentration von 0,01 – 1 $\mu\text{g/ml}$ als Matrize. Zum Screenen von Klonen wurde DNA dagegen in Form von ganzen Zellen vorgelegt, die in das PCR-Gefäß transferiert und durch 1-minütiges Erhitzen in einem Mikrowellengerät aufgebrochen worden waren. Die Konzentration der eingesetzten Oligonukleotide betrug in allen Fällen 1 $\text{pmol}/\mu\text{l}$. Wurde PCR-amplifizierte DNA für Klonierungen eingesetzt, so wurde ihre Sequenz nach erfolgter Ligation immer durch Sequenzierung bestätigt.

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (Prober *et al.*, 1987), wie im Protokoll „Dye Terminator Cycle-Sequenzierung mit AmpliTaq“ beschrieben. Die Analyse der Reaktionsprodukte wurde mit einem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems GmbH/Perkin Elmer, Warrington, Großbritannien) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt.

8. Methoden zur Analyse von RNA

Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus *E. coli* erfolgte unter Verwendung von heißem Phenol nach der Methode von Aiba *et al.* (1981).

***in vitro*-Transkription von RNA**

Die Synthese von RNA-Oligonukleotiden erfolgte *in vitro* unter Verwendung von T7 RNA-Polymerase und DNA-Oligonukleotiden als Matrize (Milligan *et al.*, 1987; Wyatt *et al.*, 1991). Die Reaktionsansätze enthielten 40 mM Tris-HCl (pH 8,1), 40 mM $MgCl_2$, 1 mM Spermidin,

5 mM DTT, 0,01 % Triton X-100, 8 % Polyethylenglycol 8000, 8 mM GMP, 4 mM ATP, 4 mM UTP, 4 mM GTP, 4 mM CTP, 2,4 U/ml Pyrophosphatase, 20 µg/ml T7 RNA-Polymerase und 0,2 µM partiell doppelsträngige DNA-Matrize. Die Ausbildung des partiellen Doppelstrangs war zuvor durch Mischen von jeweils 20 pmol eines jeden Matrizen-Oligonukleotids in 100 µl einer Lösung von 10 mM Tris-HCl (pH 8,1) und 10 mM MgCl₂, 3-minütiges Erhitzen bei 65 °C und Abkühlen auf Raumtemperatur begünstigt worden. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz mit saurem Phenol (äquilibriert mit 100 mM Natriumacetat, pH 4,6) behandelt. Die Transkripte wurden durch Zugabe von 1/10 Vol. Natriumacetat (pH 4,6) und 1 Vol. Isopropanol bei -20 °C präzipitiert, durch Zentrifugation bei 30.000 g gesammelt, mit eiskaltem 80 % Ethanol gewaschen und anschließend auf einem 17,5 %-Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Visualisierung der Banden durch „UV-Shadowing“ (Hassur und Whitlock Jr., 1974) wurde das Produkt mit der korrekten Länge ausgeschnitten und unter Verwendung einer Biotrap-Kammer (Schleicher & Schüll, Dassel) mit 0,5x TBE (Sambrook *et al.*, 1989) als Laufpuffer aus dem Gel eluiert.

Reinigung von tRNA^{Sec}

Für die Reinigung von tRNA^{Sec} wurden mit dem Plasmid pCB2013 transformierte Zellen des Stamms MC4100 in 5 l-Erlenmeyer-Kolben, welche mit 2 l 2x LB-Medium gefüllt waren, bei 37 °C bis zur stationären Phase angezogen. Nach Ernte durch Zentrifugation und Waschen in Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM Magnesiumacetat) wurden ca. 70 g (Nassgewicht) des resultierenden Zellsediments für die Präparation von Roh-tRNA nach von Ehrenstein (1967) eingesetzt. Die Separation der erhaltenen Nukleinsäuren erfolgte anschließend nach dem von Leinfelder *et al.* (1990) beschriebenen Verfahren durch Chromatographie an BD-Cellulose (Serva, Heidelberg) und Sepharose 4B. Die resultierende tRNA^{Sec}-Präparation wurde durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,6) gefällt, durch Zentrifugation sedimentiert, mit 80 % Ethanol gewaschen und schließlich in 10 mM Natriumacetat (pH 5,0)/ 10 mM MgCl₂ gelöst.

5'-Markierung von RNA

Zur radioaktiven Markierung des 5'-Endes von *in vitro* synthetisierter RNA wurden 50 pmol RNA-Oligonukleotid in 50 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,1 bei 37 °C), 7 % Formamid und 0,1 % SDS durch 1-minütiges Erhitzen bei 90 °C und Abkühlen auf Eis denaturiert und nach Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C dephosphoryliert. Nach Zugabe von weiteren 1 U alkalischer Phosphatase und 15-minütiger Inkubation bei 50 °C wurde

die Lösung mit Phenol (äquilibriert in 100 mM Natriumacetat, pH 4,6) extrahiert und die im wässrigen Überstand enthaltene RNA durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 1 Vol. Isopropanol bei -20 °C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation gesammelt, mit 80% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in der SpeedVac (Univapo 150 H; Uniequip, Martinsried) in 5 µl H₂O gelöst. Die nachfolgende Phosphorylierung wurde in einem Endvolumen von 10 µl in Gegenwart von 30 µCi γ -³²P-ATP und 1 U Polynukleotidkinase bei 37 °C durchgeführt. Nach 30 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Formamid-Auftragspuffer (95,6 % (v/v) Formamid, 0,02 % Bromphenolblau, 0,02 % Xylen-cyanol, TBE) und Erhitzen für 1 min bei 90 °C gestoppt. Die markierte RNA wurde durch Elektrophorese auf einem 17,5 % Harnstoff-Polyacrylamidgel von uninkorporierter Radioaktivität getrennt, durch Autoradiographie im Gel lokalisiert, ausgeschnitten und durch Agitation des zerkleinerten Gelstücks in 600 µl Elutionspuffer (100 mM Natriumacetat, pH 4,6, 1 mM EDTA, 0,05 % (v/v) Phenol) bei 25 °C passiv eluiert.

Faltung von SECIS-Elementen

Um Salze, die die Ausbildung von biologisch inaktiven RNA-Dimeren stark begünstigen, zu entfernen wurden sowohl die kommerziell bezogene, fluoresceinmarkierte *fdhF*-Minihelix als auch präparierte *in vitro*-Transkripte vor ihrer weiteren Verwendung durch Zugabe von 0,1 Vol. Natriumacetat (pH 4,6) sowie 1 Vol. Isopropanol und Inkubation bei -20 °C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation gesammelt, mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 0,1 mM EDTA (pH 8,0) wieder gelöst. Die Faltung der Oligonukleotide erfolgte anschließend bei einer maximalen Konzentration von 200 µM in einem Volumen von 100 µl durch Erhitzen für 90 s bei 80 °C und unmittelbar darauf folgendes schnelles Abkühlen auf Eis. Unter den beschriebenen Bedingungen nahmen alle verwendeten RNA-Oligonukleotide ausschließlich die Haarnadel-Konformation an.

Bestimmung der Konzentration von RNA-Oligonukleotiden

Zur Bestimmung ihrer exakten Konzentration wurden RNA-Oligonukleotide durch Inkubation für 2 h bei 60 °C in 100 µl einer Lösung von 30 mM Natriumacetat (pH 5,0), 1,6 mM ZnCl₂ und 8 U/ml RNase P1 vollständig hydrolysiert. Nach geeigneter Verdünnung des Reaktionsgemisches mit H₂O und Zugabe von Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) zu einer Endkonzentration von 50 mM wurde die Absorption der freigesetzten Nukleotidmonophosphate bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Aus den erhaltenen Werten konnte anschließend unter Einbeziehung der

spezifischen Absorptionskoeffizienten der eingesetzten Oligonukleotide (Tabelle 7) die Konzentration der RNA-Lösungen bestimmt werden.

TABELLE 7: Millimolare Extinktionskoeffizienten der verwendeten RNA-Oligonukleotide.

Bezeichnung	Matrizen-Oligonukleotide bzw. Referenz	Länge	ϵ_{260} (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
<i>fdhF</i> -HNS	T7-promoter / <i>fdhF</i> -sl	32 nt	343,9
<i>fdhF</i> -Minihelix	Kromayer <i>et al.</i> , 1996	17 nt	177,2
<i>fdnG</i> -HNS	T7-promoter / <i>fdnG</i> -sl	39 nt	424,8
<i>fdnG</i> -Minihelix	T7-promoter / <i>fdnG</i> -mh	18 nt	190,6
SL-Element-wt	T7-promoter / SLE-wt	40 nt	432,1
SL-Element-aa	T7-promoter / SLE-aa	40 nt	439,4

Die den Berechnungen zu Grunde liegenden Absorptionskoeffizienten der einzelnen Nukleotidmonophosphate waren 15,31 mM⁻¹ cm⁻¹ für AMP, 11,67 mM⁻¹ cm⁻¹ für GMP, 9,82 mM⁻¹ cm⁻¹ für UMP und 7,45 mM⁻¹ cm⁻¹ für CMP.

9. Reinigung und Quantifizierung von Proteinen

Alle Schritte von Proteinreinigungen wurden bei 0 - 4 °C durchführt. Nach der Applikation der Proben wurden Ionenaustauscher- und Affinitätssäulen mit Puffer gespült, bis sämtliches ungebundenes Material wieder ausgewaschen worden war, bevor mit der Elution begonnen wurde. Die Analyse von Fraktionen auf das Vorhandensein und die Reinheit des gewünschten Proteins erfolgte, sofern nicht anders erwähnt, mittels SDS-PAGE.

Reinigung der Seryl-tRNA Synthetase

Die Reinigung der Seryl-tRNA Synthetase (SerS) erfolgte in Anlehnung an das von Härtlein *et al.* (1987) ausgearbeitete Protokoll. Mit dem Plasmid pSerS2 transformierte Zellen des Stamms CSH26 wurden dazu unter Verwendung eines 70 l Fermenters in 30 l 2x LB-Medium, dem 25 µg/ml Ampicillin zugesetzt worden waren, bis zu einer OD₆₀₀ von 4,9 kultiviert. Nach der Ernte in einer Durchlaufzentrifuge wurden die Zellen in Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT) gewaschen. Etwa 70 g der erhaltenen Zellen wurden auf ein Endvolumen von 200 ml in Puffer A, der zusätzlich 10 µM PMSF enthielt, suspendiert und durch zwei Passagen in der French Press bei 16.000 psi aufgebrochen. Die resultierende Suspension wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 30.000 g und anschließend für 2 h bei

150.000 g geklärt, mit DNase I zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml versetzt und auf eine mit Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 10 µM PMSF) äquilibrierte DEAE-Sepharose FF-Säule (2,6 × 23,5 cm) geladen. Die Elution erfolgte mit 2500 ml eines linearen Gradienten von 0 - 500 mM KCl in Puffer B bei einer Flußrate von 1,5 ml/min. Fraktionen im Bereich von 110 - 130 mM KCl, die in Aminoacylierungsreaktionen mit ¹⁴C-Serin und tRNA^{Sec} Aktivität zeigten, wurden vereinigt und mit 47,2 g (NH₄)₂SO₄ pro 100 ml Lösung versetzt. Die erhaltene Suspension wurde in acht Aliquots aufgeteilt, die nacheinander wie folgt weiterbehandelt wurden: Das Präzipitat jeweils eines Aliquots wurde durch Zentrifugation bei 20.000 g für 30 min gesammelt und nach Abnahme des Überstandes durch Zugabe von 700 µl Puffer B wieder in Lösung gebracht. Die erhaltenen Proteine wurden dann mittels Gelfiltration auf einer Sephacryl S-200 HR-Säule (1,6 × 60 cm) in Puffer B, dem 150 mM KCl zugesetzt worden waren, bei einer Flußrate von 0,5 ml/min weiter separiert. Fraktionen, die SerS enthielten, wurden vereinigt und festes (NH₄)₂SO₄ wurde bis zu einer Sättigung von 50 % zugegeben. Nach Abtrennung der ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation erfolgte die Präzipitation von SerS durch Erhöhung der (NH₄)₂SO₄-Sättigung auf 60 %. Die aus den acht Aliquots resultierenden Präzipitate wurden vereinigt, durch Zentrifugation für 30 min bei 20.000 g sedimentiert, in 30 ml Puffer B wieder gelöst und schließlich gegen 1 l Puffer B, der 50 % Glycerin enthielt, dialysiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Reinigung der Selenophosphat Synthetase

Die Reinigung der Selenophosphat Synthetase (SelD) erfolgte ähnlich wie nach Ehrenreich *et al.* (1992) durch Überexpression in dem mit pMN340 transformierten Stamm BL21(DE3), Solubilisierung des Proteins im Rohextrakt durch Zugabe von KCl, Chromatographie an DEAE-Sepharose FF, fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (35 % - 55 % Sättigung) und Chromatographie an Hydroxyapatit (BioGel Hydroxyapatit HTP; Bio-Rad Laboratories, München). Um die Zahl der Reinigungsschritte bei gleichbleibender Reinheit des erhaltenen Proteins zu verringern wurde aber der an die DEAE-Sepharose FF-Säule angelegte Salzgradient von ca. 4 auf 15 Säulenvolumen verlängert und bis zu einer KCl-Konzentration von 500 mM geführt. Außerdem wurde die untere Schwellenkonzentration bei der fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung auf 40 % Sättigung angehoben. Auf Grund dieser Veränderungen erübrigte sich die im Originalprotokoll beschriebene abschließende Reinigung des Proteins durch eine zweite Chromatographie an DEAE-Sepharose FF bei verändertem pH-Wert. Die Lagerung von SelD erfolgte als Ammoniumsulfat-Suspension bei 4 °C. Unmittelbar vor der Verwendung wurde ein Aliquot der Suspension zentrifugiert und das resultierende Sediment wurde in Puffer (20 mM

Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM Magnesiumacetat, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA) in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Nach Dialyse gegen denselben Puffer konnte das Protein direkt für die Konversions-Reaktion verwendet werden.

Reinigung des Elongationsfaktors SelB

Die Reinigung von SelB erfolgte aus Zellen des Stamms BL21(DE3), die mit pWL194 transformiert worden waren. Diese wurden in 12 l- und 70 l-Fermentern bei 37 °C in einem Medium aus 3 % Pepton, 1 % Hefeextrakt, 0,4 % Glucose, 0,2 % Glycerin, 25 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 60 mM Kaliumphosphat (pH 7,1) und 100 µg/ml Ampicillin bis zu einer OD₆₀₀ von 3,0 angezogen. Nach Zugabe von IPTG in einer Konzentration von 100 µM wurde die Temperatur auf 30 °C gesenkt und die Fermentation für 75 - 150 min fortgesetzt. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von Eis auf 0 °C gekühlt, in einer Durchlaufzentrifuge geerntet, in Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7,4 bei 4 °C, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA) gewaschen und mit flüssigem N₂ schockgefroren. Der Aufbruch der Zellen (ca. 140 g pro Reinigung), die Anreicherung von SelB durch Sedimentation mit den Ribosomen und anschließende Extraktion aus dem Niederschlag mit Hochsalz-Puffer und die fraktionierte (NH₄)₂SO₄-Fällung wurden nach Forchhammer *et al.* (1990) durchgeführt. Das Präzipitat der zweiten Fällung wurde in 50 ml Puffer B (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 2 mM Magnesiumacetat, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA) gelöst und zweimal für 6 h gegen 2 l Puffer B dialysiert. Die Lösung wurde dann auf eine BioGel Hydroxyapatit HTP-Säule (1,6 × 12,5 cm; Bio-Rad Laboratories, München) aufgetragen, die mit 500 ml eines linearen Kaliumphosphat-Gradienten (100 - 200 mM in Puffer B) bei einer Flußrate von 0,5 ml/min entwickelt wurde. Fraktionen im Bereich von 165 mM Kaliumphosphat, die SelB enthielten, wurden vereinigt, zweimal gegen 2 l Puffer C (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA) dialysiert und auf eine Q-Sepharose-Säule (1,2 × 8 cm) geladen. Die Elution von SelB erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten (90 ml) von 0 - 267 mM KCl in Puffer C bei einer Flußrate von 1 ml/min. SelB enthaltende Fraktionen im Bereich von 125 mM KCl wurden vereinigt, gegen 2 l Puffer C dialysiert und dann auf eine SP-Sepharose-Säule (1 × 5 cm) aufgebracht. Die Elution von SelB erfolgte unter Spülen der Säule mit 80 ml eines linearen KCl-Gradienten (0 - 400 mM in Puffer C) bei einer Flußrate von 1 ml/min. SelB wurde bei einer KCl-Konzentration von ca. 230 mM von der Säule gewaschen. Geeignete Fraktionen wurden vereinigt, gegen 2 l Puffer C sowie anschließend 500 ml Puffer C, dem 50 % Glycerin zugesetzt worden waren, dialysiert und bei -20 °C gelagert.

Reinigung von SelB_{His}

Für die Reinigung des SelB_{His}-Fusionsproteins wurde der Stamm BL21(DE3) mit dem Plasmid pT7SelBH6 transformiert und in 5 l-Erlenmeyerkolben, die mit 2 l LB-Medium (+Ap) gefüllt waren, bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen. Nach Zugabe von IPTG in einer Konzentration von 100 µM und weiteren 2 h Kultivierung wurden die Zellen in einer Durchlaufzentrifuge geerntet, in Puffer A (200 mM Borsäure/NaOH, pH 7,0, 10 mM MgCl₂) gewaschen und mit flüssigem N₂ schockgefroren. Etwa 12 g der erhaltenen Zellen wurden in 12 ml Puffer B (200 mM Borsäure/NaOH, pH 7,0, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM β-Mercaptoethanol), dem 200 µg/ml PMSF und 20 µg/ml DNase I zugesetzt worden waren, resuspendiert und durch dreimalige Passage in der French Press (American Instrument Company, Silver Spring, USA) bei 16.000 psi aufgebrochen. Unlösliche Zellfragmente wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 30.000 g sedimentiert und der Überstand wurde auf eine Chelating Sepharose FF-Säule (1,6 × 5 cm) geladen. Um unspezifisch gebundene Proteine zu desorbieren wurde die Säule bei einer Flußrate von 1 ml/min mit 200 ml Puffer B und nachfolgend 250 ml Puffer B, der 20 mM Imidazol enthielt, gespült. Die Elution von SelB_{His} erfolgte anschließend durch 300 ml eines linearen Imidazol-Gradienten (20 - 100 mM in Puffer B). Fraktionen im Bereich von 50 - 80 mM Imidazol, die SelB_{His} enthielten, wurden vereinigt, zweimal gegen 2 l Puffer C (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA) dialysiert und auf eine SP-Sepharose-Säule (1,6 × 5 cm) aufgetragen. Durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0 - 350 mM KCl in Puffer C bei 2 ml/min Flußrate wurde SelB_{His} bei 230 mM KCl von der Säule eluiert. Die Fraktionen, in denen das Protein in reiner Form vorlag, wurden vereinigt, gegen 2 l Puffer C und dann gegen 1 l Puffer C, der 50 % Glycerin enthielt, dialysiert. Die Lagerung des Proteins erfolgte bei -20 °C.

Reinigung von SelB_{His}-Varianten

Um Varianten von SelB_{His} zu isolieren wurde der Stamm JM109(DE3) mit den gewünschten pMB-Derivaten transformiert. Die Überexpression und Reinigung der Proteine erfolgte wie für die Wildtyp-Form beschrieben.

Reinigung von SelB₄₇₂₋₆₁₄

Die Präparation der mit einem N-terminalen His-Tag versehenen Domäne 4b von SelB (SelB₄₇₂₋₆₁₄) erfolgte weitgehend wie von Kromayer *et al.* (1996) beschrieben durch Überexpression des Fusionsproteins in dem mit pT7HIAS1414-1842 transformierten Stamm

BL21(DE3) und Chromatographie des Rohextraktes an Chelating Sepharose FF. Fraktionen, die SelB₄₇₂₋₆₁₄ in reiner Form enthielten, wurden vereinigt, zweimal gegen 2 l Puffer (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA) und dann gegen 1 l desselben Puffers, der 50 % Glycerin enthielt, dialysiert.

Reinigung von SelB₃₇₉₋₆₁₄

Zur Reinigung von SelB₃₇₉₋₆₁₄ wurde der Stamm BL21(DE3) mit den Plasmiden pUBS520 und pT7SBD4 transformiert und in 5 l-Erlenmeyerkolben, die 2 l 2xLB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) enthielten, bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 angezogen. Nach Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 100 µM wurde die Kultivierung für 3 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in Puffer A (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA) gewaschen und mit flüssigem N₂ schockgefroren. 10 g der erhaltenen Zellen wurden in 30 ml Puffer B (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA), dem 0,5 µg/ml Leupeptin, 0,7 µg/ml Pepstatin, 100 µg/ml PMSF und 10 µg/ml DNase I zugesetzt worden waren, resuspendiert und durch zweimalige Passage in der French Press bei 16.000 psi aufgebrochen. Der Rohextrakt wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 30.000 g geklärt und auf eine SP-Sepharose-Säule (2,6 × 9,5 cm) geladen, die mit 1 l eines linearen NaCl-Gradienten (0 - 400 mM in Puffer B) bei einer Flußrate von 4 ml/min entwickelt wurde. Fraktionen im Bereich von 150 - 250 mM NaCl, die SelB₃₇₉₋₆₁₄ in hoher Reinheit beinhalteten, wurden vereinigt und gegen 2 l Puffer B dialysiert, was zum beinahe quantitativen Ausfällen des Proteins aus der Lösung führte. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 20.000 g gesammelt, in möglichst wenig Puffer C (Puffer B + 400 mM NaCl) wieder gelöst und in 2 ml Aliquots auf eine Sephacryl S-300-Säule (2,6 × 100 cm) aufgetragen. Nach Entwicklung der Säule bei einer Flußrate von 1,5 ml/min wurden Fraktionen, die SelB₃₇₉₋₆₁₄ enthielten, vereinigt. Das Protein wurde anschließend für Kristallisationszwecke durch Dialyse gegen Puffer D (10 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA) präzipitiert und bei 4 °C gelagert. Alternativ wurde die Lösung nach geeigneter Verdünnung gegen Puffer B, der 50 % Glycerin enthielt, dialysiert und bei -20 °C gelagert.

Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Die exakte Quantifizierung von SelB und dessen Varianten erfolgte photometrisch nach Gill und von Hippel (1989). Die verwendeten spezifischen Extinktionskoeffizienten (ϵ_{280}) waren 81080 M⁻¹ cm⁻¹ für SelB, SelB_{His} sowie mutierte SelB_{His}-Formen, 41820 M⁻¹ cm⁻¹ für SelB₃₇₉₋₆₁₄

und $26600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für SelB₄₇₂₋₆₁₄. Als Nullwerte dienten jeweils die Lagerpuffer, gegen den die Präparationen am Ende der Reinigungen dialysiert worden waren. Die Konzentrationen aller anderen Proteine wurden nach Bradford (1976) unter Verwendung des Bradford-Reagenzes der Firma Bio-Rad Laboratories (München) mit BSA als Standardprotein bestimmt.

10. Elektrophoretische Methoden

Elektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in horizontalen Agarose-Gelen unter Verwendung von TAE (Sambrook *et al.*, 1989) als Laufpuffer.

Elektrophorese von RNA

Die Separation von RNA unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in vertikalen Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen, die 7 M Harnstoff und 10 - 17,5 % Acrylamid/Bisacrylamid (38:2) in TBE (Sambrook *et al.*, 1989) enthielten. Die Proben wurden mit mindestens 1 Vol. Formamid-Puffer (95 % Formamid, 0,02 % Bromphenolblau, 0,02 % Xylencyanol, in TBE) versetzt, 1 min auf 90 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und nach Erwärmen der Gele durch einen 30-minütigen Vorlauf aufgetragen. Für analytische Zwecke kamen Gele mit den Dimensionen $0,1 \times 8,5 \times 7 \text{ cm}$ zum Einsatz, die bei 300 V entwickelt wurden. Die Reinigung von *in vitro*-Transkripten erfolgte dagegen unter Verwendung von präparativen Sequenzgelen ($0,2 \times 18 \times 50 \text{ cm}$), die 19 h bei einer konstanten Leistung von 40 W liefen.

Für die Auftrennung von RNA unter nicht denaturierenden Bedingungen zur Analyse der Sekundärstruktur von SECIS-Elementen wurden 12 %-Polyacrylamid-Gele (30:0,8) in TBE als Laufpuffer verwendet, die bei 4 °C und 100 V für 1,5 h entwickelt wurden.

Die Färbung von RNA in Polyacrylamid-Gelen erfolgte mit 1-Ethyl-2-(3-[1-ethylnaphtho(1,2-d)thiazolin-2-yliden]-2-methylpropenyl)naphtho(1,2-d)thiazoliumbromid (Stains-all).

Elektrophorese von Proteinen

Für die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden diskontinuierliche Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) verwendet. Proteinlösungen wurden mit 1 Vol. SDS-Auftragspuffer (Sambrook *et al.*, 1989) gemischt und nach Erhitzen für 5 min bei 95 °C auf das Gel aufgetragen. Für die Herstellung von Gesamtzell-Lysaten wurden Bakterien aus 1 ml Kultur durch Zentrifugation gesammelt, in SDS-Auftragspuffer (75 mM Tris/HCl,

pH 6,8, 20 % Glycerin, 2,5 % SDS, 100 mM DTT) auf eine OD₆₀₀ von 10 resuspendiert und 15 min auf 95 °C erhitzt. Die resultierende Lösung wurde anschließend direkt auf das Gel aufgetragen. Die Detektion und Fixierung der separierten Proteine erfolgte durch Schwenken des Gels in Färbelösung (0,1 % Serva Blue R, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure). Überschüssiger Farbstoff wurde danach durch Behandlung mit Entfärber (30 % Methanol, 10 % Essigsäure) wieder entfernt.

11. Western Blot

Zur Analyse mittels Western-Blot wurden Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, unter Anwendung eines Nassblot-Verfahrens (Schmid und Böck, 1981) auf eine Nitrocellulose-Membran (BioTrace NT; Pall Corporation, Dreieich) transferiert, zur Überprüfung der Blot-Effizienz mit einer Lösung aus 0,1 % Amidoschwarz, 1 % Essigsäure und 40 % Methanol angefärbt und in H₂O wieder entfärbt. Die Membran wurde anschließend durch 1-stündige Inkubation in 5 % Magermilch (Fluka, Neu-Ulm), die in TBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7,6, 137 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Tween 20) gelöst war, abgesättigt. Nach Waschen mit TBS-T wurde sie dann für 1 h mit in TBS-T verdünntem Antiserum behandelt, erneut gewaschen und 1 h in einer Lösung von Meerrettichperoxidase-Protein A-Konjugat (Bio-Rad Laboratories, München) (1:5000 in TBS-T) geschwenkt. Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die Detektion der durch die Antikörper markierten Proteine unter Verwendung des ECL-Systems von Roche Biochemicals (Penzberg), wobei die Signale durch Auflegen eines Röntgenfilms (WICORex B+; Typon Medical Systems, Burgdorf) detektiert wurden.

12. Spektroskopische Methoden

CD-Spektroskopie

CD-spektroskopische Messungen wurden am CD-Spektrometer J-715 von Jasco (Groß-Umstadt), das mit einem Temperaturregler des Typs PTC348WI desselben Herstellers ausgerüstet war, durchgeführt. Der Lichtweg in der Quarzküvette betrug 1 mm, die Temperatur der Küvette 25 °C. Die Messungen erfolgten über einen Wellenlängenbereich von 190 - 260 nm mit 0,2 nm Auflösung und einer Scanrate von 50 nm/min. Es wurden pro Ansatz 10 Scans erstellt, die anschließend gemittelt wurden. Die eingesetzten Proteine wurden vor ihrer Verwendung zuerst gegen 2 l Puffer A (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM

DTT, 0,5 mM EDTA) und dann gegen 2 l Puffer B (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT) dialysiert. Als Nullproben fungierten Lösungen, die mit den Messansätzen identisch waren, aber kein Protein enthielten.

Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Interaktion von fluoresceinmarkierten Nukleinsäuren mit SelB wurde in einem SLM8000 Spektrophotometer der Firma Aminco (Silver Spring, USA) verfolgt. Die Temperatur der Küvette betrug 25 °C. Die Excitation der fluoreszierenden Gruppe erfolgte mit Licht der Wellenlänge 490 nm, emittiertes Licht wurde bei 520 nm detektiert. Als Puffer diente eine Lösung von 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 10 % Glycerin.

Stopped-Flow Analysen

Experimente zur Untersuchung schneller Kinetiken wurden an einem Stopped-Flow-Gerät der Firma High Tech Scientific (Salisbury, Großbritannien) in einem Puffer, der 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 10 % Glycerin enthielt, durchgeführt. Die Temperatur der Reaktionslösungen betrug 25 °C. Um die Fluoreszenz der mant-Gruppe verfolgen zu können, wurde eine Excitations-Wellenlänge von 366 nm in Kombination mit einem Cutoff-Filter mit einer Grenzwellenlänge von 389 nm gewählt. Die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz von SelB wurde mit Licht der Wellenlänge 289 nm angeregt, wobei das emittierte Licht unter Verwendung eines 320 nm-Cutoff-Filters detektiert wurde. Für Messungen unter Ausnutzung von Fluoreszenz-Resonanztransfer wurde eine Excitations-Wellenlänge von 289 nm mit einem Filter-Cutoff von 389 nm kombiniert. Zur Verfolgung der Fluoreszenz der Fluorescein-Gruppe erfolgte die Excitation bei 494 nm und die Detektion der Emission unter Verwendung eines Filters mit 530 nm Cutoff. Die primäre Analyse der aufgezeichneten Daten erfolgte mit Hilfe der mit dem Gerät mitgelieferten Software. Je nach Qualität des Signals wurden für jeden Messpunkt bis zu 15 der aufgezeichneten Kurven gemittelt.

13. Biochemische Methoden

Limitierte Proteolyse

Die Teilhydrolyse von Proteinen mit limitierenden Mengen an Proteinase K erfolgte in Ansätzen, die 100 mM Kaliumphosphat (pH 7,0), 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT,

20 % Glycerin, 2 µg/ml Protease und 1,8 µM zu untersuchendes Protein enthielten. Die Reaktion wurde nach 10-minütiger Vorinkubation bei 28 °C durch Zugabe der Protease gestartet. Nach 0,5 min, 15 min und 45 min wurden jeweils 30 µl Proben entnommen, mit 15 µl SDS-Auftragspuffer (Ausubel *et al.*, 1997) gemischt und sofort für 5 min auf 90 °C erhitzt. Die Auftrennung der Hydrolyseprodukte erfolgte auf einem 12,5 %-SDS-Polyacrylamidgel.

Bestimmung von β -Galactosidase-Aktivitäten

Die Bestimmung von β -Galaktosidase-Aktivitäten erfolgte nach Miller (1992). Die Zellen wurden dazu in TP- oder TP2-Medium bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bis zur stationären Phase kultiviert, anschließend 1:100 in frisches Medium überimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 1,4 - 2,0 (exponentielle Phase) angezogen und nach Abkühlen der Kulturen auf Eis in den Test eingesetzt.

Aminoacylierung von tRNA^{Sec}

Die Beladung von tRNA^{Sec} mit Serin erfolgte in einem Reaktionsansatz, der 100 mM Hepes (pH 7,0), 10 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, 10 mM ATP, 200 µM L-Serin, 83 µM tRNA^{Sec}, 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin, 2,5 U/ml Pyrophosphatase und 0,84 mg/ml Seryl-tRNA Synthetase enthielt. Nach Inkubation für 15 min bei 37 °C wurde die Lösung durch Zugabe von 1/30 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,6) angesäuert und mit 1 Vol. saurem Phenol (äquilibriert in 100 mM Natriumacetat, pH 4,6) extrahiert. Seryl-tRNA^{Sec} wurde anschließend aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,6) sowie 1 Vol. Isopropanol und Inkubation bei -20 °C ausgefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 16.000 g und 4 °C gesammelt, mit kaltem 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 mM Natriumacetat (pH 4,6) wieder gelöst. Um radioaktiv markierte Seryl-tRNA^{Sec} zu erhalten, wurde [¹⁴C]-L-Serin (171,6 mCi/mmol) in einer Endkonzentration von 160 µM an Stelle der unmarkierten Verbindung eingesetzt.

Konversion von Seryl-tRNA^{Sec} zu Selenocystyl-tRNA^{Sec}

Die präparative Umwandlung von Seryl-tRNA^{Sec} zu Selenocystyl-tRNA^{Sec} fand in einer Lösung von 100 mM Pipes (pH 6,7), 10 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 0,5 mM DTT, 5 mM ATP, 250 µM Natriumselenit, 17 µM Seryl-tRNA^{Sec}, 0,1 mg/ml Sela und 5,9 mg/ml Seld statt. Nach Inkubation für 35 min bei 37 °C wurde 1/20 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 1/10 Vol. 100 mM DTT zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit saurem Phenol (äquilibriert mit 100 mM Natriumacetat, pH 4,6) extrahiert und Selenocystyl-tRNA^{Sec} wurde aus der wässrigen

Phase durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,6) sowie 1 Vol. Isopropanol und Inkubation für 1 h bei 0 °C ausgefällt. Die präzipitierte tRNA wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 g sedimentiert, mit eiskaltem 80 % Ethanol, der 5 mM DTT enthielt, gewaschen, im Vakuum getrocknet und schließlich in 10 mM Natriumacetat (pH 4,6), dem 5 mM DTT zugesetzt worden waren, gelöst. Sollte radioaktiv markierte Selenocysteyl-tRNA^{Sec} hergestellt werden, so wurde entweder Natrium-[⁷⁵Se]-selenit an Stelle der unmarkierten Verbindung in die Konversionsreaktion eingesetzt oder [¹⁴C]-Seryl-tRNA^{Sec} als Substrat verwendet. Die Präparation von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} für Stopped-Flow-Experimente wurde unter Verwendung eines Anaerobenzelts in einer Formiergas-Atmosphäre durchgeführt. Für alle anderen Anwendungen fand die Umwandlung in Gegenwart von Luftsauerstoff statt, was unter den verwendeten Bedingungen keine Auswirkungen auf die Produktausbeute oder die biologische Aktivität der tRNA zur Folge hatte.

Hydrolyseschutz-Experimente

Um den aus einer Interaktion mit einem Protein resultierenden Schutz von Aminoacyl-tRNA^{Sec} vor alkalischer Hydrolyse zu verfolgen, wurde eine Lösung von 100 mM Kaliumphosphat (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 100 µM GTP und 1 µM Protein für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von radioaktiv markierter Aminoacyl-tRNA^{Sec} wurden in regelmäßigen Abständen 30 µl Proben aus dem Ansatz entnommen und unmittelbar für die Quantifizierung der noch nicht hydrolysierten tRNA eingesetzt. Die Konzentration und Art des in der Reaktion enthaltenen Nukleotids wurde in Abhängigkeit von der Zielsetzung des Experiments teilweise verändert.

Quantifizierung von radioaktiv markierter Aminoacyl-tRNA

Zur Quantifizierung von tRNA^{Sec}, die mit einer radioaktiv markierten Aminosäure verestert worden war, wurde ein Aliquot der zu analysierenden Lösung in 15 µl Hefe-tRNA (10 mg/ml) pipettiert und nach Zugabe von 250 µl eiskalter 10 % TCA, die 0,1 % L-Serin enthielt, auf Eis inkubiert. Das gebildete Präzipitat wurde auf einen Glasfaser-Rundfilter (GF 6; Schleicher & Schuell, Dassel) abfiltriert und dreimal mit 1 ml 10 % TCA, die 0,1 % L-Serin enthielt, fünfmal mit 1 ml 5 % TCA, die 0,05 % L-Serin enthielt, und dreimal mit eiskaltem 80 % Ethanol gewaschen. Die Filterplättchen wurden anschließend bei 80 °C für 30 min getrocknet und in Szintillationsröhrchen mit 2,5 ml Ultima Gold F (Packard Instruments, USA) überführt. Die Bestimmung der enthaltenen Radioaktivität erfolgte in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler des Typs Tri-Carb 2100TR (Packard Instruments) bei einer Zähldauer von 5 min.

Analyse von SelB-Liganden Interaktionen im Gelretardations-Assay

Zur Analyse der Interaktion von Proteinen mit SECIS- und SECIS-ähnlichen Elementen wurden in der Regel steigende Mengen an Protein in einer Lösung von 100 mM Kaliumphosphat (pH 7,0), 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 10 % Glycerin, 3,6 μM Hefe-tRNA und 80 nM markierter RNA in einem Endvolumen von 100 μl für 5 min bei 25 °C inkubiert. Nach Überführen der Reaktionen auf Eis wurden 0,1 Vol. Auftragspuffer (50 % Glycerin, 0,03 % Bromphenolblau) zugegeben und Aliquots der Ansätze auf ein nicht denaturierendes 6 %-Polyacrylamid-Gel (Quervernetzung: 30:0,8; 0,1 × 8,5 × 7 cm) aufgetragen, das in einem Laufpuffer aus 100 mM Kaliumphosphat (pH 7,0), 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT und 0,5 mM EDTA für 3 h bei 50 V und 4 °C entwickelt wurde. Das Gel wurde anschließend getrocknet und auf einem Kodak Storage Phosphor-Screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) exponiert. Die Versuchsbedingungen wurden teilweise zur Einstellung spezifischer Rahmenbedingungen verändert.

S1-Nukleaseschutz-Experimente

Um die Gleichgewichts-Konzentration und die Halbwertszeit der *selAB* mRNA zu bestimmen wurden Zellen der zu untersuchenden Stämme in TP2-Medium aerob angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 1,0 wurden 10 ml Suspension entnommen, unmittelbar mit 1,25 ml eiskaltem 5 % Phenol (in Ethanol) gemischt und auf Eis gelagert. Nach Zugabe von Rifampicin (240 μg/ml) wurden anschließend im regelmäßigen Abständen weitere Proben entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4 °C geerntet, in flüssigem N₂ schockgefroren und für die Isolation von Gesamt-RNA verwendet. Sonden, die mit dem 5'- bzw. 3'-Ende des *selA*-Transkripts hybridisieren, wurden nach 5'-Markierung der Oligonukleotide S1-*selA1* und S1-*selA2* mit γ-[³²P]-ATP and T4 Polynukleotidkinase mittels PCR synthetisiert. In 100 μl Reaktionsansatz waren dabei eines der markierten Oligonukleotide (25 pmol), 3 μg mit *EcoO109I* hydrolysiertes Plasmid pUAB, 0,2 μM eines jeden Desoxynukleotids, 10 % DMSO und 2 U DyNAzyme II in dem mit dem Enzym gelieferten Puffer enthalten. Nach einem 2-minütigen Denaturierungsschritt und 18 Syntheszyklen (30 sec 50 °C, 40 sec 72 °C, 30 sec 94 °C) wurden die Ansätze mit Formamid-Auftragspuffer versetzt und auf ein 8 % Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Separation von Nebenprodukten wurden die Sonden aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter „5'-Markierung von RNA“ beschrieben eluiert. Nach Kopräzipitation von jeweils 10.000 cpm einer jeden Sonde mit der zu analysierenden RNA-Probe, Waschen des Präzipitats mit 80 % Ethanol und Trocknen des Niederschlags wurden die Nukleinsäuren in 20 μl Hybridisierungspuffer (80 % Formamid, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA,

40 mM PIPES, pH 7,0) gelöst, 5 min bei 95 °C denaturiert, unmittelbar in ein 58 °C Wasserbad überführt und für mindestens 12 h inkubiert. Der Abbau von nicht hybridisierten Sonden erfolgte durch Zugabe von 200 µl S1-Nuklease-Puffer (300 mM NaCl, 2 mM ZnSO₄, 30 mM Natriumacetat, pH 5,5, 1 U/µl S1-Nuklease) und Inkubation für 45 min bei 37 °C. Nach Stoppen der Reaktion durch Hinzufügen von 5,5 µl 10 % SDS und 2 µl Hefe-tRNA (10 mg/ml) wurden die Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert. Der Niederschlag wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in Formamid-Auftragspuffer gelöst. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte in einem 8 % Harnstoff-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde anschließend getrocknet und auf einem Phosphor-Screen exponiert.

14. Bioinformatische Methoden

Auswertung von CD-Spektren

Die Dekonvolution von CD-Spektren fand mit dem Programm CDNN 2.1 statt (Böhm *et al.*, 1992), das unter der Internetadresse http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cd_spec verfügbar ist. Die Analyse erfolgte dabei durch ein mit einfachen Spektren trainiertes neuronales Netzwerk. Der für die Auswertung verwendete Wellenlängenbereich betrug 200-260 nm.

Bildverarbeitung

SDS-Polyacrylamid-Gele und Röntgenfilme wurden mit einem Flachbettscanner des Typs Astra 4000U (Umax Systems, Willich) unter Verwendung einer Durchlicht-Einheit mit einer Auflösung von 600 dpi eingelesen. Die Weiterverarbeitung der graphischen Daten erfolgte anschließend in Photoshop 5.0 (Adobe Systems, San Jose, USA).

Darstellung von 3D-Strukturen

Die Darstellung dreidimensionaler Strukturmodelle auf Grundlage von pdf-Dateien erfolgte unter Verwendung von RasWin 2.7.2 (Bernstein, 2000) oder MolMol 2K.1 (Konradi *et al.*, 1996).

Sequenzanalysen

Die generelle Bearbeitung von DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Programm GeneTool Lite 1.0 (BioTools Inc., Edmonton, Kanada), die von Protein-Sequenzen mit PepTool Lite 1.1 (BioTools Inc.). Sequenz-Alignments wurden in ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) berechnet und zur

graphischen Darstellung in GeneDoc 2.6 (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) weiterverarbeitet. Die Suche nach homologen Sequenzen in Nukleotid- und Protein-Datenbanken erfolgte mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) am BLAST-Server des National Institute of Health (USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Die Faltungsmöglichkeiten von RNA-Sequenzen wurden unter Verwendung von mfold 3.1 (Mathews *et al.*, 1999) analysiert.

Analyse von Autoradiogrammen

Phosphor-Screens wurden mit einem Storm 860 Laser Scanner der Firma Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA) eingelesen. Die Daten wurden anschließend mit dem Programm ImageQuant 2.1 (Molecular Dynamics) analysiert und in PhotoShop 5.0 (Adobe Systems, San Jose, USA) weiterverarbeitet.

Analyse mathematischer Daten

Die Analyse und Darstellung von Primärdaten aus kinetischen Experimenten erfolgte mit dem Programm GraFit 3.0 (Erithacus Software, Staines, Großbritannien). Zur globalen Analyse komplexer Reaktions-Systeme wurde Scientist 2.01 (Micromath, Salt Lake City, USA) verwendet. Die Verarbeitung aller übrigen numerischen Daten erfolgte in SigmaPlot 2001 (SPSS Science, Chicago, USA).

Ergebnisse

1. System zur effizienten Charakterisierung von mutierten SelB-Proteinen

Biochemische Reaktionen, die der Funktion eines Proteins zu Grunde liegen, lassen sich oft durch Zufallsmutagenese oder zielgerichtete Veränderung konservierter Aminosäuren und eine anschließende Analyse der resultierenden, veränderten Eigenschaften aufklären. Der relativen Schnelligkeit, mit der sich eine große Zahl mutierter Gene isolieren lässt, steht jedoch in der Regel ein hoher zeitlicher Aufwand für die Überproduktion und Reinigung der Genprodukte in ausreichender Menge gegenüber. Diese Situation erschwerte insbesondere auch die funktionelle Analyse des Elongationsfaktors SelB, dessen Reinigung aus *E. coli* (Forchhammer *et al.*, 1990; Thanbichler und Böck, 2002) eine Vielzahl von Schritten erfordert und dabei nur eine geringe Ausbeute an Protein liefert. Die Plasmidsysteme, die für die Mutagenese von *selB*, die Überprüfung der Funktionalität der mutierten Genprodukte *in vivo* und für die Überproduktion zu Reinigungszwecken eingesetzt wurden, unterschieden sich zudem meist voneinander, so dass für jedes Allel eine Reihe von Klonierungsschritten notwendig war, um es einer Charakterisierung zugänglich zu machen. Zur Vereinfachung von Funktionsstudien sollte daher ein System entwickelt werden, das eine möglichst einfache Analyse von *selB* Allelen *in vivo* und *in vitro* ermöglichte.

Vorbereitende Klonierungen

Die Entwicklung von Verfahren zur Isolierung von Proteinen aus Zell-Rohextrakten mittels Affinitätschromatographie ermöglicht die Reduktion einer Reinigungsprozedur auf wenige Schritte. Eine spezifische und hochaffine, aber reversible Interaktion zwischen einem säulengekoppelten Faktor und einem Peptid, mit dem das zu isolierende Protein fusioniert ist, führt hierbei zu einer selektiven Anreicherung des Zielproteins. Diese Methode bot sich auch für die Reinigung von SelB an. Als Affinitätspeptid (Tag) werden häufig komplette Proteine, wie Glutathion S-Transferase (Smith und Johnson, 1988) oder das Maltose-Bindeprotein (Guan *et al.*, 1988) benutzt. Die biologische Aktivität des Fusionspartners kann aber durch sterische Behinderung der Ligandenbindung oder durch erzwungene Konformationsänderungen auf Grund der Größe des Tags beeinträchtigt werden. Da SelB ein komplexes Molekül darstellt, das mit einer Reihe von verschiedenen Liganden interagiert, wurde diese Möglichkeit der Reinigung

ausgeschlossen. Eine Abspaltung des Tags mit sequenzspezifischen Proteasen würde diesen Nachteil zwar kompensieren, aber die Prozedur um einen zusätzlichen Reinigungsschritt verlängern. Als Alternative bot sich das kurze Hexahistidin-Affinitätspeptid (His-Tag) (Hochuli *et al.*, 1987) an. Es besteht, vergleichbar mit den verschiedenen Varianten des *Strep*-Tags (Schmidt und Skerra, 1993; Maier *et al.*, 1998), aus nur wenigen Aminosäuren, so dass die Möglichkeit zur Interferenz mit der Aktivität des Fusionspartners stark eingeschränkt ist, und kann auch für Reinigungen im präparativen Maßstab problemlos eingesetzt werden.

Konstruktion von pT7SelBH6

Der N-terminale Teil von SelB umfasst die Guaninnukleotid-Bindetasche sowie einen Teil der tRNA-Bindetasche und er interagiert vermutlich in identischer Weise wie EF-Tu mit der L7/L12-Region des Ribosoms, die an der Bindung von Translationsfaktoren und der Aktivierung ihrer GTPase-Aktivität beteiligt ist (Stark *et al.*, 1997). Er bietet sich daher für die Fusion eines Affinitätspeptids nicht an, da eine Veränderung der biochemischen Parameter der Interaktionen nicht ausgeschlossen werden kann. Die C-terminale Region des Proteins dagegen bindet das SECIS-Element, das zum Zeitpunkt der Dekodierung des Selenocystein-Codons überwiegend außerhalb der mRNA-führenden Region des Ribosoms liegt (Hüttenhofer *et al.*, 1996a), so dass eine Interaktion mit ribosomalen Komponenten unwahrscheinlich ist. Aus diesem Grund wurde einer Fusion des His-Tags am C-Terminus von SelB der Vorzug gegeben. Für diese Lokalisation sprach außerdem die Tatsache, dass EF-Tu von *E. coli* (Boon *et al.*, 1992) und Terminationsfaktor 1 (RF1) von *Thermus thermophilus* (Ito und Nakamura, 1997) bereits als Fusionsproteine mit C-terminalem His-Tag gereinigt worden waren und gezeigt werden konnte, dass ihre Aktivität durch das Affinitätspeptid nicht negativ beeinflusst wurde. Um eine spezifische Abspaltung des Affinitätspeptids für spätere Anwendungen zu ermöglichen sollte in den Tag zusätzlich eine Faktor Xa-Schnittstelle eingeführt werden.

Die Erweiterung des *selB*-Gens um die für den His-Tag kodierende, 36 bp lange Sequenz (Abbildung 9) erfolgte unter Verwendung der phosphorylierten Oligonukleotide SelBH6-uni und SelBH6-rev mittels inverser PCR mit pWL194 (Forchhammer *et al.*, 1990) als Matrize. Nach Religation des erhaltenen PCR-Produkts wurde ein 435 bp *PfI*M/*SalI*-Fragment des Ligationsproduktes in den mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pWL194 umklont und die korrekte Amplifikation durch Sequenzierung verifiziert. Das resultierende Überexpressionsplasmid, welches *selB_{His}* unter Kontrolle des T7 Φ 10-Promotors trägt, wurde pT7SelBH6 genannt.

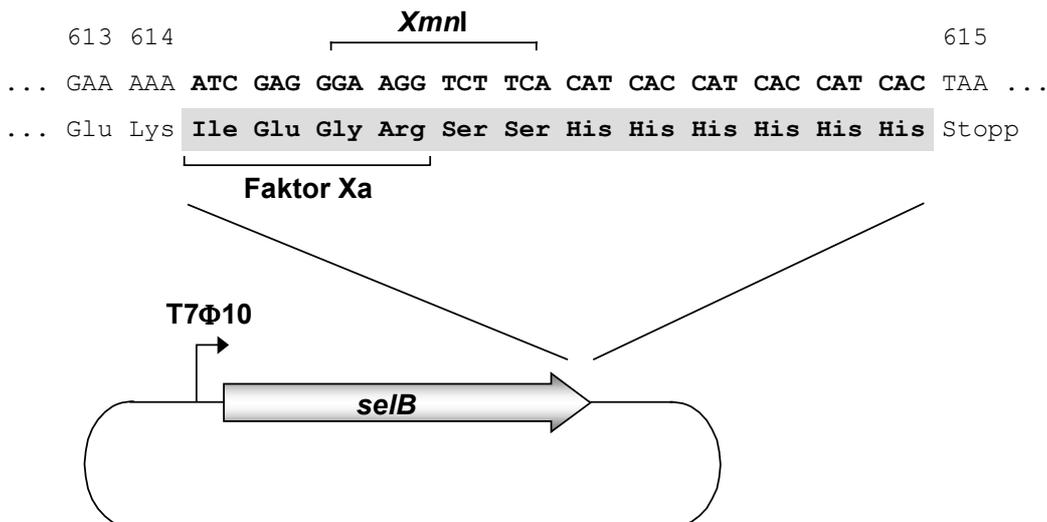


Abbildung 9: Sequenz des in SelB eingeführten Hexahistidin-Affinitätspeptids. Die in SelB eingeführte Sequenz ist zusammen mit der entsprechenden Nukleotidsequenz in Fettdruck dargestellt. Aminosäuren des Wildtyp-Proteins sind mit den entsprechenden Kodons und ihren Positionen in der Wildtyp-Sequenz in dünner Schrift aufgeführt. Die Position der durch die Einführung des His-Tags entstandenen, zusätzlichen *XmnI*-Schnittstelle in pT7SelBH6 sowie der Spaltungsstelle von Faktor Xa im Affinitätspeptid sind durch Klammern angegeben.

Konstruktion von pMT7 und pMB

Neben dem Plasmid pT7SelBH6, das sich für die Überproduktion und Reinigung von SelB im großen Maßstab eignet, sollte auch ein Vektor konstruiert werden, der sowohl eine induzierbare, T7Φ10-abhängige Expression von *selB* als auch eine konstitutive Expression unter Kontrolle des *tet*-Promotors erlaubt. Dadurch wird es möglich, ein mutiertes *selB*-Allel unter Verwendung von nur einem Plasmid *in vivo* auf seine Funktionalität zu überprüfen und es anschließend zur Reinigung und biochemischen Charakterisierung des Genprodukts zu überexprimieren.

Als Grundlage für das System diente der Vektor pMT7. Er basiert auf dem low-copy Vektor pACYC184, in dessen *tet*-Gen durch Restriktion mit *BfmI* und *Eco32I* und anschließende Ligation mit einem aus den Oligonukleotiden T7-MCS 1, T7-MCS-2, T7-MCS-3 und T7-MCS-4 *in vitro* assemblierten Fragment in die 5'-Region ein T7Φ10-Promotor sowie ein Polylinker eingeführt wurden. Das daraus resultierende Plasmid wurde nach Isolation aus *E. coli* WA321 mit *SalI* und *BclI* gespalten und mit einem Fragment, das durch *in vitro*-Assemblierung der Oligonukleotide TER-1, TER-2, TER-3, TER-4, TER-5 und TER-6 generiert wurde und für Transkriptions-Terminatoren kodiert, ligiert. Die Sequenz und Position der einzelnen Komponenten von pMT7 sind in Abbildung 10 dargestellt. Der *rrnB T1*-Terminator stoppt mit hoher Effizienz *E. coli* RNA Polymerase und T7 RNA Polymerase, während der VSV Terminator spezifisch für T7 RNA Polymerase ist (Lyakhov *et al.*, 1997; Lyakhov *et al.*, 1998). Dadurch ist

sowohl bei schwacher konstitutiver Transkription unter Kontrolle des *tet*-Promotors als auch bei Erhöhung der Transkriptionsrate bei T7 RNA Polymerase-abhängiger Transkription ein definiertes Ende des produzierten Transkripts sichergestellt.

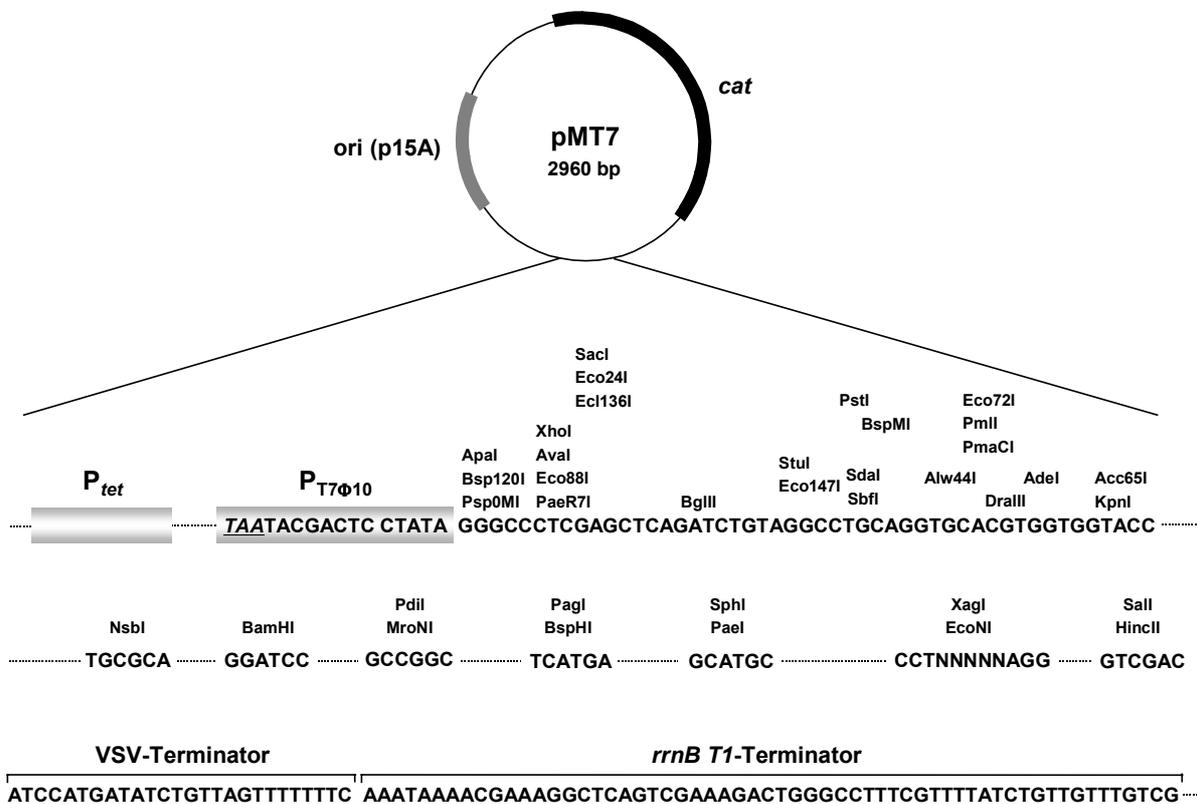


Abbildung 10. Schematische Darstellung des Plasmids pMT7. Die Sequenz der durch *in vitro*-Assemblierung von Oligonukleotiden erzeugten Fragmente ist angegeben. Ein TAA Stopp-Kodon, das im Leserahmen des *tet*-Gens liegt und dessen Translation beendet, ist unterstrichen dargestellt. Die Enzyme mit in pMT7 singulärer, im Polylinker-Bereich liegender Erkennungssequenz sind an der Position ihrer Schnittstelle aufgeführt. Gestrichelte Linien repräsentieren nicht im Detail aufgeführte Nukleotidsequenzen.

Die Konstruktion des Plasmids pMB erfolgte anschließend durch Restriktion von pMT7 mit *BglI* und *SallI* und Ligation mit einem *BstYI/SallI*-Fragment von pT7SelBH6, welches das *selB_{His}*-Gen, 202 bp der *selB* upstream-Region und 56 bp der downstream-Region umfasst. Die vom *tet*-Promotor dirigierte, konstitutive Expression von *selB_{His}* wurde durch Komplementation der *ΔselB*-Mutation des Stamms PT91300 bei Einführen von pMB, wie im Gastest beobachtet, bestätigt (vgl. auch Abbildung 22). Die Überexpression von SelB_{His} im T7-Promotor/RNA Polymerase-System war ferner nach Transfer von pMB in den Stamm BL21(DE3) und Induktion der T7 RNA Polymerase durch IPTG-Zugabe mittels SDS-PAGE und nachfolgender Färbung der Proteine mit Coomassie Blue deutlich nachweisbar. Auf Grund der niedrigeren Kopienzahl von

pMB fiel die Menge an produziertem Protein jedoch geringer aus als bei Verwendung von pT7SelBH6 unter identischen Bedingungen (Daten nicht gezeigt).

Reinigung des SelB_{His}-Fusionsproteins

Die Reinigung von SelB_{His} erfolgte aus dem Stamm BL21(DE3), der mit pT7SelBH6 transformiert worden war.

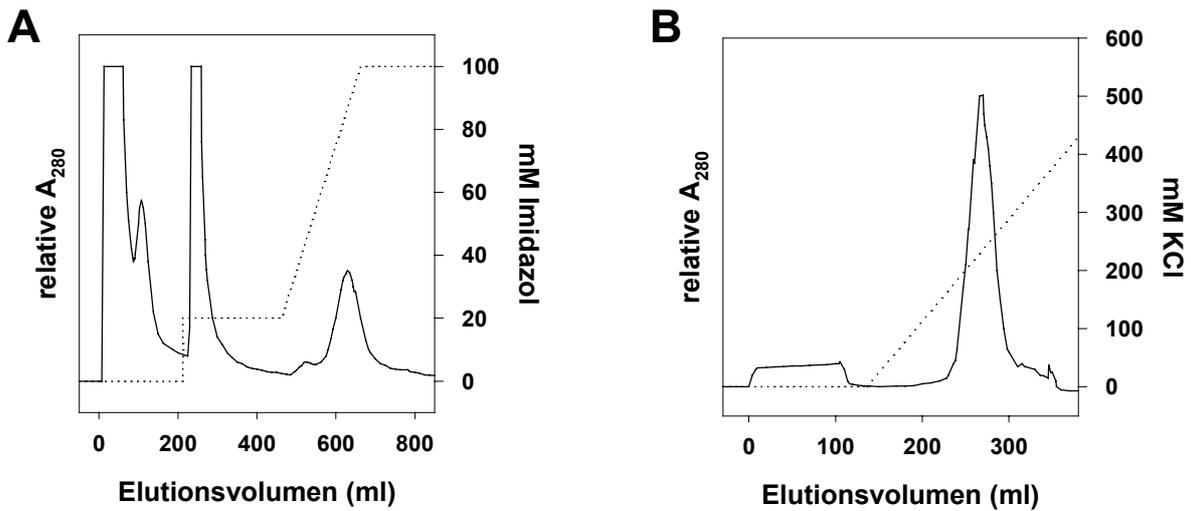


Abbildung 11. Anreicherung von SelB_{His}. Die Elutionsprofile der Chromatographie des Rohextrakts an Zn²⁺-NTA-Sepharose (**A**) und der angereicherten SelB_{His}-Fraktion an SP-Sepharose (**B**) sind mit durchgehenden Linien dargestellt. Der Verlauf der Salzgradienten in den Säulenpuffern ist durch unterbrochene Linien wiedergegeben.

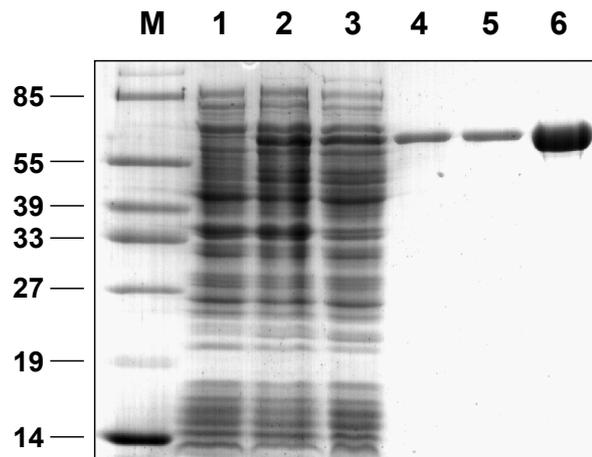


Abbildung 12. Schritte der Reinigung von SelB_{His}. Nach den einzelnen Reinigungsschritten wurden Proben mit SDS-Auftragspuffer versetzt und erhitzt. Die Proteine wurden anschließend in einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Färbung mit Coomassie-Lösung detektiert. Spuren: M, Längenstandard; 1, Lysat von Zellen vor Induktion der Expression; 2, Lysat von geernteten Zellen; 3, S30; 4, vereinigte Fraktionen nach Chromatographie an Zn²⁺-IDA-Sepharose; 5, vereinigte Fraktionen nach Chromatographie an SP-Sepharose; 6, gereinigtes Protein.

Nach Aufbruch der Zellen in Hochsalz-Puffer, der die Assoziation von SelB mit den Ribosomen (Forchhammer *et al.*, 1990) auflöst und die Löslichkeit von SelB deutlich erhöht, wurde durch Affinitäts-Chromatographie an Zn^{2+} -IDA-Sepharose (Abbildung 11A) eine starke Anreicherung des Zielproteins erreicht. Kontaminierende Proteine wurden anschließend mittels Kationenaustausch-Chromatographie an SP-Sepharose (Abbildung 11B) abgetrennt. Der Verlauf der Reinigung ist in Abbildung 12 dargestellt. Aus 12 g Zellen wurden ca. 10 mg reines Protein gewonnen.

Charakterisierung des SelB_{His}-Fusionsproteins

Es hatte sich gezeigt, dass das *selB_{His}*-Gen in *E. coli* funktionell exprimiert wird. Um das Genprodukt jedoch als repräsentatives Modell für das Wildtyp-Protein einsetzen zu können, musste sichergestellt werden, dass es sich biochemisch identisch zu Wildtyp-SelB verhielt.

Biologische Aktivität

Um einen ersten Hinweis auf die Funktionalität von SelB_{His} zu erhalten, wurde dessen Fähigkeit, das Durchlesen an UGA-Kodons zu vermitteln, mit Hilfe eines β -Galaktosidase-Assays quantitativ ermittelt. Hierzu wurden *selB* und *selB_{His}* durch Restriktion von pWL194 bzw. pT7SelBH6 mit *NheI*, Glätten der Fragmentenden mit Klenow-Polymerase und anschließende Restriktion mit *SalI* isoliert und durch Ligation in den mit *EcoRV* und *SalI* geschnittenen Vektor pACYC184 unter die Kontrolle des *tet*-Promotor gestellt. Die resultierenden Plasmide pACSELB bzw. pACSELBH6 wurden zusammen mit dem Reporterplasmid pWT in den Stamm PT91300 ($\Delta selB$) transferiert und die durch die beiden Genprodukte vermittelte Durchleseaktivität wurde bestimmt (Tabelle 8).

TABELLE 8: Effizienz der durch SelB und SelB_{His} vermittelten UGA-Suppression.

Plasmid	Miller Units
pACYC184	4,80 (\pm 0,05)
pACSELB	134 (\pm 4)
pACSELBH6	140 (\pm 3)

Es zeigte sich, dass beide SelB-Varianten *in vivo* unter den verwendeten Bedingungen identische Aktivitäten besitzen.

Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur

Eine Beeinflussung der Sekundär- und Tertiärstruktur von SelB durch den His-Tag konnte nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde SelB_{His} einer strukturellen Analyse mittels proteinbiochemischer und spektroskopischer Methoden unterzogen.

Limitierte Proteolyse

Die Behandlung eines Proteins mit limitierenden Mengen an Protease führt zu einer Spaltung der Polypeptidkette in definierten, besonders zugänglichen Bereichen. Bei Konformationsunterschieden kann es zu einer Exposition von zusätzlichen Schnittstellen oder zu einer Abschirmung zuvor zugänglicher Bereiche kommen, die in einer Veränderung des Degradationsmusters resultiert. Wildtyp-SelB und SelB_{His} wurden daher einer limitierten Proteolyse durch Trypsin (Abbildung 13A) und Proteinase K (Abbildung 13B) unterzogen, um die erhaltenen Muster der Abbauprodukte miteinander zu vergleichen. Bei tryptischem Verdau zeigte sich in beiden Fällen das für SelB typische Spaltungsmuster, das auf einer anfänglichen Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Arg³⁴ und Gly³⁵ und einer nachfolgenden Spaltung zwischen Arg¹⁵² und Gly¹⁵³ beruht (Forchhammer *et al.*, 1990). Die Kinetik der Reaktion ist für beide Proteine identisch. Die Behandlung von SelB und SelB_{His} mit Proteinase K ergab ebenfalls eine weitgehende Übereinstimmung im erhaltenen Bandenmuster und im Verlauf der Reaktion, was auf eine Konservierung der generellen Proteinstrukturen schließen lässt.

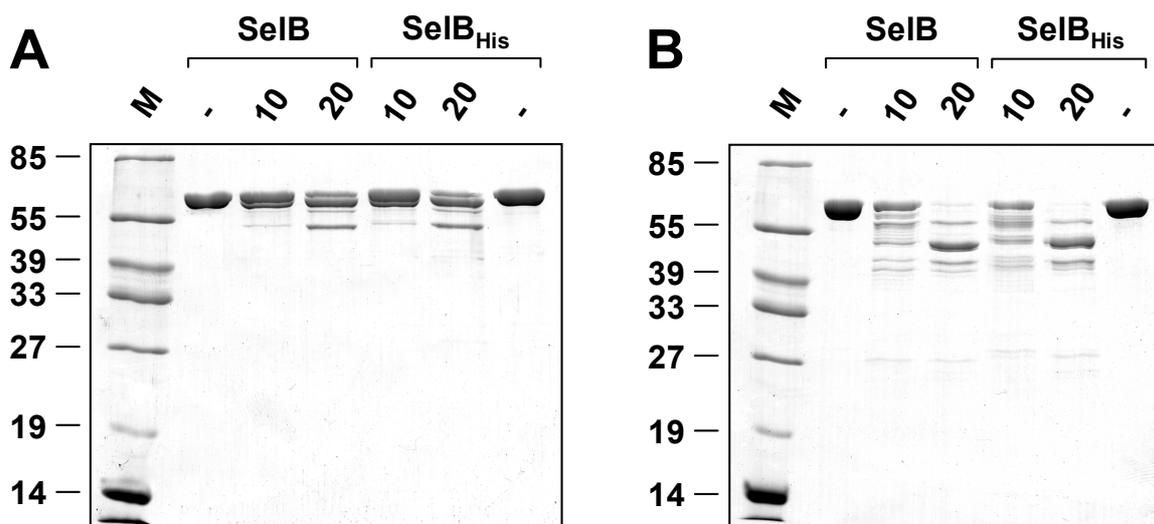


Abbildung 13. Limitierte Proteolyse von SelB und SelB_{His}. Die Proteine wurden mit limitierenden Mengen an Trypsin (A) und Proteinase K (B) behandelt. Vor Start der Reaktion sowie zu definierten Zeitpunkten nach Zugabe der Protease wurden Proben aus den Ansätzen entnommen. Die Produkte wurden auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Färbung mit Coomassie-Lösung sichtbar gemacht.

CD-Spektroskopie

CD-Spektroskopie erlaubt Aussagen über die Strukturelemente eines Proteins und stellt daher ein geeignetes Verfahren zum Vergleich der Faltung von SelB und SelB_{His} dar. Die normierten Spektren, die bei der Analyse der beiden Proteine erhalten wurden (Abbildung 14), sind weitgehend deckungsgleich, was auf eine identische Verteilung von Sekundärstruktur-Elementen und somit auf eine native Konformation von SelB_{His} schließen lässt.

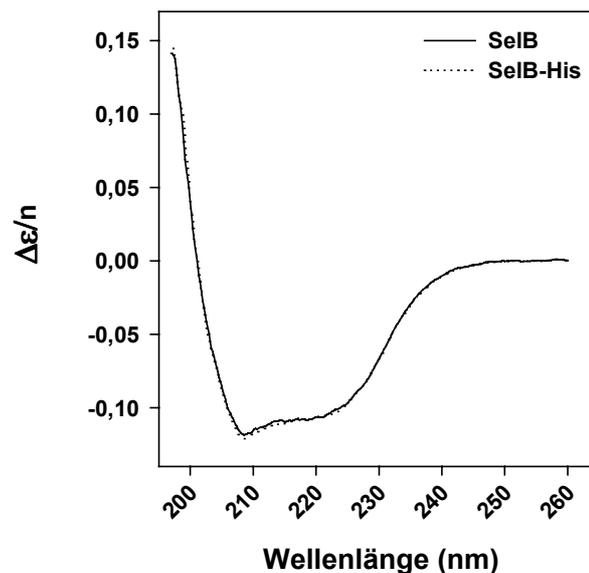


Abbildung 14. Überlagerung der CD-Spektren von SelB und SelB_{His}. Es wurden CD-Spektren von Lösungen, die 3,64 μM SelB bzw. 3,73 μM SelB_{His} enthielten, gemessen und gegen die Proteinkonzentrationen und die jeweilige Länge der untersuchten Proteine korrigiert.

Analyse der biochemischen Eigenschaften

Die vorhergehenden Untersuchungen hatten eine weitgehende Übereinstimmung der Eigenschaften von Wildtyp-SelB und SelB_{His} ergeben. Um auch leichte, *in vivo* nicht detektierbare Veränderungen in biochemischen Parametern, die auf geringfügigen, mit den verwendeten Methoden nicht nachweisbaren Strukturveränderungen oder auf einer sterischen Behinderung der Ligandenbindung beruhen, ausschließen zu können, wurde die Interaktion von SelB_{His} mit den seinen Liganden GTP, SECIS-RNA und Selenocysteyl-tRNA^{Sec} näher untersucht.

Bindung von Guanosin-Nukleotiden

Um die Interaktion von SelB_{His} mit Guanosin-Nukleotiden zu untersuchen, wurde die Kinetik seiner Assoziation mit mantdGTP unter Verwendung der Stopped-Flow-Methode analysiert. Aus der in Abbildung 15A aufgetragenen Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziationsreaktion von der mantdGTP-Konzentration ergibt sich unter Annahme einer Reaktion pseudo-erster Ordnung eine Geschwindigkeitskonstante (k_{ass}) von $1,75 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert stimmt im Rahmen der Messgenauigkeit mit der für das Wildtyp-Protein bestimmten Geschwindigkeitskonstanten (vgl. Tabelle 12) überein. Dasselbe gilt für die Verdrängung von mantdGTP von SelB_{His} durch GTP (Abbildung 15B), die mit einer Geschwindigkeitskonstanten (k_{dis}) von $0,108 \text{ s}^{-1}$ abläuft. Dieser Wert führt zusammen mit k_{ass} zu einer Gleichgewichtskonstanten (K_D) für die Interaktion von SelB_{His} mit mantdGTP von $0,62 \text{ }\mu\text{M}$. Die Funktionalität der G-Domäne von SelB_{His} ist somit vollständig erhalten geblieben.

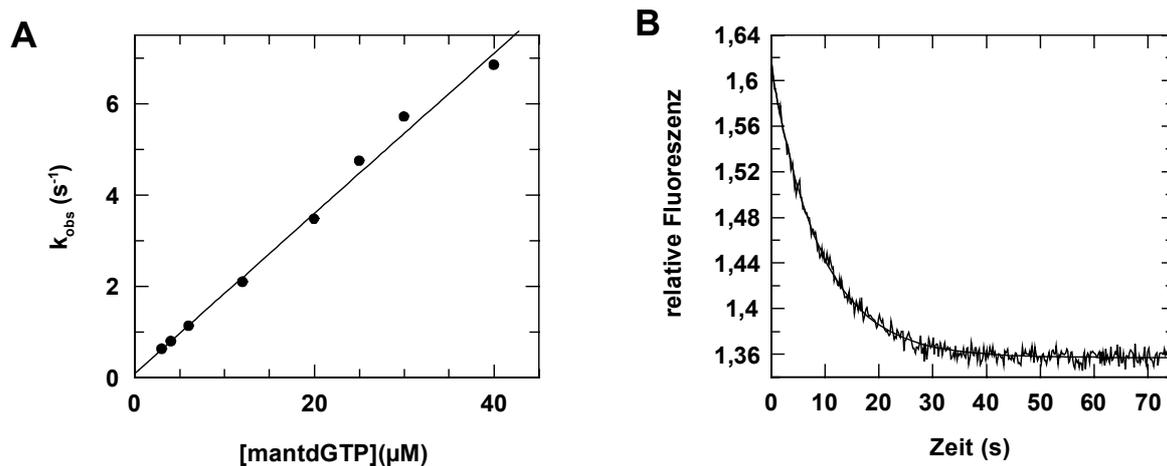


Abbildung 15. Interaktion von SelB_{His} mit mantdGTP. Die Assoziation von mantdGTP mit SelB_{His} (A) wurde in Ansätzen, die $0,195 \text{ }\mu\text{M}$ SelB_{His} und mantdGTP in variierenden Konzentrationen enthielten, verfolgt. Die Verdrängung von mantdGTP von SelB_{His} (B) erfolgte durch Mischen einer Lösung des Komplexes aus SelB_{His} ($0,39 \text{ }\mu\text{M}$) und mantdGTP ($4 \text{ }\mu\text{M}$) mit einer Lösung von $200 \text{ }\mu\text{M}$ GTP. Der Verlauf der Reaktionen wurde mittels FRET detektiert.

Interaktion mit SECIS-Elementen

Der His-Tag von SelB_{His} ist am C-Terminus des Proteins, der für die Bindung des SECIS-Elements verantwortlich ist, lokalisiert und könnte daher durch sterische Behinderung oder durch Interaktion der positiv geladenen Histidin-Reste mit den negativen Ladungen des mRNA-Rückgrats die Bindung des Liganden beeinflussen. Die Fähigkeit von SelB_{His} zur Interaktion mit SECIS Elementen wurde in einem Gelretardations-Assay getestet. Abbildung 16 zeigt, dass die

Komplexbildung zwischen SelB_{His} und der *fdnG*-HNS mit derselben Effizienz erfolgt wie bei Wildtyp-SelB.

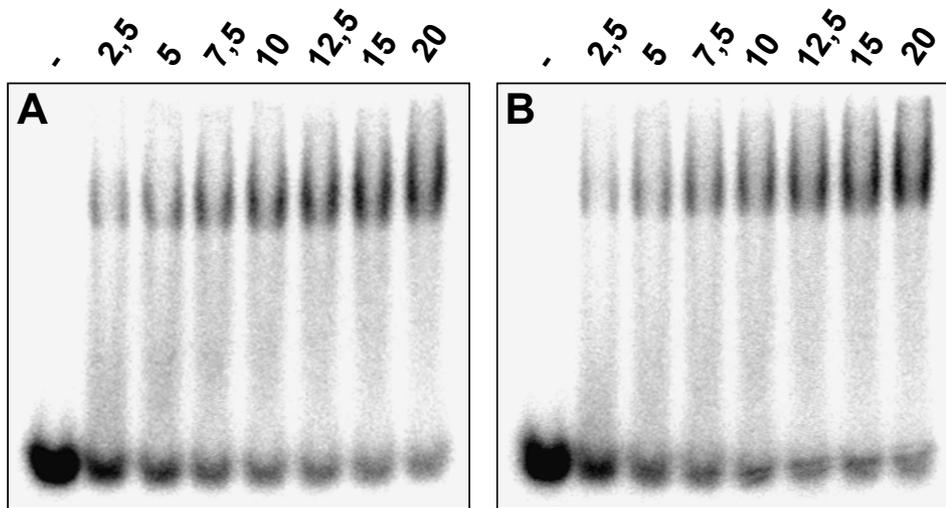


Abbildung 16. Vergleich der Interaktion von SelB und SelB_{His} mit der *fdnG*-HNS. 39 nt-*fdnG*-HNS wurde mit zunehmenden Mengen SelB (A) und SelB_{His} (B) inkubiert. Die gebildeten Komplexe wurden anschließend in einem nicht denaturierenden Gel von der freien Haarnadelstruktur getrennt und mit einem PhosphorImager detektiert.

Interaktion mit Selenocysteyl-tRNA^{Sec}

Die Effizienz der Bindung von Sec-tRNA^{Sec} durch SelB_{His} wurde in einem Hydrolyseschutz-Experiment ermittelt.

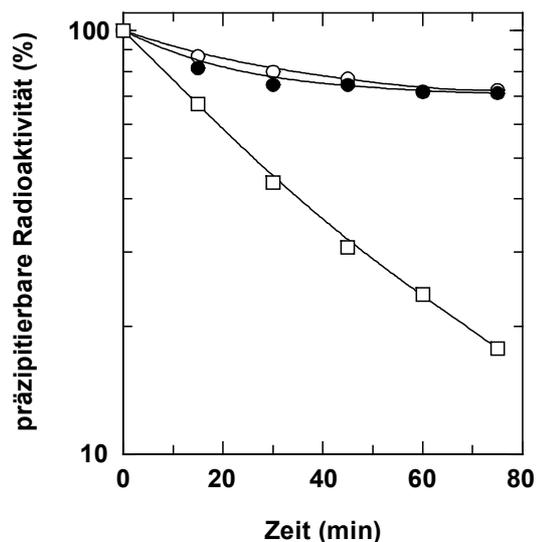


Abbildung 17. Schutz von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} durch SelB_{His} vor alkalischer Hydrolyse. 0,17 μ M [¹⁴C]-Sec-tRNA^{Sec} wurden in Gegenwart von 1 mM GTP mit 1 μ M SelB (●), SelB_{His} (○) oder BSA (□) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, aus denen die Menge an noch nicht hydrolysierter [¹⁴C]-Sec-tRNA^{Sec} durch Präzipitation mittels TCA bestimmt wurde.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich wurde die Esterbindung der aminoacylierten tRNA durch SelB_{His} in gleicher Weise vor Hydrolyse geschützt wie durch Wildtyp-SelB, während mit BSA kein Schutz festzustellen war. Der C-terminale His-Tag übt also keinen Einfluss auf die biochemischen Eigenschaften von SelB aus. Er kann daher im folgenden für die Reinigung von mutierten SelB-Proteinen eingesetzt werden.

2. Determinanten der Aminosäurespezifität von SelB

Nur wenige Enzyme sind in der Lage, *spezifisch* mit der Aminosäure Selenocystein zu interagieren. Zu diesen Ausnahmen gehören Selenocystein Methyltransferase aus *Astragalus bisulcatus*, die für die Pflanze toxisches Selenocystein durch Methylierung in das nicht proteinogene und daher ungiftige Se-Methyl-Selenocystein überführt (Neuhierl *et al.*, 1999), Selenocystein Lyase, die freies Selenocystein durch Hydrolyse zu Alanin und enzymgebundenes Se⁰ umsetzt, welches anschließend als Selendonor für die Selenophosphat Synthetase-Reaktion dienen kann (Mihara *et al.*, 2002), und SelB, das mit hoher Selektivität nur die selenocysteilierte Form von tRNA^{Sec} bindet, während deren Vorstufe Seryl-tRNA^{Sec} nicht als Ligand erkannt wird. Diese Spezifität der tRNA-Bindung durch SelB ist essentiell für die Synthese funktioneller Proteine, da eine Substitution von Selenocystein durch Serin in der Regel die Aktivität des betroffenen Enzyms auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau reduziert (Zinoni *et al.*, 1987; Zhong und Holmgren, 2000).

Gerichtete Mutagenese der Aminoacyl-Bindetasche von SelB

EF-Tu interagiert im Gegensatz zu SelB mit fast allen Aminoacyl-tRNA-Spezies, wobei sowohl die tRNA-Körper als auch die damit veresterten Aminosäuren mit hoher Spezifität erkannt werden. Die thermodynamischen Beiträge des Aminoacyl-Restes und der tRNA zur gesamten freien Energie der Bindung sind voneinander unabhängig. Sie kompensieren sich jedoch bei korrekter Beladung der tRNA, so dass die Affinitäten von EF-Tu für die verschiedenen Aminoacyl-tRNA-Spezies sehr ähnlich sind (LaRiviere *et al.*, 2001; Asahara und Uhlenbeck, 2002). Die Architektur der Bindetaschen muss also die Akkomodation unterschiedlichster Strukturen ermöglichen, aber gleichzeitig die Ausbildung von spezifischen Kontakten mit den Liganden zulassen. Auf Grund der großen Ähnlichkeit des N-terminalen Anteils von SelB mit EF-Tu sollte die Bindung der Liganden durch beide Proteine auf denselben Prinzipien beruhen. Spezifische Modifikationen in SelB haben aber dazu geführt, dass die Bandbreite möglicher

Substrate stark eingeschränkt wurde und nur noch Selenocysteyl-tRNA^{Sec} als einziger Ligand erkannt wird.

Die tRNA-Bindetasche von SelB weist eine Reihe charakteristischer Veränderungen auf, die möglicherweise zum Ausschluss kanonischer tRNAs führen (Hilgenfeld *et al.*, 1996). Die Unterscheidung zwischen Seryl- und Selenocysteyl-tRNA^{Sec} könnte dabei durch spezifische Determinanten der Aminoacyl-Bindetasche erfolgen, welche die Stringenz der Bindung gegenüber der von EF-Tu stark erhöhen. Die Modellierung des zu EF-Tu homologen Teils von SelB auf Grundlage der Koordinaten des EF-Tu·GDPNP-Komplexes aus *Thermus thermophilus* ermöglicht einen Vergleich der Regionen beider Proteine, die in direktem Kontakt mit dem Aminoacyl-Rest der gebundenen tRNA stehen (Abbildung 18).

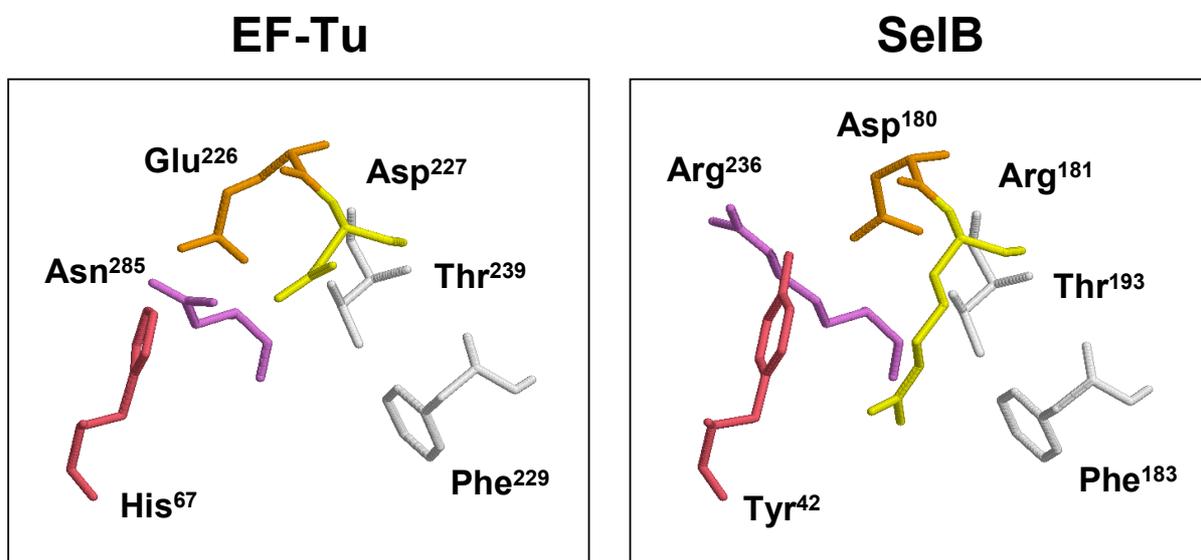


Abbildung 18. Vergleich der Aminoacyl-Bindetaschen von EF-Tu und SelB. Die Abbildung zeigt die räumliche Anordnung der Aminosäure-Reste von EF-Tu aus *Thermus aquaticus*, die in direktem Kontakt zum Aminoacyl-Rest der gebundenen tRNA stehen (Nissen *et al.*, 1995), im Vergleich zur Anordnung der entsprechenden Reste von SelB. Konservierte Aminosäuren sind in grau dargestellt. Einander entsprechende Aminosäuren sind durch identische Farben gekennzeichnet. Die Darstellung erfolgte auf Grundlage der Koordinaten von EF-Tu·GDPNP aus *Thermus aquaticus* (Kjeldgaard *et al.*, 1993) (1EFT) und der mittels Homologie-Modellierung berechneten Koordinaten des N-terminalen Teils von SelB (Hilgenfeld *et al.*, 1996).

Die generelle Struktur der Bindetaschen ist zu einem hohen Grad konserviert. So weist die räumliche Anordnung der konservierten Threonin- und Phenylalanin-Reste und der ungesättigten Ringsysteme von His⁶⁷ bzw. Tyr⁴² eine starke Übereinstimmung zwischen beiden Proteinen auf. Glu²²⁶ ist in SelB durch Asp¹⁸⁰ ersetzt worden, was zu einer Konservierung der negativen Ladung führt, die allerdings infolge der kürzeren Seitenkette von Aspartat anders positioniert ist. Ein auffälliger Unterschied liegt im Austausch der polaren Aminosäure Asn²⁸⁵ sowie der sauren

Aminosäure Asp²²⁷ von EF-Tu gegen positiv geladene Arginin-Reste in SelB. Selenocystein liegt mit einem pK_a der Selenol-Gruppe von 5,2 unter physiologischen Bedingungen überwiegend in der deprotonierten Form vor, während die Hydroxylgruppe von Serin (pK_a = 13,6) vollständig protoniert bleibt. Die positiven Ladungen von Arginin könnten somit über ionische Wechselwirkungen oder Wasserstoff-Brücken mit dem negativ geladenen Selenocystein-Rest die Bindung von korrekt aminoacylierter tRNA^{Sec} begünstigen, während eine Anlagerung der serylerten Vorstufe aus Mangel an Interaktionsmöglichkeiten thermodynamisch nicht möglich ist.

Wenn die stringente Architektur der Bindetasche für die Selektivität der Aminoacyl-Bindung durch SelB verantwortlich ist, dann sollte ihre Überführung in die bei EF-Tu vorliegende Form eine Akkomodation von Serin zulassen. Diese Hypothese wurde im folgenden durch gerichtete Mutagenese der bei Bakterien, Archaeen und Eukaryonten funktionell stark konservierten Reste Tyr⁴², Asp¹⁸⁰, Arg¹⁸¹ und Arg²³⁶ von SelB getestet.

Einführen der Mutationen

Um die Mutagenese von *selB* zu erleichtern, wurde ein Fragment des Gens durch Restriktion von pACSELB mit *Hind*III und *Hpa*I isoliert und in den mit *Hind*III und *Sma*I behandelten Vektor pUC19 ligiert. Das resultierende Plasmid pUB (Abbildung 19) diente anschließend als Matrize für inverse PCR-Reaktionen, in denen unter Verwendung der Oligonukleotidpaare SelB-Y42H-uni/SelB-Y42H-rev, SelB-D180E-uni/SelB-DRF-rev, SelB-R181D-uni/SelB-DRF-rev, SelB-R236N-uni/SelB-R236N-rev und SelB-DR-uni/SelB-DRF-rev in *selB* Mutationen eingeführt wurden, die in den entsprechenden Genprodukten zu den Einzelaustauschen Tyr⁴²→His⁴² (Y42H), Asp¹⁸⁰→Glu¹⁸⁰ (D180E), Arg¹⁸¹→Glu¹⁸¹ (R181D) und Arg²³⁶→Asn²³⁶ (R236N) bzw. zum Doppelaustausch Asp¹⁸⁰→Glu¹⁸⁰ / Arg¹⁸¹→Glu¹⁸¹ führten. Nach Selbstligation der PCR-Produkte wurden mutagenisierte Fragmente von *selB* unter Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme (s. Abbildung 19) aus den erhaltenen Plasmiden isoliert und in das mit denselben Enzymen behandelte Plasmid pUB umklont. Das Vorliegen der eingeführten Mutationen und eine fehlerfreie PCR-Reaktion wurde anschließend durch Sequenzierung der inserierten Bereiche verifiziert.

Ausgehend von den erhaltenen Plasmiden wurden durch Kombination von Restriktionsfragmenten in mehreren Klonierungsschritten Allele von *selB* konstruiert, die alle möglichen Permutationen der vier Einzelmutationen trugen. Die insgesamt fünfzehn mutierten *selB*-Fragmente wurden schließlich durch Restriktion der entsprechenden Plasmide mit *Bst*YI und

*Bsa*HI isoliert und in den mit *Bgl*II und *Bsa*HI behandelten Vektor pMB ligiert, wodurch der *selB*-Leserahmen wieder vervollständigt wurde.

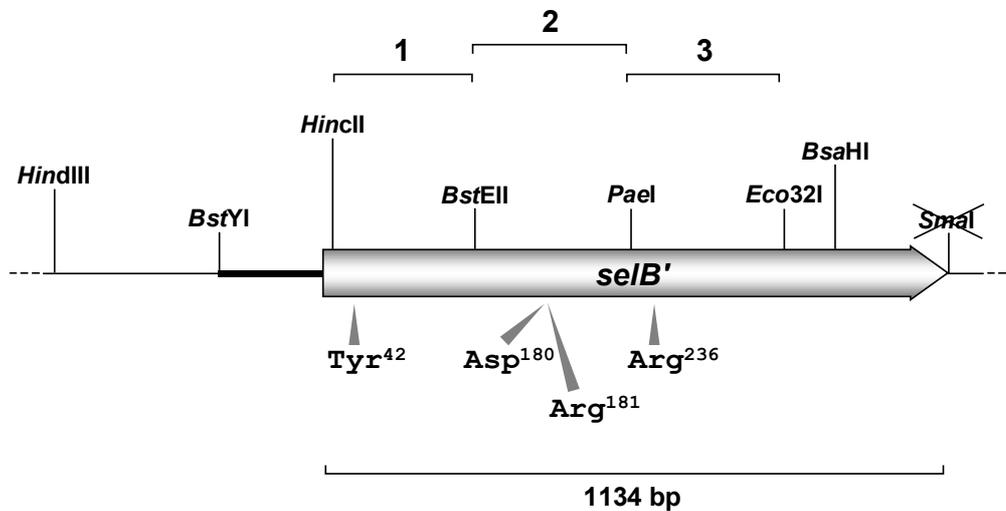


Abbildung 19. Schematische Darstellung des in Plasmid pUB enthaltenen *selB*-Fragments. Die singulären Restriktions-Schnittstellen in pUB, die für die Konstruktion mutierter *selB*-Allele verwendet wurden, sind angegeben. Die Positionen der Kodons, die für die Aminosäuren Tyr⁴², Asp¹⁸⁰, Arg¹⁸¹ und Arg²³⁶ kodieren, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Klammern bezeichnen *selB*-Fragmente, die sich durch Restriktion von pUB mit den Enzympaaren *Hinc*II/ *Bst*EII (1), *Bst*EII/ *Pae*I (2) und *Bst*EII/ *Eco*32I (3) ergeben und die für die Umklonierung und Kombination der Mutationen verwendet wurden. Anteile des Vektors pACSELB sind mit dünnen, chromosomale Sequenzen mit dicken Linien dargestellt.

Aktivität der mutierten *SelB*-Proteine in vivo

Um die Fähigkeit der *SelB*-Varianten, das Durchlesen eines UGA-Kodons in Abwesenheit von selenocysteylierter tRNA^{Sec} zu vermitteln, zu testen, wurden die verschiedenen pMB-Derivate in den Stamm AF90422 ($\Delta selAB$) transferiert. Dieser besitzt kein *selB*-Gen, dessen Produkt mit den Aktivitätsmessungen interferieren würde, und synthetisiert ferner keine Selenocystein Synthase (*SelA*), so dass in den Zellen Seryl-tRNA^{Sec} akkumuliert wird. Der Stamm wurde zusätzlich mit dem Reporterplasmid pWT transformiert, das in Gegenwart von funktionellem *SelB* die Synthese von β -Galaktosidase und somit eine Bestimmung der UGA-Durchleaserate erlaubt (Abbildung 20).

Um Aufschluss über die Interaktion der *SelB*-Varianten mit selenocysteylierter tRNA^{Sec} zu erhalten, wurde die Bestimmung der Durchleaserate außerdem unter Verwendung des Stamms PT91300 ($\Delta selB$) durchgeführt, der ein funktionelles *selA*-Gen besitzt und Seryl-tRNA^{Sec} daher quantitativ zu Sec-tRNA^{Sec} konvertiert.

Die für beide genetischen Hintergründe in TP-Medium gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Die Daten zeigen, dass nur die Variante SelB_{Y42H, D180E, R236N} im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine leicht erhöhte Aktivität mit Seryl-tRNA^{Sec} aufweist, während die Durchleseraten in allen anderen Fällen niedriger waren.

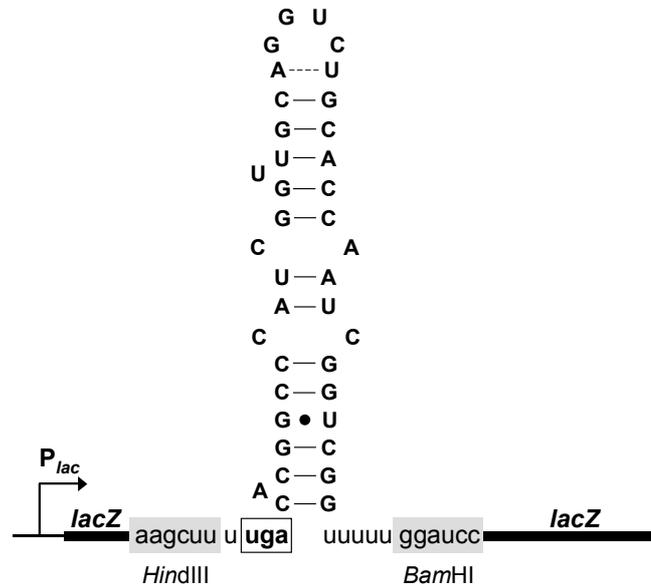


Abbildung 20. Schematische Darstellung des auf dem Plasmid pWT kodierten lacZ-Allels. Die Sequenz der für das *fdhF*-SECIS-Element kodierende Kasette ist als RNA in der funktionellen Haarnadel-Konformation dargestellt. Die Umrahmung kennzeichnet das im Leserahmen von *lacZ* liegende UGA-Kodon.

Die Funktionalität des Proteins mit Selenocysteyl-tRNA^{Sec} wurde durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure und durch bestimmte Kombinationen von Mutationen kaum beeinträchtigt. Die gemessenen Aktivitäten lagen in den meisten Fällen sogar leicht über dem für das Wildtyp-Protein erhaltenen Wert.

Andere Kombinationen führten jedoch zu einem völligen Verlust der enzymatischen Aktivität. Eine Instabilität der betroffenen SelB-Varianten kann als Ursache für dieses Phänomen ausgeschlossen werden, da die Proteine in ungefähr derselben Konzentration wie die funktionellen Varianten und in korrekter Größe in den Zellen nachweisbar waren (Abbildung 21). Das Auftreten zusätzlicher Signale, die eine partielle Degradation der Proteine andeuten würden, konnte für keine der Varianten beobachtet werden. Bestimmte mehrfache Veränderungen der Aminoacyl-Bindetasche scheinen daher entweder die Bindung von beladener tRNA^{Sec} zu verhindern oder aber Konformationsänderungen, die nach Bindung der tRNA induziert werden und die Voraussetzung für eine produktive Interaktion mit dem Ribosom sind, nicht mehr zuzulassen.

TABELLE 9. Aktivität von SelB-Varianten mit mutierter Aminoacyl-Bindetasche. ^{a)}

Plasmid	selB-Allel	Aktivität mit Seryl-tRNA ^{Sec} ^{b)}		Aktivität mit Selenocysteyl-tRNA ^{Sec} ^{c)}	
		%	SD	%	SD
pMB	WT	3,3	± 0,3	100,0	± 8,8 ^{d)}
pMT7	-	0,5	± 0,1	0,2	± 0,1
pMBD-1	Y42H	2,9	± 0,1	145,5	± 2,2
pMBD-2	D180E	1,6	± 0,2	137,4	± 4,2
pMBD-3	R181D	0,3	± 0,0	84,7	± 4,7
pMBD-4	R236N	2,3	± 0,0	122,2	± 10,2
pMBD-12	Y42H, D180E	1,2	± 0,3	171,7	± 15,2
pMBD-13	Y42H, R181D	0,4	± 0,1	123,1	± 7,1
pMBD-14	Y42H, R236N	1,6	± 0,3	60,0	± 0,1
pMBD-23	D180E, R181D	0,2	± 0,0	5,6	± 2,3
pMBD-24	D180E, R236N	2,2	± 0,1	181,1	± 4,8
pMBD-34	R181D, R236N	0,2	± 0,0	0,3	± 0,3
pMBD-123	Y42H, D180E, R181D	0,3	± 0,0	78,6	± 1,3
pMBD-124	Y42H, D180E, R236N	8,0	± 0,6	199,1	± 18,6
pMBD-134	Y42H, R181D, R236N	0,2	± 0,0	0,0	± 0,0
pMBD-234	D180E, R181D, R236N	0,3	± 0,0	0,1	± 0,1
pMBD-1234	Y42H, D180E, R181D, R236N	0,3	± 0,1	0,5	± 0,2

^{a)} Kontroll-Plasmide und Plasmide, die für mutierte SelB-Proteine kodieren, wurden in AF90422/pWT bzw. PT91300/pWT transferiert. Nach Anzucht der Transformanten in TP-Medium wurden die β -Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt und nach der Aktivität, die mit pMB in PT91300/pWT erhalten wurde, normiert.

^{b)} bestimmt in AF9044/pWT

^{c)} bestimmt in PT91300/pWT

^{d)} entspricht 273,4 (\pm 24,0) Miller Einheiten

SD: Standardabweichung

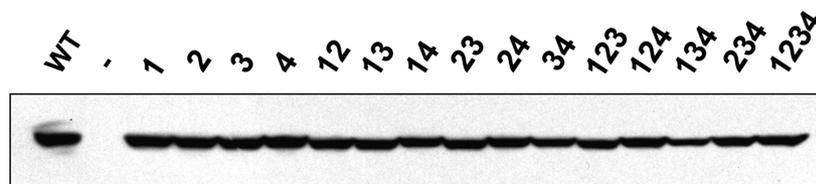


Abbildung 21. Intrazelluläre Konzentration von SelB-Varianten mit mutierter Aminoacyl-Bindetasche. Aliquots der Kulturen, die für die Bestimmung der Durchleeseraten verwendet wurden, wurden zentrifugiert und die sedimentierten Zellen wurden in SDS-Auftragspuffer resuspendiert und lysiert. Nach Auftrennung der Proteine in einem 12,5 %-SDS-Polyacrylamidgel und Transfer auf eine Nylonmembran wurden SelB (WT) und dessen Varianten mit anti-SelB-Antiserum detektiert.

Isolierung und Charakterisierung von SelB-Varianten mit veränderter Aminosäurespezifität

Selektion

Da die gerichtete Mutagenese der Aminoacyl-Bindetasche zu keinen SelB-Varianten mit erweiterter Aminosäure-Spezifität führte, wurde versucht, durch Zufallsmutagenese und anschließende gezielte Selektion Allele von *selB* zu isolieren, deren Genprodukte Aktivität mit Seryl-tRNA^{Sec} zeigen. Als Grundlage für dieses Vorgehen diente das Plasmid pWL143 (p15A *ori*, Cm^R), das *selB* unter Kontrolle des *tet*-Promotors trägt (Leinfelder *et al.*, 1988a). Eine Population dieses Plasmids, in die durch Propagation in einem Stamm mit Defekten in DNA-Reparatursystemen mit einer Häufigkeit von ca. $7,2 \times 10^{-4}$ /bp Punktmutationen eingeführt worden waren (Kromayer *et al.*, 1999), wurde für die Transformation des Stamms AF90422 (*ΔselAB*), in den zuvor das Reporterplasmid pWT (s. Abbildung 19) transferiert worden war, eingesetzt.

Die Selektion von Transformanten erfolgte anschließend auf MS-Agar (+ Ap, + Cm), der die chromogene Verbindung X-Gal enthält. Da der Stamm AF90422 kein *selA*-Gen besitzt und daher die Konversion von Seryl- zu Selenocysteyl-tRNA^{Sec} nicht durchführen kann, erfolgt die Synthese von β -Galaktosidase nur, wenn das eingeführte pWL143-Derivat ein *selB*-Allel trägt, dessen Genprodukt unabhängig von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} ein Durchlesen des im *lacZ*-Leserahmen liegenden Stopp-Kodons erlaubt. Zur Reduktion des Hintergrundsignals, das auf einer unspezifischen Suppression des UGA-Kodons beruht, wurde dem Medium 0,6 mM Lactose als Kompetitor von X-Gal zugesetzt. Die Detektion von positiven Klonen wurde zusätzlich durch mehrtägige Inkubation der bewachsenen Platten bei 4 °C erleichtert.

Bei der Untersuchung von insgesamt 808.000 Klonen wurden 100 Kolonien identifiziert, deren Blaufärbung sich signifikant von der Hintergrundfärbung unterschied. Nach einmaliger Reinigung auf MS-Agar wurde aus 29 Klonen, welche die höchste β -Galaktosidase-Aktivität aufwiesen, Plasmid-DNA isoliert. Um das Reporterplasmid vom jeweiligen pWL143-Derivat zu trennen, wurden die einzelnen Präparationen in die Transformation des Stamms DH5 α nach der TSS-Methode eingesetzt und Transformanten auf LB-Medium (+ Cm) selektiert. Auf Grund der geringen Effizienz dieser Methode konnte eine Kotransformation einzelner Zellen mit zwei Plasmiden ausgeschlossen werden, so dass ausschließlich Klone erhalten wurden, die allein das pWL143-Derivat besaßen. Nach erneuter Isolation der Plasmide wurden die mutierten *selB*-Allele durch Restriktion mit *Bst*YI und *Sgf*I und gleichzeitiger Hydrolyse störender Fragmente mit *Eco*32I isoliert und in den mit *Bg*III und *Sgf*I geschnittenen Vektor pMB ligiert. Diese

Umklonierung stellte sicher, dass spätere Aktivitätsmessungen nicht durch Expressionsunterschiede, die auf Mutationen im Replikationsursprung des Plasmids oder im *tet*-Promotor beruhen, verfälscht wurden. Gleichzeitig wurden die isolierten Allele mit einer für einen His-Tag kodierenden Sequenz versehen und unter die kombinierte Kontrolle der *tet*- und T7 Φ 10-Promotoren gestellt, was ihre nachfolgende Charakterisierung deutlich vereinfachte.

Aktivität der selektierten SelB-Varianten

Die Aktivität der selektierten SelB-Varianten in Abwesenheit von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} wurde nach Ko-Transformation des Stamms AF90422 ($\Delta selAB$) mit dem Reporterplasmid pWT (s. Abbildung 20) und den erhaltenen pMB-Derivaten durch Quantifizierung der β -Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt. Die Messung wurde parallel auch mit dem Stamm PT91300 ($\Delta selA$) durchgeführt, um so Aufschluss über die Funktionalität der mutierten Proteine in Gegenwart von SelA-Aktivität zu erhalten. Die in Abbildung 22A dargestellten Daten zeigen, dass für alle mutierten SelB-Proteine in einem $\Delta selAB$ -Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine 3- bis 6-fache Steigerung der Durchleserate beobachtet werden konnte. Die Aktivität in Gegenwart von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} (Abbildung 22B) wurde in den meisten Fällen durch die eingeführte Mutation nicht beeinflusst, zum Teil aber um einen Faktor von ca. 2,5 reduziert. Die intrazelluläre Konzentration der verschiedenen Proteine variierte nur leicht und lag auf oder leicht unter dem Niveau des Wildtyp-Proteins (Abbildung 22C).

Die Aktivitätstests ließen bereits Gruppen von Klonen mit übereinstimmenden Eigenschaften erkennen. Nach Sequenzierung aller 29 isolierten Allele mit Hilfe der Oligonukleotide pMT7-uni, SSB-1, SSB-2 und SSB-3 stellte sich heraus, dass tatsächlich nur vier verschiedene Punktmutationen selektiert worden waren. Die in Tabelle 10 zusammengefassten Daten zeigen, dass der Austausch G167A mit Abstand am häufigsten erhalten wurde, gefolgt von C1217T, C472T und T1370C. Bei den Mutationen handelte es sich ausschließlich um Transitionen vom Typ G \rightarrow A und C \leftrightarrow T, was auf Limitierungen des verwendeten Mutagenesesystems hinweist. Die Tatsache, dass bestimmte Mutationen mehrfach erhalten wurden und das Spektrum an Austauschen mit positivem Phänotyp sehr beschränkt war, deutet aber dennoch eine signifikante Rolle der betroffenen Aminosäuren in der Erkennung des tRNA-Liganden durch SelB an. Zwei der Mutationen (D57N, R158C) führen zu einer Modifikation der G-Domäne von SelB, die anderen beiden zu Austauschen in Domäne 4a.

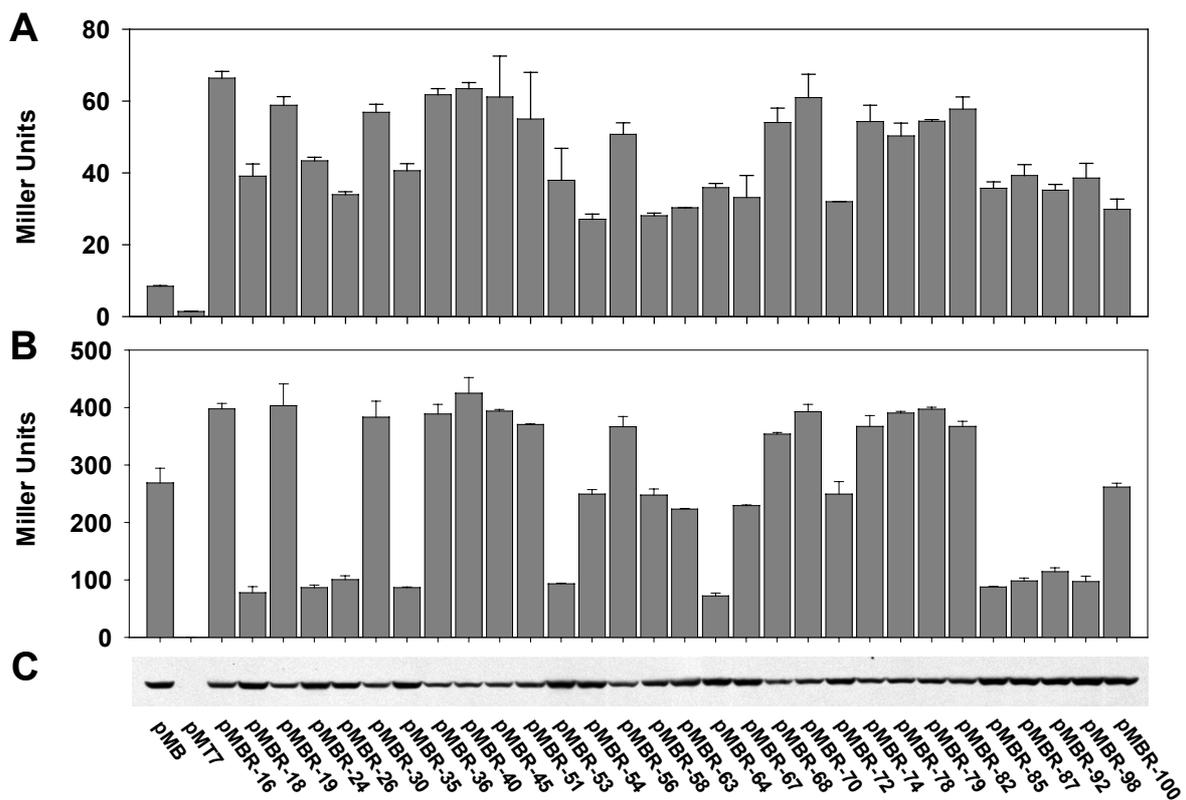


Abbildung 22. Charakterisierung der durch Zufallsmutagenese erzeugten SelB-Varianten. Plasmide der pMBR-Serie, welche die isolierten *selB*-Allele trugen, wurden zusammen mit dem Reporterplasmid pWT in die Stämme AF90422 (A) und PT91300 (B) transferiert. Die Transformanten wurden in TP2-Medium kultiviert und für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität eingesetzt. Parallel dazu wurden Aliquots der Suspensionen von Stamm PT91300 abzentrifugiert, in SDS-Auftragspuffer suspendiert und lysiert. Nach Auftrennung der Proteine in einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel und Transfer auf eine Nylonmembran wurden SelB und dessen Derivate mittels Immunoblot unter Verwendung von anti-SelB-Antiserum detektiert (C).

Für weitere Untersuchungen wurden die vier Plasmide pMBR-26, pMBR-70, pMBR-98 und pMBR-100, die jeweils eine der selektierten Mutationen trugen, ausgewählt.

TABELLE 10. Mutationen in den nach Zufallsmutagenese selektierten *selB*-Allelen.

Mutation	AS-Austausch	Anzahl	Plasmide
G169A	D57N	13	pMBR-16, -19, -30, -36, -45, -51, -56, -68, -70, -74, -78, -79, -82
C472T	R158C	6	pMBR-54, -58, -63, -67, -72, -100
C1217T	A406V	8	pMBR-18, -24, -35, -53, -64 ^{a)} , -85 ^{b)} , -87, -98
T1370C	L457P	2	pMBR-26, -92

^{a)} zusätzliche Mutation: G367A

^{b)} zusätzliche Mutation: G1350A

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass auch die SelB-Varianten SelB_{A416V} und SelB_{A417V} *in vivo* eine erhöhte Aktivität mit Seryl-tRNA^{Sec} zeigten (A. Herzog, unveröffentlicht), so dass im folgenden auch diese Proteine einer genaueren Untersuchung unterzogen wurden. Die entsprechenden Mutationen wurden hierzu mittels inverser PCR mit den Oligonukleotid-Paaren MSB-A416V/MSB-inv2 bzw. MSB-A417V/MSB-inv2 in das Plasmid pMB eingeführt. Nach Selbstligation der PCR-Produkte wurden Fragmente von *selB*, welche die Mutationen trugen, durch Restriktion mit *Bsa*HI und *Bgl*I isoliert und in den mit denselben Enzymen behandelten Vektor pMB umklontiert. Die resultierenden Plasmide erhielten die Bezeichnung pMB-A416V bzw. pMB-A417V.

Reinigung der SelB-Varianten

Um Material für eine biochemische Charakterisierung der verschiedenen SelB-Varianten zu erhalten, wurden die entsprechenden pMB-Derivate in den Stamm JM109(DE3) transferiert. Dieser besitzt kein funktionelles *recA*-Gen, wodurch eine Rekombination zwischen dem chromosomalen *selB*-Leserahmen und den plasmidkodierten mutierten Allelen verhindert wurde. Nach Anzucht der Transformanten in jeweils 6 l LB-Medium (+ Cm), Induktion mittels IPTG und zweistündiger Expression wurden jeweils etwa 17 g Zellen geerntet.

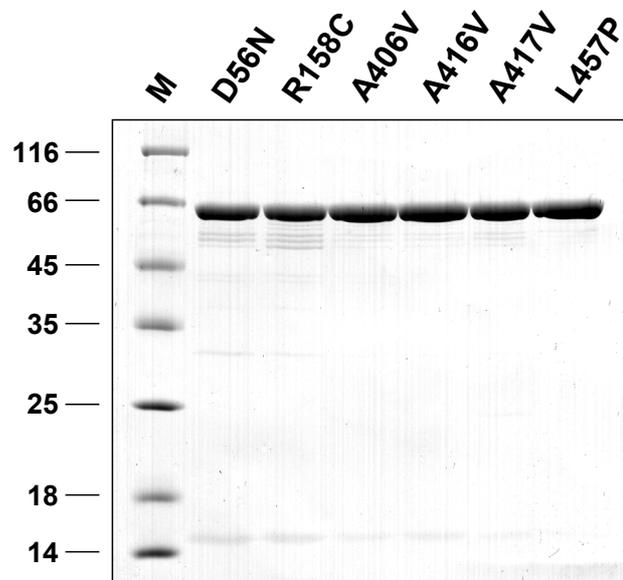


Abbildung 23. Gereinigte SelB-Varianten. Je 2,4 µg gereinigtes Protein wurde in SDS-Auftragspuffer denaturiert, auf ein 12,5 % nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und nach Elektrophorese durch Behandeln des Gels mit Coomassie-Lösung sichtbar gemacht.

Die Reinigung der Proteine erfolgte anschließend nach dem für SelB_{His} ausgearbeiteten Protokoll. Die Zellen wurden dazu aufgebrochen und der Rohextrakt wurde auf eine Zn²⁺-IDA-Sephrose-Säule geladen. Nach Elution der gebundenen Proteine mit imidazolhaltigem Puffer lagen die SelB-Varianten bereits stark angereichert vor. Eine weitere Abtrennung von kontaminierenden Proteinen erfolgte anschließend durch Kationenaustausch-Chromatographie an SP-Sephrose (Daten nicht gezeigt). Die verschiedenen SelB-Varianten verhielten sich während der Reinigung exakt wie das Wildtyp-Protein (s. Abbildung 11). Die Ausbeuten schwankten jedoch beträchtlich, was auf deutliche Unterschiede in der Löslichkeit der Proteine zurückzuführen ist. Sie lagen bei 1,6 mg für SelB_{D57N}, 2,6 mg für SelB_{R158C}, 5,1 mg für SelB_{A406V}, 6,2 mg für SelB_{A416V}, 4,8 mg für SelB_{A417V} und 7,3 mg für SelB_{L457P}. Die Reinheit der Präparationen korrelierte mit der Löslichkeit der jeweiligen SelB-Varianten (Abbildung 23) und war für nachfolgende biochemische Analysen ausreichend.

Biochemische Charakterisierung der SelB-Varianten

Analyse der Tertiärstruktur

Die verschiedenen SelB-Varianten zeigten *in vivo* deutlich veränderte UGA-Durchlese-Aktivitäten mit Seryl-tRNA^{Sec} und teilweise auch mit Selenocysteyl-tRNA^{Sec}. Um zu überprüfen, ob dieses Verhalten mit Modifikationen der Tertiärstruktur zusammenhing, wurde die Topologie der Proteinoberflächen mit Hilfe von limitierter Proteolyse analysiert.

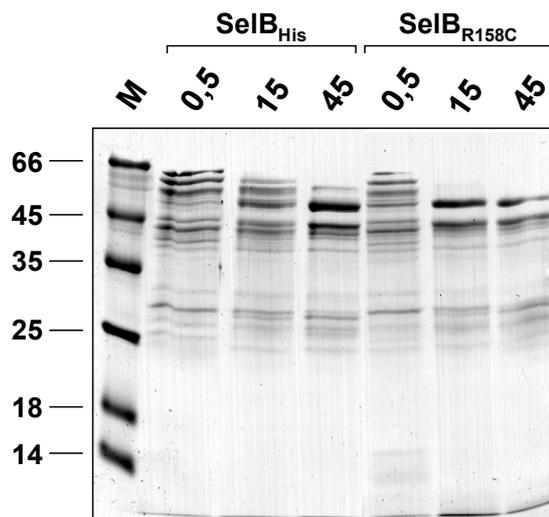


Abbildung 24. Limitierte Proteolyse von SelB_{His} und SelB_{R158C}. Die beiden Proteine wurden mit limitierenden Mengen an Proteinase K inkubiert. 0,5, 15 und 45 min nach Start der Reaktion wurden Proben entnommen, mit SDS-Auftragspuffer gemischt, erhitzt und auf ein 12,5 %-SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Hydrolyseprodukte wurden nach erfolgter Elektrophorese durch Behandeln des Gels mit Coomassie-Lösung sichtbar gemacht. Abkürzung: M, Längenstandard

Die Bandenmuster, die bei partieller Hydrolyse von SelB_{His} und dessen Varianten erhalten wurden, waren in den meisten Fällen identisch (Daten nicht gezeigt). Auch die Hydrolyseprodukte von SelB_{R158C} stimmten in ihrer Größe mit den aus SelB_{His} resultierenden Fragmenten überein, doch die Kinetik der Reaktion wies deutliche Unterschiede auf, die auf eine bessere Zugänglichkeit mancher Schnittstellen hindeuten (Abbildung 24).

Interaktion mit SECIS-Elementen

Da die Rate des SelB-vermittelten Durchlesens eines UGA-Kodons von der Effizienz der Bildung des quaternären Komplexes und somit auch von der Affinität von SelB für das SECIS-Element abhängt, wurde die Interaktion der isolierten SelB-Varianten mit der *fdnG*-HNS in einem Gelretardations-Experiment untersucht. Abbildung 25 zeigt, dass alle SelB-Varianten zur Ausbildung von binären Komplexen mit der markierten RNA fähig waren und dass sowohl bei 5-fachem als auch 20-fachem Überschuss an Protein im Rahmen der Genauigkeit der Methode keine signifikanten Unterschiede in den Affinitäten im Vergleich zum Wildtyp-Protein erkennbar waren. Dasselbe Ergebnis wurde auch für die Interaktion mit der 32 nt-*fdhF*-HNS erhalten (Daten nicht gezeigt), die *in vivo* für die Selektion der SelB-Varianten zum Einsatz gekommen war (vgl. Abbildung 20). Eine Abhängigkeit der Sec-tRNA^{Sec}-unabhängigen Aktivität der Proteine vom Typ des gebundenen SECIS-Elements kann daher ausgeschlossen werden.

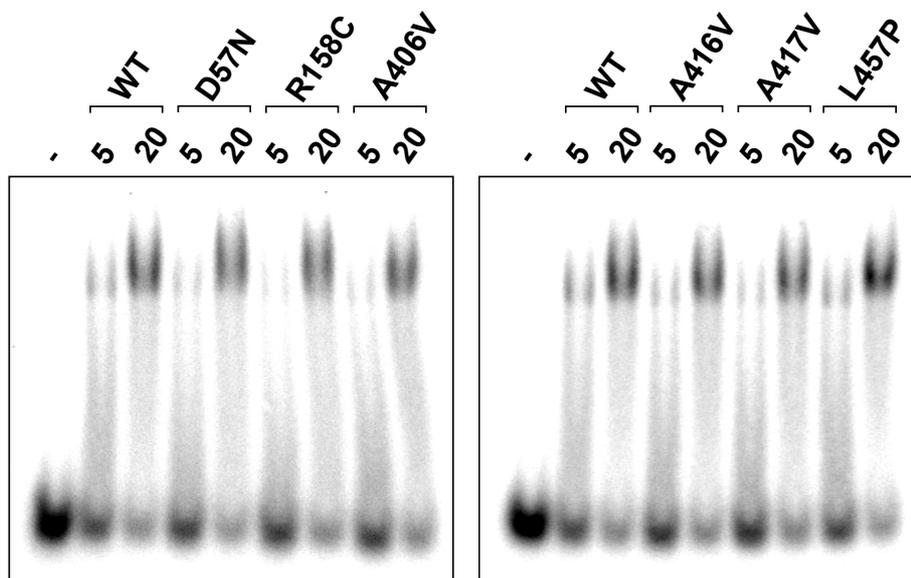


Abbildung 25. Interaktion von mutierten SelB-Proteinen mit der *fdnG*-HNS. Die 39 nt-*fdnG*-HNS wurde mit einem 5- bzw. 20-fachen Überschuss an SelB_{His} oder dessen Varianten inkubiert. Gebildete Komplexe wurden durch Elektrophorese in einem nicht denaturierenden 6%-Polyacrylamidgel von freier RNA getrennt und unter Verwendung eines Phosphor-Screens detektiert.

Interaktion mit Seryl- und Selenocysteyl-tRNA^{Sec}

Eine naheliegende Ursache der gesteigerten Aktivität der isolierten SelB-Varianten in Abwesenheit von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} bestand in der Zunahme der Affinität für die serylierte Form der tRNA. Es wurde daher in einem Hydrolyseschutz-Experiment versucht, eine Interaktion der SelB-Varianten mit Seryl-tRNA^{Sec} nachzuweisen (Abbildung 26). Die Kinetik der Hydrolysereaktionen ergab jedoch unter den verwendeten Bedingungen keinen Hinweis auf eine Komplexierung dieses Liganden. Die Dissoziationskonstante der Komplexe muss daher deutlich über der Konzentration der eingesetzten Substrate und somit mindestens im zweistelligen mikromolaren Bereich liegen.

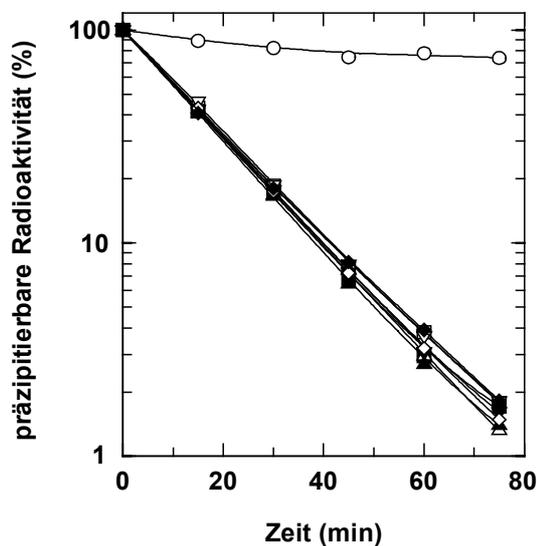


Abbildung 26. Schutz von Seryl-tRNA^{Sec} durch mutierte SelB-Proteine vor alkalischer Hydrolyse. 0,21 μ M [¹⁴C]-Seryl-tRNA^{Sec} wurde mit 1 μ M SelB_{His} (□), SelB_{D57N} (△), SelB_{R158C} (▲), SelB_{A406V} (▽), SelB_{A416V} (▼), SelB_{A417V} (◇), SelB_{L457P} (◆) und BSA (■) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden aus den Ansätzen Proben entnommen und die Menge an noch nicht hydrolysiertes [¹⁴C]-Seryl-tRNA^{Sec} wurde mittels TCA-Fällung bestimmt. Als Kontrolle wurden 0,17 μ M [¹⁴C]-Sec-tRNA^{Sec} (O) mit 1 μ M SelB_{His} inkubiert und in gleicher Weise behandelt.

Frühere Arbeiten (Baron *et al.*, 1993a) und die zuvor durchgeführte Analyse des Ligandenbindungs-Verhaltens von SelB zeigten, dass die Affinität des Proteins für das SECIS-Element durch die Bindung von Sec-tRNA^{Sec} und GTP stark erhöht wird. Der resultierende quaternäre Komplex stabilisiert umgekehrt auch die Interaktion der tRNA mit SelB und er lässt sich durch seine im Vergleich zum ternären SelB·GTP·SECIS-Komplex höhere Mobilität nach Elektrophorese in einem nicht denaturierenden Gel eindeutig nachweisen. Im folgenden wurde daher versucht, eine Bindung von Seryl-tRNA^{Sec} an die SelB-Varianten indirekt über die Ausbildung eines quaternären Komplexes mit GTP und der *fdnG*-HNS zu detektieren. Das in

Abbildung 27 dargestellte Gelretardations-Experiment zeigt jedoch, dass sich das Migrationsverhalten der ternären Komplexe in Gegenwart von Seryl-tRNA^{Sec} nicht von dem unterschied, das bei alternativer Zugabe von unspezifischer Hefe-tRNA zu beobachten war. Mit SelB_{His} wurde in Gegenwart von Sec-tRNA^{Sec} dagegen erwartungsgemäß die für den quaternären Komplex typische Laufform erhalten.

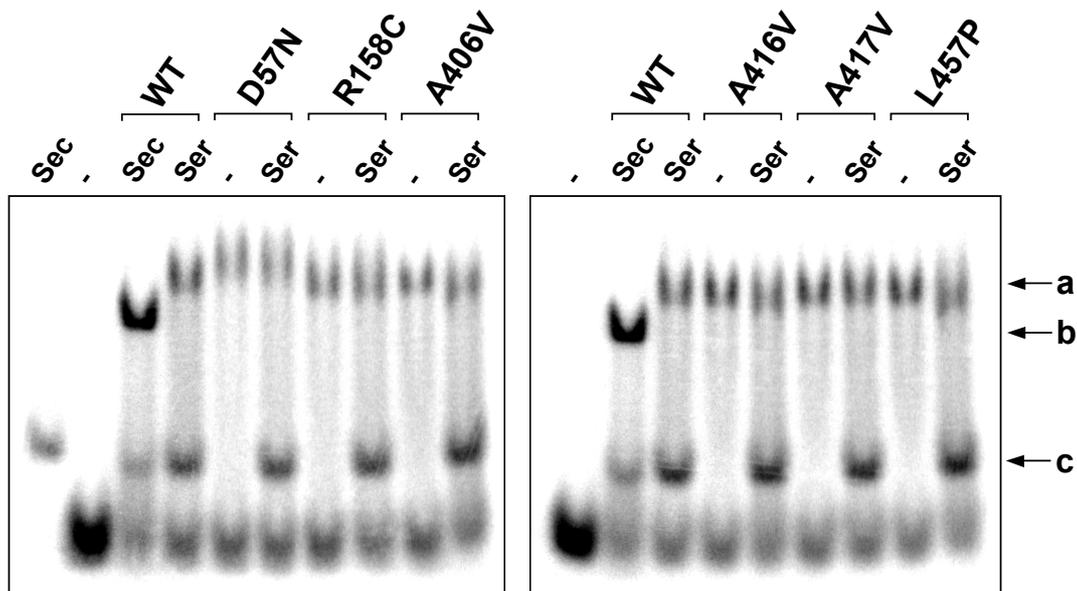


Abbildung 27. Interaktion der mutierten SelB-Proteine mit der *fdnG*-HNS in Gegenwart von tRNA. 40 nM [³²P]-markierte 39 nt-*fdnG*-HNS wurde in Gegenwart von 100 μM GTP und 4 μM [¹⁴C]-Selenocysteyl-tRNA^{Sec} (Sec), [¹⁴C]-Seryl-tRNA^{Sec} (Ser) oder unmarkierter Hefe-tRNA (-) mit 0,4 μM des Proteins mit der angegebenen Mutation oder ohne Protein inkubiert. Gebildete Komplexe wurden anschließend durch Elektrophorese in einem nicht denaturierenden 6 %-Polyacrylamidgel von nicht gebundenen RNA-Spezies abgetrennt und durch Exposition auf einem Phosphor-Screen detektiert. Die Position des ternären SelB-GTP·SECIS-Komplexes (a), des quaternären Komplexes (b) und der freien markierten Aminoacyl-tRNA (c) ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die bisherigen Ergebnisse lassen also keinen Unterschied zwischen SelB_{His} und dessen mutierten Derivaten in der Interaktion mit Seryl-tRNA^{Sec} erkennen.

Im folgenden wurde mit Hilfe von Gelretardations-Experimenten untersucht, ob die selektierten Mutationen Unterschiede in der Bindung der selenocysteylierten Form von tRNA^{Sec} verursachten. Alle SelB-Varianten konnten jedoch stabile Interaktionen mit [¹⁴C]-Sec-tRNA^{Sec} als Liganden eingehen und sie wiesen im Vergleich zum Wildtyp-Protein keine signifikanten Unterschiede in der Effizienz der Komplexbildung auf (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse der Interaktion von SelB_{D57N} und SelB_{R158C} mit Sec-tRNA^{Sec} mit Hilfe eines Hydrolyseschutz-Experiments ergab ebenfalls keine Hinweise auf ein vom Wildtyp-Protein abweichendes tRNA-Bindevverhalten der SelB-Varianten (Abbildung 28).

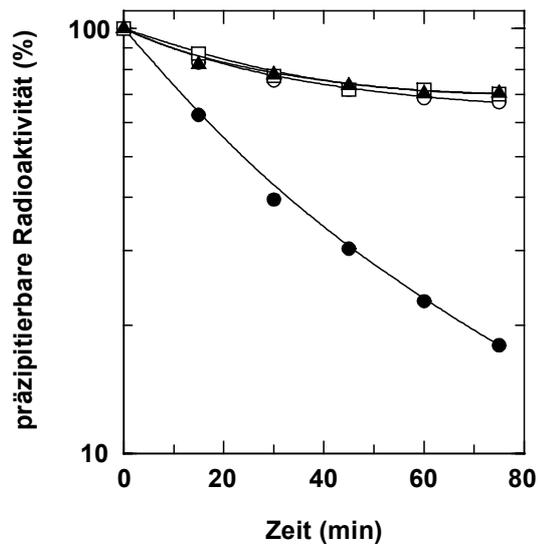


Abbildung 28. Interaktion von SelB_{D57N} und SelB_{R158C} mit Selenocysteyl-tRNA^{Sec}. 0,17 μ M [¹⁴C]-Sec-tRNA^{Sec} wurden mit 1 μ M SelB_{His} (O), SelB_{D57N} (□), SelB_{R158C} (▲) oder BSA (●) inkubiert. Nach definierten Zeiten wurden Proben aus den Ansätzen entnommen, mit TCA versetzt und für die Quantifizierung der noch nicht hydrolysierten Sec-tRNA^{Sec} verwendet.

Die durchgeführten Analysen erlauben derzeit noch keine Aussage über den Mechanismus, der für die erhöhte Aktivität der mutierten SelB-Proteine mit Seryl-tRNA^{Sec} verantwortlich ist. Möglicherweise führen die erhaltenen Mutationen zu einer Stabilisierung der Interaktion mit der tRNA, die zwar *in vivo* eine signifikante Komplexbildung erlaubt, *in vitro* aber unter den verwendeten Bedingungen nicht nachweisbar ist. Die Position der Mutationen lässt jedoch auch eine Beeinflussung des Bindevhaltens für Guanosin-Nukleotide und der Affinität für das Ribosom erwarten, die über einen noch unbekanntem Mechanismus zu einer Erweiterung der Aminosäure-Spezifität von SelB führen könnten. Diese interessante Möglichkeit wird gegenwärtig mit Hilfe von Stopped-Flow-Experimenten und GTPase-Assays, die jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit liegen, überprüft.

3. Quantitative Analyse der Interaktion von SelB mit seinen Liganden

Die Interaktion des Elongationsfaktors SelB mit seinen Liganden und die gegenseitige Beeinflussung der Liganden-Bindestellen war bisher hauptsächlich mit qualitativen Methoden untersucht worden. So ergab die graduelle Verkürzung der *fdhF* mRNA vom 3'-Ende her den ersten Hinweis darauf, dass eine unmittelbar auf das für Selenocystein kodierende UGA-Kodon folgende Struktur des Transkripts mit SelB interagieren muß, um eine Selenocystein-

Inkorporation zu ermöglichen (Zinoni *et al.*, 1990). Der direkte biochemische Nachweis der Bindung des SECIS-Elements an SelB erfolgte mit Hilfe von Gelretardations-Experimenten (Baron *et al.*, 1993a). Dieselbe Methodik erlaubte später unter Verwendung von verkürzten SelB-Formen die Lokalisation der mRNA-Bindedomäne (Kromayer *et al.*, 1996) von SelB, während die minimale Binderegion des SECIS-Elements mit Hilfe von Footprint-Analysen definiert werden konnte (Ringquist *et al.*, 1994). Die Interaktion zwischen SelB und tRNA^{Sec} wurde vor allem anhand von Hydrolyse-Schutzexperimenten untersucht. Es wurde gezeigt, dass unbeladene oder serylerte tRNA^{Sec} nicht mit SelB interagiert, während sie bei Veresterung mit Selenocystein mit hoher Affinität gebunden wird (Forchhammer *et al.*, 1989; Baron und Böck, 1991). Gelretardations-Experimenten zeigten zudem, dass sich die Affinität von SelB zum SECIS-Element bei gleichzeitiger Bindung von Sec-tRNA^{Sec} signifikant erhöht (Baron *et al.*, 1993a). Die Gleichgewichtskonstanten für die Interaktion von SelB mit Guanosin-Nukleotiden waren mittels Gleichgewichtsdialyse bestimmt worden und es zeigte sich, dass die Affinität von SelB für GTP ($K_D = 1,7 \mu\text{M}$) im Gegensatz zu den meisten anderen G-Proteinen höher war als die für GDP ($K_D = 10 \mu\text{M}$) (Forchhammer *et al.*, 1989). Es lag jedoch keine Information über die Kinetik der Interaktion und somit über die Hintergründe für dieses ungewöhnliche Verhalten von SelB vor. Auch die Frage nach der Notwendigkeit eines Nukleotid-Austauschfaktors für SelB wurde bisher noch nicht vollständig geklärt.

Um ein Gesamtbild der Funktion von SelB zu erhalten, sollten die kinetischen Parameter der verschiedenen Interaktionen des Proteins mit quantitativen biochemischen und biophysikalischen Methoden bestimmt werden. Außerdem sollte durch Charakterisierung des gegenseitigen Einflusses der einzelnen Liganden-Bindungsstellen untereinander ein Einblick in die Konformationsänderungen von SelB erhalten werden, die letztendlich zur Assemblierung des funktionellen quaternären Komplexes führen.

Präparation von Enzymen und RNA-Substraten

Da einige der verwendeten Methoden einen hohen Aufwand an Material verlangten, mußten alle RNA-Liganden, die in die Messungen eingesetzt werden sollten, sowie alle Enzyme in großem Maßstab gereinigt werden. Entscheidend war dabei außerdem eine hohe Reinheit und Homogenität der Präparationen, um für quantitative Aussagen die Konzentration an biologisch aktiven Molekülen exakt bestimmen zu können.

Reinigung von Proteinen

Optimierung der Reinigung von SelB

Die Reinigung von SelB nach der Methode von Forchhammer *et al.* (Forchhammer *et al.*, 1990) wies Nachteile auf, die sie für die Isolierung von großen Mengen an Protein ungeeignet machte. So erfolgt die Überproduktion des Proteins in einem hitzeinduzierbaren System, das sich bei Anzuchten im 50 l-Maßstab nur unter Schwierigkeiten einsetzen ließ und deshalb durch ein mit IPTG induzierbares System auf Basis von *E. coli* BL21(DE3) ersetzt wurde. Die Anreicherung von SelB aus dem Rohextrakt erfolgte durch Sedimentation mit den Ribosomen, Resolubilisierung mit NH_4Cl , fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung und Chromatographie an Hydroxyapatit. Als letzten Reinigungsschritt machte man sich die Tatsache zunutze, dass SelB nur bei hohen Salzkonzentrationen in Lösung bleibt, während es bei Dialyse gegen Niedersalzpuffer quantitativ und selektiv ausfällt. Der Niederschlag lässt sich anschließend in Hochsalzpuffer in Gegenwart von GDP wieder in Lösung bringen. Das Präzipitations- und Lösungsverhalten von SelB war jedoch nur schwer reproduzierbar, so dass die Reinheit und Ausbeute verschiedener Präparationen erheblich variierten. Außerdem sollte auf den Einsatz von GDP als Lösungsvermittler verzichtet werden, um eine Beeinflussung nachfolgender Experimente durch Restspuren des Nukleotids ausschließen zu können. Die Präzipitation wurde daher durch zwei säulenchromatographische Reinigungsschritte ersetzt (Thanbichler und Böck, 2002), deren Chromatographie-Profile in Abbildung 29 gezeigt sind.

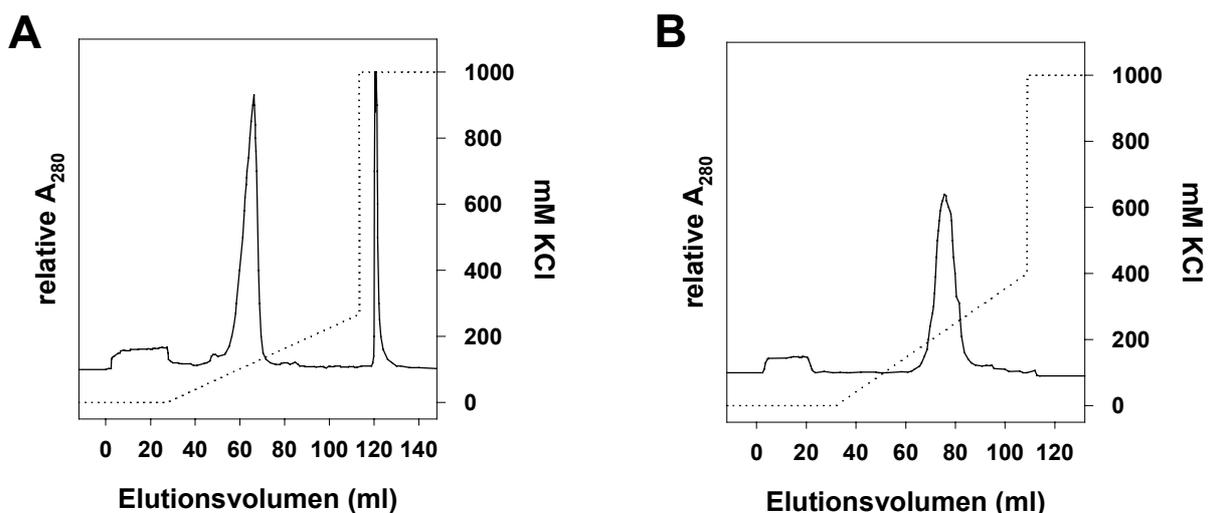


Abbildung 29. Reinigung von SelB. Die Elutionsprofile der Chromatographie von SelB-haltigen Lösungen an Q-Sepharose (A) und SP-Sepharose (B) sind mit durchgehenden Linien dargestellt. Der Verlauf der Salzgradienten in den Säulenpuffern ist mit unterbrochenen Linien wiedergegeben.

Eine deutliche Anreicherung von SelB wurde mittels Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose erzielt, an die SelB band, während sich der Großteil der nach den vorhergehenden Reinigungsschritten noch vorhandenen kontaminierenden Proteine im Durchlauf befand. Letzte Verunreinigungen wurden anschließend durch Chromatographie an dem Kationentauscher SP-Sepharose abgetrennt. Die schwache Überproduktion von SelB und seine geringe Löslichkeit hatten eine drastische Verringerung der Ausbeute zur Folge, so dass aus insgesamt 1200 g Zellen nur ca. 60 mg reines Protein erhalten wurden (Daten nicht gezeigt).

Reinigung von SelB₃₇₉₋₆₁₄

Die Bindestellen für Guanosin-Nukleotide und Sec-tRNA^{Sec} wurden in den zu EF-Tu homologen Domänen 1-3 lokalisiert, während die Bindung des SECIS-Elements durch Domäne 4b von SelB erfolgt (Kromayer *et al.*, 1996). Die exakte Rolle von Domäne 4a ist dagegen noch weitgehend ungeklärt. Ihr war auf Grund der Ergebnisse von Mutagenese-Studien eine regulatorische Funktion zugeschrieben worden, die für die Modulation der Spezifität der mRNA-Bindung durch Domäne 4b verantwortlich ist (Kromayer *et al.*, 1999). Um den Einfluß von Domäne 4a auf die SECIS-Bindung biochemisch untersuchen zu können und um zusätzlich Material für kristallographische Studien zu erhalten, wurde ein Fragment von SelB, das den Großteil der kompletten Domäne 4 umfasst (SelB₃₇₉₋₆₁₄), gereinigt. Auf die Verwendung eines Affinitätspeptids wurde dabei verzichtet, um eine Beeinträchtigung der Kristallisation durch unstrukturierte Proteinregionen zu vermeiden.

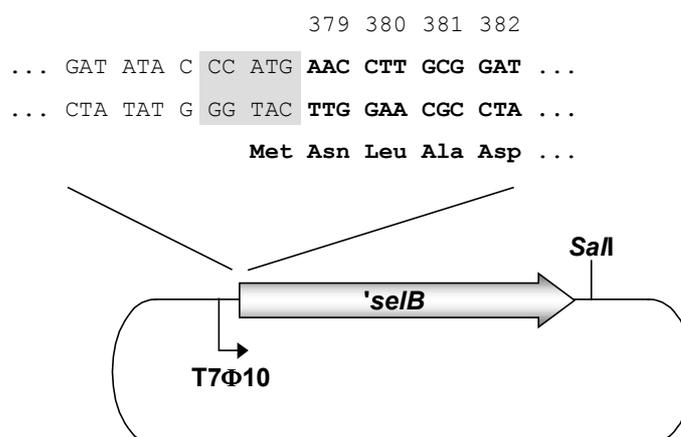


Abbildung 30. Schematische Darstellung des Plasmids pT7SBD4. Plasmid-Sequenzen sind in Dünndruck dargestellt. Kodons des *selB*-Gens sind in Dickdruck und zusammen mit der Position der durch sie kodierten Aminosäuren in SelB aufgeführt. Der nach Auffüllen des Überhangs durch Klenow-Polymerase verbliebene Rest der *NcoI*-Schnittstelle von pT7-7_{NcoI} ist grau hinterlegt. Die Aminosäuren des kodierten Proteins sind unter den entsprechenden Kodons angegeben.

Der für das Fragment kodierende Bereich des *selB*-Gens (Basen 1135-1845) wurde durch Restriktion von pWL194 mit *HpaI* und *SalI* isoliert und in den Vektor pT7-7_{NcoI} ligiert, der zuvor mit *NcoI* geschnitten, mit Klenow-Polymerase und anschließend mit *SalI* behandelt worden war. Im resultierenden Plasmid pT7SBD4 (Abbildung 30) ist *selB*₁₁₃₅₋₁₈₄₅ hinter dem T7Φ10-Promotor lokalisiert, der nach Transfer in den Stamm BL21(DE3) die induzierte Expression des Gens ermöglicht. Da sich SelB₃₇₉₋₆₁₄ sehr stark überproduzieren ließ, lag das Protein nach einer ersten Anreicherung mittels Kationenaustausch-Chromatographie an SP-Sepharose (Abbildung 31A) bereits in relativ großer Reinheit vor.

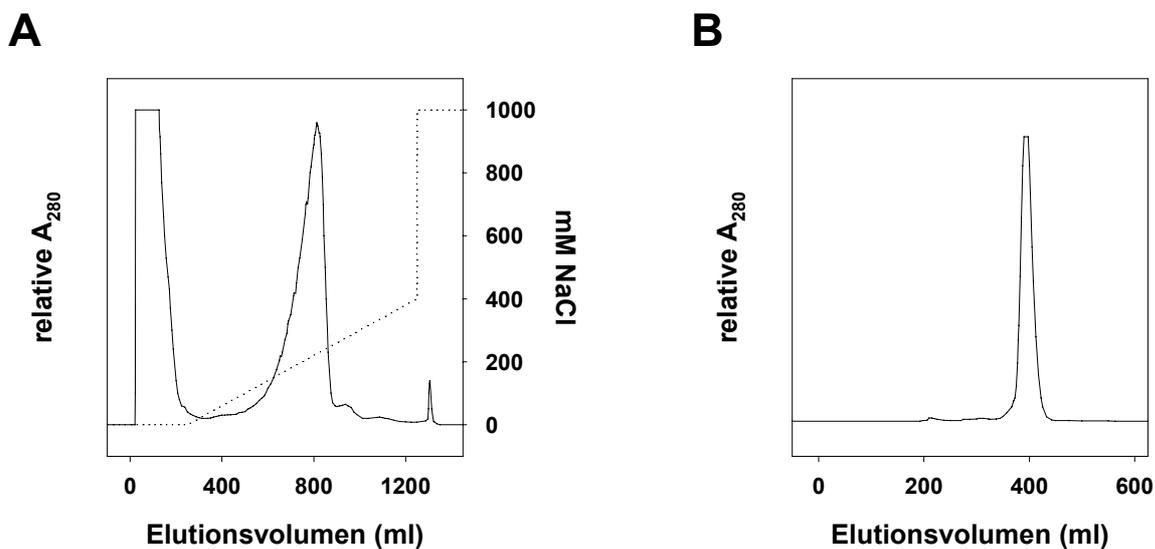


Abbildung 31. Anreicherung von SelB₃₇₉₋₆₁₄. Die Elutionsprofile der Chromatographie des Rohextrakts an SP-Sepharose (A) und der Gelfiltration der in Niedersalz-Puffer gefällten Fraktion (B) sind mit durchgehenden Linien dargestellt. Die unterbrochene Linie kennzeichnet den Verlauf des Salzgradienten im Säulenpuffer.

Eine weitere Abtrennung von kontaminierenden Proteinen und eine gleichzeitige Konzentration der Proteinlösung wurde durch Dialyse gegen Niedersalz-Puffer erreicht, wodurch ein Teil von SelB₃₇₉₋₆₁₄ präzipitierte. Der gesammelte Niederschlag konnte anschließend durch Zugabe von Hochsalz-Puffer sofort wieder in Lösung gebracht werden. Nach einer abschließenden Fraktionierung der Proteine mittels Gelfiltration (Abbildung 31B) wurde SelB₃₇₉₋₆₁₄ in reiner Form erhalten. Die Reinigung, deren Verlauf in Abbildung 32 dargestellt ist, ergab ca. 25 mg SelB₃₇₉₋₆₁₄ aus 12 g eingesetzten Zellen.

Ein Großteil des Proteins wurde A. Scheidig (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) zu Kristallisationszwecken überlassen.

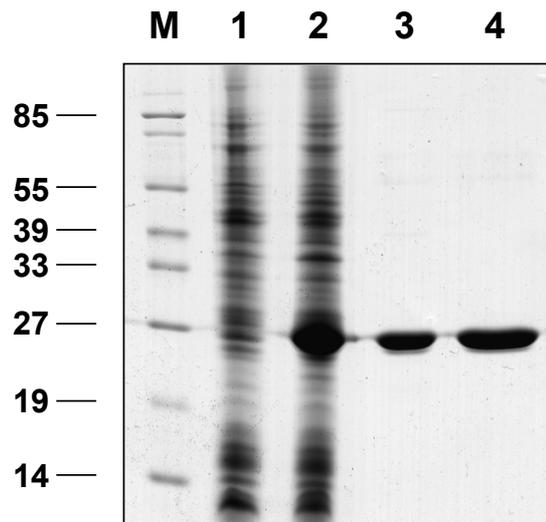


Abbildung 32. Verlauf der Reinigung von SelB₃₇₉₋₆₁₄. Proben der einzelnen Reinigungsschritte wurden in SDS-Auftragspuffer erhitzt und auf ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine durch Färben mit Coomassie-Lösung detektiert. Spuren: M, Längenstandard; 1, Lysat von Zellen vor Induktion der Expression; 2, Lysat von geernteten Zellen; 3, vereinigte Fraktionen nach Chromatographie an SP-Sephrose; 4, vereinigte Fraktionen nach der Gelfiltration.

Reinigung weiterer Enzyme

Seryl-tRNA Synthetase wurde aus dem Stamm CSH26, der das Enzym nach Transformation mit pSerS2 konstitutiv überexprimierte, auf der Grundlage eines publizierten Protokolls (Härtlein *et al.*, 1987) gereinigt, welches aber zur Vereinfachung der Durchführung und zur Anpassung an verfügbare Chromatographie-Materialien in einigen Punkten modifiziert worden war. Aus 70 g Zellen wurden nach Chromatographie an DEAE-Sephrose, Fraktionierung mittels Ammoniumsulfat-Fällung und Gelfiltration über Sephacryl S-200 ca. 150 mg reines Protein erhalten (Daten nicht gezeigt).

Der Reinigung von Selenophosphat Synthetase (SelD) lag ebenfalls ein veröffentlichtes Schema zu Grunde (Ehrenreich *et al.*, 1992). Dieses wurde jedoch durch Veränderung von Gradienten und durch Modifikation der Ammoniumsulfat-Fällung um einen chromatographischen Schritt bei gleichbleibender Reinheit des Produkts verkürzt. Nach dem Aufbruch von 66 g Zellen des Stamms BL21(DE3), der nach Transformation mit pMN340 und Induktion der T7 Polymerase durch IPTG-Zugabe SelD überproduzierte, wurden durch Solubilisierung des Proteins mit Hilfe von KCl, Chromatographie an DEAE-Sephrose, fraktionierter Ammoniumsulfat-Fällung und Chromatographie an Hydroxyapatit ca. 600 mg reines SelD isoliert (Daten nicht gezeigt).

Die Reinigung von SelB₄₇₂₋₆₁₄ erfolgte nach Überexpression im Stamm BL21(DE3), der mit pT7HIAS1414-1842 transformiert worden war, mittels Chromatographie an Zn²⁺-IDA-Sephrose

(Kromayer *et al.*, 1996). Aus 12 g Zellen wurden dabei 20 mg Protein erhalten (Daten nicht gezeigt).

Präparation von Selenocysteyl-tRNA^{Sec}

tRNA^{Sec} wurde nach dem von Leinfelder *et al.* (1990) ausgearbeiteten Verfahren aus 110 g Zellen des Stamms MC4100, der durch Transformation mit pCB2013 *selC* konstitutiv auf hohem Niveau exprimiert, gereinigt. Nach der Isolation von Gesamt-tRNA wurde tRNA^{Sec} von den übrigen tRNA-Spezies mittels kombinierter Anionenaustausch-/ hydrophober Interaktions-Chromatographie an BD-Cellulose und anschließender hydrophober Interaktions-Chromatographie an Sepharose 4B separiert. Die Ausbeute betrug 38 mg (Daten nicht gezeigt).

Die auf die Aminoacylierung von tRNA^{Sec} mit Serin folgende Konversion des Seryl-Rests in einen Selenocysteyl-Rest erfolgt *in vitro* durch Selenocystein Synthase (SelA). Der Selendonor Selenophosphat wird dabei im selben Ansatz aus Selenit synthetisiert, das mit Hilfe von DTT zu Selenid reduziert und anschließend durch SelD umgesetzt wird. Die Konversionsreaktion läuft unter unbalancierten Reaktionsbedingungen nicht quantitativ ab. Dieser Effekt beruht einerseits auf einer nicht vollständigen Umsetzung des Substrats, auf der spontanen Hydrolyse der Esterbindung während der Reaktionszeit oder auf der Synthese des Nebenprodukts Alanyl-tRNA^{Sec} infolge einer unspezifischen Reduktion des SelA-gebundenen Aminoacrylyl-Intermediats (Forchhammer und Böck, 1991). Die Optimierung der Reaktionsbedingungen zeigte, dass eine maximale Ausbeute an Produkt bei pH 6,7 unter schwach reduzierenden Bedingungen (0,5 mM DTT), bei limitierenden Mengen an SelA und einem gleichzeitigen sehr hohen Überschuss an SelD erzielt wird (Daten nicht gezeigt).

Präparation und Faltung von SECIS-Elementen

Die Synthese von SECIS-Elementen erfolgte *in vitro* unter Verwendung von T7 Polymerase und partiell doppelsträngigen Oligonukleotiden als Matrize. Nach Auftrennung der Reaktionsprodukte in Harnstoff-Polyacrylamidgelen wurden die Produkte mit der korrekten Länge aus den Gelen ausgeschnitten und elektroeluiert. Die Ausbeute betrug dabei 14 mg für die *fdnG*-HNS, 12 mg für die *fdhF*-HNS und 0,4 mg für die *fdnG*-Minihelix.

Selbstkomplementäre RNA-Moleküle, die Haarnadel-Strukturen formen, besitzen in höheren Konzentrationen eine starke Tendenz zur Ausbildung von Dimeren, die oft thermodynamisch stabiler aber biologisch inaktiv sind. Die Faltung von SECIS-Transkripten wurde in vorausgegangenen Arbeiten in der Regel in Puffern verschiedener Zusammensetzung durchgeführt und es zeigte sich, dass die 17 Nukleotide lange *fdhF*-Minihelix unter den verwendeten Bedingungen

schon bei einer Konzentration von 500 nM zu 50 % in einem Dimer gebunden vorlag (Kromayer, 1998). Da dieser Umstand quantitative biochemische Experimente stark erschwert, wurde nach Bedingungen gesucht, unter denen eine zuverlässige und vollständige Faltung der Transkripte in die Haarnadel-Konformation möglich war. Das Austesten verschiedener Puffer und Renaturierungsverfahren ergab, dass bereits Spuren von Kationen und langsames Rückfalten in einem Temperaturgradienten zu einer Fehlfaltung führten. Wurden die Transkripte dagegen durch Isopropanol-Fällung und anschließendes Waschen der Präzipitate mit 80 % Ethanol entsalzt und zur Komplexierung restlicher Kationen in 0,1 mM EDTA wieder gelöst, dann nahmen sie nach Erhitzen auf 80 °C und unmittelbar darauf folgendem schnellem Abkühlen auf Eis selbst bei Konzentrationen von bis zu 200 µM ausschließlich die biologisch aktive Konformation an. Der Effekt von Mg^{2+} auf das Faltungsverhalten der verschiedenen SECIS-Transkripte ist in Abbildung 33 veranschaulicht. In Abwesenheit störender Ionen lagen die Transkripte nach der Faltung ausschließlich in der schneller migrierenden Haarnadel-Konformation vor, während in Gegenwart von $MgCl_2$ überwiegend die langsamer wandernden Dimere gebildet wurden.

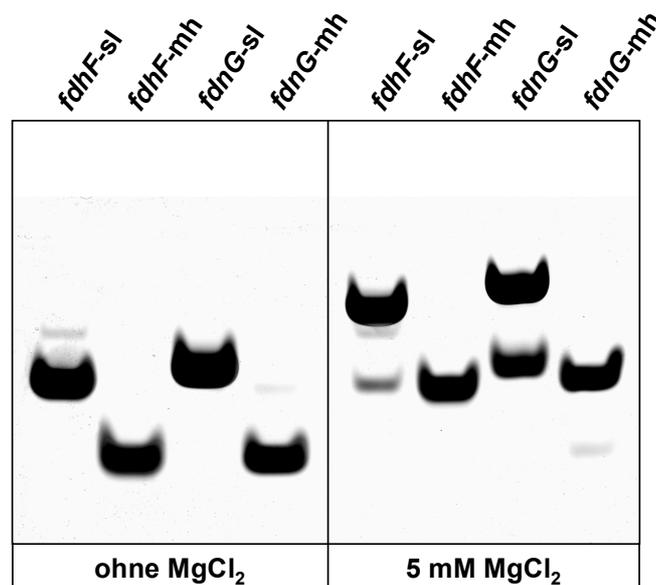


Abbildung 33. Faltung von SECIS-Transkripten. 200 µM Transkript, das in 0,1 mM EDTA gelöst vorlag, wurde in Abwesenheit von Salzen oder in Gegenwart von 5 mM $MgCl_2$ in einem Volumen von 10 µl für 90 sec auf 80 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl 50 % Glycerin wurden die Ansätze auf ein vorgekühltes, nicht denaturierendes 12 %-Polyacrylamidgel (30:0,8 Quervernetzung) mit TBE als Gel- und Laufpuffer aufgetragen. Die Auftrennung der isomeren Formen erfolgte für 1,5 h bei 100 V und 4 °C, ihre anschließende Detektion durch Färben mit Stains-all. Spuren: *fdhF-sl*, 33 nt-*fdhF*-HNS; *fdhF-mh*, 17 nt-*fdhF*-Minihelix; *fdnG-sl*, 39 nt-*fdnG*-HNS; *fdnG-mh*, 18 nt-*fdnG*-Minihelix.

Einfluss der Ligandenbindung auf die Sekundärstruktur von SelB

Eine Proteinklösung absorbiert bei Bestrahlung mit circular polarisiertem Licht einer definierten Wellenlänge in Abhängigkeit von den Anteilen verschiedener Sekundärstruktur-Elemente in der Polypeptidkette bevorzugt entweder den links oder den rechts polarisierten Anteil. Dieser Effekt beruht vor allem auf dem $n-\pi^*$ -Übergang (210–230 nm) und dem $\pi-\pi^*$ -Übergang (180–200 nm) der Peptid-Amidbindung, deren Maxima und Energie in Abhängigkeit von der molekularen Umgebung variieren (Woody, 1994). CD-Spektroskopie stellt daher ein geeignetes Verfahren dar, um die Sekundärstruktur-Zusammensetzung eines Proteins und deren Veränderung bei Bindung von Liganden zu untersuchen. Das CD-Spektrum von SelB ist typisch für ein Protein mit einem hohen Anteil an α -Helices. Die Bindung von GTP führte zu einer kleinen, aber signifikanten Veränderung der Amplitude der 208 nm-Bande (Abbildung 34A), die aber keine Veränderung in Sekundärelementen widerspiegelt. Eine deutliche Zunahme der Amplitude der 208 nm- und 222 nm-Bande konnte jedoch bei Inkubation von SelB mit dem *fdnG*-SECIS-Element beobachtet werden (Abbildung 34B). Diese wurde von einem geringfügigen Übergang von ungeordneten und β -Faltblatt-Anteilen zu α -helikalen Strukturen begleitet. Bei gleichzeitiger Bindung beider Liganden summieren sich die einzelnen Effekte auf (Abbildung 34C).

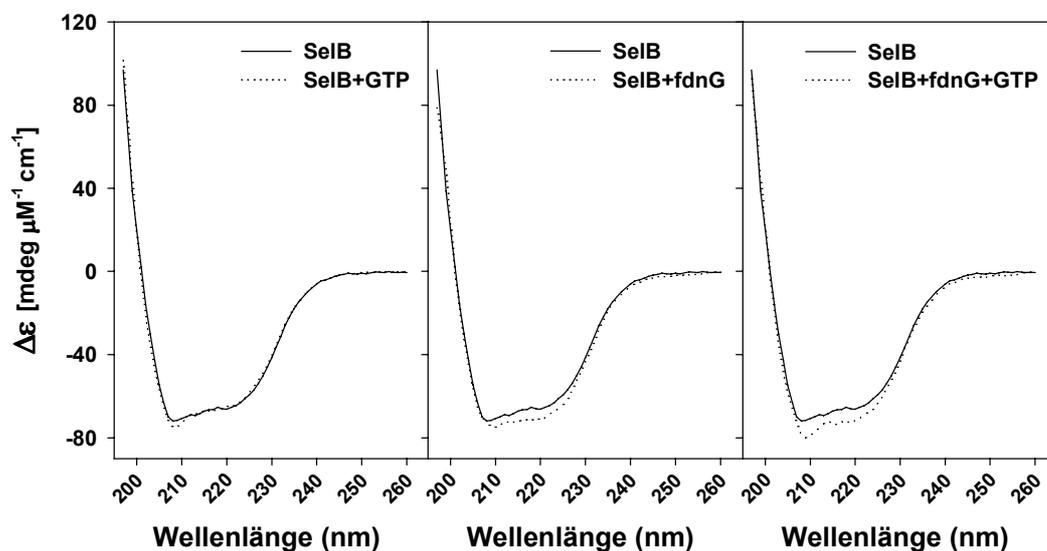


Abbildung 34. Einfluss der Bindung von GTP und SECIS-RNA auf die Sekundärstruktur von SelB. Die CD-Spektren von SelB (3,64 μM) wurden ohne Liganden und in Gegenwart von 50 μM GTP (A) bzw. 6,7 μM 39 nt-*fdnG*-HNS (B) oder nach Zugabe beider Liganden (C) aufgezeichnet und auf die Proteinkonzentration und Weglänge des Lichts normiert.

Eine Zusammenfassung der Anteile einzelner Sekundärstruktur-Komponenten, die aus den gemessenen Spektren unter Verwendung des Programms CDNN 2.1 ermittelt wurden, ist in

Tabelle 11 aufgeführt. Da die Differenzen zwischen den entsprechenden Werten sehr gering sind, findet die Bindung der Liganden vermutlich überwiegend über Rearrangement von Domänen statt, so wie es auch für die Nukleotidbindung durch EF-Tu unter Verwendung von spektroskopischen (Ohta *et al.*, 1977) und kristallographischen (Berchtold *et al.*, 1993) Methoden gezeigt wurde. Die Sekundärstruktur des Proteins bleibt dabei weitgehend unverändert. Die Bindung der *fdnG*-HNS an SelB₄₇₂₋₆₁₄ führte ebenfalls zu diesem Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

TABELLE 11. Sekundärstruktur-Zusammensetzung von SelB-Liganden-Komplexen.

	SelB	GTP	SelB + <i>fdnG</i> -sl ^{a)}	SelB + GTP + <i>fdnG</i> -sl ^{a)}
α-Helix	35,2 %	35,3 %	37,0 %	37,8 %
β-Faltblatt	16,2 %	16,2 %	15,3 %	15,0 %
ungeordnet	47,0 %	46,7 %	45,5 %	44,7 %
Summe	98,4 %	98,1 %	97,9 %	97,5 %

^{a)} *fdnG*-sl: 39 nt-*fdnG*-HNS

Prinzip der Stopped-Flow-Methode

Die Untersuchung von Protein-Liganden-Interaktionen unter Gleichgewichtsbedingungen ermöglicht in der Regel keine direkten Aussagen über die Kinetik der Assoziations- und Dissoziationsreaktionen. Da diese aber Rückschlüsse auf die mechanistischen Hintergründe des Ligandenbindungsverhaltens erlaubt, als Indikator für Konformationsänderungen dienen kann und zudem oft exaktere Werte für die Gleichgewichtskonstanten liefert, wurde die Interaktion von SelB mit seinen Liganden mit Hilfe der Stopped-Flow-Methode analysiert. Hierbei werden zwei Lösungen, die sich in unterschiedlichen Spritzen befinden und im einfachsten Fall einmal das Apoprotein und einmal den Liganden enthalten, unter Druck in einer Küvette gemischt. Die Ausbildung des Komplexes kann anschließend anhand der Änderung eines Fluoreszenzsignals in Echtzeit verfolgt werden. Das gemessene Signal beruht entweder auf der intrinsischen Fluoreszenz der Tryptophan-Reste des zu untersuchenden Proteins oder auf der Fluoreszenz einer Reportergruppe, die mit dem Liganden gekoppelt ist. Die direkte Interaktion des Liganden mit dem Protein oder Konformationsänderungen, die durch den Bindungsvorgang induziert werden, können in der Folge zu einer Veränderung der unmittelbaren molekularen Umgebung der angeregten Gruppe führen, die in einer Ab- oder Zunahme der Signalintensität resultiert. Die aufgezeichneten Daten erlauben anschließend nach Regressionsanalyse Aufschluß über die Geschwindigkeitskonstante der beobachteten Reaktion und über die Anzahl der Schritte, die zum Ausbilden der Interaktion nötig sind. Die Stopped-Flow-Methode erfordert zwar große Mengen

an Material, um verwertbare Signale zu erhalten, besitzt aber gegenüber der ähnlich angelegten Methode der Oberflächenplasmon-Resonanz den Vorteil, dass die Reaktionen in Lösung ablaufen und daher keine Immobilisierung von Reaktanden nötig ist, die zu einer Verfälschung der Messergebnisse durch sterische Hinderung oder Massentransport-Probleme führen kann.

Analyse der Interaktion von SelB mit Guanosin-Nukleotiden

Interaktion mit mantdGTP und GTP

Guanosin-Nukleotide, die nach Reaktion mit Methylisotriosäureanhydrid eine Methylantraniloyl (mant)-Gruppe am Ribose-Rest tragen, besitzen ähnliche biochemische Eigenschaften wie unmodifizierte Nukleotide (Hiratsuka, 1983). Die Fluoreszenz der Reportergruppe lässt sich bei einer Wellenlänge von 330 - 350 nm anregen und die Intensität der Emission, deren Maximum bei 430 - 445 nm liegt, nimmt bei Bindung des Nukleotids an ein Protein zuverlässig um 100 – 200 % zu. Das Exzitationsspektrum der mant-Gruppe überlappt zudem mit dem Emissionsspektrum der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz von Proteinen ($\lambda_{\text{max}} = 350 - 360$ nm). Dadurch ist es möglich, das anregende Signal mittels Fluoreszenz-Resonanztransfer (FRET) von Tryptophan auf den mant-Rest weiterzuleiten und so das Hintergrundsignal stark zu reduzieren, indem nur noch gebundene Nukleotide zur Fluoreszenz angeregt werden. Aufgrund dieser Eigenschaften sind mant-Nukleotide hervorragend für die Analyse des Nukleotidbindungsverhaltens von G-Proteinen geeignet. Derivatisierte Ribonukleotide liegen in der Regel als Racemat aus 2'- und 3'-Estern vor, die leicht unterschiedliche Binde-Eigenschaften besitzen und somit zu mehrphasigen Assoziations- und Dissoziationskurven führen können. Dieses Problem kann durch Verwendung von 3'-mant-2'-Desoxynukleotiden vermieden werden, die sich in ihren Eigenschaften von den entsprechenden Ribonukleotiden kaum unterscheiden (John *et al.*, 1990).

Die Bindung von mantdGTP an SelB führte zu einer Zunahme der Emissionsintensität um ca. 130 % (Daten nicht gezeigt). Dieses Signal konnte allerdings nicht für Gleichgewichtsmessungen mittels Fluoreszenz-Titration eingesetzt werden, da das Mischen einer SelB-Lösung mit steigenden Mengen an mant-Nukleotid zu einer starken Erhöhung des Hintergrundsignals geführt hätte. Eine Titration einer mant-Nukleotid-Lösung mit SelB war ebenfalls nicht möglich, da die geringe Löslichkeit von SelB das Herstellen einer hochkonzentrierten Protein-Stammlösung nicht erlaubte. Diese Probleme verhinderten aber nicht die Analyse der mantdGTP-SelB-Interaktion mit Hilfe der Stopped-Flow-Methode. Ein typisches Beispiel für

eine Transiente, die nach Mischen von SelB mit mantdGTP erhalten wurde, ist in Abbildung 35A gezeigt. Findet die Reaktion unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung ($c_{\text{mantdGTP}} \gg c_{\text{selB}}$) statt, dann lässt sich die Kurve durch eine einfach exponentielle Gleichung der Form

$$I = I_{\Delta} - I_{\Delta} e^{-k t} + A \quad (\text{Gleichung 1})$$

beschreiben (Gutfreund, 1995). I repräsentiert dabei die gemessene Emissionsintensität, I_{Δ} die maximale Änderung der Emissionsintensität ($I_{\infty} - I_0$), k die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Reaktion, t die Zeit und A die Emissionsintensität zum Zeitpunkt $t=0$. Die Größen der Konstanten, die den Verlauf der Kurve optimal definieren, lassen sich durch Regressionsanalyse ermitteln, wobei sich für k im vorliegenden Fall ein Wert von $3,29 \text{ s}^{-1}$ ergibt. Eine Erhöhung der mantdGTP-Konzentration bei konstanter Konzentration von SelB führte zu einer linearen Zunahme der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (Abbildung 35B), was für eine einstufige Reaktion spricht. Die Beziehung zwischen diesen beiden Größen kann bei der vorliegenden Art von Experiment durch die Gleichung

$$k = k_{\text{ass}} [\text{mantdGTP}] + k_{\text{dis}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

beschrieben werden, wobei k_{ass} die Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion und k_{dis} die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion darstellt.

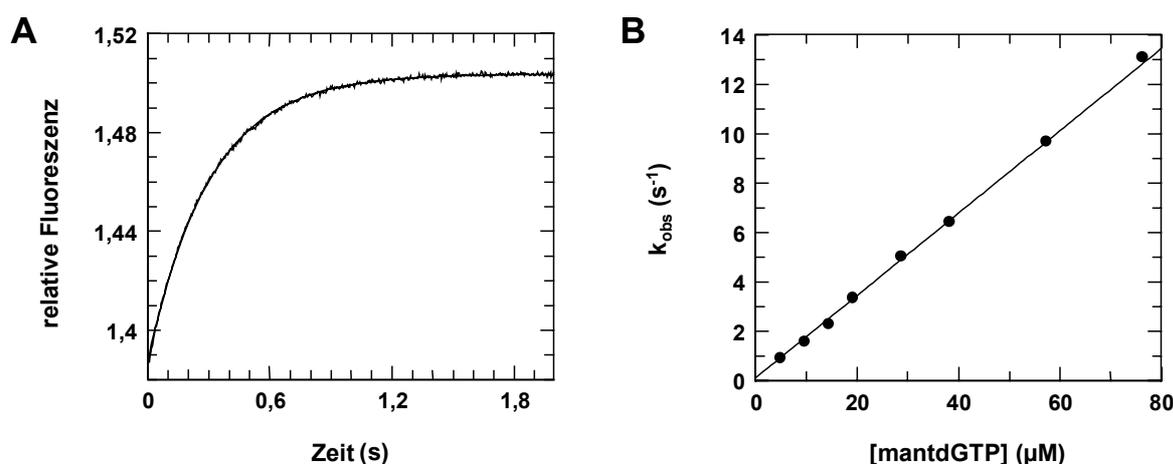


Abbildung 35. Kinetik der Interaktion von SelB mit mantdGTP. (A) Transiente der im Stopped-Flow-Apparat verfolgten Bindung von mantdGTP ($19 \mu\text{M}$) an SelB ($0,3 \mu\text{M}$). Die Detektion des Signals erfolgte mittels FRET. Die eingezeichnete Kurve entspricht einer einfach exponentiellen Funktion mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $3,29 \text{ s}^{-1}$. (B) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der mantdGTP-Konzentration. Die Ausgleichsgerade definiert k_{ass} mit $1,67 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und k_{dis} mit $0,11 \text{ s}^{-1}$.

Da die Bestimmung von k_{dis} nach diesem Verfahren mit einem relativ großen Fehler verbunden ist, wurde die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation in einem Verdrängungsexperiment genauer bestimmt. Ein Komplex aus SelB und mantdGTP wurde dazu mit einem großen Überschuss an GTP gemischt. Da mantdGTP-Moleküle, die von SelB abdissoziieren, sofort durch unmarkiertes GTP ersetzt und auf Grund ihrer Unterzahl an einer erneuten Bindung gehindert werden, konnte der Dissoziationsvorgang an der Verringerung der mant-Fluoreszenz verfolgt werden. Die erhaltene Transiente (Abbildung 36) lässt sich ebenfalls mit einer einfach exponentiellen Funktion beschreiben, in die aber zur Kompensation eines leichten Bleicheffekts ein linearer Term eingeführt werden musste (Gleichung 3).

$$I = I_A e^{-k t} + A + Bt \quad (\text{Gleichung 3})$$

Da eine Reaktion nullter Ordnung vorliegt, entspricht in diesem Fall die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k der Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten k_{dis} , für die nach Regressionsanalyse ein Wert von $0,092 \text{ s}^{-1}$ ermittelt wurde.

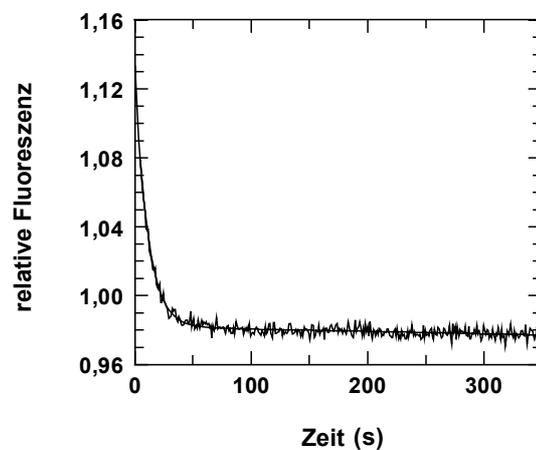


Abbildung 36. Verdrängung von mantdGTP von SelB. Ein Komplex aus SelB ($1,2 \mu\text{M}$) und mantdGTP ($4 \mu\text{M}$) in einer Spritze des Stopped-Flow-Apparats wurde mit einer Lösung von GTP ($200 \mu\text{M}$), die sich in der anderen Spritze befand, gemischt. Die Fluoreszenz der mant-Gruppe wurde direkt bei 366 nm angeregt und die Emission wurde durch einen 389 nm -Cutoff-Filter registriert. Die eingepasste Kurve ist durch eine einfach exponentielle Gleichung mit der Geschwindigkeitskonstanten $0,092 \text{ s}^{-1}$ definiert, in die zur Berücksichtigung eines leichten Bleichungseffekts ein linearer Term eingeführt wurde.

Um die Interaktion von SelB mit unmodifizierten Nukleotiden zu charakterisieren, wurde die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz von SelB als Signal verwendet, die bei einer Wellenlänge von 289 nm angeregt wurde. Die Intensität der Emission erhöhte sich bei Bindung von GTP um ca. $2,5 \%$. Ein typisches Beispiel für die Transienten, die bei der Assoziation von SelB mit GTP

erhalten wurden, ist in Abbildung 37A gezeigt. Der Verlauf der Kurve kann wieder durch eine einfach exponentielle Gleichung beschrieben werden, die aber zur Berücksichtigung des starken Bleicheffekts einen linearen Term enthält (Gleichung 3). Der aus Abbildung 37B ersichtliche lineare Zusammenhang zwischen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten und der verwendeten GTP-Konzentration ergibt nach Gleichung 2 für k_{ass} einen Wert von $2,16 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

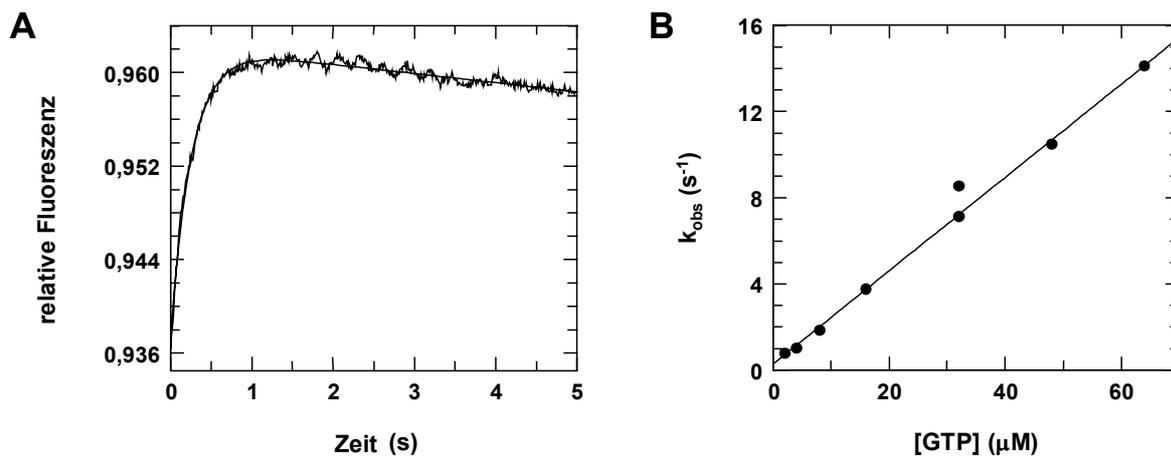


Abbildung 37. Kinetik der Assoziation von SelB mit GTP. (A) Transiente der Assoziation von SelB (0,6 µM) mit GTP (16 µM) unter Verwendung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz von SelB als Signal. Die eingepasste Kurve ist durch eine einfach exponentielle Funktion (Gleichung 3) mit $k_{ass} = 3,85 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. (B) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der GTP-Konzentration. Die Ausgleichsgerade entspricht Werten von $2,16 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für k_{ass} und $0,28 \text{ s}^{-1}$ für k_{dis} .

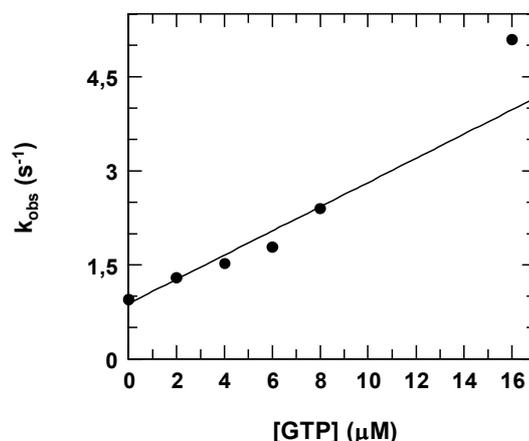


Abbildung 38. Kinetik der Assoziation von SelB mit mantdGTP in Gegenwart von GTP. Der Graph zeigt die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten, die für die Assoziation von SelB (0,6 µM) mit mantdGTP (6 µM) in Gegenwart variierender Konzentrationen von GTP bestimmt wurden. Die Reaktionen wurden mittels FRET verfolgt. Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt $1,93 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Die Assoziations-Geschwindigkeitskonstante für unmodifiziertes GTP konnte zusätzlich durch ein Experiment bestimmt werden, in dem GTP mit mantdGTP um die Bindung an SelB konkurrierte. Wurde dabei die mantdGTP-Konzentration konstant gehalten, während die Konzentration von unmodifiziertem GTP variierte, so zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation von mantdGTP und der GTP-Konzentration (Abbildung 38). Die Steigung der erhaltenen Geraden ($1,93 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) entspricht bei dieser Art von Experiment dem Wert von k_{ass} für die Assoziation von GTP.

Die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{dis} für GTP wurde mit Hilfe eines Verdrängungsexperiments bestimmt. Um das Hintergrundsignal der mant-Fluoreszenz in einem akzeptablen Rahmen zu halten, konnten keine hohen Konzentrationen an mantdGTP als Kompetitor eingesetzt werden. Da aber bei Mischen eines Komplexes aus SelB ($0,6 \mu\text{M}$) und GTP ($4 \mu\text{M}$) in der einen Spritze mit $20 \mu\text{M}$ bzw. $60 \mu\text{M}$ mantdGTP in der anderen Spritze im Rahmen der Messgenauigkeit zweimal dieselben Geschwindigkeitskonstanten erhalten wurden ($0,16 \text{ s}^{-1}$), kann der ermittelte Wert als ausreichend genaue Bestimmung für k_{dis} angesehen werden (Daten nicht gezeigt).

Interaktion mit mantGDP und GDP

Während die Bindung von mantGTP an SelB zu deutlich zweiphasigen Transienten führte, konnte das unterschiedliche Verhalten der 2'- und 3'-Ester im Fall von mantGDP bei den verwendeten Konzentrationen nicht aufgelöst werden. Da das mant-Ribonukleotid leichter verfügbar war als das entsprechende Desoxynukleotid, wurde ihm für die nachfolgenden Experimente der Vorzug gegeben. Die Assoziation von SelB mit mantGDP führte, wie für mantdGTP beobachtet, zu Transienten, die durch die in Gleichung 1 definierte einfach exponentielle Funktion beschrieben werden konnten. Der lineare Zusammenhang zwischen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten und der mantGDP-Konzentration (Abbildung 39A) deutet auf eine einstufige Reaktion mit einer Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten k_{ass} von $1,79 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und einer Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten k_{dis} von $14,25 \text{ s}^{-1}$ hin. Die Charakterisierung der Bindung von unmarkiertem GDP erfolgte in einem Kompetitionsexperiment. Wurde die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation von SelB mit mantGDP in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an GDP bestimmt, so ergab sich die in Abbildung 39B dargestellte lineare Abhängigkeit der beiden Größen. Die Steigung der berechneten Ausgleichsgeraden definiert den Wert der Assoziations-Geschwindigkeitskonstante für GDP als $1,12 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

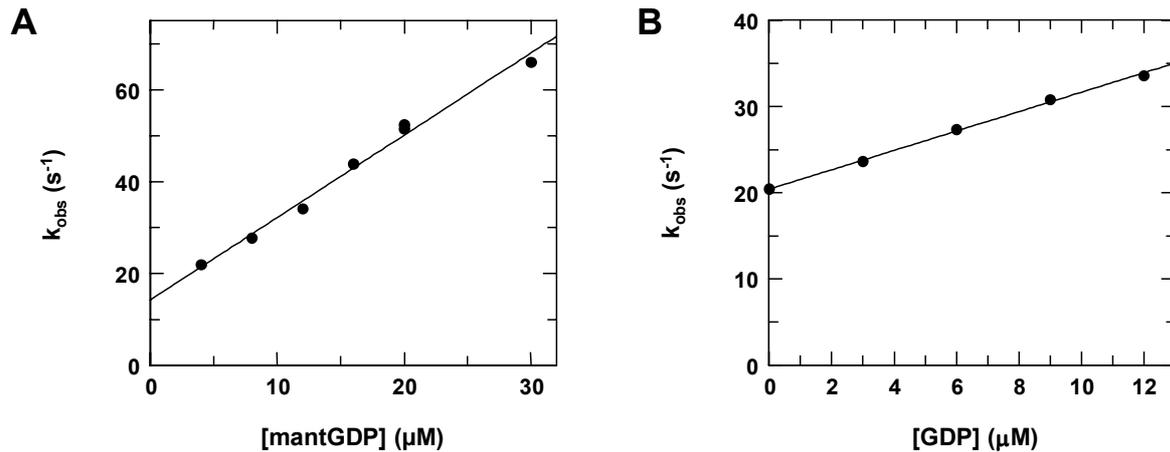


Abbildung 39. Kinetik der Assoziation von SelB mit mantGDP und GDP. (A) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation von SelB ($0,75 \mu\text{M}$) mit mantGDP von der Nukleotid-Konzentration. Die Fluoreszenz der mant-Gruppe wurde mittels FRET angeregt. Die Ausgleichsgerade ergibt Werte von $1,79 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für k_{ass} und $14,25 \text{ s}^{-1}$ für k_{dis} . (B) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation von SelB ($0,6 \mu\text{M}$) mit mantGDP ($5 \mu\text{M}$) von der Konzentration des Kompetitors GDP. Die Fluoreszenz der mant-Gruppe wurde direkt bei 366 nm angeregt. Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt $1,12 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten für mantGDP und GDP wurden in Verdrängungsexperimenten genauer definiert. Wurde ein SelB·mantGDP-Komplex mit einem großen Überschuss an GDP gemischt, so konnte die Abdissoziation des verdrängten Nukleotids an der Verringerung der mant-Fluoreszenz verfolgt werden (Abbildung 40). Der Verlauf der beobachteten Transiente ließ sich durch eine einfach exponentielle Funktion (Gleichung 1) beschreiben und ergab für k_{dis} einen Wert von $13,9 \text{ s}^{-1}$.

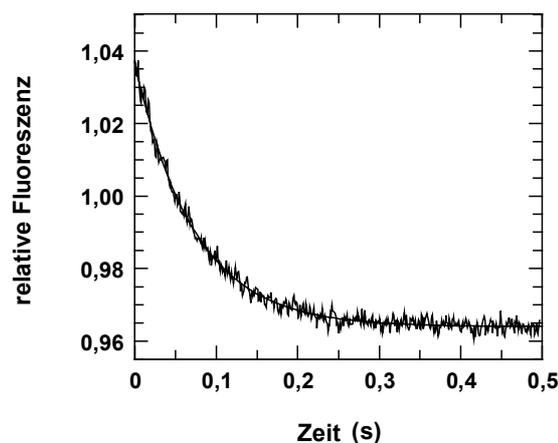


Abbildung 40. Verdrängung von mantGDP aus der Bindung mit SelB. Ein Komplex aus SelB ($1,2 \mu\text{M}$) und mantGDP ($40 \mu\text{M}$) in einer Spritze des Stopped-Flow Apparats wurde mit einer Lösung von 1 mM GDP in der anderen Spritze gemischt. Die Fluoreszenz der mant-Gruppe wurde mittels FRET angeregt. Die eingepasste Kurve folgt einer einfach exponentiellen Funktion mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $13,9 \text{ s}^{-1}$.

Die Verdrängung von GDP konnte nur unter Verwendung eines moderaten Überschusses an mantGDP gemessen werden, damit eine ausreichende Signalqualität gewahrt blieb. Eine Lösung, die den Komplex aus SelB (0,6 μM) und GDP (20 μM) enthielt, wurde dazu mit einer Lösung von 100 μM bzw. 150 μM mantGDP gemischt. Es ergaben sich Transienten mit einfach exponentiellem Verlauf und Geschwindigkeitskonstanten von 16,26 s^{-1} und 14,95 s^{-1} (Daten nicht gezeigt). Aus der Ähnlichkeit der beiden Werte kann gefolgert werden, dass eine weitere Erhöhung der mantGDP-Konzentration zu keiner signifikanten Verringerung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten führen würde und daher für k_{dis} ein Wert von 15 s^{-1} als gute Näherung angenommen werden kann.

Eine Zusammenfassung der kinetischen Daten, die für die Interaktion von SelB mit Guanosin-Nukleotiden ermittelt wurden, ist in Tabelle 12 gezeigt.

TABELLE 12. Geschwindigkeitskonstanten für die Interaktion von SelB mit Guanosin-Nukleotiden und ihren mant-Derivaten.

Nukleotid	k_{ass} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{dis} (s^{-1})	K_D (μM)
mantdGTP	$1,67 \times 10^5$	0,092	0,55
GTP	$2,16 \times 10^5$ ^{a)}	0,16	0,74
GTP	$1,93 \times 10^5$ ^{b)}		
mantGDP	$1,79 \times 10^6$	13,9	7,8
GDP	$1,12 \times 10^6$ ^{c)}	15,0	13,4

^{a)} direkt über die intrinsische Fluoreszenz bestimmt

^{b)} durch Konkurrenz mit mantdGTP bestimmt

^{c)} durch Konkurrenz mit mantGDP bestimmt

Analyse der Interaktion von SelB mit SECIS-Elementen

Kinetische Charakterisierung der Interaktion mit der *fdhF*-Minihelix

Obwohl sich sieben der insgesamt zwölf Tryptophan-Reste von SelB in der für die mRNA-Bindung zuständigen Domäne 4 befinden, führte die Assoziation der 17 nt-*fdhF*-Minihelix nur zu einer äußerst geringen, als Signal nicht verwertbaren Verringerung der intrinsischen Fluoreszenz des Proteins. Um dennoch die Kinetik der SelB-mRNA-Interaktion untersuchen zu können, wurde auf ein fluoreszenzmarkiertes RNA-Oligonukleotid als Liganden zurückgegriffen. Als Fluorophor kam 3',6'-Dipivaloylfluorescein zum Einsatz, das über einen 6-Carbox-amidohexyl-Linker an das 5'-Ende des Oligonukleotids gekoppelt war. Bei Anregung mit

monochromatischen Licht der Wellenlänge 494 nm lag das Maximum der Emission bei 500 - 510 nm und die Bindung der markierten *fdhF*-Minihelix an SelB führte zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität. Dieses Signal war ausreichend stabil, um Titrationsexperimente durchführen zu können. Die Form der Kurve, die bei Titration einer konstanten Menge von markierter *fdhF*-Minihelix mit SelB erhalten wurde (Abbildung 41A), deutet bereits eine sehr hohe Affinität zwischen den beiden Interaktionspartnern an. Da sich das Signal dem Sättigungsplateau weitgehend linear annähert, muss die Dissoziationskonstante weit unter der Konzentration der eingesetzten Substrate liegen. Die Zunahme der Fluoreszenzemission unter Sättigungsbedingungen betrug ca. 7 %. Die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der zugegebenen Menge an SelB kann durch eine Gleichung der Form

$$[\text{SelB}] = \frac{K_D (I/I_0 - 1)}{I_\infty/I_0 - I/I_0} + \frac{L_0 (I/I_0 - 1)}{I_\infty/I_0 - 1} \quad (\text{Gleichung 4})$$

beschrieben werden, wobei K_D die Dissoziationskonstante der Reaktion, I die gemessene Fluoreszenzintensität, I_0 die Fluoreszenzemission in Abwesenheit von SelB, I_∞ die maximale Fluoreszenzintensität und L_0 die Konzentration der markierten *fdhF*-Minihelix repräsentieren (Ott *et al.*, 1989).

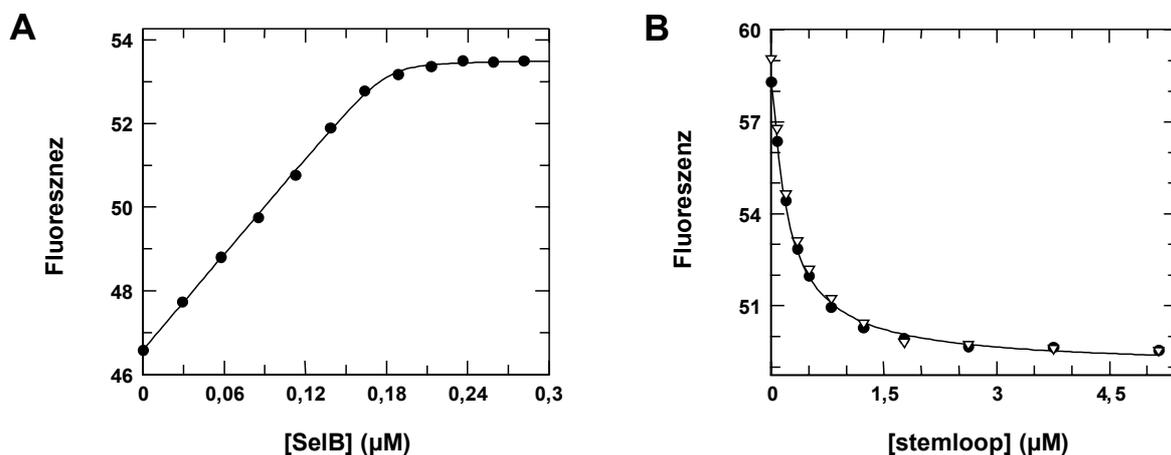


Abbildung 41. Interaktion von SelB mit SECIS-Elementen. (A) Titration der fluoresceinmarkierten *fdhF*-Minihelix (181 nM) mit SelB. Die Ausgleichskurve ist durch die in Gleichung 4 beschriebene Funktion mit einem Wert für K_D von 0,7 nM definiert. (B) Verdrängung der fluoresceinmarkierten *fdhF*-Minihelix (181 nM) aus dem vorgeformten Komplex mit SelB (198 nM) durch die nicht markierte 17 nt-*fdhF*-Minihelix (●) und die 39 nt-*fdnG*-HNS (▽). Die eingezeichnete Kurve, die durch Regressionsanalyse der Messwerte auf Basis von Gleichung 5 mit einem vorgegebenen K_D von 1,26 nM für die markierte *fdhF*-Minihelix (s. Tabelle 14) erhalten wurde, ergibt für die nicht markierte *fdhF*-Minihelix einen K_D -Wert von 1,26 nM. Die Auswertung der für die *fdnG*-HNS erhaltenen Daten, für die keine Ausgleichskurve eingezeichnet ist, führte zu einem K_D von 1,38 nM.

Eine Regressionsanalyse der Daten führte zu einem K_D -Wert von 0,7 nM. Dieser kann allerdings nur als Näherung betrachtet werden, da die verwendeten hohen Konzentrationen an markierter *fdhF*-Minihelix und SelB den Informationsgehalt der Titrationskurve stark einschränken. Eine Verringerung der Konzentrationen war jedoch auf Grund der Instabilität des Fluoreszenzsignals nicht möglich.

Um zu untersuchen, ob die Reportergruppe einen Einfluss auf die Bindung der RNA ausübt und um gleichzeitig Information über die Affinitäten von nativen SECIS-Elementen zu erhalten, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Fluoresceinmarkierte *fdhF*-Minihelix wurde dabei durch sukzessive Zugabe von nicht markierter *fdhF*-Minihelix aus dem vorgeformten Komplex mit SelB verdrängt. Abbildung 41B zeigt, dass die Verdrängung bei einem hohen Überschuss an nicht markierter RNA quantitativ erfolgte, was für eine rein kompetitive Bindung beider Liganden an die mRNA-Bindestelle von SelB spricht und eine durch die Reportergruppe vermittelte, unspezifische Bindung der markierten *fdhF*-Minihelix ausschließt. Der Einfluss der Zugabe von unmarkiertem SECIS-Element auf die beobachtete Fluoreszenz lässt sich durch eine Erweiterung von Gleichung 4 auf die Form

$$[SelB] = \frac{K_D (I/I_0 - 1)}{I_\infty/I_0 - I/I_0} + \frac{L_0 (I/I_0 - 1)}{I_\infty/I_0 - 1} + C_0 / \left[1 + \frac{K_i/K_D (I_\infty/I_0 - I/I_0)}{I_\infty/I_0 - 1} \right] \quad (\text{Gleichung 5})$$

beschreiben, wobei K_i die Dissoziationskonstante und C_0 die Konzentration des Kompetitors darstellen (Ott *et al.*, 1989). Wurde als K_D für die Interaktion von SelB mit der markierten *fdhF*-Minihelix der aus den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktion abgeleitete Wert von 1,26 nM eingesetzt (s. Tabelle 14), dann ergab sich nach Regressionsanalyse der Daten für die unmarkierte *fdhF*-Minihelix ein K_D von 1,36 nM. Bei Verwendung der 39 nt-*fdnG*-HNS als Kompetitor wurden identische Ergebnisse erzielt und der ermittelte K_D -Wert lag bei 1,38 nM. Da die Resultate für die markierte und die nicht markierten SECIS-Elemente weitgehend übereinstimmten, konnte ein signifikanter Einfluss des Fluorophors auf die Bindung ausgeschlossen werden.

Die Kinetik der Interaktion von SelB mit der fluoresceinmarkierten *fdhF*-Minihelix wurde unter Verwendung der Stopped-Flow-Methode näher untersucht. Die Assoziationsreaktion führte zu Transienten, deren Verlauf durch einfach exponentielle Funktionen (Gleichung 1) beschrieben werden konnte (Abbildung 42A). Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten zeigten bei konstanter Konzentration an markierter Minihelix eine lineare Abhängigkeit von der SelB-

Konzentration (Abbildung 42B), aus der für k_{ass} ein Wert von $2,23 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ berechnet wurde.

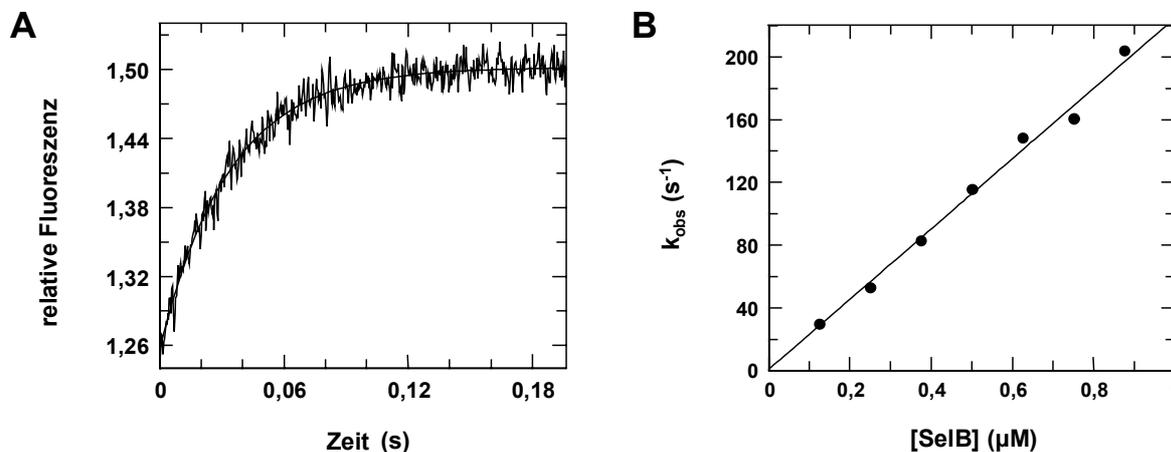


Abbildung 42. Kinetik der Interaktion von SelB mit der fluoresceinmarkierten *fdhF*-Minihelix. (A) Transiente der Assoziation von SelB ($0,125 \mu\text{M}$) mit der markierten *fdhF*-Minihelix ($45,3 \text{ nM}$). Die eingezeichnete Ausgleichskurve ist durch eine einfach exponentielle Funktion mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $29,6 \text{ s}^{-1}$ definiert. (B) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der SelB-Konzentration. Die Ausgleichsgerade entspricht Werten von $2,23 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für k_{ass} und $0,75 \text{ s}^{-1}$ für k_{dis} .

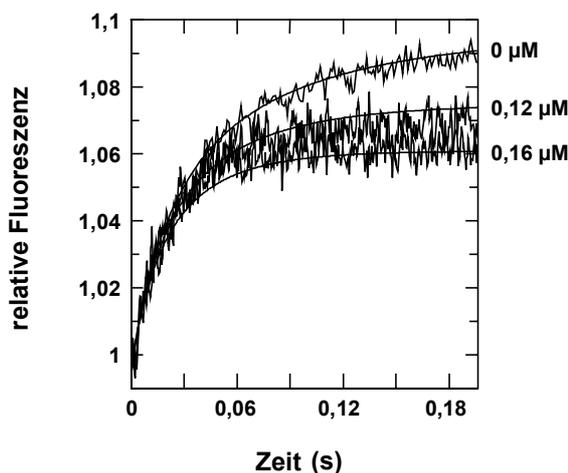


Abbildung 43. Kinetik der Assoziation von SelB mit der fluoresceinmarkierten *fdhF*-Minihelix in Gegenwart von nicht markierter *fdhF*-Minihelix. Die Konzentrationen von SelB ($0,128 \mu\text{M}$) und der markierten *fdhF*-Minihelix ($0,136 \mu\text{M}$) blieben konstant, während die Konzentration der nicht markierten Minihelix wie im Graph angegeben variiert wurde. Die eingezeichneten Ausgleichskurven wurden durch globale Analyse der Daten mittels Scientist 2.01 ermittelt. Sie resultieren in Werten für die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktionen von $k_{ass} = 2,39 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{dis} = 0,28 \text{ s}^{-1}$ für die markierte *fdhF*-Minihelix und $k_{ass} = 1,09 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{dis} = 0,28 \text{ s}^{-1}$ für die unmarkierte Minihelix.

Die Tatsache, dass die Ausgleichsgerade die Ordinate nahezu am Nullpunkt schneidet, deutet auf eine im Vergleich sehr niedrige Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante hin. Diese wurde durch Verdrängung der markierten *fdhF*-Minihelix aus ihrem Komplex mit SelB durch unmarkierte *fdhF*-Minihelix exakt bestimmt (Abbildung 45). Aus dem erhaltenen Wert ($0,28 \text{ s}^{-1}$) ergibt sich zusammen mit der Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten ein K_D von $1,26 \text{ nM}$, der die aus den Titrationsexperimenten (s. Abbildung 41A) abgeleitete Näherung von 1 nM bestätigt.

Es war möglich, Daten zur Kinetik der Interaktion von SelB mit der nicht markierten *fdhF*-Minihelix zu erhalten, indem deren Einfluss auf die Kinetik der Assoziation mit dem markierten Molekül untersucht wurde. Die Zugabe steigender Mengen an Kompetitor führte zu einer deutlich Beeinflussung der Assoziationsreaktion (Abbildung 43). Eine globale Analyse der erhaltenen Transienten, die unter den verwendeten Bedingungen nur durch ein komplexes Gleichungssystem beschrieben werden können, ergab unter Verwendung des Programms Scientist 2.01 Werte von $1,09 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für k_{ass} und $0,28 \text{ s}^{-1}$ für k_{dis} .

Einfluss der Struktur des SECIS-Elements auf die Affinität für SelB

Die minimale Binderegion des SECIS-Elements konnte durch biochemische (Ringquist *et al.*, 1994; Kromayer *et al.*, 1996) und genetische (Liu *et al.*, 1998) Untersuchungen exakt definiert werden. Es zeigte sich, dass für dessen Interaktion mit SelB *in vitro* und für dessen biologische Aktivität die 17 nt-*fdhF*- bzw. 18 nt-*fdnG*-Minihelix ausreichend war. Zu klären blieb, ob die Affinität der Bindung von SelB durch die basalen Anteil der SECIS-Strukturen beeinflusst wurde.

Mit Hilfe von kompetitiver Fluoreszenztitration konnte bereits gezeigt werden, dass die *fdhF*-Minihelix dieselbe Affinität für SelB aufweist wie die 39 nt-*fdnG*-HNS (s. Abbildung 41B). Um aber einen direkten Vergleich zwischen den SECIS-Elementen voller und minimaler Länge zu erhalten, wurde ihre Komplexbildung mit SelB in Gelretardations-Experimenten analysiert (Abbildung 44). Auch in diesem Fall verhielten sich die 17 nt-*fdhF*-Minihelix und die 39 nt-*fdnG*-HNS sehr ähnlich, während die 32 nt-*fdhF*-HNS eine signifikant höhere apparente Affinität für SelB zeigte. Die schwächste Interaktion wurde durch die 18 nt-*fdnG*-Minihelix ausgebildet. Eine Verkürzung des helikalen Bereiches schien die apparente Affinität der SECIS-Elemente für SelB zu verringern. Gleichzeitig zeigte sich, dass beide Varianten des *fdhF*-SECIS-Elements SelB mit einer höheren apparenten Affinität komplexierten als die entsprechenden Varianten des *fdnG*-SECIS-Elements. Es ist allerdings unklar, ob tatsächlich unterschiedliche

Gleichgewichtskonstanten oder nur abweichende Assoziations- und Dissoziationskinetiken für dieses Verhalten im Gel verantwortlich sind.

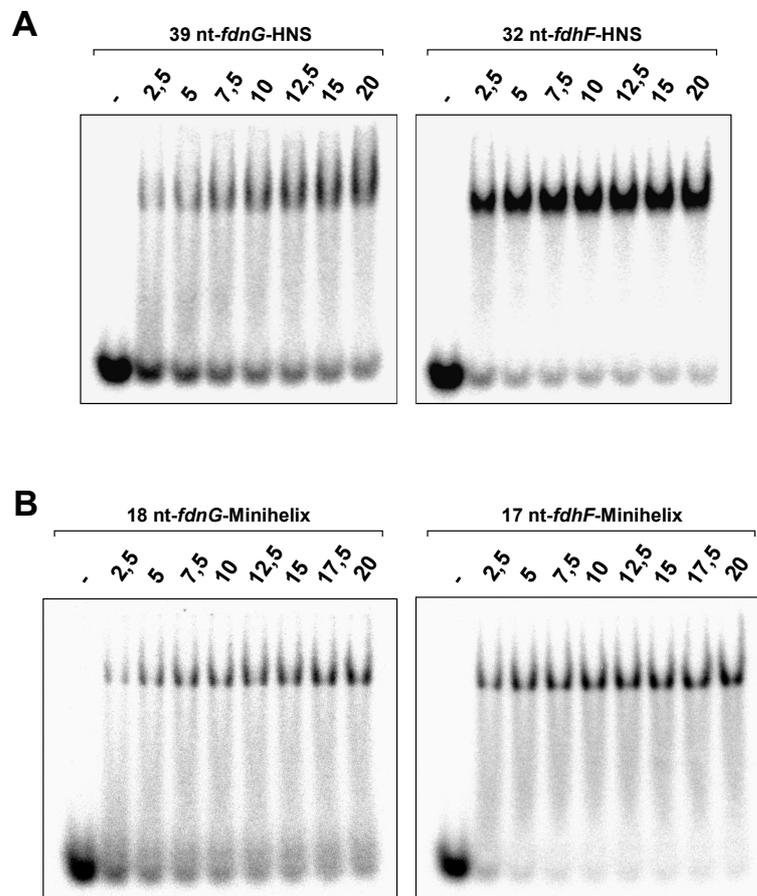


Abbildung 44. Vergleich der Interaktion von SelB mit *fdhF*- und *fdnG*-SECIS-Transkripten. SECIS-Transkripte voller (A) und minimaler (B) Länge wurden mit zunehmenden Mengen an SelB inkubiert und anschließend in einem nicht denaturierenden 6 %-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Kooperativität der Liganden-Bindung durch SelB

Interaktion zwischen der Nukleotid- und der SECIS-Bindetasche

Um zu prüfen, ob die Bindung des SECIS-Elements einen Einfluss auf die Interaktion von SelB mit Guanosin-Nukleotiden ausübt, wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation und Dissoziation von mantdGTP und mantGDP in Gegenwart von sättigenden Konzentrationen an *fdnG*-HNS bestimmt. Die in Tabelle 13 gezeigten Ergebnisse lassen keine Interaktion zwischen den Bindestellen der beiden Liganden erkennen.

TABELLE 13. Geschwindigkeitskonstanten der Interaktion von SelB mit mant-Nukleotiden in Gegenwart der *fdnG*-HNS.

Nukleotid	k_{ass} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{dis} (s^{-1})	K_D (μM)
mantdGTP	$1,71 \times 10^5$ ^{a)}	0,091 ^{b)}	0,53
mantGDP	$1,60 \times 10^6$ ^{b)}	14,0 ^{b)}	8,75

^{a)} Alle Lösungen enthielten $1,5 \mu M$ 39 nt-*fdnG*-HNS.

^{b)} Alle Lösungen enthielten $3,75 \mu M$ 39 nt-*fdnG*-HNS.

Um sicherzustellen, dass umgekehrt auch die Besetzung der Guanodin-Bindestelle keinen Einfluss auf die Interaktion von SelB mit dem SECIS-Element ausübt, wurde die Kinetik der Assoziation und Dissoziation der markierten *fdhF*-Minihelix in Gegenwart von Guanodin-Nukleotiden analysiert. Die Resultate (Tabelle 14) bestätigen jedoch die Unabhängigkeit der beiden Liganden-Bindestellen voneinander.

TABELLE 14. Geschwindigkeitskonstanten der Interaktion von SelB mit der fluoresceinmarkierten *fdhF*-Minihelix in Gegenwart von Guanodin-Nukleotiden.

Nukleotid	k_{ass} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{dis} (s^{-1})	K_D (nM)
-	$2,23 \times 10^8$ ^{a)}	0,28 ^{a)}	1,26
GDP ^{b)}	$2,36 \times 10^8$	0,28	1,19
GTP ^{c)}	$2,23 \times 10^8$	0,27	1,21

^{a)} Geschwindigkeitskonstante aus dem in Abbildung 42 dargestellten Experiment

^{b)} Alle Lösungen enthielten $250 \mu M$ GDP.

^{c)} Alle Lösungen enthielten $50 \mu M$ GTP.

Interaktion zwischen der SECIS- und der tRNA^{Sec}-Bindetasche

Da die Bindung von Sec-tRNA^{Sec} zu keiner als Signal verwertbaren Veränderung der intrinsischen Fluoreszenz von SelB führte und kein fluoreszenzmarkiertes Derivat der tRNA verfügbar war, konnte eine detaillierte Analyse der Interaktion mit Hilfe von Fluoreszenz-Titration oder der Stopped-Flow-Methode nicht durchgeführt werden. Die Komplexbildung von Sec-tRNA^{Sec} führte aber zu einer deutlichen Beeinflussung der Kinetik der Interaktion von SelB mit der markierten *fdhF*-Minihelix. Wurde deren Verdrängung durch einen hohen Überschuss an nicht markierter *fdhF*-Minihelix verfolgt, so zeigte sich, dass sich die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation in Gegenwart von GTP und beladener tRNA auf ca. 15 % ($0,043 s^{-1}$) verringerte (Abbildung 45A). Eine entsprechende Untersuchung der Assoziationsreaktion war auf Grund von störenden Einflüssen der tRNA nicht möglich.

Um Aufschluss über die Hintergründe für dieses Verhalten von SelB zu erhalten, wurde im folgenden die Interaktion von SECIS-RNA mit der mRNA-Bindedomäne SelB₄₇₂₋₆₁₄ unter Verwendung der Stopped-Flow-Methode näher untersucht. Die Assoziation von markierter *fdhF*-Minihelix mit SelB₄₇₂₋₆₁₄ ergab Transienten mit einfach exponentiellem Verlauf. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zeigte eine lineare Abhängigkeit von der SelB-Konzentration, aus der sich für k_{ass} ein Wert von $2,58 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ableiten ließ (Daten nicht gezeigt). Dieser ist annähernd identisch mit dem für das Wildtyp-Protein ermittelten Wert von $2,23 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (s. Abbildung 42).

Das Dissoziationsverhalten von SelB₄₇₂₋₆₁₄ zeigte aber, wie sich in einem Verdrängungsexperiment herausstellte, deutliche Unterschiede zu dem des Wildtyp-Proteins. Eine Auswertung der erhaltenen Transienten (Abbildung 45B) ergab für k_{dis} einen Wert von $0,037 \text{ s}^{-1}$, der mit dem Ergebnis, das für die Verdrängung der markierten *fdhF*-Minihelix von SelB in Gegenwart von Sec-tRNA^{Sec} erhalten wurde, im Rahmen der Messgenauigkeit übereinstimmt. Die resultierende Gleichgewichtskonstante für das isolierte SelB-Fragment ($K_D = 0,14 \text{ nM}$) liegt somit deutlich unter der des Volllängen-Proteins ($K_D = 1,26 \text{ nM}$).

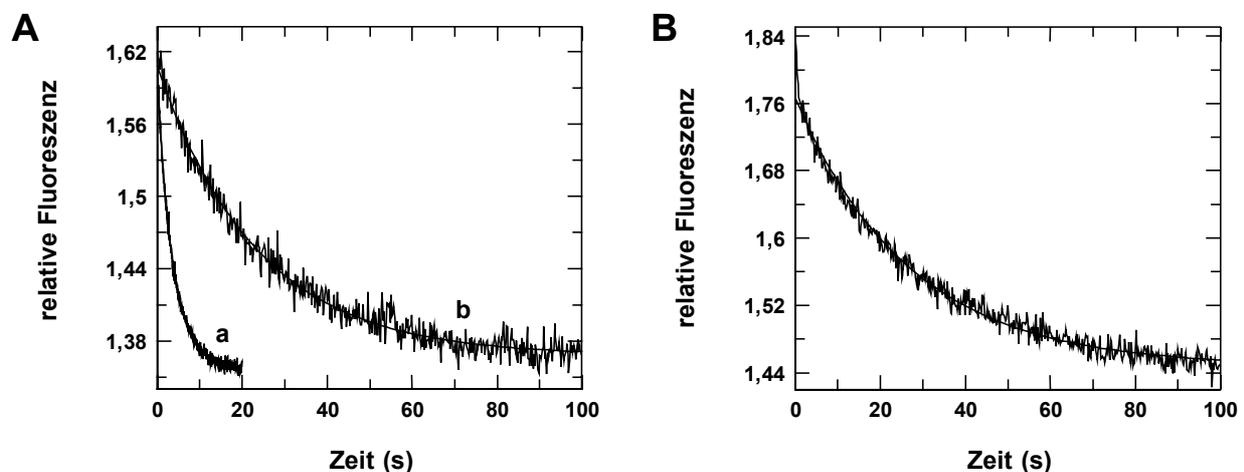


Abbildung 45. Dissoziation der fluoreszenzmarkierten *fdhF*-Minihelix. (A) Verdrängung der markierten *fdhF*-Minihelix von SelB. Kurve a zeigt die Transiente, die nach Mischen eines Komplexes aus SelB ($0,25 \mu\text{M}$) und der markierten Minihelix ($0,14 \mu\text{M}$) in der einen Spritze des Stopped-Flow-Apparats mit einer Lösung von $15 \mu\text{M}$ unmarkierter 17 nt-*fdhF*-Minihelix, die sich in der anderen Spritze befand, aufgezeichnet wurde. Kurve b wurde bei Mischen eines Komplexes aus SelB ($0,25 \mu\text{M}$) und der markierten *fdhF*-Minihelix ($0,21 \mu\text{M}$) in der einen Spritze mit einer Lösung von $15 \mu\text{M}$ unmarkierter 17 nt-*fdhF*-Minihelix in der anderen Spritze in Gegenwart von zusätzlich $4 \mu\text{M}$ GTP und $2,5 \mu\text{M}$ Sec-tRNA^{Sec} in jeder Spritze erhalten. Der Verlauf der Fluoreszenzänderung lässt sich in beiden Fällen durch einfach exponentielle Funktionen (Gleichung 1) mit Geschwindigkeitskonstanten von $0,28 \text{ s}^{-1}$ (Kurve a) und $0,043 \text{ s}^{-1}$ (Kurve b) beschreiben. (B) Verdrängung der markierten *fdhF*-Minihelix von SelB₄₇₂₋₆₁₄. Die Kurve repräsentiert den Verlauf der Fluoreszenzänderung nach Mischen eines Komplexes aus SelB₄₇₂₋₆₁₄ ($0,31 \mu\text{M}$) und der markierten *fdhF*-Minihelix ($0,14 \mu\text{M}$) mit $15 \mu\text{M}$ nicht markierter *fdhF*-Minihelix. Die Transiente kann durch eine einfach exponentielle Funktion mit $k = 0,037 \text{ s}^{-1}$ beschrieben werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die Affinität der mRNA-Bindedomäne für das SECIS-Element im intakten SelB-Molekül in Abwesenheit von gebundener tRNA durch Kontakte mit anderen Regionen des Proteins verringert. Die Bindung von Sec-tRNA^{Sec} führt dann zur Freisetzung von Domäne 4b, die in der Folge ein Liganden-Bindungsverhalten wie isoliertes SelB₄₇₂₋₆₁₄ aufweist. Da Domäne 4a nach Mutationsanalysen ein regulatorischer Einfluss auf das SECIS-Bindevverhalten von SelB zugeschrieben worden war (Kromayer *et al.*, 1999), wurde im folgenden in einem Gelretardations-Experiment untersucht, ob deren Interaktion mit Domäne 4b für die postulierte Destabilisierung der Ligandenbindung verantwortlich ist (Abbildung 46). Es zeigte sich, dass das mRNA-Bindevverhalten von gereinigtem SelB₃₇₉₋₆₁₄, welches einen Großteil der kompletten Domäne 4 umfasst, mit dem des Volllängenproteins identisch war, während die isolierte Domäne 4b eine deutlich höhere apparente Affinität für das SECIS-Element aufwies. Diese Beobachtung spricht deutlich für eine direkte, regulatorische Interaktion zwischen beiden Subdomänen.

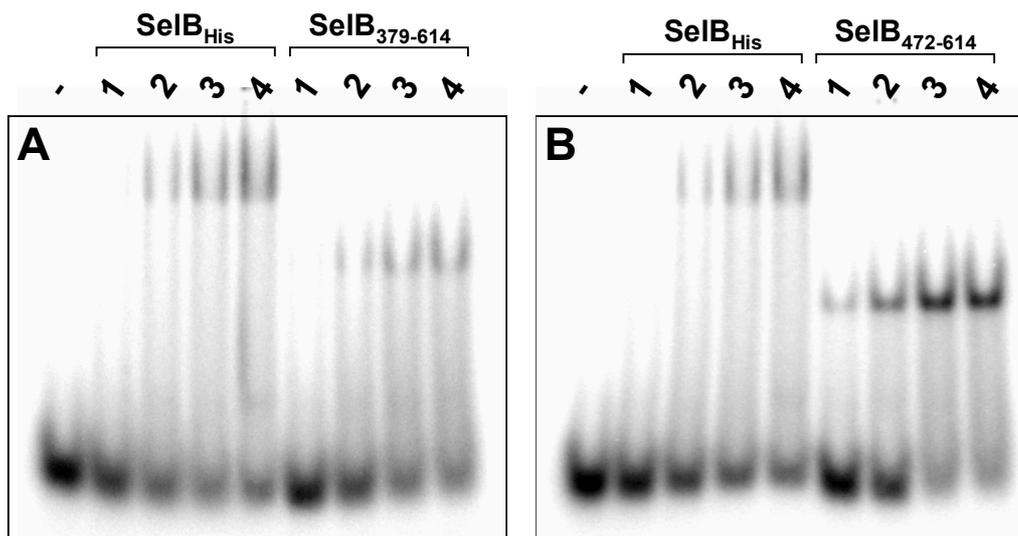


Abbildung 46. Vergleich der Interaktion von SelB, SelB₃₇₉₋₆₁₄ und SelB₄₇₂₋₆₁₄ mit der *fdnG*-HNS. Die 39 nt-*fdnG*-HNS wurde mit steigenden Mengen des jeweiligen Proteins inkubiert. Gebildete Komplexe wurden anschließend in einem nicht-denaturierenden 8 %-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Exposition auf einem Phosphor-Screen detektiert.

Interaktion zwischen der Nukleotid- und der tRNA^{Sec}-Bindetasche

Es wurde gezeigt, dass EF-Tu·GDP für Aminoacyl-tRNA eine Dissoziationskonstante aufweist, die im Bereich von 0,14 - 28,5 μ M und somit um mehrere Größenordnungen über dem für EF-Tu·GTP bestimmten Wert liegt (Pingoud *et al.*, 1982; Dell *et al.*, 1990).

Um den Einfluss des komplexierten Nukleotids auf die Interaktion von SelB mit Sec-tRNA^{Sec} zu untersuchen, wurden Hydrolyseschutz-Experimente durchgeführt. Diese ergaben, dass die Esterbindung in Abwesenheit von Guanosin-Nukleotiden oder in Gegenwart von GDP durch SelB weitgehend in gleichem Ausmaß geschützt wurde wie in Gegenwart von GTP (Abbildung 47). Die Bindung von Sec-tRNA^{Sec} scheint daher selbst in Abwesenheit von GTP mit hoher Affinität zu erfolgen.

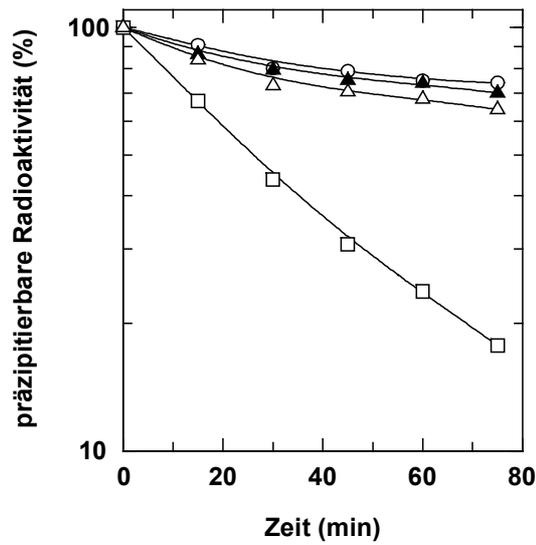


Abbildung 47. Abhängigkeit der Schutzes von Sec-tRNA^{Sec} durch SelB vor alkalischer Hydrolyse von der Art des gebundenen Nukleotids. 1 μ M SelB wurde mit 1 mM GTP (○), 1 mM GDP (▲) und ohne Nukleotid (△) für 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 0,17 μ M [¹⁴C]-Sec-tRNA^{Sec} gestartet. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, aus denen die Menge an noch nicht hydrolysiertes [¹⁴C]-Sec-tRNA^{Sec} durch Präzipitation mittels TCA bestimmt wurde. Als Kontrolle diente BSA (□), das ohne Nukleotide vorinkubiert und dann in die Reaktion eingesetzt wurde.

Die Analyse der Interaktion von SelB mit Guanosin-Nukleotiden, Selenocystein-tRNA^{Sec} und dem SECIS-Element deutet auf eine komplexe Architektur des Proteins hin, die durch das Zusammenspiel der drei Liganden-Bindetaschen eine gerichtete Bildung des quaternären Komplexes ermöglicht. Durch eine Integration der Information über einzelne Bindungsereignisse wird dabei sichergestellt, dass nur bei gleichzeitiger Komplexierung aller für die biologische Aktivität nötiger Komponenten eine Konformation angenommen wird, die eine maximale Affinität zur mRNA und eine Interaktion mit dem Ribosom zulässt. Dieser Mechanismus spielt, wie im Folgenden gezeigt wurde, nicht nur eine wichtige Rolle für die Zuverlässigkeit der kotranslationellen Selenocystein-Inkorporation, sondern auch für die Regulation des Selenmetabolismus in *E. coli*.

4. Regulation der Selenocystein-Biosynthese

Zu Beginn dieser Arbeit existierte kaum Information über den Einfluss bestimmter Wachstumsbedingungen auf die Expression der im Selenmetabolismus involvierten Gene von Bakterien. Soweit vorhanden beschränkten sich die Untersuchungen meist auf die Analyse der Regulation durch aerobe und anaerobe Bedingungen. Dabei wurde festgestellt, dass in *E. coli* die Transkripte der *sel*-Gene unabhängig von der Verfügbarkeit von Sauerstoff in konstanter Menge in den Zellen vorlagen (Sawers *et al.*, 1991). Dasselbe Ergebnis wurde für die intrazelluläre Konzentration von SelB erhalten (Forchhammer *et al.*, 1990). Da das vollständige Fehlen eines regulatorischen Systems für die Komponenten des Selenocystein inserierenden Apparats unwahrscheinlich war, wurde die Expression der *sel*-Gene im folgenden einer detaillierteren Analyse unterzogen.

Organisation des *selAB*-Transkripts

Die Gene für Selenocystein Synthase (*selA*) und den Translationsfaktor SelB (*selB*) bilden in *E. coli* eine bicistronische Transkriptionseinheit und ihre Leserahmen überlappen um vier Basenpaare (Abbildung 48A). Vorausgegangene Arbeiten hatten gezeigt, dass die Transkription des *selAB*-Operons auf sehr niedrigem Niveau erfolgt und bei Position -48 relativ zum Startkodon des *selA*-Gens beginnt (Sawers *et al.*, 1991). Eine Untersuchung der 5'-untranslatierten Region auf regulatorische Motive führte zur Entdeckung einer möglichen mRNA-Sekundärstruktur, die eine überraschend große Ähnlichkeit mit dem SECIS-Element aufwies (Abbildung 48B). Ihre freie Energie wurde unter Verwendung des Programms mfold 3.1 auf -10,6 kcal/mol bei 37 °C bestimmt. Da sie nicht im Leserahmen eines Gens lokalisiert war, wurde sie als SECIS-ähnliches Element (SL-Element) bezeichnet. Die mutmaßliche Binderegion des SL-Elements besaß alle Merkmale eines typischen SECIS-Elements (Heider *et al.*, 1992; Hüttenhofer *et al.*, 1996b; Liu *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000). So wird die apikale Helix am basalen Ende von zwei G-C/C-G Watson-Crick-Basenpaaren und einem vorausgehenden A-U/U-A Basenpaar und am distalen Ende von einem C-G Basenpaar abgeschlossen und weist einen ungepaarten Uridin-Rest an einer zur Position +17 des SECIS-Elements äquivalenten Position auf. Die Loop-Region enthält zudem das GU Duplett, das vermutlich als wichtige Determinante für die Interaktion mit SelB fungiert (Abbildung 48C). Das SL-Element befindet sich unmittelbar am 5'-Ende der mRNA und schließt die Shine-Dalgarno nicht mit ein (s. Abbildung 48B).

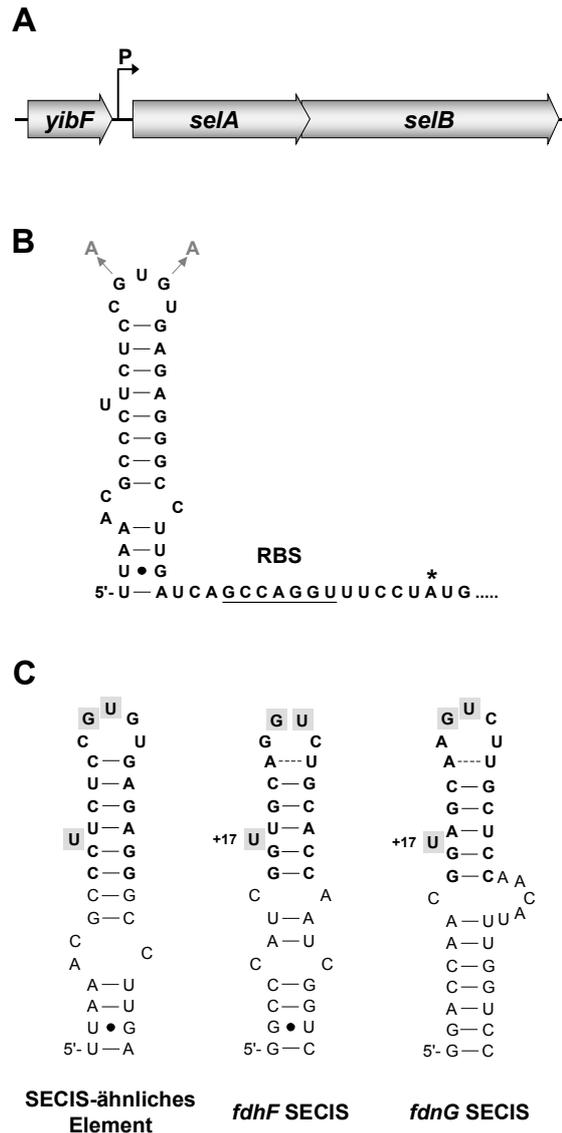


Abbildung 48. Lokalisation und Eigenschaften des SECIS-ähnlichen Elements. (A) Organisation des *selAB*-Operons. (B) Faltung der Haarnadel-Struktur am 5'-Ende der *selAB*-mRNA. Die Sekundärstruktur wurde mit Hilfe des Programms mfold 3.1 berechnet. Der Transkriptionsstart (Sawers *et al.*, 1991), das Shine-Dalgarno-Motiv (RBS), das Startkodon von *selA* und die Basenaustausche, die in das SL-Element eingeführt wurden, sind in der Sequenz gekennzeichnet. (C) Vergleich des SL-Elements mit den SECIS-Elementen der *fdhF* und *fdnG* mRNA. Die minimalen Binderegionen sind in Dickdruck dargestellt. Basen, die vermutlich direkt Kontakt mit der mRNA-Bindetasche von SelB aufnehmen (Hüttenhofer *et al.*, 1996b), sind grau hinterlegt. Der ungepaarte Uridin-Rest an Position +17 relativ zum Selenocystein kodierenden UGA-Kodon ist gekennzeichnet.

Interaktion von SelB mit dem SECIS-ähnlichen Element

Die große Ähnlichkeit des SL-Elements mit dem SECIS-Element legte eine Untersuchung der Interaktion von SelB mit dieser Struktur nahe. Zu diesem Zweck wurde mittels *in vitro*-Transkription ein RNA-Oligonukleotid präpariert, das die komplette in Abbildung 48B dargestellte Haarnadelstruktur umfasst, und nach 5'-Markierung in Gelretardations-Experimente eingesetzt. Abbildung 49A zeigt, dass trotz der Gegenwart eines großen Überschusses an

unspezifischer Kompetitor-tRNA schon bei einem 5-fachen molaren Überschuss von SelB über das Transkript ein langsam migrierender Komplex zu beobachten war. Das Signal wurde durch Zugabe von zusätzlicher kompetitierender tRNA nicht verändert, verschwand jedoch nach Hinzufügen einer identischen Menge an *fdhF*-HNS vollständig. Dieses Verhalten spricht für eine spezifische Interaktion mit dem SL-Element, die über die SECIS-Bindetasche von SelB vermittelt wird.

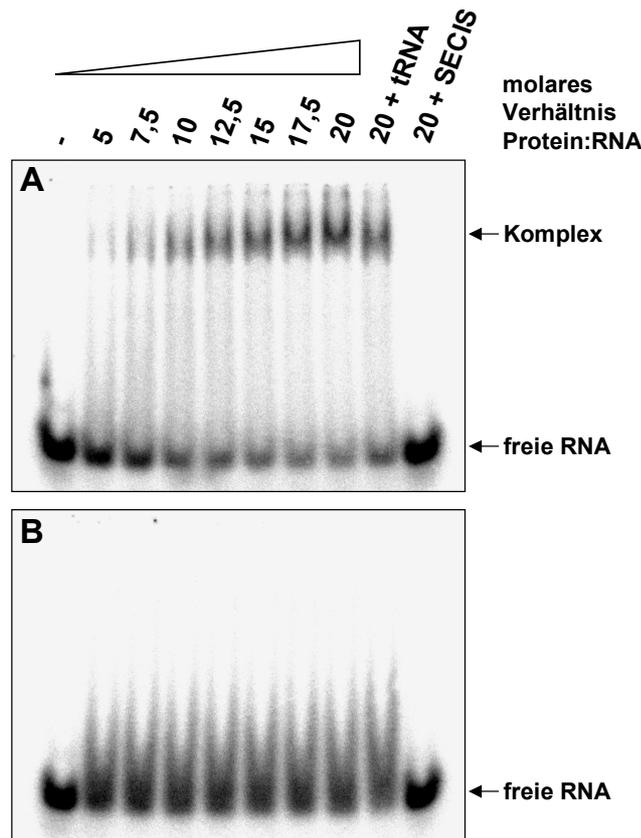


Abbildung 49. Interaktion des SECIS-ähnlichen Elements mit SelB (A) und SelB₄₇₂₋₆₁₄ (B). 80 nM ³²P-markiertes SL-Element wurden mit steigenden Mengen an Protein in Gegenwart von 3,6 μM Hefe-tRNA inkubiert. In den letzten beiden Spuren wurden zu den Ansätzen zusätzlich 3,6 μM unspezifische (Hefe-tRNA) bzw. spezifische (32 nt-*fdhF*-HNS) Kompetitor-RNA gegeben. Nach Separation der Gemische in einem nicht denaturierenden 6 %-Polyacrylamidgel wurden freies Transkript und die gebildeten Komplexe durch Exposition auf einem Phosphor-Screen detektiert.

Die vorausgegangenen Experimente hatten gezeigt, dass die isolierte mRNA-Bindedomäne von SelB eine höhere Affinität für das SECIS-Element aufweist als das Volllängenprotein. Um zu untersuchen, ob für die Bindung des SL-Elements dieselben Resultate erhalten werden, wurde in einem Gelretardations-Experiment die Interaktion von SelB₄₇₂₋₆₁₄ mit dem SL-Element analysiert (Abbildung 49B). Überraschenderweise konnte selbst bei hohen molaren Überschüssen an Protein keine Bildung eines stabilen Komplexes detektiert werden. Das Schmieren des

markierten Transkripts, das mit zunehmender Menge an SelB₄₇₂₋₆₁₄ zunahm und nach Zugabe von spezifischer Kompetitor-RNA nicht mehr auftrat, kann aber als Beweis für eine schwache Interaktion angesehen werden. Wurde dasselbe Experiment mit isoliertem SelB₃₇₉₋₆₁₄, das einen Großteil der kompletten Domäne 4 umfasst, wiederholt, so waren keine Anzeichen für eine Interaktion mit dem SL-Element mehr erkennbar, obwohl dieses Protein stabile Komplexe mit SECIS-Elementen ausbilden kann (vgl. Abbildung 46). Das Verhalten des SL-Elements erinnert somit an das Bindevverhalten bestimmter Aptamere, die von Klug *et al.* (1997) *in vitro* selektiert worden waren. Diese banden zwar mit hoher Affinität an Wildtyp-SelB, zeigten aber keine Interaktion mit SelB₄₇₂₋₆₁₄.

Wurde die Bindung des SL-Elements an SelB in Gegenwart von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} und GTP untersucht (Abbildung 50), so zeigte sich, dass bereits bei einem 2,5-fachem molaren Überschuss an Protein ein signifikanter Anteil des markierten Transkripts in einem Komplex gebunden vorlag, dessen Mobilität im Vergleich zum binären Komplex deutlich erhöht war. Diese Beobachtung lässt auf eine starke Zunahme der Affinität von SelB für das SL-Element schließen und erinnert an das Bindevverhalten des *fdhF* SECIS-Elements, dessen Komplex mit SelB ebenfalls durch gleichzeitige Assoziation von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} stabilisiert und in eine schneller migrierende Form überführt wird (Baron *et al.*, 1993a).

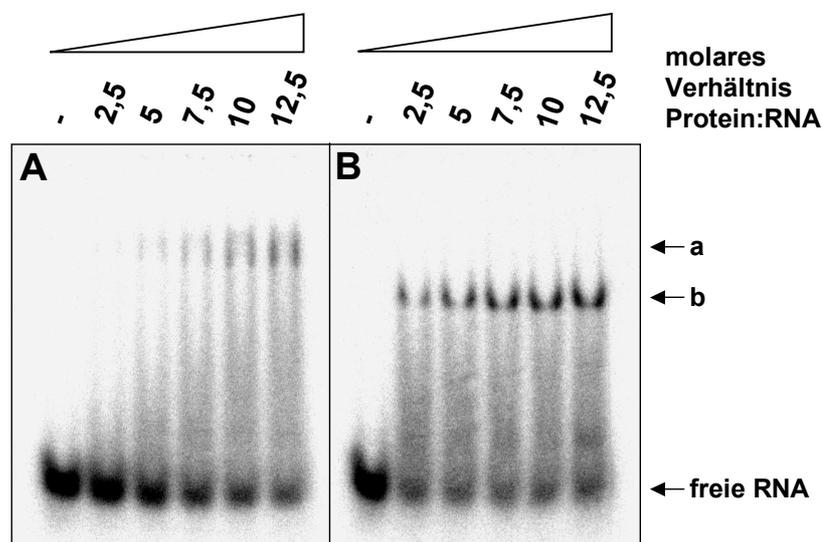


Abbildung 50. Effekt von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} auf die Komplexbildung zwischen SelB und dem SECIS-ähnlichen Element. 80 nM ³²P-markiertes SL-Element wurden in Gegenwart von 3,6 µM Hefe-tRNA mit zunehmenden Mengen an SelB inkubiert (A). Um den Einfluss von Sec-tRNA^{Sec} zu untersuchen, wurden die Ansätze zusätzlich mit 1,0 µM Sec-tRNA^{Sec} und 100 µM GTP supplementiert (B). Die gebildeten Komplexe wurden durch Elektrophorese in einem nicht-denaturierenden 6 %-Polyacrylamidgel von nicht gebundenen Transkripten getrennt, wobei in beiden Fällen 100 µM GTP zum Gel- und Elektrophoresepuffer gegeben wurde. Die Detektion erfolgte anschließend unter Verwendung eines PhosphorImagers. Die Positionen der ternären (a) und quaternären (b) Komplexe sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Um die Spezifität der Bindung des SL-Elements an SelB zu testen wurden zwei Mutationen in die Loop-Region eingeführt (vgl. Abbildung 48B), von denen eine das funktionell vermutlich bedeutsame GU Duplett betraf. Aus früheren Experimenten war nämlich bekannt, dass der Austausch von Basen im terminalen, ungepaarten Bereich des SECIS-Elements mit der Bindung von SelB und somit mit dessen Funktion im Dekodierungsprozess interferiert (Heider *et al.*, 1992; M. Kromayer, unveröffentlicht). Abbildung 51 zeigt, dass auch das mutierte SL-Element nicht mehr mit SelB interagieren kann.

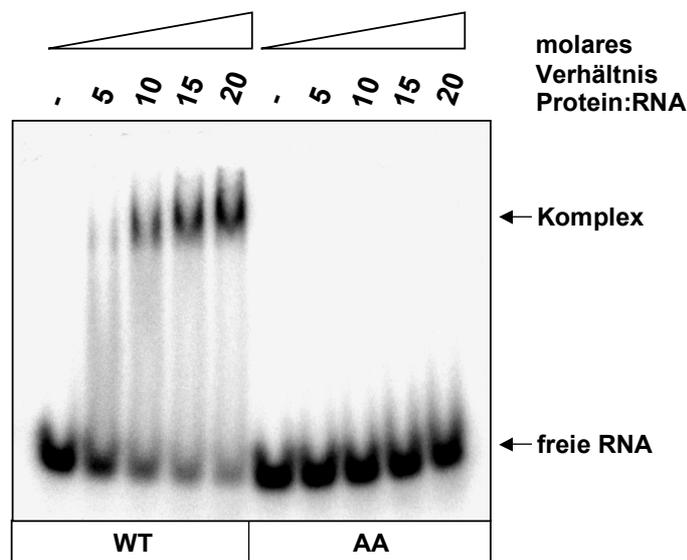


Abbildung 51. Spezifität der Interaktion zwischen SelB und dem SECIS-ähnlichen Element. 80 nM ³²P-markiertes Wildtyp- (WT) bzw. mutiertes (AA) SL-Element wurden in Gegenwart von 3,6 μM Hefe-tRNA mit steigenden Mengen an SelB inkubiert. Die gebildeten Komplexe wurden von freiem Transkript durch Elektrophorese in einem nicht denaturierenden 6 %-Polyacrylamidgel abgetrennt. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines PhosphorImagers.

Um qualitative Informationen über die Größenordnung der Affinität der Interaktion von SelB mit dem SL-Element zu erhalten, wurden gefaltete Transkripte von diesem parallel zur *fdnG*-HNS mit zunehmenden Konzentrationen an SelB titriert. Die Analyse der Komplexbildung mittels Gelretardation zeigte, dass das SL-Element eine ungefähr 3- bis 4-fach geringere Affinität zu seinem Bindungspartner aufweist (Abbildung 52). Da der K_D -Wert für die Interaktion von SelB mit der *fdnG*-HNS auf 1,4 nM bestimmt worden war, liegt der entsprechende Wert für das SL-Element im Bereich von ungefähr 10 nM.

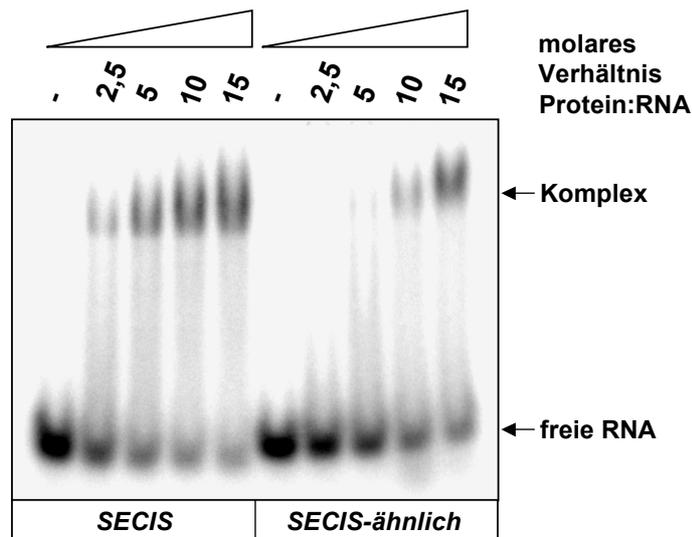


Abbildung 52. Affinität des SECIS-ähnlichen Elements für SelB. 80 nM ^{32}P -markiertes SL-Element oder 39 nt-*fdnG*-HNS wurden in Gegenwart von 3,6 μM Hefe-tRNA mit steigenden Mengen an SelB inkubiert. Die Separation der im Ansatz enthaltenen Komponenten erfolgte durch Elektrophorese in einem nicht denaturierenden 6 %-Polyacrylamidgel. Die Detektion von Radioaktivität erfolgte durch Exponieren des Gels auf einem Phosphor-Screen.

Regulation der Expression von *sel*-Genen

Die Charakterisierung des SECIS-ähnlichen Elements zeigte deutlich, dass dieses sowohl einen binären Komplex mit SelB alleine als auch einen quaternären Komplex mit SelB, Selenocysteyl-tRNA^{Sec} und GTP bilden kann, wobei dieser eine deutlich höhere Stabilität aufweist. Diese Eigenschaften gaben Anlass zu der Vermutung, dass die Bildung eines quaternären Komplexes auf der SECIS-ähnlichen Struktur einen Einfluss auf die Translation der *selAB* mRNA haben könnte.

Konstruktion von Stämmen mit Deletionen in *sel*-Genen

Um dieser Annahme nachzugehen, war es nötig, Stämme zu konstruieren, die in einem ansonsten identischen genetischen Hintergrund in-frame-Deletionen in verschiedenen *sel*-Genen besaßen.

Die Deletion der Basen 490 – 936 von *selA* erfolgte durch inverse PCR unter Verwendung der Oligonukleotide DSA-1 und DSA-2 und des Plasmids pWL187 als Matrize. Nach Religation des PCR-Produkts wurde das mutierte *selA*-Gen durch Restriktion des resultierenden Plasmids pT Δ selA mit *Bam*HI und *Sal*I isoliert und in den mit denselben Enzymen vorbehandelten Vektor pKO3 ligiert. Das daraus hervorgehende Plasmid wurde pK Δ selA genannt.

Um die Basen 145 – 1785 von *selB* zu deletieren, wurde ein 5'-Fragment des Gens mittels PCR mit den Oligonukleotiden DSB-1 und DSB-2 und dem Plasmid pWL107 als Matrize amplifiziert,

wobei gleichzeitig eine *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Mlu*I-Schnittstelle am 3'-Ende des Produkts eingeführt wurde. Ein Fragment, das die 3'-Region des Gens umfasste, wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden DSB-3 und DSB-4 unter Verwendung des Plasmids pWL194 als Matrize generiert. Dieses wurde mit *Mlu*I und *Sal*I geschnitten, mit dem mit *Bam*HI und *Mlu*I hydrolysierten 5'-Fragment von *selB* kombiniert und in den Vektor pKO3, der zuvor mit *Bam*HI und *Sal*I behandelt worden war, ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als pKΔ*selB* bezeichnet. Zur Deletion der Basen 5 – 92 von *selC* wurde ein Fragment, das unmittelbar stromaufwärts vom Leserahmen des Gens lokalisiert ist, mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide DSC-1 und DSC-2 und chromosomaler DNA des Stamms MC4100 als Matrize amplifiziert, wobei gleichzeitig eine *Bam*HI-Schnittstelle am 3'-Ende des Produkts eingeführt wurde. Die unmittelbar stromabwärts von *selC* liegende chromosomale Region wurde in gleicher Weise mit Hilfe der Oligonukleotide DSC-3 und DSC-4 präpariert. Dabei wurde gleichzeitig eine *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Eco*RI-Schnittstelle am 3'-Ende des Produkts erzeugt. Das 5'-Fragment wurde durch Restriktion mit *Pae*I verkürzt, mit Klenow-Polymerase behandelt und mit *Bam*HI geschnitten. Anschließend wurde es mit dem mit *Bam*HI und *Eco*RI behandelten 3'-Fragment kombiniert und in den mit *Sma*I und *Bam*HI geschnittenen Vektor pKO3 ligiert, woraus das Plasmid pKΔ*selC* entstand.

Nach Transformation des Stamms PT90422 mit den konstruierten pKO3-Derivaten wurden die Mutationen mittels homologer Rekombination nach der Methode von Link *et al.* (1997) auf das Chromosom übertragen.

Regulation der Expression von *selA*, *selB* und *selD*

Um die Auswirkung der Ausbildung eines quaternären Komplexes auf dem SECIS-ähnlichen Element auf die Expression von *selA* und *selB* zu untersuchen, wurde die Menge an *sel*-Genprodukten in verschiedenen isogenen Stämmen, die Mutationen in einem oder zwei der *sel*-Gene besaßen, bestimmt. Die Ergebnisse von Immunoblot-Analysen (Abbildung 53) zeigten, dass die Synthese des *selA*-Genprodukts in allen genetischen Hintergründen, die eine Bildung von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} und die gleichzeitige Produktion von SelB erlauben, stark reduziert war. Mutationen in den Genen *selA*, *selB*, *selC* und *selD* führten dagegen zu einer deutlichen Stimulation der *selA*-Expression.

Dasselbe Regulationsmuster wurde für das *selB*-Genprodukt erhalten, aber der Effekt war schwächer ausgeprägt. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen früherer Arbeiten überein, die demonstrierten, dass *selB* eine eigene interne Ribosomen-Bindungsstelle besitzt, die zu einer wenigstens partiellen Entkopplung der Translation von *selA* und *selB* führt und die

eigenständige Expression von *selB* bei Transkription unter Kontrolle des T7 Φ 10-Promotors erlaubt (Forchhammer *et al.*, 1990).

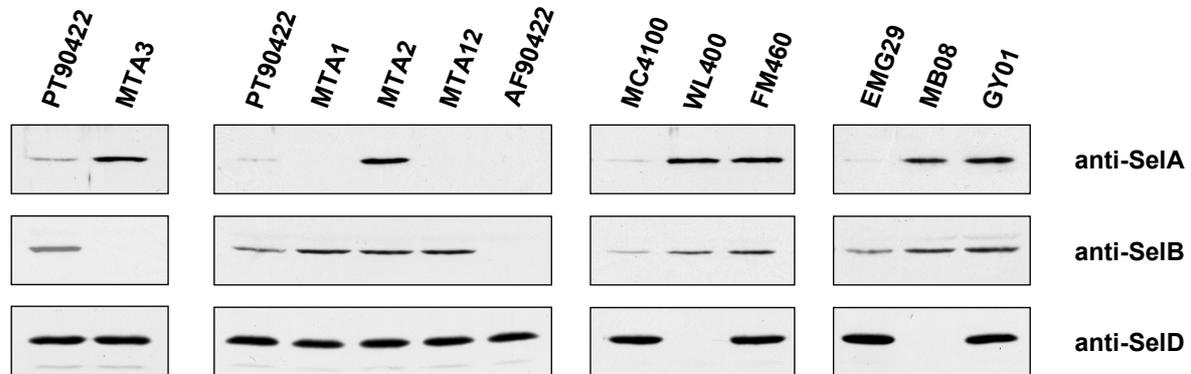


Abbildung 53. Immunoblot-Analyse der intrazellulären Konzentration von SelA, SelB und SelD. Derivate der Stämme PT90422, MC4100 und EMG29, die Deletionen oder Punktmutationen in *sel*-Genen besaßen, wurden in TP2-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 angezogen, geerntet und in SDS-Auftragspuffer lysiert. Die Proteine wurden durch Elektrophorese in einem 10 %-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mittels Immunoblot detektiert. Der Stamm GY01 produziert ein stabiles, aber inaktives *selA*-Genprodukt, während in allen anderen Stämmen die Produkte der mutierten Gene nicht detektierbar sind.

Regulatorische Funktion des SECIS-ähnlichen Elements

Die vorausgegangenen Immunoblot-Analysen gaben einen deutlichen Hinweis auf eine Involvierung des SECIS-ähnlichen Elements in die Regulation der *selAB*-Expression. Im folgenden wurde daher versucht, die regulatorische Funktion der mRNA-Struktur zu bestätigen und Hinweise auf den zu Grunde liegenden Mechanismus zu erhalten.

Konstruktion von Reporter-gen-Fusionen

Da Immunoblot-Studien nur Information über das relative Niveau der intrazellulären Proteinmenge unter Gleichgewichtsbedingungen liefern und die unterschiedlichen Beiträge von Neusynthese und Abbau der kodierenden mRNA bzw. der resultierenden Genprodukte nicht auflösen, wurde die Analyse des SECIS-ähnlichen Elements auf die Verwendung von Reporter-gen-Fusionen ausgeweitet.

Zur Konstruktion einer Translationsfusion von *selA* mit dem *lacZ*-Gen wurde die stromaufwärts des *selA*-Leserahmens liegende Region durch PCR mit den Oligonukleotiden FSAL-1 und FSAL-rev und chromosomaler DNA von *E. coli* KL19 als Matrize amplifiziert, wobei gleichzeitig eine *EcoRI*- und eine *BamHI*-Schnittstelle am 5'- bzw. 3'-Ende des resultierenden Produkts eingeführt wurde. Das Fragment wurde mit den entsprechenden Enzymen geschnitten

und in den ebenso behandelten Vektor pUC19 ligiert, woraus das Plasmid pUSL hervorging. Eine Variante davon mit Austausch in der Sequenz, die für die Loop-Region des SECIS-ähnlichen Elements kodiert (s. Abbildung 48B), wurde durch inverse PCR mit den Oligonukleotiden MSAL-1 und MSAL-2 und pUSL als Matrize sowie Selbstligation des resultierenden Produkts generiert. Die Inserts beider Plasmide wurden durch Restriktion mit *EcoRI* und *MluI* isoliert, mit einem Fragment kombiniert, das durch PCR-Amplifikation der 5'-Region von *selA* mit den Oligonukleotiden FSAL-1 und FSAL-4 sowie Plasmid pWL107 als Matrize und anschließende Restriktion des PCR-Produkts mit *MluI* und *BamHI* erhalten worden war, und in den mit *EcoRI* und *BamHI* behandelten Vektor pRS552 ligiert. Die resultierenden Plasmide, die 298 Basen der stromaufwärts von *selA* liegenden Region und die ersten 50 Kodons des *selA*-Gens im Leserahmen mit *lacZ* fusioniert trugen, wurden als pRL1 und pRL12 bezeichnet.

Zur Konstruktion von entsprechenden transkriptionellen Fusionen wurde die Wildtyp- und die mutierte regulatorische Region von *selA* in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden FSAL-1 und FSAL-7 amplifiziert, wobei gleichzeitig eine *EcoRI*- und eine *BamHI*-Schnittstelle am 5'- bzw. 3'-Ende der resultierenden Produkte eingeführt wurde. Die Fragmente wurden mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* hydrolysiert und anschließend in den auf dieselbe Weise behandelten Vektor pRS551 ligiert, woraus die Plasmide pRC1 und pRC12 hervorgingen.

Um eine Untersuchung der Translation von *selB* zu ermöglichen, wurde ein Reporterkonstrukt, das eine im Leserahmen erfolgte Fusion des *selAB*-Operons mit *lacZ* trug, konstruiert. Das *selA*-Gen enthielt dabei eine in-frame Deletion, die keinen polaren Effekt auf die Expression von *selB* ausübte (Daten nicht gezeigt), um bei späteren Messungen eine Komplementation in einem *ΔselA*-Hintergrund zu verhindern. Ein Fragment des Plasmids pWL184, das die 3'-Region von *selA* und die ersten sechs Kodons von *selB* umfasst, wurde dazu mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide FSB-1 und FSB-3 amplifiziert, wobei an dessen 3'-Ende zusätzlich eine *BamHI*- und eine *PaeI*-Schnittstelle eingeführt wurden. Das PCR-Produkt wurde mit *SchI* und *PaeI* geschnitten, mit einem 1452 bp langen *SchI/SalI*-Fragment des Plasmids pT Δ *selA* kombiniert und in den mit *PaeI* sowie *SalI* behandelten Vektor pUSL ligiert. Das daraus resultierende Plasmid wurde pRL Δ AB genannt.

Um eine korrekte Stöchiometrie von mRNA und regulierenden Faktoren sicher zu stellen, wurden die Reporterkonstrukte anschließend mittels homologer Rekombination in den Phagen λ RS45 integriert und durch Lysogenisierung mit den rekombinanten Phagen (Abbildung 54A) als einzelne Kopien in den *attB*-Locus verschiedener Stämme inseriert.

Einfluss des SECIS-ähnlichen Elements auf die Expression von *selA* und *selB*

Die Rolle des SECIS-ähnlichen Elements in der Regulation der Translation von *selA* wurde durch die Bestimmung von β -Galaktosidase-Aktivitäten in Stämmen, die mit λ RL1 lysogenisiert worden waren, näher beleuchtet (Abbildung 54B). Die gemessenen Werte verdeutlichen, dass die Expression des Reportergens in Wildtyp-Zellen reprimiert ist, während diese in Mutanten mit Defekten, die keine Bildung des quaternären Komplexes mehr erlauben, ungefähr 5-fach stimuliert wird. Das Regulationsmuster stimmt mit den Beobachtungen, die mit Hilfe der Immunoblot-Analysen gemacht worden waren, überein (vgl. Abbildung 53) und es beweist die Abhängigkeit der im Wildtyp beobachteten Repression von der Bindung von SelB·GTP·Selenocysteyl-tRNA^{Sec} an das SECIS-ähnliche Element.

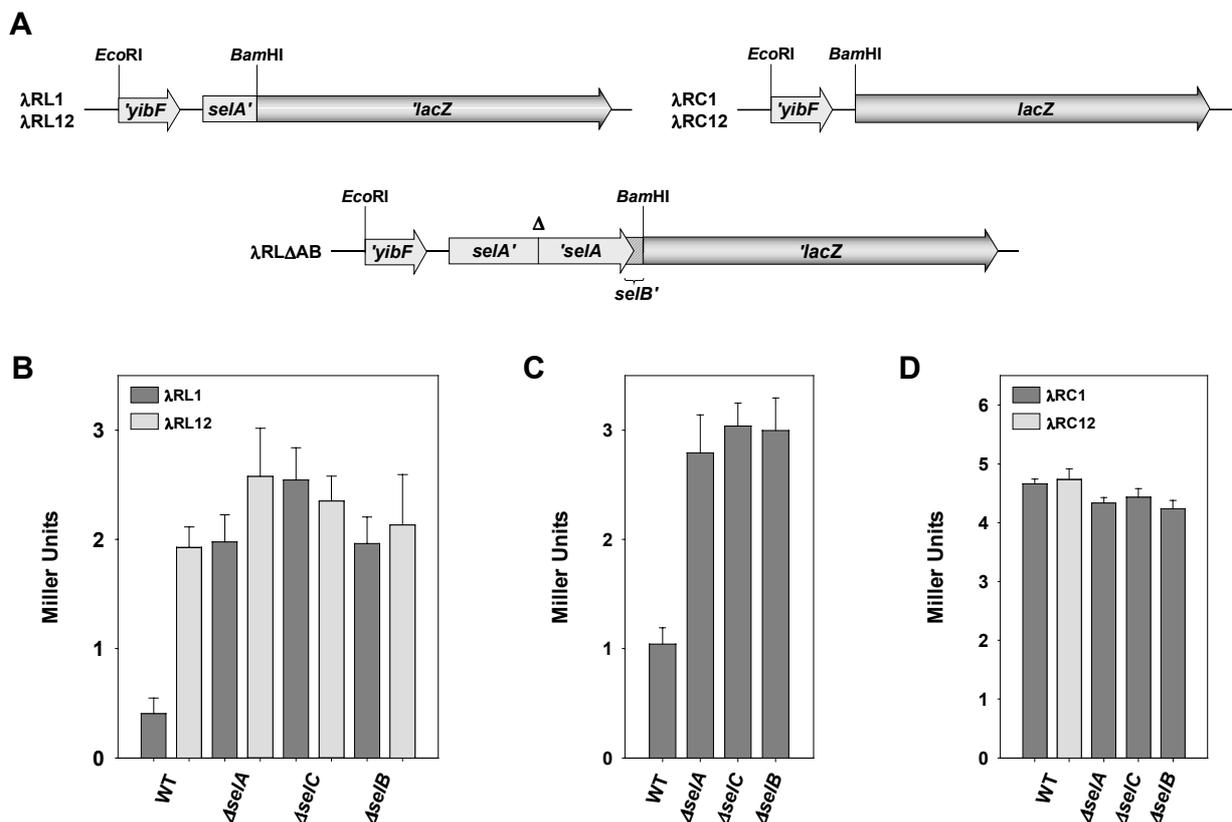


Abbildung 54. Regulatorische Rolle des SECIS-ähnlichen Elements. (A) Reporterkonstrukte, die für die Analyse der regulatorischen Funktion des SL-Elements eingesetzt wurden. Die Restriktions-Schnittstellen, die für die Insertion der jeweiligen Fragmente in die Vektoren pRS551 bzw. pRS552 verwendet wurden, sind angegeben. Die Position der Deletion in *selA* auf dem Reporterkonstrukt, das von λ RL Δ AB getragen wird, ist mit einem Dreieck gekennzeichnet. λ RL12 und λ RC12 kodieren für das mutierte SL-Element, während alle anderen Phagen die Wildtyp-Sequenz besitzen. (B) β -Galaktosidase-Aktivitäten, die für die Stämme PT90422 (WT), MTA1 ($\Delta selA$), MTA2 ($\Delta selC$) und MTA3 ($\Delta selB$) nach Lysogenisierung mit den Phagen λ RL1 und λ RL12 erhalten wurden. (C) β -Galaktosidase-Aktivitäten, die für dieselben Stämme nach Lysogenisierung mit λ RL Δ AB gemessen wurden. (D) β -Galaktosidase-Aktivitäten, die für die Stämme PT90422 (WT), MTA1 ($\Delta selA$), MTA2 ($\Delta selC$) und MTA3 ($\Delta selB$) nach Lysogenisierung mit den Phagen λ RC1 und λ RC12 bestimmt wurden.

Die Bedeutung dieser Interaktion für die Repression der *selA*-Expression wird durch die Tatsache untermauert, dass in Stämmen mit dem Phagen λ RL12, der Mutationen in der Loop-Region des SECIS-ähnlichen Elements trägt, ausschließlich die dereprimierte Menge an β -Galaktosidase ermittelt wurde.

Die Regulation der *selB*-Expression wurde mit Hilfe von Stämmen, die mit λ RL Δ AB lysogenisiert worden waren, analysiert (Abbildung 54C). Auch in diesem Fall war die Synthese von *lacZ* im Wildtyp-Stamm ungefähr 3-fach reprimiert, während in allen Mutanten, die nicht mehr zur Assemblierung des quaternären Komplexes fähig waren, das dereprimierte Niveau an β -Galaktosidase ermittelt wurde. Der regulatorische Effekt war schwächer ausgeprägt als der für *selA* beobachtete, was ebenfalls mit den Daten der Immunoblot-Analysen (vgl. Abbildung 53) korreliert.

Um sicherzustellen, dass die Stimulation der β -Galaktosidase-Synthese, die in Stämmen mit Mutationen in den *sel*-Genen beobachtet worden war, auf einem spezifischen Effekt beruht, der aus dem Fehlen eines für die Ausbildung des regulatorischen Komplexes essentiellen Faktors resultiert, wurden Komplementations-Experimente durchgeführt.

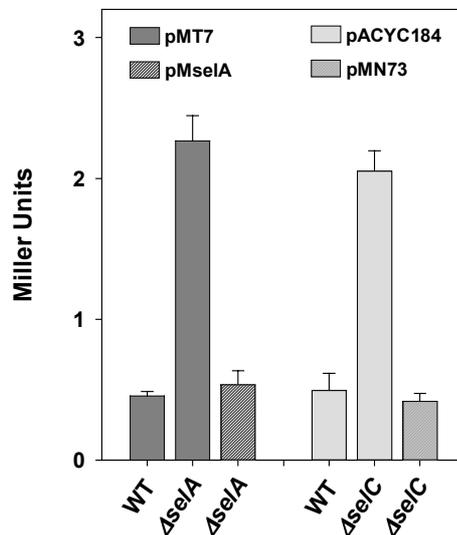


Abbildung 55. Expression der *selA'*-*lacZ*-Fusion in Stämmen mit Mutationen in *sel*-Genen nach Einführen komplementierender Plasmide. Die Stämme PT90422:: λ RL1 (WT), MTA1:: λ RL1 (Δ *selA*) und MTA2:: λ RL1 (Δ *selC*) wurden mit den Kontrollplasmiden pMT7 und pACYC184 oder mit den Plasmiden pMselA und pMN73 transformiert. Transformanten wurden in TP2-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 angezogen und anschließend für die Bestimmung von β -Galaktosidase-Aktivitäten eingesetzt.

Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pMselA, das den *selA*-Leserahmen ohne das SL-Element unter Kontrolle des *tet*-Promotors trägt, konstruiert. Der Vektor pMT7 wurde hierzu mit *SalI*

geschnitten, mit Mungbohnen-Nuklease behandelt, nachfolgend mit *Eco*O109I gespalten und mit einem Fragment ligiert, das durch Restriktion von pWL187 mit *Sma*I und *Eco*O109I erhalten wurde und das komplette *selA*-Gen umfasst. Die Stämme MTA1:: λ RL1 (*ΔselA*) und MTA2:: λ RL1 (*ΔselC*) wurden anschließend entweder mit Kontrollplasmiden oder mit den Plasmiden pMselA bzw. pMN73, die zu einer moderaten Überproduktion von SelA oder tRNA^{Sec} führten, transformiert. Die anschließende Bestimmung von β -Galaktosidase-Aktivitäten zeigte, dass die Einführung komplementierender Allele die *lacZ*-Expression wieder auf das Wildtyp-Niveau reduzierte (Abbildung 55).

Effekt des SECIS-ähnlichen Elements auf die Synthese und Stabilität der *selAB*-mRNA

Es existieren mehrere Mechanismen, die dem beobachteten regulatorischen Einfluss der Quaternärkomplex-Bildung am SECIS-ähnlichen Element zu Grunde liegen könnten, nämlich Transkriptions-Attenuation, die Modulation der mRNA-Stabilität und die Regulation der Translationsinitiation. Die Regulation der Transkription durch Bindung von Proteinen an ihre eigene mRNA hat sich als ein generelles Schema für die Einstellung von Expressionsniveaus herausgestellt (Yanofsky, 2000). Um daher festzustellen, ob das SECIS-ähnliche Element eine Attenuation der Transkription von *selAB* vermitteln kann, wurde die relative β -Galaktosidase-Aktivität in Stämmen untersucht, welche die auf λ RC1 lokalisierte Transkriptionsfusion der upstream-Region von *selA* mit *lacZ* trugen. Es zeigte sich jedoch, dass die Expression des Reportergens unabhängig vom Genotyp der Zellen war (Abbildung 54D). Eine identische β -Galaktosidase-Aktivität wurde gemessen, wenn der Wildtyp-Stamm PT90422 mit λ RC12 an Stelle von λ RC1 lysogenisiert wurde, der für ein Reporterkonstrukt mit einem mutierten SECIS-ähnlichen Element kodiert, das keine Interaktion mit SelB mehr zeigte (vgl. Abbildung 51). Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine regulatorische Funktion des SECIS-ähnlichen Elements auf Ebene der Transkription ausgeschlossen werden.

Im folgenden wurde untersucht, ob die Einbindung des SECIS-ähnlichen Elements in einen quaternären Komplex eine Veränderung der Stabilität der *selAB*-mRNA bewirkt. Für viele mRNAs wurde nämlich gezeigt, dass ihr Abbau durch Sekundärstrukturen an ihrem unmittelbaren 5'-Ende, die mit der initialen endonukleolytischen Spaltung durch RNaseE interferieren, verlangsamt wird (Rauhut und Klug, 1999). Die Bindung von SelB·GTP·Sec-tRNA^{Sec} könnte daher die Konformation des SECIS-ähnlichen Elements oder der angrenzenden Region verändern und so die Degradation der *selAB*-mRNA beschleunigen. Um diese Möglichkeit zu testen wurde die Konzentration der mRNA unter Gleichgewichtsbedingungen

und ihre Halbwertszeit in einem S1-Nukleaseschutz-Experiment unter Verwendung von zwei ^{32}P -markierten Sonden, die mit dem 5'- bzw. 3'-Ende des *selA*-Transkripts hybridisieren (Abbildung 56A), untersucht. Als Grundlage für die Synthese der Sonden diente das Plasmid pUAB, das durch Isolation des *selAB*-Operons und der angrenzenden Regionen aus pWL107 durch Restriktion mit *GsuI* und *AocI*, Glätten der Enden mit Klenow-Polymerase und Ligation des Fragments in die geglättete *Bam*HI-Schnittstelle von pUC19 erzeugt wurde. Die *Eco*O109I-Schnittstelle des Plasmid-Rückgrats war zuvor durch Schneiden von pUC19 mit *Eco*O109I, Glätten der Enden mit Klenow-Polymerase und Religation zerstört worden.

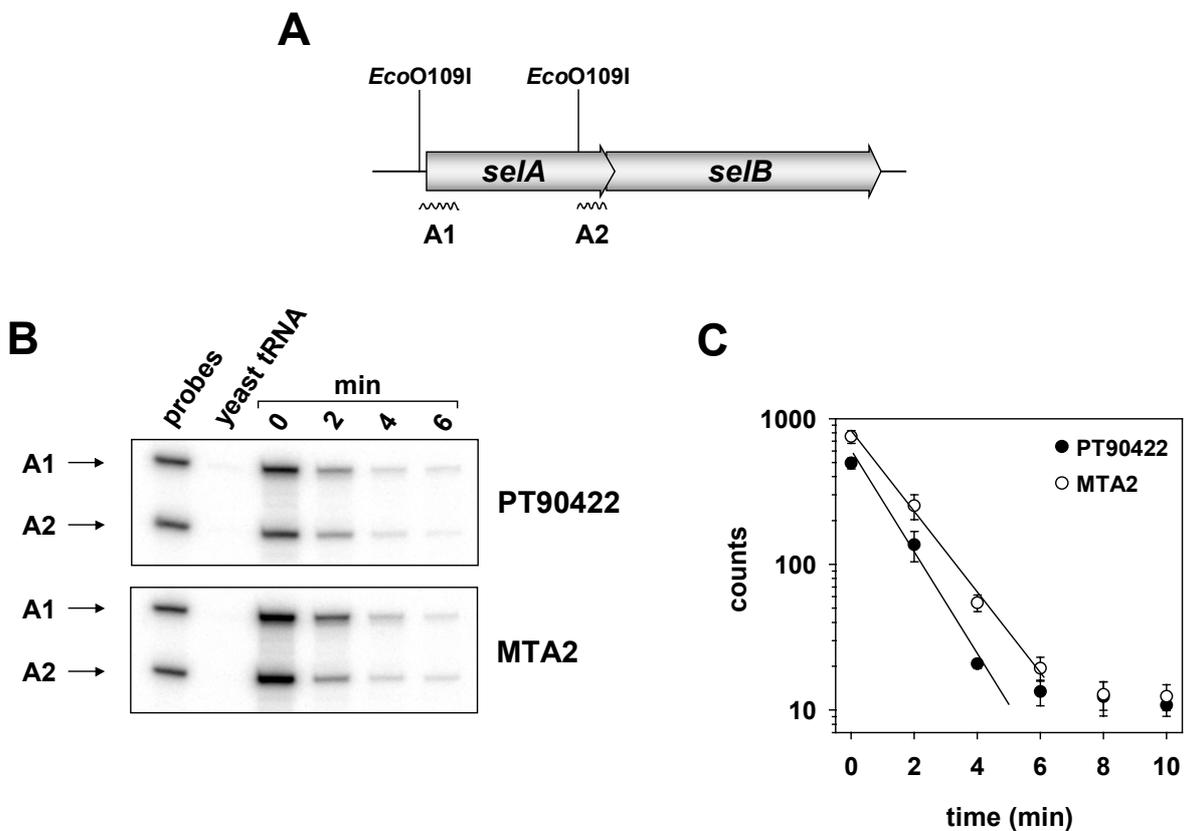


Abbildung 56. Gleichgewichtsniveau und Halbwertszeit der *selAB*-mRNA. (A) Lokalisation der gegen die *selA*-mRNA gerichteten Sonden A1 und A2. Die Restriktions-Schnittstellen, die für die Generierung der Sonden verwendet wurden, sind angegeben. (B) S1-Nukleaseschutz-Experiment. 75 μg Hefe-tRNA oder Gesamt-RNA, die aus Zellen von PT90422 (WT) und MTA2 ($\Delta selC$) isoliert worden war, die unmittelbar vor sowie 2, 4, und 6 min nach Inhibition der Transkription durch Zugabe von Rifampicin geerntet worden waren, wurden mit jeweils 10.000 cpm der beiden Sonden A1 und A2 inkubiert. Nach Behandlung mit S1-Nuklease wurden die nicht hydrolysierte Sonden durch Elektrophorese in einem 8 %-Harnstoff-Polyacrylamidgel separiert und durch Exponieren auf einem Phosphor-Screen detektiert. (C) Halbwertszeit der *selAB* mRNA. Die Signale von Sonde A1, die in drei unabhängigen Experimenten des in Abbildung 56B beschriebenen Typs erhalten worden waren, wurden unter Verwendung von ImageQuant 2.1 quantifiziert, gegen einen internen Standard normalisiert und gemittelt. Die Geraden, die in den linearen Teil der Kurven nach Regressionsanalyse der Daten eingepasst wurden, entsprechen Halbwertszeiten von 67 s im Stamm MTA2 und 52 s im Stamm PT90422.

Es zeigte sich, dass die Menge an mRNA in einer *ΔselC*-Mutante im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp-Stamm um einen Faktor von 1,5 – 2 erhöht war (Abbildung 56B). Dieser Effekt konnte auch in einer *ΔselA*- und *ΔselB*-Mutante beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das Verhältnis zwischen dem 3'- und dem 5'-Ende blieb in allen Fällen konstant bei ca. 60 %. Um ferner zu untersuchen, ob sich die Halbwertszeit des Transkripts in Abhängigkeit von der Ausbildung des quaternären Komplexes verändert, wurde das Abbauprofil der *selAB*-mRNA für die Stämme PT90422 und MTA2, die beide dasselbe nicht mutierte Operon aufweisen, bestimmt. Abbildung 56C zeigt, dass das 5'-Ende des Transkripts schnell abgebaut wird und seine Konzentration etwa 6 min nach Inhibierung der Transkription ein basales Niveau erreicht. Die mRNA ist jedoch im *ΔselC*-Hintergrund stabiler ($t_{1/2} = 67$ s) als im Wildtyp-Stamm ($t_{1/2} = 52$ s), was den zuvor beobachteten Unterschied in den Gleichgewichtskonzentrationen erklärt. Nahezu identische Werte wurden auch mit der Sonde A2 erhalten, die mit dem 3'-Ende der *selA* mRNA hybridisiert (Daten nicht gezeigt).

Funktionalität des SECIS-ähnlichen Elements

Nachdem demonstriert worden war, dass die SECIS-ähnliche mRNA-Struktur als ein neuartiges regulatorisches Element fungiert, war es interessant zu sehen, ob es auch als funktionelles SECIS-Element die Dekodierung von UGA als Selenocystein vermitteln kann. Zu diesem Zweck wurde ein Reporterplasmid (pWA) generiert, das ein *lacZ*-Gen trug, in dessen 5'-Region ein im Leserahmen liegendes UGA-Kodon und die Sequenz des SECIS-ähnlichen Elements inseriert war (Abbildung 57A). Die Konstruktion dieses Plasmids erfolgte durch Restriktion von pWT mit *HindIII* und *BamHI* und Ligation mit einem Fragment, das durch Assemblierung der Oligonukleotide SLE-uni1, SLE-uni2, SLE-rev1 und SLE-rev2 erhalten worden war. Die Distanz zwischen dem UGA-Kodon und der Sequenz des SECIS-ähnlichen Elements, die der minimalen Binderegion von SECIS-Elementen entspricht, wurde dabei auf elf Basenpaare eingestellt, die sich als optimal für die Aktivität von SelB erwiesen hatten (Heider *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1998). Als Kontrolle diente das Plasmid pWT (Abbildung 20), das anstelle des SECIS-ähnlichen Elements das *fdhF* SECIS-Element an der identischen Position trug.

Die beiden Plasmide wurden in die Stämme PT90422 und MTA2 transferiert und die resultierenden β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden als Maß für die Durchleaserate am UGA-Kodon bestimmt (Abbildung 57B). Die Ergebnisse zeigen, dass das SECIS-ähnliche Element tatsächlich die Insertion von Selenocystein vermitteln kann. Die Effizienz war aber im Vergleich zu SECIS-Elementen stark reduziert.

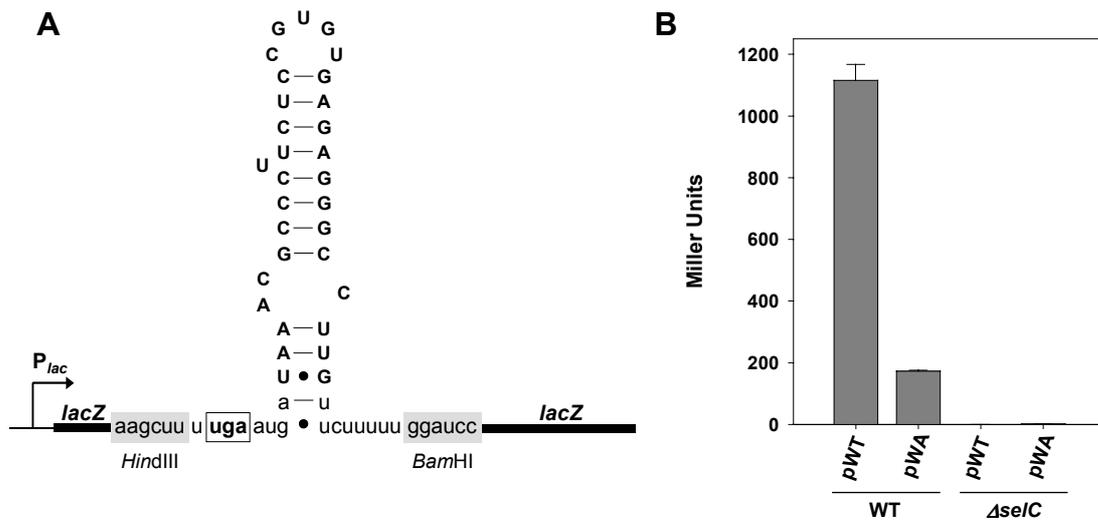


Abbildung 57. Vermittlung des Durchlesens eines UGA-Kodons durch das SECIS-ähnliche Element. (A) Schematische Darstellung des Inserts von pWA. Die Sequenz des Inserts, das die *fdhF*-Kassette von pWT ersetzt, ist als RNA in der berechneten Haarnadelstruktur abgebildet, wobei Reste, die mit denen des SL-Elements übereinstimmen, in Großbuchstaben aufgeführt sind. **(B)** β -Galaktosidase-Aktivitäten, die für die Stämme PT90422 (WT) und MTA2 ($\Delta selC$) nach Transformation mit pWT (*fdhF* SECIS) bzw. pWA (SECIS-ähnliches Element) gemessen wurden.

Diskussion

1. Biochemie der Ligandenbindung durch SelB

Mechanismus der Selenocystein-Spezifität

Die zuverlässige Dekodierung der genetischen Information der mRNA ist für die Funktion einer Zelle essentiell. In der Funktion des Translationsapparats kommen daher eine Reihe verschiedener Mechanismen zum Tragen, die eine Selektion der korrekten Liganden und eine Erkennung und anschließende Korrektur falscher Bindungsereignisse gewährleisten (Ibba und Soll, 1999; Rodnina und Wintermeyer, 2001). Auch die Synthese und Inkorporation von Selenocystein unterliegt einer solchen strengen Kontrolle, da eine Fehlfunktion im Selenmetabolismus zur Synthese infunktionaler Proteine führen würde (Böck *et al.*, 2002). Einen wichtigen Schritt für den spezifischen Einbau von Selenocystein stellt dabei die Diskriminierung zwischen Selenocysteyl-tRNA^{Sec} und deren Vorstufe Seryl-tRNA^{Sec} durch den Elongationsfaktor SelB dar.

Diese Selektivität der tRNA-Bindung zeigt Analogien zur Erkennung von Formylmethionyl-tRNA^{fMet} durch IF2, einem Initiationsfaktor, der wie SelB eine G-Domäne besitzt und nur mit einer einzigen tRNA-Spezies interagiert. Auch in diesem Fall beruht die Spezifität der Interaktion auf Determinanten in der Akzeptorhelix der tRNA und auf der Gegenwart des korrekten Aminoacylrests (Guenneugues *et al.*, 2000; Szkaradkiewicz *et al.*, 2000). Die tRNA-Bindetasche wird im Gegensatz zu EF-Tu und SelB jedoch von nur einer Domäne gebildet, die allerdings strukturell starke Ähnlichkeiten zu Domäne II von EF-Tu und somit auch SelB aufweist und vermutlich ähnliche Kontakte mit dem Liganden ausbildet (Meunier *et al.*, 2000). Eine Fehlacylierung von tRNA^{fMet} mit nicht formyliertem Methionin oder anderen formylierten Aminosäuren führt ähnlich wie bei SelB zu einer deutlich reduzierten Affinität zu IF2 (Wu und RajBhandary, 1997; Szkaradkiewicz *et al.*, 2000). Für EF-Tu konnte gezeigt werden, dass die Affinität für eine aminoacylierte tRNA durch die Summe der thermodynamischen Beiträge des tRNA-Körpers und des Aminoacylrests bestimmt wird (LaRiviere *et al.*, 2001). Die Fehlacylierung einer tRNA kann daher zu einer Zunahme, aber auch zu einer drastischen Abnahme der Stabilität des EF-Tu-tRNA-Komplexes führen. Die Erkennung des Aminoacylrests durch eine spezifisch gestaltete Aminoacyl-Bindetasche spielt also sowohl bei EF-Tu als auch IF2 eine entscheidende Rolle in der Selektion der korrekten tRNA.

Rolle der Aminoacyl-Bindetasche

Ergebnisse früherer Arbeiten gaben Anlass zu der Hypothese, dass auch im Fall von SelB die Architektur der Aminoacyl-Bindetasche für die Spezifität der tRNA-Bindung verantwortlich ist (Hilgenfeld *et al.*, 1996). Die gerichtete Mutagenese der postulierten Aminoacyl-Bindetasche von SelB in Richtung einer EF-Tu-ähnlichen Topologie ergab Varianten des Proteins, die *in vivo* in Gegenwart von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} entweder völlig inaktiv sind oder aber trotz mehrfacher Austausche annähernd Wildtyp-Aktivität besitzen. Die Akkomodation von Selenocystein scheint also nicht notwendigerweise auf die Gegenwart der Reste Tyr⁴², Asp¹⁸⁰, Arg¹⁸¹ und Arg²³⁶ angewiesen zu sein, auch wenn diese Positionen in Bakterien, Archaeen und Eukaryonten stark konserviert sind. Alle inaktiven Formen von SelB wurden stabil und in fast unveränderter Menge in der Zelle produziert. Die beobachtete Reduktion der Aktivität kann daher direkt auf eine Beeinflussung der tRNA-Bindung zurückgeführt werden. Es ist allerdings unklar, ob die eingeführten Veränderungen keine Assoziation von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} mehr zulassen oder ob diese zwar noch binden kann, aber nicht mehr im Stande ist, die für die Interaktion von SelB mit dem Ribosom notwendigen Konformationsänderungen zu induzieren.

Keine der Varianten zeigte Aktivität mit Seryl-tRNA^{Sec}. Als Erklärung dafür kommt neben der Unfähigkeit der tRNA zur Bindung an SelB aber auch in diesem Fall das Ausbleiben von Konformationsänderungen nach der Assoziation des Liganden in Frage. Es wurde gezeigt, dass die Veresterung mit einer Aminosäure zu einer Konformationsänderung im 3'-Bereich von tRNA-Molekülen führen kann (Schlosser *et al.*, 2001). Möglicherweise wird daher die Konformation, welche tRNA^{Sec} zu einer Interaktion mit SelB befähigt, nur in Gegenwart des Selenocysteyl-Rests angenommen und die Aminosäure-Spezifität von SelB überwiegend durch Kontakte zum tRNA-Körper bestimmt.

Die vorliegenden Resultate lassen darauf schließen, dass die Erkennung des Aminoacyl-Rests von tRNA^{Sec} nicht durch punktuelle Determinanten der Bindetasche erfolgt. Eine Lösung des Problems der Aminosäure-Spezifität von SelB ist daher mit rationellem Proteindesign nicht möglich.

Selektion von Selenocysteyl-tRNA^{Sec}: Ein komplex regulierter Prozess

Um Anhaltspunkte zu erhalten, welche Mechanismen zur Auswahl der korrekten tRNA beitragen, wurde *selB* einer Zufallsmutagenese unterzogen. Es wurden 29 Allele selektiert, deren Genprodukte eine signifikante Steigerung der Aktivität mit Seryl-tRNA^{Sec} zeigten. Der veränderte Phänotyp der SelB-Varianten konnte nach Sequenzierung auf jeweils eine aus insgesamt vier Mutationen zurückgeführt werden. Zwei der betroffenen Aminosäuren sind in der

G-Domäne von SelB lokalisiert (Abbildung 59). Arg¹⁵⁸ liegt an der Oberfläche des Proteins und ist in Bakterien und Archaeen konserviert. Sein Austausch gegen Cystein führt zum Ersatz der positiv geladenen Guanidino-Gruppe gegen eine unter physiologischen Bedingungen partiell deprotonierte Thiol-Gruppe. Die veränderte Ladung und die starke Verkürzung der Seitenkette induzieren strukturelle Veränderungen in der G-Domäne, die sich in einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Abbau äußern und einen Einfluss auf die Interaktion von SelB mit Guanosin-Nukleotiden oder mit der tRNA haben könnten.

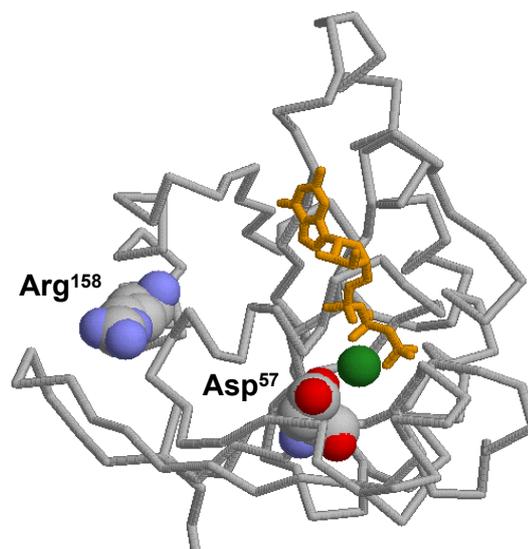


Abbildung 58. Lokalisation der Aminosäuren Asp⁵⁷ und Arg¹⁵⁸ in der G-Domäne von SelB. Die Aminosäuren Asp⁵⁷ und Arg¹⁵⁸ sowie das Mg²⁺-Ion (grün) sind als Kalottenmodelle dargestellt, während GTP (orange) als Stabmodell abgebildet ist. Die G-Domäne, deren Koordinaten auf einem Strukturmodell von SelB beruhen (Hilgenfeld *et al.*, 1996), wird durch eine schematische Repräsentation des Polypeptid-Rückgrats wiedergegeben. Farbkodierung: blau, Stickstoff; rot, Sauerstoff.

Asp⁵⁷, das in EF-Tu und SelB strikt konserviert ist, liegt in der Nähe des GTPase-Zentrums und spielt eine Rolle in der Koordination des Mg²⁺-Kofaktors (Berchtold *et al.*, 1993). Der äquivalente Austausch der Aminosäure Asp⁸⁰ von EF-Tu gegen Glutamin führt zu einer starken Beeinflussung der Interaktion mit GDP, der intrinsischen GTPase-Aktivität und der Bindung des 3'-Endes von Aminoacyl-tRNA (Krab und Parmeggiani, 1999). Ähnliche Effekte können auf Grund der hohen Übereinstimmung der katalytischen Zentren auch für SelB erwartet werden.

Die Ausbeuten, die bei der Reinigung von SelB_{D57N} und SelB_{R158C} erzielt wurden, waren deutlich niedriger als bei den anderen SelB-Varianten. Da die Proteine während der Reinigung und im angereicherten Zustand keine erhöhte Instabilität aufwiesen, lässt dieser Umstand auf Faltungsschwierigkeiten in der Zelle schließen. Dasselbe Phänomen war auch für EF-Tu_{D80N} beobachtet worden (Krab und Parmeggiani, 1999).

Die weiteren isolierten Mutationen und zwei Austausche mit identischem Phänotyp, die in früheren Arbeiten identifiziert worden waren, sind in Domäne 4a von SelB lokalisiert. Die exakte Position der veränderten Aminosäuren in der Struktur von SelB aus *E. coli* lässt sich anhand der Kristallstruktur eines C-terminalen Fragments von SelB aus *Moorella thermoacetica* bestimmen (Abbildung 59). Es zeigt sich, dass sich die Mutationen in der Mitte von Domäne 4a am Übergang zwischen den Subdomänen I und II häufen.

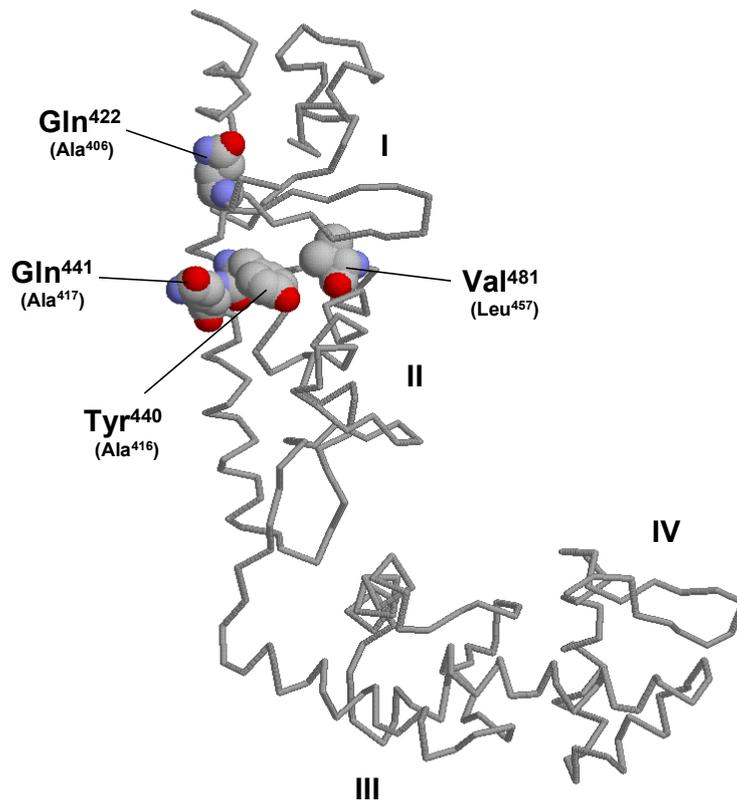


Abbildung 59. Lokalisation der Aminosäuren Arg⁴²⁷, Tyr⁴⁴⁰, Gln⁴⁴¹ und Val⁴⁸¹ in Domäne 4 von SelB aus *Moorella thermoacetica*. Die vier in der Abbildung angegebenen Aminosäuren sind als Kalottenmodelle dargestellt, während der Rest des Proteins als schematische Repräsentation des Polypeptid-Rückgrats wiedergegeben ist. Die vier Subdomänen des Proteins sind durch römische Ziffern gekennzeichnet. Die Subdomänen I + II entsprechen Domäne 4a, die Subdomänen III + IV Domäne 4b. Die den hervorgehobenen Aminosäuren entsprechenden Reste von SelB aus *E. coli* sind in Klammern angegeben. Die Koordinaten beruhen auf der Kristallstruktur eines C-terminalen Fragments von SelB aus *Moorella thermoacetica* (Selmer und Su, 2002). Farbcodierung: blau, Stickstoff; rot, Sauerstoff.

Leu⁴⁵⁷ liegt im Inneren des Moleküls und ist Bestandteil eines α -helikalen Segments. Sein Austausch gegen Prolin führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zum vorzeitigen Abbruch der Helix und dadurch zu strukturelle Veränderungen in Domäne 4a und zu einer Modifikation der Interaktion zwischen den Subdomänen I und II. Die Alanin-Reste Ala⁴⁰⁶, Ala⁴¹⁶ und Ala⁴¹⁷ liegen an der Oberfläche des Moleküls in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Ihr Austausch gegen Valin könnte aus sterischen Gründen ebenfalls zu einer Beeinflussung der Subdomänen-

orientierung führen. Möglicherweise sind die Reste aber auch Teil einer Kontaktstelle, die eine Wechselwirkung von Domäne 4a mit anderen Regionen von SelB, mit tRNA^{Sec} oder mit dem Ribosom vermittelt.

Die Mutationen in den Domänen 1 und 4a scheinen unterschiedliche, kooperativ wirkende Aspekte der tRNA-Bindung zu betreffen. So wurde im Rahmen einer Diplomarbeit gezeigt, dass sich die Fähigkeit von SelB_{R158C}, UGA-Durchlesen mit Seryl-tRNA^{Sec} zu vermitteln, durch das zusätzliche Einführen der Austausch A406V oder L457P um ein Vielfaches steigern ließ (Malamoussi, 2002). Wurden dagegen Mutationen miteinander kombiniert, die ausschließlich in Domäne 4a lokalisiert sind, dann konnte gegenüber den Varianten mit nur einer einzelnen Mutation keine weitere Zunahme der Aktivität festgestellt werden.

Interessanterweise wurden keine Proteine mit veränderter Aminoacyl-Bindetasche isoliert, was ebenfalls gegen die Bedeutung von Wechselwirkungen einzelner Aminosäuren mit dem Aminoacyl-Rest für die Selektion der tRNA spricht. Die erhaltenen Austausche liegen ferner nicht in Regionen von SelB, die direkt in die Bindung von tRNA involviert sind. Die spezifische Erkennung von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} stellt daher vermutlich einen komplex regulierten Prozess dar, der auf Interaktionen des tRNA-Moleküls mit verschiedenen Kontaktstellen des Proteins beruht und von adaptiven Konformationsänderungen begleitet wird.

Der Mechanismus, der den mutierten SelB-Proteinen eine Erweiterung ihrer Aminosäure-Spezifität erlaubt, bedarf zu seiner Aufklärung einer detaillierteren biochemischen Analyse der gereinigten SelB-Varianten, die zur Zeit in Kooperation mit M. Rodnina (Institut für Physikalische Biochemie, Universität Witten/Herdecke) durchgeführt wird. Im Vordergrund steht dabei vor allem der Einfluss der Mutationen auf die Interaktion von SelB mit Guanosin-Nukleotiden und mit dem Ribosom.

Kinetik der Interaktion mit Guanosin-Nukleotiden

SelB gehört zur GTPase-Superfamilie der Proteine und ist eng verwandt mit dem eukaryontischen Elongationsfaktor eIF-2 γ (Keeling *et al.*, 1998). Seine G-Domäne teilt daher eine Reihe von strukturellen und mechanistischen Merkmalen mit den GTPasen der Ras-Familie und den α -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen. Bei dieser Klasse von Enzymen dient die Hydrolyse von GTP als ein molekularer Umschaltmechanismus, der den Übergang zwischen zwei unterschiedlichen Konformationen einleitet. Nur im GTP-gebundenen Zustand ist das Protein fähig durch Interaktion mit einem anderen Faktor seine Funktion zu erfüllen. Nach der Spaltung von GTP, die in der Regel durch ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) induziert

wird, geht es in einen inaktiven Zustand über, der bis zum Austausch von GDP gegen GTP beibehalten wird. Da G-Proteine oft sehr niedrige Dissoziationsraten für GDP aufweisen, sind viele von ihnen auf einen Nukleotid-Austauschfaktor (NEF) angewiesen, der die Freisetzung von GDP stimuliert und so die Reaktivierung des Proteins durch die erneute Bindung von GTP ermöglicht.

Die Analyse der Interaktion von SelB mit Guanosin-Nukleotiden zeigte in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Forchhammer *et al.*, 1989), dass SelB in den binären Komplexen relativ geringe Affinitäten für GDP und GTP aufweist, die mit denen von Ffh (Jagath *et al.*, 1998) und FtsY (Moser *et al.*, 1997) aus *E. coli* vergleichbar sind, aber um Größenordnungen unter den für EF-Tu aus *E. coli* (Gromadski *et al.*, 2002) ($K_D \sim 10^{-9}$ M) oder Ras-p21 (John *et al.*, 1990) und Ran (Klebe *et al.*, 1995) ($K_D \sim 10^{-11}$ M) bestimmten Werten liegen. Die Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten für beide Nukleotide bewegen sich im Bereich von $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und somit weit unter dem Wert, der für eine diffusionskontrollierte Bildung der Komplexe zu erwartet wäre. Sie spiegeln daher vermutlich eine Konformationsänderung wieder, die auf die eigentliche, diffusionskontrollierte Assoziation der Nukleotide folgt, welche selbst zu keiner Änderung der intrinsischen oder der mant-Fluoreszenz führt. Ein solches Verhalten wurde auch für EF-Tu (Wagner *et al.*, 1995; Gromadski *et al.*, 2002) und eine Reihe anderer GTP-bindender Proteine beobachtet und als Stabilisierung der Nukleotidbindung durch das Schließen der Bindetasche gedeutet. Die Bindung von GTP induziert in SelB daher wahrscheinlich dieselbe drastische Konformationsänderung, die für EF-Tu beobachtet wurde (Berchtold *et al.*, 1993). Anders als bei vielen G-Proteinen weist GDP eine deutlich niedrigere Affinität für SelB auf als GTP. Seine Assoziation erfolgt zwar fünffach schneller, es wird aber gleichzeitig mit einer um zwei Größenordnungen höheren Geschwindigkeit freigesetzt als GTP. Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von GDP ist vergleichbar mit der von EF-Tu im Komplex mit EF-Ts (Gromadski *et al.*, 2002) und mit der der SRP-Typ-GTPasen FtsY (Moser *et al.*, 1997) und Ffh (Jagath *et al.*, 1998), welche eine intrinsische NEF-Domäne (I-Box) besitzen. Die niedrige Affinität für GDP und vor allem die hohe intrinsische Dissoziationsrate für das Nukleotid sprechen für einen spontanen, von einem akzessorischen Faktor unabhängigen Nukleotid-austausch durch SelB. Dieser wird durch die hohe intrazelluläre Konzentration von GTP (0,9 mM) und dem vergleichsweise niedrigem Spiegel an GDP (0,1 mM) zusätzlich begünstigt (Neuhard und Nygaard, 1987).

Viele GTPasen besitzen im Gegensatz zu den eben erwähnten Ausnahmen niedrige ($\sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ für EF-Tu in Abwesenheit von EF-Ts) (Wagner *et al.*, 1995; Gromadski *et al.*, 2002) oder sehr

niedrige ($10^{-6} - 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ für Ras und Ras-verwandte Proteine) (John *et al.*, 1990; Simon *et al.*, 1996) GDP-Dissoziationsraten, die durch Nukleotid-Austauschfaktoren um mehrere Größenordnungen beschleunigt werden. Im Fall von Proteinen, die in die Transduktion von Signalen involviert sind, ist es leicht verständlich, warum die Freisetzung von GDP in Abhängigkeit von einem Austauschfaktor erfolgt, da dieser üblicherweise selbst erst durch vorgeschaltete Ereignisse in der Signaltransduktions-Kaskade aktiviert wird und so eine integrale Komponente des Systems darstellt. Bei Translationsfaktoren ist die Notwendigkeit eines katalysierten Austauschs von GDP jedoch nicht so offensichtlich, da die beteiligten Austauschfaktoren keiner Regulation unterliegen und konstitutiv aktiv sind. Das Beispiel von SelB zeigt, dass die von EF-Tu bekannten Reaktionsprinzipien auch dann funktionieren, wenn GDP, das nach der Induktion der GTP-Hydrolyse durch die L7/L12-Region der ribosomalen 50S-Untereinheit entsteht, nur schwach gebunden ist und spontan dissoziiert, um so eine Reaktivierung des Proteins und ein Eintreten in einen neuen Reaktionszyklus zu erlauben.

Interaktion mit dem SECIS-Element

Die Charakterisierung der Interaktion von SelB mit SECIS-Elementen zeigte, dass die Bindung der gefalteten *fdhF*- und *fdnG*-Transkripte mit einer hohen Affinität ($K_D \sim 1,3 \text{ nM}$) erfolgt. Die Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten nähern sich dem durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Liganden gesetzten Grenzwert von ca. $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Änderung der Emissionsintensität der eingesetzten Fluorescein-Reportergruppe ist daher vermutlich direkt auf die Assoziationsreaktion zurückzuführen. Eine nachfolgende Konformationsänderung der mRNA-Bindedomäne, die keinen weiteren Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften der Reportergruppe ausübt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Abdissoziation des SECIS-Elements findet trotz der hohen Affinität der Interaktion mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden statt. Es zeigte sich, dass die Länge des RNA-Liganden dessen Bindeverhalten deutlich beeinflusst. Dieser Effekt könnte auf einer Modulation der 3D-Struktur der Binderegion durch die basalen Komponenten der mRNA-Struktur beruhen, die zur Ausbildung von leicht unterschiedlichen Kontakten mit der mRNA-Bindetasche von SelB führt. Eine ähnliche Rolle wurde für nicht in die Bindung involvierte Anteile der regulatorischen Strukturen der *thrS*-mRNA festgestellt (Torres-Larios *et al.*, 2002).

Kooperativität der Ligandenbindung

Weder die Assoziations- noch die Dissoziationskinetik des SECIS-Elements wurde durch die gleichzeitige Bindung von Guanosin-Nukleotiden beeinflusst. Umgekehrt hatte auch die Bindung

der mRNA-Struktur keine Auswirkung auf die Interaktion von SelB mit GDP und GTP. Eine direkte Interaktion zwischen der G-Domäne und der mRNA-Bindedomäne scheint daher nicht stattzufinden, so dass SelB unabhängig von seinem Nukleotid-Status zur mRNA rekrutiert werden kann.

Interessanterweise konnte auch kein Einfluss des Nukleotid-Status von SelB auf den Schutz von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} gegen alkalische Hydrolyse festgestellt werden. Das durchgeführte Experiment erlaubt zwar nur qualitative Aussagen, aber es zeigt, dass die Dissoziationskonstante der Interaktion von SelB mit Selenocysteyl-tRNA^{Sec} in Gegenwart von GDP und selbst in Abwesenheit von Nukleotiden unter 1 μ M liegt. Denn nur dann kann unter den verwendeten Bedingungen eine signifikante Komplexbildung erfolgt sein. Dieses Verhalten erinnert an IF2, das die Esterbindung von Formylmethionyl-tRNA^{fMet} unter ähnlichen Bedingungen ebenfalls unabhängig von der Gegenwart von GTP gegen alkalische Hydrolyse schützt (Petersen *et al.*, 1979). Auch EF-Tu weist in der GDP-Form noch eine messbare Affinität für Phenylalanyl-tRNA^{Phe} ($K_D \sim 14 \mu$ M) auf (Pingoud *et al.*, 1982), die aber um mehrere Größenordnungen unter den Affinitäten liegt, die für die Interaktion der GTP-Form mit Aminoacyl-tRNAs bestimmt wurden (Ott *et al.*, 1990). Dieser große Unterschied zwischen den beiden Konformationen ist bei SelB offensichtlich nicht in diesem Maß ausgeprägt.

Die Dissoziation des SECIS-Elements von SelB wurde in Gegenwart von beladener tRNA deutlich verlangsamt, was für eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Bindetaschen spricht. Eine identische Verringerung der Dissoziationsrate wurde auch für die isolierte mRNA-Bindedomäne SelB₄₇₂₋₆₁₄ beobachtet. Ihre Affinität für das SECIS-Element lag gleichzeitig deutlich über der des unverkürzten Proteins, was mit der erhöhten Affinität von SelB für das SECIS-Element in Gegenwart von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} (Baron *et al.*, 1993a) korreliert.

Es scheint daher eine Interaktion zwischen der mRNA bindenden Domäne von SelB und einer anderen Region des Proteins zu existieren, die einen inhibitorischen Einfluss auf die Bindung des SECIS-Elements ausübt und bei Assoziation von beladener tRNA^{Sec} aufgehoben wird. Ein Vergleich der Bindeeigenschaften von SelB₄₇₂₋₆₁₄ und SelB₃₇₉₋₆₁₄ zeigte, dass bereits die Gegenwart von Domäne 4a ausreicht, um die Affinität der mRNA-Bindedomäne auf das für Wildtyp-SelB charakteristische Niveau zu reduzieren. Eine Rolle von Domäne 4a in der Modulation der SECIS-Bindeeigenschaften von SelB, die aus diesen Daten abgeleitet werden kann, steht im Einklang mit Ergebnissen, die durch Mutationsanalysen erhalten wurden (Kromayer *et al.*, 1999). Die Kristallisation eines C-terminalen Fragments von SelB aus *Moorella thermoacetica* ergab zudem einen direkten Hinweis auf eine ionische Interaktion

zwischen den beiden Subdomänen 4a und 4b (Selmer und Su, 2002). Sie zeigte außerdem, dass Domäne 4, die eine L-förmige Struktur besitzt, mit einer Länge von 75 Å zu kurz ist um bei gleichzeitiger Bindung des SECIS-Elements den N-terminalen Teil von SelB korrekt an der Translationsfaktor-Bindestelle des Ribosoms zu plazieren. Die Freisetzung der mRNA-Bindedomäne 4b aus der inhibitorischen Interaktion mit Domäne 4a könnte daher auf einer durch die Bindung von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} induzierten Streckung der Struktur beruhen, die zu einem Aufbrechen der im Kristall zwischen beiden Subdomänen vorliegenden Interaktionen führen würde.

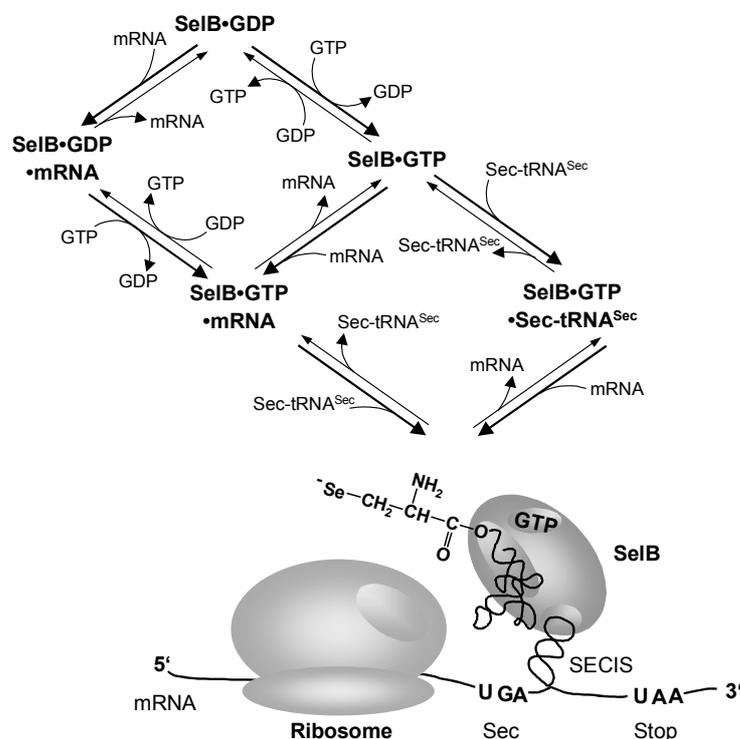


Abbildung 60. Assemblierung des quaternären Komplexes. Eine genaue Beschreibung der Abbildung ist im Text gegeben. Die aus thermodynamischen Gründen bevorzugte Reaktionsrichtung ist durch dicke Pfeile gekennzeichnet.

Die Zunahme der Affinität von SelB für das SECIS-Element nach Bindung von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} impliziert aus thermodynamischen Gründen gleichzeitig, dass SelB nach Bindung an das SECIS-Element eine erhöhte Affinität für die beladene tRNA aufweist. Daraus ergibt sich in Kombination mit den anderen erhaltenen Daten das in Abbildung 60 dargestellte Schema für die Interaktion von SelB mit seinen Liganden. Die Gleichgewichtslage der einzelnen Reaktionen führt trotz der vielen Interaktionsmöglichkeiten zu einer gerichteten Assemblierung des quaternären Komplexes, wobei sichergestellt ist, dass die maximale Affinität von SelB zur mRNA nur bei gleichzeitiger Bindung aller für die Aktivität benötigten Faktoren gegeben ist. Die

hohe Stabilität des quaternären Komplexes fixiert SelB anschließend in einer Konformation, die dessen Interaktion mit dem Ribosom ermöglicht. Nach Induktion der GTP-Hydrolyse wird Selenocysteyl-tRNA^{Sec} in der Aminoacyl-tRNA-Bindestelle freigesetzt, was zu einer Erhöhung der Dissoziationsrate vom SECIS-Element führt. Dieser Mechanismus ist vermutlich Voraussetzung für die Translation der nachfolgenden Kodons, da frühere Arbeiten gezeigt hatten, dass ein stabil an das SECIS-Element gebundener SelB-Komplex ein beträchtliches Hindernis für den Translationsapparat darstellt (Suppmann *et al.*, 1999).

2. Regulation der Selenocystein-Biosynthese durch SelB: Ein neuartiger Mechanismus translationeller Kontrolle

Eigenschaften des SECIS-ähnlichen Elements

Bakterielle SECIS-Elemente liegen, soweit bisher untersucht, innerhalb des Leserahmens von Selenoprotein-mRNAs und sie vermitteln die Dekodierung des Kodons UGA als Selenocystein, indem sie einen quaternären Komplex mit SelB, GTP und Selenocysteyl-tRNA^{Sec} bilden. In diesem nimmt SelB eine Konformation an, die es ihm ermöglicht, mit RF2 um die Bindung an die Aminoacyl-tRNA-Bindestelle des herannahenden Ribosoms zu konkurrieren. Die in dieser Arbeit gezeigte Existenz eines SECIS-Elements im untranslatierten Bereich einer mRNA und die daraus resultierende Übernahme regulatorischer Aufgaben erweitert auf unerwartete Weise das Spektrum an Funktionen, die diese mRNA-Sekundärstrukturen erfüllen.

Obwohl die Sequenz des SECIS-ähnlichen Elements stark vom SECIS-Konsensus abweicht, zeigen sich nach Faltung der RNA einige Merkmale, wie das ungepaarte U im apikalen Bereich der Helix und das GU Duplett in der Loopregion, die sich in früheren Experimenten als notwendig für eine funktionelle Interaktion mit SelB herausgestellt hatten. Dennoch würden viele der Austausche, die das SECIS-ähnlichen Element im Vergleich zur SECIS-Struktur aufweist, für sich genommen aber eine Funktion in der Dekodierung von UGA als Selenocystein ausschließen (Heider *et al.*, 1992). Umso erstaunlicher ist es, dass diese regulatorische Struktur als authentisches SECIS-Element fungieren kann.

Dies erinnert an frühere Arbeiten, in denen durch *in vitro*-Selektion von Aptameren mit hoher Affinität für SelB eine Reihe von RNA-Molekülen identifiziert wurden, die mit dem Zielprotein sogar eine stabilere Interaktion ausbildeten als das *fdhF* SECIS-Element (Klug *et al.*, 1997). Die meisten dieser Strukturen konnten jedoch kein Durchlesen des UGA-Kodons von Selenoprotein-mRNAs vermitteln. Es existieren also viele Möglichkeiten, RNA-Moleküle in die mRNA-

Bindetasche von SelB einzupassen. Für die Ausübung ihrer biologischen Funktion müssen die Liganden aber bestimmte zusätzliche Determinanten aufweisen, die nach dem Assoziationsprozess zur Induktion der Konformationsänderungen führen, die für das Eingehen einer produktiven Interaktion mit dem Ribosom notwendig sind. Diese sind aber offensichtlich nicht in der Primär- oder Sekundärstruktur der mRNA, sondern in der sterischen Anordnung spezifischer Kontaktpunkte kodiert. Das SECIS-ähnliche Element ist ein natürliches Beispiel für ein solches System. Es weist das Bindungsverhalten authentischer SECIS-Elemente auf, aber die Stereochemie innerhalb des quaternären Komplexes unterscheidet sich, so dass die Fähigkeit zur Rekodierung des UGA-Kodons stark eingeschränkt ist. Diese Funktionseinbuße äußert sich in der Unfähigkeit der Struktur einen stabilen Komplex mit SelB₄₇₂₋₆₁₄ einzugehen, für das eine hohe Stringenz in der Erkennung von SECIS-Elementen gezeigt wurde. So interagiert die mRNA-Bindedomäne nicht mit einem mutierten *fdhF* SECIS-Element, das immer noch eine hohe Affinität für SelB zeigt, aber seine Funktionalität eingebüßt hat (Kromayer *et al.*, 1996). Auch viele der selektierten Aptamere, die keine biologische Aktivität mehr zeigen, sind gleichzeitig unfähig mit SelB₄₇₂₋₆₁₄ zu assoziieren.

Da sich die Affinität des regulatorischen Elements für SelB sowohl im binären als auch im quaternären Komplex nicht drastisch von der authentischer SECIS-Elemente unterscheidet, müssen die fehlenden Kontakte durch zusätzliche Interaktionen mit SelB kompensiert worden sein. Diese Situation erinnert an die Interaktion von Threonyl-tRNA Synthetase mit einer in die translationelle Autoregulation involvierten Haarnadelstruktur im 5'-untranslatierten Bereich des *thrS*-Gens. Diese weist Ähnlichkeit mit dem Antikodon-Stamm von tRNA^{Thr}₂ auf und wird trotz zahlreicher Unterschiede der beiden Moleküle in der Primärstruktur von der tRNA-Bindetasche des Proteins akzeptiert. Aufgrund struktureller Abweichungen zu tRNA^{Thr}₂ werden aber neben konventionellen, für den tRNA-Liganden beobachteten Kontakten auch neue Interaktionen mit Aminosäure-Resten der Bindetasche eingegangen, die essentiell für die regulatorische Funktion sind (Torres-Larios *et al.*, 2002).

Die starken Unterschiede zwischen dem SECIS-ähnlichen und dem authentischen SECIS-Element machen einen gemeinsamen Ursprung beider Strukturen unwahrscheinlich. Übereinstimmungen in bestimmten Merkmalen beruhen vermutlich allein auf deren Notwendigkeit für eine stabile Interaktion mit SelB.

Das SECIS-ähnliche Element weist interessanterweise Ähnlichkeiten mit eukaryontischen SECIS-Elementen auf. Beide Strukturen liegen in einem nicht translatierten Bereich der mRNA und können, wenn sie im korrekten Kontext plaziert sind, die Insertion von Selenocystein an

einem UGA-Kodon vermitteln, indem sie mit Komponenten der Selenocystein inserierenden Maschinerie interagieren. Da dem SECIS-Element von Eukaryonten eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Hierarchie der Selenoprotein-Biosynthese zugeschrieben wird (Low *et al.*, 2000), dienen beide Strukturen zusätzlich als regulatorische Elemente, die das Niveau der Genexpression an die Versorgung der Zellen mit Selen anpassen.

Mechanismus der Regulation

Die Beobachtung, dass ein Translationsfaktor im Komplex mit einer spezifischen tRNA die Expression von Genen reguliert, stellt ein Novum dar. Der zu Grunde liegende Mechanismus erinnert jedoch an die Autoregulation der Biosynthese von Threonyl-tRNA Synthetase (Sacerdot *et al.*, 1998) und verschiedenen ribosomalen Proteinen (Zengel und Lindahl, 1994). Diese binden an die 5'-Region ihrer eigenen mRNA, die die Struktur des eigentlichen RNA-Liganden nachahmt, und verringern dadurch die Zugänglichkeit oder Effizienz der Translations-Initiationsregion (TIR). Der exakte Mechanismus, der die post-transkriptionelle Regulation der Expression des *selAB*-Operons durch das SECIS-ähnliche Element im Komplex mit SelB, GTP und Selenocysteyl-tRNA^{Sec} erlaubt, ist bisher nicht vollständig geklärt. Eine Attenuation der Transkription kann als Erklärung ausgeschlossen werden, da die Bildung des quaternären Komplexes am SECIS-ähnlichen Element keinen Einfluss auf die Transkriptionsrate der des anfusionierten *lacZ*-Reportergens zeigte.

In Abwesenheit des funktionellen Komplexes wurde eine Zunahme der Gleichgewichtskonzentration der *selAB*-mRNA um 50 - 100 % beobachtet, die auf eine Stabilisierung des Transkripts zurückgeführt werden kann. Ein direkter Einfluss der Ausbildung des quaternären Komplexes am SECIS-ähnlichen Element auf die Stabilität der mRNA ist aber unwahrscheinlich, da die Synthese von β -Galaktosidase in Stämmen, die eine transkriptionelle Fusion der *selA*-Upstreamregion mit *lacZ* trugen, nicht von der Fähigkeit zur Bildung des Komplexes beeinflusst wurde. Vermutlich führt eine Zunahme der Translationsinitiations-Rate in Abwesenheit des regulatorischen Komplexes zu einer häufigeren Besetzung der TIR und dadurch zu einer effizienteren Maskierung interner RNase-Schnittstellen, so wie es für eine Reihe anderer Systeme gezeigt wurde (Baumeister *et al.*, 1991; Yarchuk *et al.*, 1991; Jain und Kleckner, 1993; Braun *et al.*, 1998).

Es ist unwahrscheinlich, dass dieser geringe Einfluss auf die mRNA-Konzentration als einziger Faktor für die beobachtete, 5-fache Stimulation der β -Galaktosidase-Synthese in Stämmen mit Mutationen in *sel*-Genen verantwortlich ist. Die Assemblierung des quaternären Komplexes am

SECIS-ähnlichen Element scheint daher hauptsächlich zu einer Verringerung der Translationsinitiations-Effizienz zu führen. Es wurde in dieser Hinsicht in früheren Arbeiten gezeigt, dass die ribosomale 30 S-Untereinheit in Gegenwart von tRNA^{fMet} ungefähr 54 Basen im Bereich des Startkodons einer mRNA schützt, wobei sich der bedeckte Bereich von den Positionen -35 bis +19 erstreckt (Hüttenhofer und Noller, 1994). Das SECIS-ähnliche Element umfasst die Basen -48 bis -16 der *selAB*-mRNA und überlappt daher mit der Bindestelle des initiiierenden Ribosoms. Die Sekundärstruktur muss also entweder vollständig aufgeschmolzen werden, damit die Initiation der Translation erfolgen kann, oder sie wird in den ribosomalen mRNA-Pfad eingepasst, so wie es für die mRNA-Strukturen, welche die translationelle Regulation der *thrS*-Expression vermitteln, gezeigt wurde (Sacerdot *et al.*, 1998). In beiden Fällen könnte die Beladung des SECIS-ähnlichen Elements mit SelB·GTP·Selenocysteyl-tRNA^{Sec} die Interaktion des Ribosoms mit der TIR aus thermodynamischen bzw. sterischen Gründen zusätzlich erschweren und so zu einer verminderten Initiationseffizienz führen.

Der Stamm MTA3 ($\Delta selB$) wies nach Lysogenisierung mit dem Phagen $\lambda RL1$, der eine translationelle Fusion von *selA* mit dem *lacZ*-Reportergen trägt, keinen höheren β -Galaktosidase-Spiegel auf als Stämme mit Mutationen in anderen *sel*-Genen. Die Assoziation des SECIS-ähnlichen Elements mit SelB alleine scheint daher keine reprimierende Wirkung auf die Translation von *selA* zu haben. Die regulatorische Wirkung des quaternären Komplexes könnte auf dessen deutlich höhere Stabilität zurückgeführt werden, die eine Verdrängung von SelB von der mRNA erschwert. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass sie auf einer sterischen Hinderung der Interaktion von Ribosomen und TIR durch SelB beruht, die erst nach Bindung der voluminösen tRNA oder nach der postulierten Streckung von Domäne 4 nach Interaktion mit beiden RNA-Liganden (Selmer und Su, 2002) zum Tragen kommt. Da die Assoziation von SelB·GTP·Selenocysteyl-tRNA^{Sec} mit dem SECIS-ähnlichen Element zur Bildung eines Komplexes führt, der zu einer funktionellen Interaktion mit dem Ribosom fähig ist, wäre es auch vorstellbar, dass eine direkte Interaktion von SelB mit der ribosomalen A-Site stattfindet, die in einer Blockade der Translationsinitiation resultiert.

Modell des regulatorischen Netzwerks

Die Existenz einer selenabhängigen Regulation der Genexpression wurde bisher nur in Archaeen und Eukaryonten nachgewiesen. In *Methanococcus voltae* werden Gene, die für selenfreie [NiFe]-Hydrogenasen kodieren, nur bei Selenmangel transkribiert, während in Gegenwart von

Selen im Medium eine Repression der Transkription zu beobachten ist (Müller und Klein, 2001). Die mRNA für die katalytische Untereinheit der wolframabhängigen Formylmethanofuran Dehydrogenase von *Methanopyrus kandleri* wird in ähnlicher Weise ausschließlich bei ausreichender Versorgung der Zellen mit Selen synthetisiert (Vorholt *et al.*, 1997). Die Mechanismen, die dieser Regulation zu Grunde liegen, konnten bisher aber nicht aufgeklärt werden.

Für Eukaryonten wurde gezeigt, dass die Inkorporation von Selenocystein einer Hierarchie folgt, die dazu führt, dass bei Selenmangel bestimmte Selenoproteine bevorzugt synthetisiert werden. Die Ursache für dieses Verhalten liegt unter anderem in den unterschiedlichen Affinitäten verschiedener SECIS-Elemente für den akzessorischen Faktor SBP2 begründet, die zu einer starken Variation der Translationeffizienz führen (Low *et al.*, 2000). Der intrazelluläre Spiegel bestimmter Selenoprotein-mRNAs wird zusätzlich in Abhängigkeit vom Selenstatus der Zellen über den Nonsense-Kodon-vermittelten Abbau (NMD) reguliert (Moriarty *et al.*, 1998; Weiss Sachdev und Sunde, 2001). Transkripte, deren für Selenocystein kodierende UGA-Kodons infolge von Selenmangel nicht dekodiert werden können, werden dabei als frühzeitig terminiert angesehen und der Degradation zugeführt.

Die bisher beschriebenen Regulationseffekte führen alle zu einer differenziellen Synthese von *Selenoproteinen*. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal der Nachweis für selenabhängige Regulation in Bakterien erbracht und eine direkte Abhängigkeit der *Selenocystein-Biosynthese* vom Selenstatus der Zellen gezeigt werden. Die Repression der Translation von *selA* und in geringerem Maß *selB* ist dabei direkt von der Ausbildung eines quaternären Komplexes am SECIS-ähnlichen Element abhängig. SelB stellt somit das zentrale Element im Selen-Metabolismus von *E. coli* dar, das die Synthese und die Inkorporation von Selenocystein zu einer funktionellen Einheit integriert.

Das Netzwerk an Interaktionen, das sich daraus ergibt, ist in Abbildung 61 schematisch dargestellt: Die Biosynthese von Selenocystein (*Teil I*) ist von einer ausreichenden Versorgung der Zelle mit Selenid abhängig, das durch SelD zu Selenophosphat umgesetzt wird. Dieses dient als Selendonator für die Konversion von Seryl-tRNA^{Sec}, die durch SerS unabhängig von der Versorgung der Zelle mit Selen gebildet wird, zu Selenocysteyl-tRNA^{Sec} (*Reaktion a*). Während die serylierte Form von tRNA^{Sec} nicht von SelB erkannt wird, ermöglicht die Gegenwart von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} die Bildung des quaternären Komplexes am SECIS-Element (*Reaktion b*) und an der 5'-mRNA-Struktur des *selAB*-Transkripts (*Reaktion c*). Auf diese Weise kann das System den Beladungszustand von tRNA^{Sec} sensieren und in Abhängigkeit davon die Synthese

von Selenocystein regulieren (*Teil II*). Denn ohne die Bildung des regulatorischen Komplexes (*Zustand A*) ist die Translation von *selA* und *selB* dereprimiert, so dass beide Schlüsselenzyme des Selen-Stoffwechsels produziert werden. Die Besetzung des SL-Elements führt dagegen zu einer reduzierten Expression von *selA*, wodurch in einer negativen Rückkopplung die Synthese von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} gedrosselt wird (*Zustand B*). Die Produktion von SelB nimmt dagegen nur leicht ab, um so die Konzentration des Regulators nicht unter einen kritischen Schwellenwert sinken zu lassen.

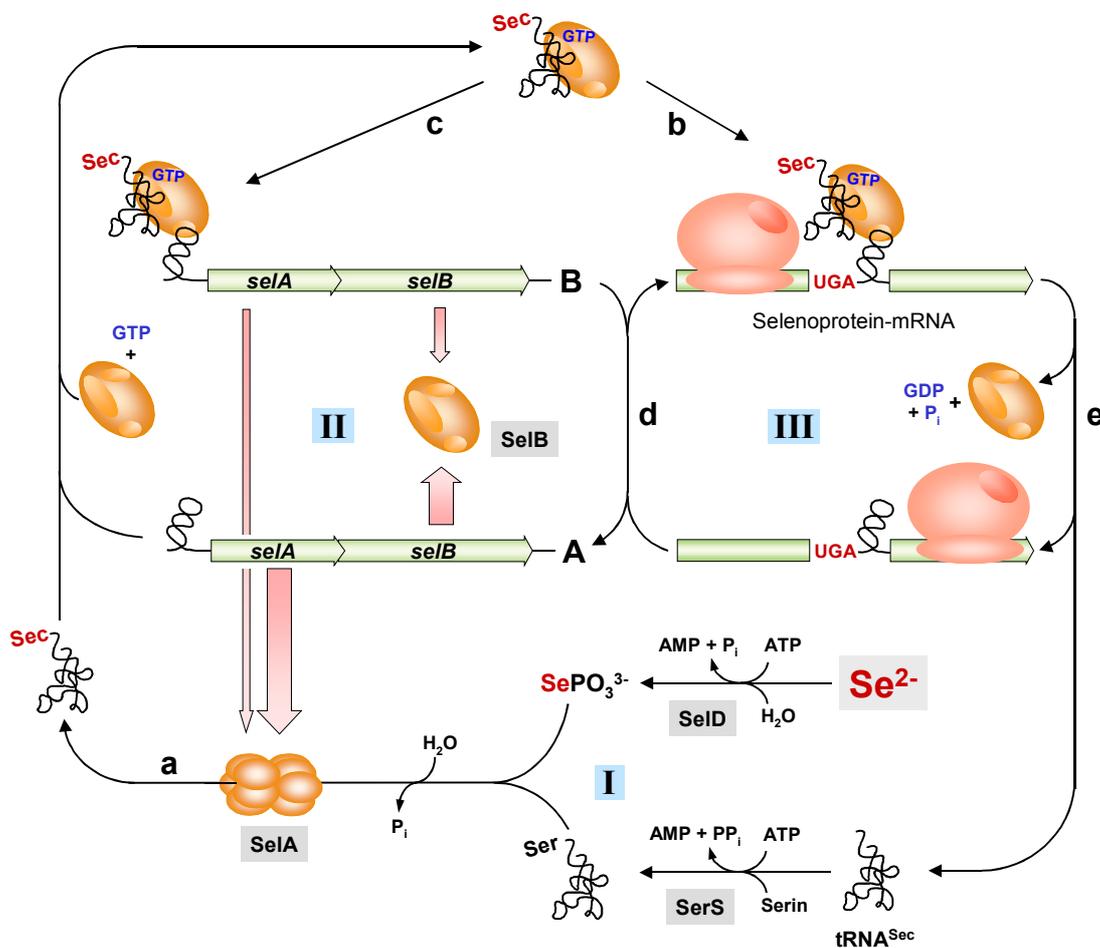


Abbildung 61. Modell des Selen-Stoffwechsels von *Escherichia coli*. Eine Erläuterung der Abbildung wird im Text gegeben.

Die regulatorische Funktion des SECIS-ähnlichen Elements ermöglicht es der Zelle dadurch, ihren Metabolismus an die Verfügbarkeit des Spurenelements Selen anzupassen. Bei ausreichender Versorgung wird die Bildung des Selenocystein synthetisierenden Enzyms verringert, bei Selenmangel dagegen stimuliert. Da keine Regulation der Expression von *selD*

detektiert werden konnte, stellt dieser Mechanismus die einzige Möglichkeit dar, um die Aquisition des Substrats unter selenlimitierten Bedingungen zu erleichtern.

Dieser Regelkreis übernimmt bei ausreichender Selen-Versorgung zugleich eine homöostatische Funktion. Die physiologische Notwendigkeit einer solchen Kontrolle könnte in der Toxizität von Selenocystein begründet sein, die auf der Reaktivität der Selenolgruppe beruht. Diese Verbindung sollte daher selbst im tRNA-gebundenen Zustand nicht über das für die Synthese von Selenoproteinen nötige Maß hinaus akkumuliert werden. Ein Überschuss an Selenocysteyl-tRNA^{Sec} könnte zudem durch spontane Hydrolyse der labilen Esterbindung zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration an freiem Selenocystein führen. Es wurde zwar gezeigt, dass Selenocystein wiederverwertet und als Selendonator für die *de novo*-Synthese von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} dienen kann (Lacourciere, 2002; Mihara *et al.*, 2002), aber es infiltriert auch in hohem Ausmaß die Proteinbiosynthese, indem es an Stelle von Cystein in Polypeptide eingebaut wird (Müller *et al.*, 1997). Dieser Vorgang führt in vielen Fällen zu einer Inaktivierung der betroffenen Enzyme, da sich die Redoxpotentiale der Thiol- und Selenol-Gruppe stark unterscheiden. Die Tatsache, dass die Expression von *sela* reguliert ist, obwohl dessen Genprodukt ohnehin nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert wird, könnte für diese starke Toxizität von Selenocystein sprechen.

Die Konkurrenz zwischen dem SECIS-ähnlichen Element und dem SECIS-Element um SelB (*Reaktion d*) könnte außerdem eine schnelle Anpassung der Selenocystein-Biosynthese an Veränderungen in der Konzentration von Selenoprotein-mRNAs ermöglichen, wie sie durch Übergänge zwischen aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen induziert werden. Eine Verringerung der Synthese von Selenoprotein-mRNAs führt zu einer verstärkten Komplexierung des SECIS-ähnlichen Elements durch überschüssigen ternären Komplex und in der Folge zu einer Reduktion der Biosynthese-Kapazität. Eine Zunahme der intrazellulären Konzentration von SECIS-Elementen führt zur vermehrten Dissoziation des regulatorischen Komplexes und in der Folge zu einer gesteigerten Produktion von SelA, um so den erhöhten Bedarf an selenocystylierter tRNA^{Sec} zu decken.

Die Synthese von Selenoproteinen (*Teil III*) trägt kontinuierlich zu einer Verringerung der intrazellulären Konzentration von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} bei. Nach Interaktion des quaternären SelB·GTP·Selenocysteyl-tRNA^{Sec}·SECIS-Komplexes mit der A-Site des Ribosoms und Induktion der GTP-Hydrolyse werden SelB und tRNA^{Sec} freigesetzt, um anschließend in einen neuen Reaktionszyklus einzutreten (*Reaktion e*).

Zusammenfassung

Die kotranslationelle Dekodierung des Kodons UGA als Selenocystein erfolgt durch eine spezifische tRNA ($tRNA^{Sec}$), die von Seryl-tRNA-Synthetase mit Serin beladen und anschließend von Selenocystein Synthase (SelA) zu Selenocysteyl-tRNA^{Sec} umgesetzt wird. Selenophosphat, das als Selendonator für diese Reaktion dient, wird von Selenophosphat Synthetase (SelD) aus Selenid und ATP generiert. Der anschließende Transfer der beladenen tRNA zum Ribosom erfolgt durch den spezialisierten Elongationsfaktor SelB, dessen N-terminale Region Homologie zu EF-Tu zeigt und wie dieses Guanosin-Nukleotide und tRNA bindet. Der C-terminale Teil interagiert zusätzlich mit einer als SECIS-Element bezeichneten mRNA-Sekundärstruktur, die in Bakterien unmittelbar auf das für Selenocystein kodierende UGA-Triplett folgt und für dessen Rekodierung als Sinnkodon verantwortlich ist.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen, die der Interaktion von SelB mit seinen Liganden sowie der Regulation der Selenocystein-Biosynthese durch SelB zu Grunde liegen. Im Einzelnen wurden dabei folgende Resultate erhalten:

1) Die strikte Diskriminierung zwischen Seryl- und Selenocysteyl-tRNA^{Sec} durch SelB ist essentiell für das Funktionieren des Selenocystein inkorporierenden Systems. Eine gerichtete Mutagenese der Aminoacyl-Bindetasche von SelB zeigte, dass die Selektivität der tRNA-Bindung vermutlich nicht auf einer spezifischen Erkennung des Aminoacyl-Rests beruht. Nach Zufallsmutagenese konnten vier SelB-Varianten isoliert werden, die *in vivo* eine erhöhte Aktivität mit Seryl-tRNA^{Sec} besitzen. Zwei der Mutationen waren in der G-Domäne von SelB lokalisiert, die anderen beiden in Domäne 4a. Die biochemische Charakterisierung der mutierten Proteine ergab noch keinen Hinweis auf eine erhöhte Affinität der SelB-Varianten für Seryl-tRNA^{Sec}, so dass andere Mechanismen für die Erweiterung der Aminosäure-Spezifität verantwortlich sein müssen.

2) Die Interaktion von SelB mit seinen Liganden wurde mit Hilfe von biochemischen und biophysikalischen Methoden analysiert. Der Elongationsfaktor zeigt im Gegensatz zu vielen anderen G-Proteinen eine höhere Affinität für GTP ($K_D = 0,74 \mu\text{M}$) als für GDP ($K_D = 13,4 \mu\text{M}$), was zusammen mit der hohen Dissoziationsrate von GDP ($k_{dis} = 15 \text{ s}^{-1}$) darauf hinweist, dass der

Nukleotidaustausch ohne Katalyse durch einen Austauschfaktor erfolgt. Die Kinetiken der Interaktion mit Guanosin-Nukleotiden werden durch die Gegenwart eines SECIS-Elements nicht beeinflusst. Die Affinität von SelB zu einem fluoresceinmarkierten SECIS-Transkript liegt im nanomolaren Bereich ($K_D = 1,23 \text{ nM}$), wobei die Assoziations- und Dissoziationskinetiken sehr schnell sind und durch die Gegenwart von Guanosin-Nukleotiden nicht verändert werden. In Gegenwart von Selenocysteyl-tRNA^{Sec} wurde jedoch eine signifikante Verringerung der Dissoziationsgeschwindigkeit beobachtet, die zu einer Stabilisierung der Bindung führt und eine Interaktion zwischen der SECIS- und tRNA-Bindetasche nahelegt. Diese intramolekulare Wechselwirkung wurde durch Charakterisierung der isolierten mRNA-Bindedomäne von SelB bestätigt. Die Gleichgewichtslage der einzelnen Reaktionen führt zu einer gerichteten Bildung eines Komplexes aus SelB, GTP, Selenocysteyl-tRNA^{Sec} und dem SECIS-Element, der durch seine hohe Stabilität auf der mRNA fixiert wird und gleichzeitig eine Konformation annimmt, die seine Interaktion mit dem Ribosom zulässt.

3) In der 5'-untranslatierten Region der *selAB*-mRNA wurde eine Sekundärstruktur identifiziert, die Ähnlichkeit mit dem SECIS-Element aufweist und mit der SelB spezifisch und mit hoher Affinität interagiert. Die Stabilität des Komplexes zwischen SelB und dem SECIS-ähnlichen Element erhöht sich in Gegenwart von Selenocysteyl-tRNA^{Sec}. Eine Analyse der *sel*-Genexpression ergab, dass die Synthese von SelA und in geringerem Ausmaß SelB in genetischen Hintergründen, die eine Assemblierung des quaternären Komplexes aus SelB, GTP, Selenocysteyl-tRNA^{Sec} und dem SECIS-ähnlichen Element erlauben, reprimiert ist. Mutationen in *sel*-Genen führen dagegen zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration dieser Proteine. Mit Hilfe von Reporter-gen-Fusionen wurde gezeigt, dass die Repression der *selA*-Expression direkt von der Bildung eines quaternären Komplexes am SECIS-ähnlichen Element abhängig ist. Da diese keinen Einfluss auf die Transkription hat und nur zu einer schwachen Verringerung der mRNA-Menge führt, wurde gefolgert, dass das SECIS-ähnliche Element eine Regulation der Translationsinitiation am *selA*-Gen in Abhängigkeit vom Selenstatus der Zelle ermöglicht.

Literaturverzeichnis

A

- AEvarsson**, A., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Y., al-Karadaghi, S., Svensson, L. und Liljas, A. (1994) Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.*, **13**, 3669-3677.
- Agrawal**, R., Heagle, A., Penczek, P., Grassucci, R. und Frank, J. (1999) EF-G-dependent GTP hydrolysis induces translocation accompanied by large conformational changes in the 70S ribosome. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 643-647.
- Agrawal**, R., Penczek, P., Grassucci, R. und Frank, J. (1998) Visualization of elongation factor G on the *Escherichia coli* 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6134-6138.
- Aiba**, H., Adhya, S. und de Crombrughe, B. (1981) Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.*, **256**, 11905-11910.
- al-Karadaghi**, S., AEvarsson, A., Garber, M., Zheltonosova, J. und Liljas, A. (1996) The structure of elongation factor G in complex with GDP: conformational flexibility and nucleotide exchange. *Structure*, **4**, 555-565.
- Altschul**, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. und Lipman, D. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
- Andreesen**, J. R. und Ljungdahl, L. G. (1973) Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J. Bacteriol.*, **116**, 867-873.
- Asahara**, H. und Uhlenbeck, O. (2002) The tRNA specificity of *Thermus thermophilus* EF-Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3499-3504.
- Ausubel**, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidmann, J., Smith, J. und Struhl, K. (eds.) (1997) *Current protocols in molecular biology*. J. Wiley & Sons, Inc., New York.
- Axley**, M. J., Böck, A. und Stadtman, T. C. (1991) Catalytic properties of an *Escherichia coli* formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8450-8454.

B

- Ban**, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P. und Steitz, T. (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature*, **400**, 841-847.
- Baron**, C. und Böck, A. (1991) The length of the aminoacyl-acceptor stem of the selenocysteine-specific tRNA^{Sec} of *Escherichia coli* is the determinant for binding to elongation factors SELB or Tu. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20375-20379.
- Baron**, C., Heider, J. und Böck, A. (1993a) Interaction of translation factor SELB with the formate dehydrogenase H selenopolypeptide mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4181-4185.
- Baron**, C., Westhof, E., Böck, A. und Giegé, R. (1993b) Solution structure of selenocysteine-inserting tRNA^{Sec} from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **231**, 274-292.
- Baumeister**, R., Flache, P., Melefors, O., von Gabain, A. und Hillen, W. (1991) Lack of a 5' non-coding region in Tn1721 encoded *tetR* mRNA is associated with a low efficiency of translation and a short half-life in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 4595-4600.
- Berchtold**, H., Reshetnikova, L., Reiser, C., Schirmer, N., Sprinzl, M. und Hilgenfeld, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature*, **365**, 126-132.
- Berg**, B. L., Li, J., Heider, J. und Stewart, V. (1991) Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22380-22385.
- Bernstein**, H. (2000) Recent changes to RasMol, recombining the variants. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 453-455.
- Böck**, A., Thanbichler, M., Rother, M. und Resch, A. (2002) Selenocysteine. In Ibba, M., Francklyn, C. und Cusack, S. (eds.), *Aminoacyl-tRNA Synthetases*. Landes Bioscience, Georgetown, USA.
- Böhm**, G., Muhr, R. und Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.*, **5**, 191-195.
- Boon**, K., Vijgenboom, E., Madsen, L., Talens, A., Kraal, B. und Bosch, L. (1992) Isolation and functional analysis of histidine-tagged elongation factor Tu. *Eur. J. Biochem.*, **210**, 177-183.
- Bourne**, H., Sanders, D. und McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, 125-132.
- Bourne**, H., Sanders, D. und McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117-127.

- Bradford**, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Braun**, B., Le Derout, J. und Régnier, P. (1998) Ribosomes inhibit an RNase E cleavage which induces the decay of the *rpsO* mRNA of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **17**, 4790-4797.
- Brinkmann**, U., Mattes, R. und Buckel, P. (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene*, **85**, 109-114.
- Brock**, S., Szkaradkiewicz, K. und Sprinzl, M. (1998) Initiation factors of protein biosynthesis in bacteria and their structural relationship to elongation and termination factors. *Mol. Microbiol.*, **29**, 409-417.

C

- Caldon**, C., Yoong, P. und March, P. (2001) Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. *Mol. Microbiol.*, **41**, 289-297.
- Casadaban**, M. J. und Cohen, S. N. (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4530-4533.
- Chambers**, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. und Harriason, P. R. (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J.*, **5**, 1221-1227.
- Chang**, A. und Cohen, S. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.*, **134**, 1141-1156.
- Chen**, G. T., Fang, L. und Inouye, M. (1993) Effect of the relative position of the UGA codon to the unique secondary structure in the *fdhF* mRNA on its decoding by selenocysteinyl tRNA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23128-23131.
- Chung**, C., Niemela, S. und Miller, R. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2172-2175.
- Cone**, J. E., Del Rio, R. M., Davis, J. N. und Stadtman, T. C. (1976) Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2659-2663.

Czworkowski, J. und Moore, P. (1997) The conformational properties of elongation factor G and the mechanism of translocation. *Biochemistry*, **36**, 10327-10334.

Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T. und Moore, P. (1994) The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.*, **13**, 3661-3668.

D

Dell, V., Miller, D. und Johnson, A. (1990) Effects of nucleotide- and aurodox-induced changes in elongation factor Tu upon its interaction with aminoacyl transfer RNA. A fluorescence study. *Biochemistry*, **29**, 1757-1763.

Dever, T., Glynias, M. und Merrick, W. (1987) GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1814-1818.

Dreiseikermann, B., Eichenlaub, R. und Wackernagel, W. (1979) The effect of differential methylation by *Escherichia coli* of plasmid DNA and phage T7 and lambda DNA on the cleavage by restriction endonuclease *MboI* from *Moraxella bovis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **562**, 418-428.

E

Eccleston, J. und Webb, M. (1982) Characterization of the GTPase reaction of elongation factor Tu. Determination of the stereochemical course in the presence of antibiotic X5108. *J. Biol. Chem.*, **257**, 5046-5049.

Ehrenreich, A., Forchhammer, K., Tormay, P., Veprek, B. und Böck, A. (1992) Selenoprotein synthesis in *E. coli*. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 767-773.

Engelhardt, H., Forchhammer, K., Müller, S., Goldie, K. N. und Böck, A. (1992) Structure of selenocysteine synthase from *Escherichia coli* and location of tRNA in the seryl-tRNA^{sec} - enzyme complex. *Mol. Microbiol.*, **6**, 3461-3467.

F

Feuerstein, J., Goody, R. und Webb, M. (1989) The mechanism of guanosine nucleotide hydrolysis by p21 c-Ha-ras. The stereochemical course of the GTPase reaction. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6188-6190.

Fiedler, S. und Wirth, R. (1988) Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.*, **170**, 38-44.

- Fischer**, W., Doi, T., Ikehara, M., Ohtsuka, E. und Sprinzl, M. (1985) Interaction of methionine-specific tRNAs from *Escherichia coli* with immobilized elongation factor Tu. *FEBS Lett.*, **192**, 151-154.
- Flohé**, L., Günzler, W. A. und Schock, H. H. (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.*, **32**, 132-134.
- Forchhammer**, K. und Böck, A. (1991) Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Analysis of the reaction sequence. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6324-6328.
- Forchhammer**, K., Boesmiller, K. und Böck, A. (1991a) The function of selenocysteine synthase and SELB in the synthesis and incorporation of selenocysteine. *Biochimie*, **73**, 1481-1486.
- Forchhammer**, K., Leinfelder, W. und Böck, A. (1989) Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into proteins. *Nature*, **342**, 453-456.
- Forchhammer**, K., Leinfelder, W., Boesmiller, K., Veprek, B. und Böck, A. (1991b) Selenocysteine Synthase from *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the gene (*selA*) and purification of the protein. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6318-6323.
- Forchhammer**, K., Rücknagel, K. und Böck, A. (1990) Purification and biochemical characterization of SELB, a translation factor involved in selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9346-9350.
- Förster**, C., Ott, G., Forchhammer, K. und Sprinzl, M. (1990) Interaction of a selenocysteine-incorporating tRNA with elongation factor Tu from *E.coli*. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 487-491.
- Freistroffer**, D., Pavlov, M., MacDougall, J., Buckingham, R. und Ehrenberg, M. (1997) Release factor RF3 in *E.coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. *EMBO J.*, **16**, 4126-4133.

G

- Gill**, S. C. und von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- Glass**, R., Singh, W., Jung, W., Veres, Z., Scholz, T. und Stadtman, T. (1993) Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. *Biochemistry*, **32**, 12555-12559.
- Graham**, A. (1980) The synthesis of formate dehydrogenase and nitrate reductase proteins in various *fdh* and *chl* mutants of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **7**, 145-151.

- Greutzmann, G.**, Brechemier-Baey, D., Heurgue, V., Mora, L. und Buckingham, R. (1994) Localization and characterization of the gene encoding release factor RF3 in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5848-5852.
- Gromadski, K.**, Wieden, H. und Rodnina, M. (2002) Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu. *Biochemistry*, **41**, 162-169.
- Gualerzi, C.**, Brandi, L., Caserta, E., La Teana, A., Spurio, R., Tomsic, J. und Pon, C. (2000) Translation initiation in bacteria. In Garret, R., Douthwaite, S., Liljas, A., Matheson, A., Moore, P. und Noller, H. (eds.), *The ribosome: structure, function, antibiotics and cellular interactions*. ASM Press, Washington, DC, pp. 477-494.
- Gualerzi, C.**, Severini, M., Spurio, R., La Teana, A. und Pon, C. (1991) Molecular dissection of translation initiation factor IF2. Evidence for two structural and functional domains. *J. Biol. Chem.*, **266**, 16356-16362.
- Gualerzi, C.** und Wintermeyer, W. (1986) Prokaryotic initiation factor 2 acts at the level of the 30S ribosomal subunit. *FEBS Lett.*, **202**, 1-6.
- Guan, C.**, Li, P., Riggs, P. und Inouye, H. (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*, **67**, 21-30.
- Guenneugues, M.**, Caserta, E., Brandi, L., Spurio, R., Meunier, S., Pon, C., Boelens, R. und Gualerzi, C. (2000) Mapping the fMet-tRNA^{Met} binding site of initiation factor IF2. *EMBO J.*, **19**, 5233-5240.
- Gutfreund, H.** (1995) *Kinetics for the life sciences*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

H

- Härtlein, M.**, Madern, D. und Leberman, R. (1987) Cloning and characterization of the gene for *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 1005-1017.
- Hartz, D.**, McPheeters, D. und Gold, L. (1989) Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. *Genes Dev.*, **3**, 1899-1912.
- Hassur, S.** und Whitlock Jr., H. (1974) UV shadowing--a new and convenient method for the location of ultraviolet-absorbing species in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **59**, 162-164.
- Heider, J.**, Baron, C. und Böck, A. (1992) Coding from the distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into proteins. *EMBO J.*, **11**, 3759-3766.

- Hilgenfeld**, R., Böck, A. und Wilting, R. (1996) Structural model for the selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Biochimie*, **78**, 971-978.
- Hiratsuka**, T. (1983) New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **742**, 496-508.
- Hirokawa**, G., Kiel, M., Muto, A., Selmer, M., Raj, V., Liljas, A., Igarashi, K., Kaji, H. und Kaji, A. (2002) Post-termination complex disassembly by ribosome recycling factor, a functional tRNA mimic. *EMBO J.*, **21**, 2272-2281.
- Hochuli**, E., Dobeli, H. und Schacher, A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.*, **411**, 177-184.
- Hüttenhofer**, A. und Böck, A. (1998) Selenocysteine inserting RNA elements modulate GTP hydrolysis of elongation factor SelB. *Biochemistry*, **37**, 885-890.
- Hüttenhofer**, A., Heider, J. und Böck, A. (1996a) Interaction of the *Escherichia coli* *fdhF* mRNA hairpin promoting selenocysteine incorporation with the ribosome. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3903-3910.
- Hüttenhofer**, A. und Noller, H. (1994) Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes. *EMBO J.*, **13**, 3892-3901.
- Hüttenhofer**, A., Westhof, E. und Böck, A. (1996b) Solution structure of mRNA hairpins promoting selenocysteine incorporation in *Escherichia coli* and their base-specific interaction with special elongation factor SELB. *RNA*, **2**, 354-366.

I

- Ibba**, M. und Soll, D. (1999) Quality control mechanisms during translation. *Science*, **286**, 1893-1897.
- Inoue**, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Ito**, K., Ebihara, K., Uno, M. und Nakamura, Y. (1996) Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5443-5448.
- Ito**, K. und Nakamura, Y. (1997) Cloning and overexpression of polypeptide release factor 1 of *Thermus thermophilus*. *Biochimie*, **79**, 287-292.

Ito, K., Uno, M. und Nakamura, Y. (2000) A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature*, **403**, 680-684.

J

Jagath, J., Rodnina, M., Lentzen, G. und Wintermeyer, W. (1998) Interaction of guanine nucleotides with the signal recognition particle from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **37**, 15408-15413.

Jain, C. und Kleckner, N. (1993) S10 mRNA stability and steady state levels in *Escherichia coli*: indirect effects of translation and role of *rne* function. *Mol. Microbiol.*, **9**, 233-247.

Jeffares, D., Poole, A. und Penny, D. (1998) Relics from the RNA world. *J. Mol. Evol.*, **46**, 18-36.

John, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A. und Goody, R. S. (1990) Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry*, **29**, 6058-6065.

Jurnak, F. (1985) Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. *Science*, **230**, 32-36.

K

Karimi, R., Pavlov, M., Buckingham, R. und Ehrenberg, M. (1999) Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol. Cell*, **3**, 601-609.

Keeling, P. J., Fast, N. M. und McFadden, G. I. (1998) Evolutionary relationship between translation initiation factor eIF-2 γ and selenocysteine-specific elongation factor SELB: change of function in translation factors. *J. Mol. Evol.*, **47**, 649-655.

Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S. und Nyborg, J. (1993) The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure*, **1**, 35-50.

Kjeldgaard, M., Nyborg, J. und Clark, B. (1996) The GTP binding motif: variations on a theme. *FASEB J.*, **10**, 1347-1368.

Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A. und Goody, R. (1995) The kinetic mechanism of Ran-nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry*, **34**, 12543-12552.

Klug, S. J., Hüttenhofer, A. und Famulok, M. (1999) In vitro selection of RNA aptamers that bind special elongation factor SelB, a protein with multiple RNA-binding sites, reveals one major interaction domain at the carboxyl terminus. *RNA*, **5**, 1180-1190.

- Klug**, S. J., Hüttenhofer, A., Kromayer, M. und Famulok, M. (1997) *In vitro* and *in vivo* characterization of novel mRNA motifs that bind special elongation factor SelB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6676-6681.
- Konradi**, R., Billeter, M. und Wuthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.*, **14**, 29-32.
- Krab**, I. und Parmeggiani, A. (1999) Mutagenesis of three residues, isoleucine-60, threonine-61, and aspartic acid-80, implicated in the GTPase activity of *Escherichia coli* elongation factor Tu. *Biochemistry*, **38**, 13035-13041.
- Kromayer**, M (1998) Struktur-Funktions-Beziehung des selenocystein-spezifischen Translationsfaktors SelB und seines mRNA-Substrats. Dissertation am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kromayer**, M., Neuhierl, B., Friebe, A. und Böck, A. (1999) Genetic probing of the interaction between the translation factor SelB and its mRNA binding element in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 800-806.
- Kromayer**, M., Wilting, R., Tormay, P. und Böck, A. (1996) Domain structure of the prokaryotic selenocysteine-specific elongation factor SelB. *J. Mol. Biol.*, **262**, 413-420.

L

- la Cour**, T., Nyborg, J., Thirup, S. und Clark, B. (1985) Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography. *EMBO J.*, **4**, 2385-2388.
- La Teana**, A., Pon, C. und Gualerzi, C. (1993) Translation of mRNAs with degenerate initiation triplet AUU displays high initiation factor 2 dependence and is subject to initiation factor 3 repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4161-4165.
- Laalami**, S., Grentzmann, G., Bremaud, L. und Cenatiempo, Y. (1996) Messenger RNA translation in prokaryotes: GTPase centers associated with translational factors. *Biochimie*, **78**, 577-589.
- Lacourciere**, G. (2002) Selenium is mobilized *in vivo* from free selenocysteine and is incorporated specifically into formate dehydrogenase H and tRNA nucleosides. *J. Bacteriol.*, **184**, 1940-1946.
- Laemmli**, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- LaRiviere**, F., Wolfson, A. und Uhlenbeck, O. (2001) Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science*, **294**, 165-168.
- Leinfelder**, W., Forchhammer, K., Veprek, B., Zehelein, E. und Böck, A. (1990) *In vitro* synthesis of selenocysteinyl-tRNA_{UCA} from seryl-tRNA_{UCA}: involvement and characterization of the *selD* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 543-547.
- Leinfelder**, W., Forchhammer, K., Zinoni, F., Sawers, G., Mandrand-Berthelot, M. und Böck, A. (1988a) *Escherichia coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. *J. Bacteriol.*, **170**, 540-546.
- Leinfelder**, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M. und Böck, A. (1988b) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature*, **331**, 723-725.
- Leipe**, D., Wolf, Y., Koonin, E. und Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.*, **317**, 41-72.
- Li**, C., Reches, M. und Engelberg-Kulka, H. (2000) The bulged nucleotide in the *Escherichia coli* minimal selenocysteine insertion sequence participates in interaction with SelB: a genetic approach. *J. Bacteriol.*, **182**, 6302-6307.
- Link**, A., Phillips, D. und Church, G. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.*, **179**, 6228-6237.
- Liu**, Z., Reches, M., Groisman, I. und Engelberg-Kulka, H. (1998) The nature of the minimal 'selenocysteine insertion sequence' (SECIS) in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 896-902.
- Lodmell**, J. und Dahlberg, A. (1997) A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science*, **277**, 1262-1267.
- Low**, K. (1968) Formation of merodiploids in matings with a class of *rec⁻* recipient strains of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**, 160-167.
- Low**, S. und Berry, M. (1996) Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 203-208.
- Low**, S. C., Grundner-Culemann, E., Harney, J. W. und Berry, M. J. (2000) SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. *EMBO J.*, **19**, 6882-6890.

Lyakhov, D., He, B., Zhang, X., Studier, F., Dunn, J. und McAllister, W. (1997) Mutant bacteriophage T7 RNA polymerase with altered termination properties. *J. Mol. Biol.*, **269**, 28-40.

Lyakhov, D., He, B., Zhang, X., Studier, F., Dunn, J. und McAllister, W. (1998) Pausing and termination by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **280**, 201-213.

M

Maier, T., Drapal, N., Thanbichler, M. und Böck, A. (1998) Strep-tag II affinity purification: an approach to study intermediates of metalloenzyme biosynthesis. *Anal. Biochem.*, **259**, 68-73.

Malamoussi, A. (2002) Aminosäurespezifität des Translationsfaktors SelB. Diplomarbeit am Department für Biologie I, Sektion Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mandrand-Berthelot, M., Wee, M. Y. K. und Haddock, B. A. (1978) An improved method for the identification and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in formate dehydrogenase activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **4**, 37-40.

Mathews, D., Sabina, J., Zuker, M. und Turner, D. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.*, **288**, 911-940.

Meunier, S., Spurio, R., Czisch, M., Wechselberger, R., Guenneugues, M., Gualerzi, C. und Boelens, R. (2000) Structure of the fMet-tRNA^{fMet}-binding domain of *B. stearothermophilus* initiation factor IF2. *EMBO J.*, **19**, 1918-1926.

Mihara, H., Kato, S., Lacourciere, G., Stadtman, T., Kennedy, R., Kurihara, T., Tokumoto, U., Takahashi, Y. und Esaki, N. (2002) The *iscS* gene is essential for the biosynthesis of 2-selenouridine in tRNA and the selenocysteine-containing formate dehydrogenase H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6679-6683.

Miller, J. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

Miller, J. (1992) *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, G. W. und Uhlenbeck, O. C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 8783-8798.

- Moazed**, D. und Noller, H. (1989a) Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell*, **57**, 585-597.
- Moazed**, D. und Noller, H. (1989b) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*, **342**, 142-148.
- Moazed**, D., Robertson, J. M. und Noller, H. F. (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S rRNA. *Nature*, **334**, 362-364.
- Moreno**, J., Dyrskjotersen, L., Kristensen, J., Mortensen, K. und Sperling-Petersen, H. (1999) Characterization of the domains of *E. coli* initiation factor IF2 responsible for recognition of the ribosome. *FEBS Lett.*, **455**, 130-134.
- Moriarty**, P., Reddy, C. und Maquat, L. (1998) Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2932-2939.
- Moser**, C., Mol, O., Goody, R. S. und Sinning, I. (1997) The signal recognition particle receptor of *Escherichia coli* (FtsY) has a nucleotide exchange factor built into the GTPase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11339-11344.
- Müller**, S., Heider, J. und Böck, A. (1997) The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.*, **168**, 421-427.
- Müller**, S. und Klein, A. (2001) Coordinate positive regulation of genes encoding [NiFe] hydrogenases in *Methanococcus voltae*. *Mol. Genet. Genomics*, **265**, 1069-1075.
- Mullis**, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quan. Biol.*, **51**, 263-273.

N

- Neidhardt**, F., Bloch, P. und Smith, D. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.*, **119**, 736-747.
- Neuhard**, J. und Nygaard, P. (1987) *Purines and pyrimidines*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Neuhierl**, B. (1998) Mechanismus der Selen-Toleranz in Selenspeicherpflanzen der Gattung *Astragalus*. Dissertation am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.

- Neuhierl**, B., Thanbichler, M., Lottspeich, F. und Böck, A. (1999) A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5407-5414.
- Nissen**, J., Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Clark, B. und Reshetnikova, L. (1997) Macromolecular mimicry in protein synthesis. *Fold Des.*, **2**, S7-S11.
- Nissen**, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B. F. C. und Nyborg, J. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and a GTP analog. *Science*, **270**, 1464-1472.

O

- Ohta**, S., Nakanishi, M., Tsuboi, M., Arai, K. und Kaziro, Y. (1977) Structural fluctuation of the polypeptide-chain elongation factor Tu. A comparison of factors from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus* HB8. *Eur. J. Biochem.*, **78**, 599-608.
- Ott**, G., Faulhammer, H. und Sprinzl, M. (1989) Interaction of elongation factor Tu from *Escherichia coli* with aminoacyl-tRNA carrying a fluorescent reporter group on the 3' terminus. *Eur. J. Biochem.*, **184**, 345-352.
- Ott**, G., Schiesswohl, M., Kiesewetter, S., Förster, C., Arnold, L., Erdmann, V. und Sprinzl, M. (1990) Ternary complexes of *Escherichia coli* aminoacyl-tRNAs with the elongation factor Tu and GTP: thermodynamic and structural studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1050**, 222-225.

P

- Pape**, T., Wintermeyer, W. und Rodnina, M. V. (1998) Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the *E. coli* ribosome. *EMBO J.*, **17**, 7490-7497.
- Parmeggiani**, A. und Sander, G. (1981) Properties and regulation of the GTPase activities of elongation factors Tu and G, and of initiation factor 2. *Mol. Cell. Biochem.*, **35**, 129-158.
- Patterson**, E., Milstrey, R. und Stockstad, E. (1957) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **95**, 617-620.
- Pel**, H., Moffat, J., Ito, K., Nakamura, Y. und Tate, W. (1998) *Escherichia coli* release factor 3: resolving the paradox of a typical G protein structure and atypical function with guanine nucleotides. *RNA*, **4**, 47-54.
- Petersen**, H., Roll, T., Grunberg-Manago, M. und Clark, B. (1979) Specific interaction of initiation factor IF2 of *E. coli* with formylmethionyl-tRNA_f^{Met}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 1068-1074.

- Pingoud**, A., Block, W., Wittinghofer, A., Wolf, H. und Fischer, E. (1982) The elongation factor Tu binds aminoacyl-tRNA in the presence of GDP. *J. Biol. Chem.*, **257**, 11261-11267.
- Pinsent**, J. (1954) The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the *Coli-aerogenes* group of bacteria. *Biochem. J.*, **57**, 10-16.
- Prober**, J., Trainor, G., Dam, R., Hobbs, F., Robertson, C., Zagursky, R., Cocuzza, A., Jensen, M. und Baumeister, K. (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, **238**, 336-341.

R

- Rauhut**, R. und Klug, G. (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 353-370.
- Ringquist**, S., Schneider, D., Gibson, T., Baron, C., Böck, A. und Gold, L. (1994) Recognition of the mRNA selenocysteine insertion sequence by the specialized translational elongation factor SELB. *Genes Dev.*, **8**, 376-385.
- Rodnina**, M., Savelsbergh, A., Katunin, V. und Wintermeyer, W. (1997) Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature*, **385**, 37-41.
- Rodnina**, M., Savelsbergh, A. und Wintermeyer, W. (1999) Dynamics of translation on the ribosome: molecular mechanisms of translocation. *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 317-333.
- Rodnina**, M. V., Stark, H., Savelsbergh, A., Wieden, H., Mohr, D., Matassova, N. B., Peske, F., Daviter, T., Gualerzi, C. O. und Wintermeyer, W. (2000) GTPase mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. *Biol. Chem.*, **381**, 377-387.
- Rodnina**, M. V. und Wintermeyer, W. (2001) Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 124-130.
- Rother**, M., Resch, A., Wilting, R. und Böck, A. (2001) Selenoprotein synthesis in Archaea. *Biofactors*, **14**, 75-83.
- Rotruck**, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G. und Hoekstra, W. G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, **179**, 588-590.

S

- Sacerdot**, C., Caillet, J., Graffe, M., Eyermann, F., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Springer, M. und Romby, P. (1998) The *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase gene contains a split

- ribosomal binding site interrupted by a hairpin structure that is essential for autoregulation. *Mol. Microbiol.*, **29**, 1077-1090.
- Saiki**, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. und Erlich, H. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook**, J., Fritsch, E. und Maniatis, T. (eds.) (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.
- Sanger**, F., Nicklen, S. und Coulson, A. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Sawers**, G., Heider, J., Zehelein, E. und Böck, A. (1991) Expression and operon structure of the *sel* genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *J. Bacteriol.*, **173**, 4983-4993.
- Schlosser**, A., Nawrot, B., Grillenbeck, N. und Sprinzl, M. (2001) Fluorescence-monitored conformational change on the 3'-end of tRNA upon aminoacylation. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **19**, 285-291.
- Schmid**, G. und Böck, A. (1981) Immunological comparison of ribosomal proteins from archaeobacteria. *J. Bacteriol.*, **147**, 282-288.
- Schmidt**, T. und Skerra, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng.*, **6**, 109-122.
- Schmidt-Eisenlohr**, H., Rittig, M., Preithner, S. und Baron, C. (2001) Biomonitoring of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis* with Trb protein-specific antisera. *Environ. Microbiol.*, **3**, 720-730.
- Schön**, A., Böck, A., Ott, G., Sprinzl, M. und Söll, D. (1989) The selenocysteine-inserting opal suppressor serine tRNA is highly unusual in structure and modification. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 7159-7165.
- Schwarz**, K. und Foltz, C. M. (1957) Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3292-3293.
- Scolnick**, E., Tompkins, R., Caskey, C. und Nirenberg, M. (1968) Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 768-774.
- Selmer**, M., Al-Karadaghi, S., Hirokawa, G., Kaji, A. und Liljas, A. (1999) Crystal structure of *Thermotoga maritima* ribosome recycling factor: a tRNA mimic. *Science*, **286**, 2349-2352.

- Selmer**, M. und Su, X.-D. (2002) Crystal structure of an mRNA-binding fragment of *Moorella thermoacetica* elongation factor SelB. *EMBO J.*, **21**, 4145-4153.
- Silhavy**, T., Berman, M. und Enquist, L. (1984) *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.
- Simon**, I., Zerial, M. und Goody, R. S. (1996) Kinetics of interaction of Rab5 and Rab7 with nucleotides and magnesium ions. *J. Biol. Chem.*, **271**, 20470-20478.
- Simons**, R., Houman, F. und Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, **53**, 85-96.
- Smith**, D. und Johnson, K. (1988) One-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
- Song**, H., Parsons, M. R., Rowsell, S., Leonard, G. und Phillips, S. E. V. (1999) Crystal structure of intact elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli* in GDP conformation at 2.05 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1245-1256.
- Spirin**, A. (1985) Ribosomal translocation: facts and models. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **32**, 75-114.
- Sprang**, S. (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 639-678.
- Stadtman**, T. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 83-100.
- Stark**, H., Rodnina, M., Rinke-Appel, J., Brimacombe, R., Wintermeyer, W. und van Heel, M. (1997) Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome. *Nature*, **389**, 403-406.
- Studier**, F. W. und Moffat, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Suppmann**, S., Persson, B. C. und Böck, A. (1999) Dynamics and efficiency *in vivo* of UGA-directed selenocysteine insertion at the ribosome. *EMBO J.*, **18**, 2284-2293.
- Szkaradkiewicz**, K., Zuleeg, T., Limmer, S. und Sprinzl, M. (2000) Interaction of fMet-tRNA^{fMet} and fMet-AMP with the C-terminal domain of *Thermus thermophilus* translation factor 2. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4290-4299.

T

- Tabor**, S. und Richardson, C. C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1074-1078.

- Tapprich**, W. und Dahlberg, A. (1990) A single base mutation at position 2661 in *E. coli* 23S ribosomal RNA affects the binding of ternary complex to the ribosome. *EMBO J.*, **9**, 2649-2655.
- Thanbichler**, M. und Böck, A. (2002) Selenoprotein biosynthesis: purification and assay of components involved in selenocysteine biosynthesis and insertion in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, **347**, 3-16.
- Thompson**, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 4876-4882.
- Tormay**, P., Sawers, A. und Böck, A. (1996) Role of stoichiometry between mRNA, translation factor SelB and selenocysteyl-tRNA in selenoprotein synthesis. *Mol. Microbiol.*, **21**, 1253-1259.
- Tormay**, P., Wilting, R., Heider, J. und Böck, A. (1994) Genes coding for the selenocysteine-inserting tRNA species from *Desulfomicrobium baculatum* and *Clostridium thermoaceticum*: structural and evolutionary implications. *J. Bacteriol.*, **176**, 1268-1274.
- Torres-Larios**, A., Dock-Bregon, A., Romby, P., Rees, B., Sankaranarayanan, R., Caillet, J., Springer, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B. und Moras, D. (2002) Structural basis of translational control by *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 343-347.
- Turner**, D. C. und Stadtman, T. C. (1973) Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 366-381.

V

- Vachon**, G., Laalami, S., Grunberg-Manago, M., Julien, R. und Cenatiempo, Y. (1990) Purified internal G-domain of translational initiation factor IF-2 displays guanine nucleotide binding properties. *Biochemistry*, **29**, 9728-9733.
- van der Hofstad**, G., Buitenhek, A., van den Elsen, P., Voorma, H. und Bosch, L. (1978) Binding of labeled initiation factor IF-1 to ribosomal particles and the relationship to the mode of IF-1 action in ribosome dissociation. *Eur. J. Biochem.*, **89**, 221-228.
- Veres**, Z., Kim, I. Y., Scholz, T. D. und Stadtman, T. C. (1994) Selenophosphate Synthetase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10597-10603.

- Veres, Z.** und Stadtman, T. (1994) A purified selenophosphate-dependent enzyme from *Salmonella typhimurium* catalyzes the replacement of sulfur in 2-thiouridine residues in tRNAs with selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8092-8096.
- Vestergaard, B.**, Van, L., Andersen, G., Nyborg, J., Buckingham, R. und Kjeldgaard, M. (2001) Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. *Mol. Cell*, **8**, 1375-1382.
- von Ehrenstein, G.** (1967) Isolation of sRNA from intact *Escherichia coli* cells. *Methods Enzymol.*, **12a**, 588-596.
- Vorholt, J.**, Vaupel, M. und Thauer, R. (1997) A selenium-dependent and a selenium-independent formylmethanofuran dehydrogenase and their transcriptional regulation in the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Mol. Microbiol.*, **23**, 1033-1042.

W

- Wagner, A.**, Simon, I., Sprinzl, M. und Goody, R. S. (1995) Interaction of guanosine nucleotides and their analogs with elongation factor Tu from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*, **34**, 12535-12542.
- Walker, H.**, Ferretti, J. A. und Stadtman, T. C. (1998) Isotope exchange studies on the *Escherichia coli* selenophosphate synthetase mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2180-2185.
- Walker, J.**, Saraste, M., Runswick, M. und Gay, N. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, 945-951.
- Weiss Sachdev, S.** und Sunde, R. (2001) Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver. *Biochem. J.*, **357**, 851-858.
- Woodcock, D.**, Crowther, P., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S., Michael, M. und Graham, M. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3469-3478.
- Woody, R.** (1994) Circular dichroism of peptides and proteins. In Nakanishi, K., Berova, N. und Woody, R. (eds.), *Circular dichroism, interpretation and applications*. VCH Publishers, New York, USA, pp. 473-498.

- Wu**, X. und RajBhandary, U. (1997) Effect of the amino acid attached to *Escherichia coli* initiator tRNA on its affinity for the initiation factor IF2 and on the IF2 dependence of its binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1891-1895.
- Wyatt**, J. R., Chastain, M. und Puglisi, J. D. (1991) Synthesis and purification of large amounts of RNA oligonucleotides. *BioTechniques*, **11**, 764-769.

Y

- Yanisch-Perron**, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
- Yanofsky**, C. (2000) Transcription attenuation: once viewed as a novel regulatory strategy. *J. Bacteriol.*, **182**, 1-8.
- Yarchuk**, O., Iost, I. und Dreyfus, M. (1991) The relation between translation and mRNA degradation in the *lacZ* gene. *Biochimie*, **73**, 1533-1541.
- Yarus**, M. und Smith, D. (1995) tRNA on the ribosome: a wobble theory. In Söll, D. und RajBhandary, U. (eds.), *tRNA: structure, biosynthesis and function*. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

Z

- Zavialov**, A., Buckingham, R. und Ehrenberg, M. (2001) A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3. *Cell*, **107**, 115-124.
- Zengel**, J. und Lindahl, L. (1994) Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **47**, 331-370.
- Zhong**, L. und Holmgren, A. (2000) Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J. Biol. Chem.*, **275**, 18121-18128.
- Zinoni**, F., Birkmann, A., Leinfelder, W. und Böck, A. (1987) Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3156-3160.
- Zinoni**, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C. und Böck, A. (1986) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4650-4654.

- Zinoni**, F., Heider, J. und Böck, A. (1990) Features of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4660-4664.
- Zucker**, F. und Hershey, J. (1986) Binding of *Escherichia coli* protein synthesis initiation factor IF1 to 30S ribosomal subunits measured by fluorescence polarization. *Biochemistry*, **25**, 3682-3690.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. August Böck für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die zahlreichen wertvollen Ratschläge und die uneingeschränkte wissenschaftliche Förderung bedanken. Die vielen Freiheiten, die man an seinem Lehrstuhl besaß, und seine Aufgeschlossenheit gegenüber neuen Ideen ermöglichten es mir, meiner Neugier freien Lauf zu lassen und ein breites Spektrum an Methoden kennenzulernen. Neben methodischen Fähigkeiten wusste er aber auch seine Begeisterung für die Forschung weiterzugeben, was die vergangenen Jahre zu einer grundlegenden Erfahrung für mein weiteres Leben machte.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. R. S. Goody für die erfolgreiche Kooperation bei der kinetischen Analyse der Ligandenbindung durch SelB.

Besonderer Dank gebührt auch Bernhard für die gute Zusammenarbeit und die Unmenge an Dingen, die ich von ihm lernen konnte.

Meinen beiden Diplomandinnen Steffi und Anastassia danke ich für ihr Engagement, ihren Wissensdurst und ihr Durchhaltevermögen. Es hat Spaß gemacht, mit Euch zu arbeiten!

Allen Mitarbeitern des Großlabors, allen voran Susanne, Mike und Tobias, danke ich für die vielen hilfreichen Ratschläge, das angenehme Arbeitsklima und die netten Stunden, die wir miteinander in der Teerunde verbracht haben. Armin danke ich für seine Hilfsbereitschaft und Verena für ihre Unterstützung bei der Reinigung von Proteinen. Den „Hamstern“ Ekatherini, Eva, Melanie, Axel und Sakis danke ich für die vielen anregenden Gespräche über Wissenschaft, Gott und die Welt, für großartige Feste und für ihre Freundschaft.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft danken.

Unschätzbar war auch die Arbeit unserer Werkstatt („Ich hätte da wieder etwas für Euch....“), deren Belegschaft Michael, Sigi, Christian und Peter daher ebenfalls mein besonderer Dank gilt. Ebenso möchte ich mich bei Frau Silvestre für ihre Unterstützung in bürokratischen Angelegenheiten und bei den Damen der Spülküche für ihr Entgegenkommen bedanken.

Heidi möchte ich für ihre Freundschaft danken.

Besonders bedanken will ich mich bei meinen Eltern, die durch ihre Freude an der Natur mein Interesse an der Biologie weckten und meine Ausbildung durch ihre ideelle und finanzielle Unterstützung erst ermöglicht haben.

Unendlichen Dank auch an Steffi. Dafür, dass es sie gibt und sie mir immer wieder zeigt, dass es außer der Wissenschaft auch noch andere Dinge gibt, die das Leben lebenswert machen.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Martin Rudolf Thanbichler
Geburtstag: 26. April 1973
Geburtsort: Laufen
Familienstand: ledig
Eltern: Rudolf Thanbichler (Postangestellter)
Agnes Thanbichler (Hausfrau)

Ausbildung:

1979 – 1983 Grundschule in Leobendorf
1983 – 1992 Rottmayr-Gymnasium in Laufen; Abitur
1992 – 1998 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München; Diplom
1998 – 2002 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Department für Biologie I, Sektion Mikrobiologie, der Ludwig-Maximilians-Universität in München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Böck