



Umkodierung des genetischen Codes mit Selenocystein**

Markus J. Bröcker, Joanne M. L. Ho, George M. Church, Dieter Söll* und Patrick O'Donoghue*

Abstract: Der Selenocystein(Sec)-Einbau in Proteine erfolgt in der Natur durch die kotranslationale Umkodierung eines UGA-Stopp-Codons. Diese Studie zeigt nun, dass Sec nicht ausschließlich durch UGA, sondern vielmehr durch 58 aller 64 möglichen Codons kodiert werden kann. Hierbei erlauben 15 Codons nicht nur die vollständige Umkodierung von ihrer ursprünglichen Bedeutung als kanonische Aminosäure zu Selenocystein, sondern sie führen zu Proteinausbeuten, die um mehr als das Zehnfache gesteigert sind. Der hoch effiziente Mechanismus zur Selenocystein-Rekodierung wird anhand zweier Reporterenzyme, der Escherichia-coli-Formiatdehydrogenase und der humanen Thioredoxinreduktase, beschrieben. Da der Selenocysteineinbau an der Position eines UGA-Stopp-Codons zwangsläufig mit translationaler Termination konkurriert, war es umso erstaunlicher, dass die Selenocystein-Einbaumaschinerie während der Umkodierung von Sense-Codons erfolgreich mit den im Überfluss vorhandenen regulären Aminoacyl-tRNAs konkurriert.

Bislang galt es als unmöglich, die ursprüngliche Bedeutung von Sense-Codons zu einer anderen Aminosäure zu rekodieren. Tatsächlich wurde bereits durch die Entdeckung, dass das Codon UGA sowohl Stopp als auch Selenocystein (Sec) bedeuten kann, ein molekularbiologisches Dogma aufgehoben.^[1] Dies erklärt, weshalb die Dekodierung und der kotranslationale Einbau von Sec seit drei Jahrzehnten Gegenstand zahlreicher biochemischer Untersuchungen sind. Darüber hinaus ist Selen ein essenzielles Spurenelement in der menschlichen Ernährung.^[2] In Zellen liegt Selen in Form der Aminosäure Sec in Enzymen vor, welche die zelluläre Redox-Homöostase gewährleisten und so Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies bieten. Infolgedessen sind Defekte in der Sec-Biosynthese und der Funktion von Sec-Enzymen für humane Krankheitsbilder verantwortlich und führen unter anderem

zu Beeinträchtigungen neuronaler Funktionen und der Embryogenese.^[3]

Die Aussicht darauf, Proteine, welche mehrere nichtkanonische Aminosäuren (ncAS) enthalten, synthetisieren zu können, ist eine der Triebfedern dafür, den genetischen Code durch die Umkodierung von Sense-Codons zu erweitern.^[4] Mit Sec und Pyrrolysin finden sich bereits zwei Beispiele für natürliche Erweiterungen des genetischen Codes, welche es erlauben, die zusätzlichen Aminosäuren kotranslational in Proteine einzufügen.^[5] Folglich existiert in Form des Sec-Translationsapparates, der bestimmte UGA-Codons in Sec übersetzt, bereits ein effizientes Umkodierungssystem (Schema 1A). Obwohl Sec nicht in allen Organismen vorkommt und zum Beispiel in Pflanzen, Pilzen und den meisten Archaeen völlig fehlt, findet es sich doch als genetisch kodierte 21. Aminosäure über Organismen aller drei Domänen des Lebens verteilt. In allen Fällen wird Sec auf einer spezifischen tRNA^{Sec} synthetisiert.^[6] Zum kotranslationalen Dekodieren eines UGA-Codons als Sec werden schließlich Sec-tRNA^{Sec}, ein spezialisierter Elongationsfaktor (SelB bei *E. coli*) und ein spezifisches mRNA-Sequenzmotiv (SECIS, Sec-Insertionssequenz) benötigt.

In der vorliegenden Studie haben wir untersucht, inwiefern es möglich ist, den Sec-Translationsapparat von *E. coli* zur sequenzspezifischen Umkodierung von Sense-Codons zu Sec zu verwenden. Bereits in früheren Arbeiten wurde versucht Sec mithilfe des UUA-Leu-Codons^[7] oder des UGG-Trp-Codons^[8] zu dekodieren, wobei im Vergleich zu durch UGA-kodiertem Sec sowohl reduzierte Ausbeuten an Selnoprotein als auch signifikante Verunreinigungen durch den Einbau der entsprechenden kanonischen Aminosäure beobachtet wurden. Um die volle Umkodierungskapazität des Sec-Apparates zu untersuchen, haben wir im Gegensatz dazu einen systematischen Ansatz gewählt, für den wir eine Bibliothek an Mutanten der *E. coli*-Formiatdehydrogenase

[*] Dr. M. J. Bröcker, Prof. D. Söll
Department of Molecular Biophysics & Biochemistry
Yale University
New Haven, CT 06520 (USA)
E-Mail: dieter.soll@yale.edu

Prof. D. Söll
Department of Chemistry, Yale University
New Haven, CT 06520 (USA)

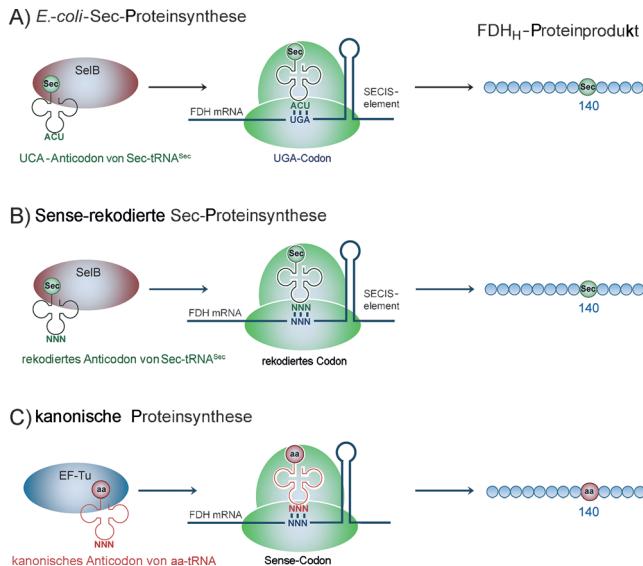
J. M. L. Ho, Prof. G. M. Church
Department of Genetics, Harvard Medical School
Boston, MA 02115 (USA)

Prof. P. O'Donoghue
Departments of Biochemistry and Chemistry, Western University
London, ON N6A 5C1 (Kanada)
E-Mail: patrick.odonoghue@uwo.ca

[**] Wir danken Hans Aerni, Måns Ehrenberg, Ilka Heinemann und Eric Westhof für die aufschlussreichen Anregungen und Diskussionen

im Verlauf der Studie. Weiterhin bedanken wir uns bei Kathryn Stone und Jean Kanyo an der W. M. Keck MS-Einrichtung der Yale University für ihre unschätzbare Hilfe bei der massenspektrometrischen Analyse unserer Proben und bei Zhengrong Wang und Ying Kiu am Kline Geology Laboratory der Yale University für deren Hilfe bei den ICP-MS-Analysen. Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch Forschungsmittel, welche D.S. von der Division of Chemical Sciences, Geosciences, and Biosciences, Office of Basic Energy Sciences of the U.S. Department of Energy (DE-FG02-98ER2031 für die Finanzierung von molekulargenetischen Arbeiten) erhält, vom National Institute of General Medical Sciences (GM22854) sowie vom DARPA-Vertrag N66001-12-C-4211. M.J.B. wurde durch ein Feodor-Lynen-Stipendium für Postdoktoranden der Alexander von Humboldt-Stiftung unterstützt. J.M.L.H. erhält ein Doktorandenstipendium der Harvard Medical School.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201308584> zu finden.



Schema 1. Umkodierung zu Sec. A) Zur Biosynthese des *E.-coli*-Sec-Enzyms Formiatdehydrogenase (FDH_H) von der *fdhF*-mRNA muss das UGA-Stopp-Codon an Position 140 als Sec dekodiert werden. Dazu werden Sec-tRNA^{Sec}, der Elongationsfaktor SelB und ein SECIS-mRNA-Strukturmotiv benötigt. Wird das UGA-Codon in *fdhF* durch eines der 63 weiteren Codons (NNN) ersetzt und mit der komplementären Sec-tRNA^{Sec}_{NNN} koexprimiert, wird die von SelB und dem SECIS-Element vermittelte Umkodierung dieses Codons zu Sec erwartet (B). Gleichzeitig kann es zu Konkurrenz durch native Aminoacyl-tRNAs und EF-Tu kommen, was den Einbau von kanonischen Aminosäuren bedingt (C). In diesem Fall (C) ist das SECIS-Element lediglich Teil der *fdhF*-mRNA und es wird nicht angenommen, dass es die EF-Tu-abhängige Translation beeinflusst.

(FDH_H) und von tRNA^{Sec}-Varianten hergestellt haben. Jede FDH_H -Variante enthielt eines der 64 möglichen Codons, um ein essentielles Sec an Position 140 zu kodieren. In der Zelle ist FDH_H Teil des membranassoziierten Formiat-Wasserstoff-Lyasekomplexes (FHL), welcher unter anaeroben Bedingungen die Fermentation von Formiat zu H_2 und CO_2 katalysiert. Im FHL-Komplex werden dabei Elektronen von Formiat zur Hydrogenase 3 transportiert, welche H^+ zu H_2 reduziert.^[9] Da die enzymatische Aktivität von FDH_H von Sec an Position 140, welches einen Molybdopterin-Kofaktor im aktiven Zentrum koordiniert,^[10] abhängt, lässt sich die Umkodierung eines Sense-Codons zu Sec an Position 140 sowohl in vivo wie auch in vitro leicht mithilfe des Elektronendonors Benzylviologen (BV) verfolgen: Katalytisch aktive FDH_H reduziert BV zu einem dunkelvioletten Farbstoff,^[11] der sich sowohl in lebenden Zellen beobachten als auch bei Verwendung von gereinigtem FDH_H spektroskopisch quantifizieren lässt.

Jede FDH_H -Genvariante ($fdhF_{140}\text{NNN}$) wurde zusammen mit *selA*, *selB* und den *selC*-Mutanten (tRNA^{Sec}_{NNN}), welche das entsprechende Anticodon trugen, in einem *E.-coli*- Δ *selA* Δ *selB* Δ *fdhF*-Deletionsstamm (MH5)^[12] koexprimiert (Schema 1). Die verwendeten Konstrukte lassen die Produktion von zwei verschiedenen Proteinprodukten zu: Da Sec-tRNA^{Sec}_{NNN} und SelB mit der kanonischen Aminoacyl-tRNA_{NNN} (aa-tRNA_{NNN}) und EF-Tu um das Codon an Position 140 konkurrieren, könnten sowohl Sec- FDH_H (Sche-

ma 1 B), FDH_H mit einer kanonischen Aminosäure an Position 140 (Schema 1 C) oder eine Mischung aus beiden Proteinspezies gebildet werden.

Unerwarteterweise zeigte bereits der in vivo FDH_H -Aktivitätstest, dass der Sec-Apparat alle drei Stop-Codons und nahezu alle Sense-Codons zu Sec umkodieren kann (Abbildung 1). Für 58 aller 64 Codons ließ sich Sec-abhängige BV-

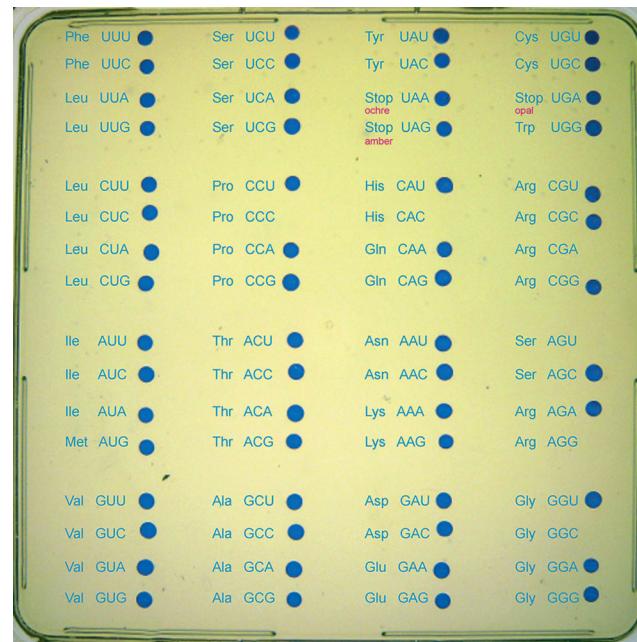


Abbildung 1. Umkodierung des genetischen Codes zu Sec. Auf einer einzigen Agarplatte sind 64 *E.-coli*- $\text{FDH}_\text{H140}\text{NNN}$ -Varianten aufgetragen, welche den gesamten genetischen Code repräsentieren. Ein *E.-coli*- Δ *selA* Δ *selB* Δ *fdhF*-Deletionsstamm wurde jeweils mit *E. coli* *selA*, *selB* und jeder der 64 $fdhF_{140}\text{NNN}$ -Codonmutanten und tRNA^{Sec}_{NNN}-Varianten mit dem entsprechenden komplementären Anti-Codon komplementiert. Die Fähigkeit jedes Stammes, das angegebene Codon als Sec zu rekodieren, wird durch den In-vivo-BV-Reduktionstest angezeigt, bei dem dunkelviolette Zellen auf die Produktion von katalytisch aktiver Sec- FDH_H hinweisen.

Reduktion in Form von Violettfärbung der Zellkolonien mit derselben Intensität wie für das UGA-Wildtyp-Sec-Codon beobachten. Obwohl dieser In-vivo-Aktivitätstest lediglich qualitative Aussagen zulässt, zeigte er zum ersten Mal, dass tatsächlich die meisten Codons umkodierbar sind. Mindestens ein Codon für jede der zwanzig kanonischen Aminosäuren kann zu Sec umkodiert werden. Folglich ist keine aa-tRNA-Spezies in der Lage, vollständig erfolgreich gegen Sec-Einbau zu konkurrieren. Zum Beispiel wurde die Bedeutung aller sechs Leu-Codons, fünf von sechs Ser-Codons und vier von sechs Arg-Codons zu Sec geändert.

Lediglich sechs Codons führten nicht zu FDH_H -Aktivität und konnten somit nicht zu Sec umkodiert werden. Erstaunlicherweise befinden sich vier dieser Codons (CGA, AGU, AGG und GGC) in den NGN-Boxen des genetischen Codes. Sowohl mit SDS-Gelen als auch mit Western-Blots (Abbildungen S1, S2) konnte gezeigt werden, dass vollständiges FDH_H mit einer relativen Molekulmasse von 80 kDa bei allen

Codons mit Ausnahme der beiden Arg-Codons AGG und CGA produziert wurde. Bei beiden Codons trat lediglich ein FDH_H-Produkt von 15.5 kDa auf, was auf eine vorzeitige translationalen Termination an Position 140 hinweist. Diese Beobachtungen zeigen, dass konkurrierende kanonische aa-tRNA nicht nur in der Lage ist, Sec-Einbau an den Codons CGA, AGG, AGU, GGC, CAC und CCC (Schema 1C) vollständig zu verhindern, sondern dass darüber hinaus der Sec-Apparat nach einem bislang unbekannten Mechanismus die Bedeutung von AGG und CGA in Stopp umwandelt.

Während sich mithilfe des FDH_H-in-vivo-Aktivitätstests qualitativ zeigen ließ, dass der Sec-Apparat in der Lage ist, nahezu alle Codons zu Sec zu rekodieren (Abbildung 1), wurden In-vitro-BV-Reduktionstests mit allen 64 unter anaeroben Bedingungen gereinigten, rekombinanten FDH_H-Varianten durchgeführt, um den Grad an Sec-Einbau zu quantifizieren (Abbildungen S1, S2). Zur Berechnung des Sec-Einbaus wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der BV-Reduktion in den rekodierten FDH_H-Varianten mit der von Wildtyp-FDH_H verglichen (Tabelle S1). Obwohl in allen Enzymtests dieselbe Konzentration an gereinigter FDH_H eingesetzt wurde, schwankt die jeweils ermittelte spezifische Aktivität. Dies zeigt an, dass das Verhältnis von katalytisch aktiver Sec-FDH_H zu inaktiver FDH_H mit einer kanonischen Aminosäure an Position 140 für jede FDH_{H140NNN}-Variante variiert. Diese Aktivitätstests bestätigten den Sec-Einbau in FDH_H für die 58 zuvor beobachteten Codons, wobei die Einbauraten zwischen 12 % und 100 % im Vergleich zum Wildtyp-UGA-Codon variierten. Darüber hinaus war die Ausbeute an Seleno-FDH_H für die meisten der umkodierten Sense-Codons im Vergleich zu Sec-Einbau bei UGA oder den anderen Stopp-Codons UAA und UAG deutlich erhöht (Tabelle S2).

Die Gegenüberstellung von Proteinausbeute und spezifischer Aktivität der 64 FDH_H -Varianten (Abbildung 2A) führt zu sechs separaten Gruppen von Codons mit jeweils ähnlichen Umkodierungseigenschaften. Inklusive der drei Stopp-Codons (Abbildung 2A) führten 18 Codons zu nahezu vollständig aktiver FDH_H (ungefähr 100% spezifische Aktivität), was auf eine komplette Umkodierung der ursprünglichen Bedeutung dieser Codons zu Sec hinweist (Gruppen I und II). Während für die beiden Stopp-Codon-Varianten $\text{FDH}_\text{H 140} \text{UAG}$ und $\text{FDH}_\text{H 140} \text{UAA}$ sowohl die spezifische Aktivität als auch die Proteinausbeute nahezu identisch mit dem UGA kodierten Wildtyp- FDH_H waren, wurden im Gegensatz dazu die 15 Codons aus Gruppe II nicht nur mit hoher Spezifität rekodiert, sondern führten gleichzeitig auch zu drastisch gesteigerten Ausbeuten an reinem Seleno- FDH_H . Hier bewegte sich die spezifische Aktivität im Bereich von 86–100% des Wildtyps, einhergehend mit einer sieben- bis dreizehnfachen Steigerung der Sec- FDH_H -Produktion. Von allen FDH_H -Varianten erreichte $\text{FDH}_\text{H 140} \text{ACG}$ (Thr-Codon) die höchste Expression, während die höchste spezifische BV-Reduktionsaktivität, und damit die effektivste Umkodierung, mit $\text{FDH}_\text{H 140} \text{UAC}$ (Tyr-Codon) erzielt wurde.

Mit MS/MS konnte der Sec-Einbau an Position 140 für das Tyr-UAC-Codon bestätigt werden (Abbildung 2B), wohingegen sich kein Tyrosineinbau an dieser Position nachwiesen ließ (Tabelle S2 A,B). Für insgesamt 11 Codons

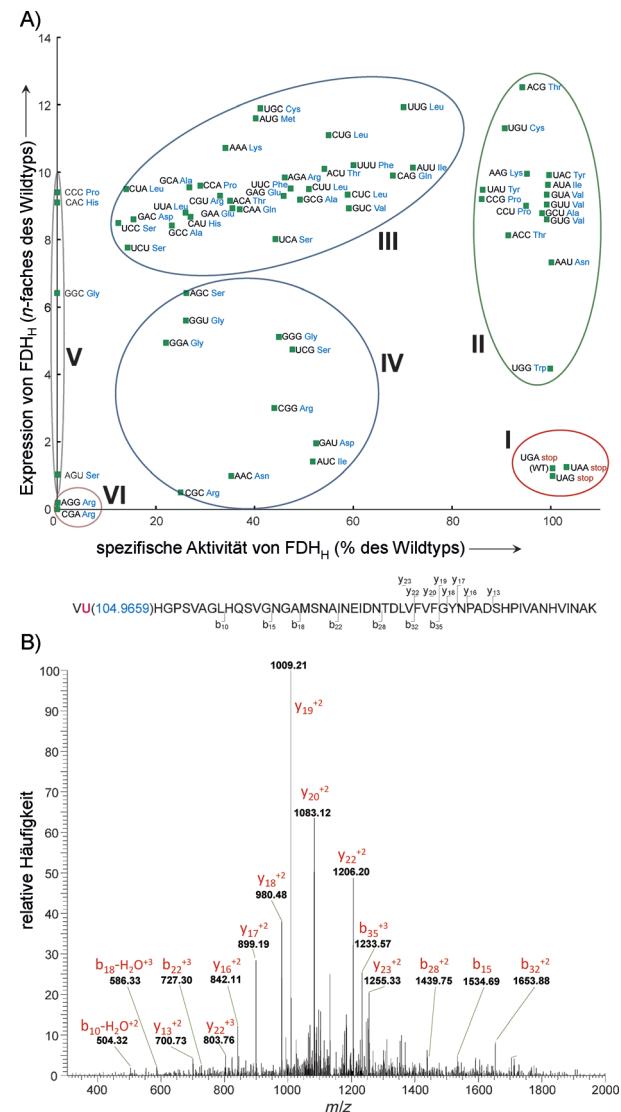


Abbildung 2. Quantifizierung der Umkodierung zu Sec. A) Die relative Ausbeute aller 64 $\text{FDH}_{\text{H}140}\text{NNN}$ -Varianten (Wildtyp $\text{FDH}_{\text{H}140}\text{UGA}=1$) ist gegen die spezifische Aktivität aufgetragen (in Relation zum Wildtyp $\text{FDH}_{\text{H}140}\text{UGA}=100\%$). Genaue Zahlenwerte zu spezifischer Aktivität und Proteinausbeute sowie die Standardabweichungen sind Tabelle S1 zu entnehmen. Die Unterschiede, welche jeweils für die spezifische Aktivität der 64 FDH_{H} -Varianten ermittelt wurden, erklären sich mit dem partiellen Einbau der entsprechenden kanonischen Aminosäure (Tabelle S2). B) Identifizierung des Sec-Einbaus in $\text{FDH}_{\text{H}140}\text{UAC}$ mit MS/MS. Das Spektrum des Sec-Peptids, die Peptidsequenz und die Positionen der identifizierten b- und y-lonen sind dargestellt. (Tabelle S2). Sec (U) wurde mithilfe der Protein-Identifikationssoftware MASCOT als Se-IAN-Cys-Modifikation von Cys nachgewiesen; Selen-Alkylierung ($\text{Se}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$).

wurden per MS/MS ausschließlich Sec-Peptide nachgewiesen (Tabelle S2, Abbildung S3). Um unabhängig davon die hohe Spezifität des Sec-Einbaus zu bestätigen, wurden gereinigte FDH_H-Varianten zusätzlich per induktiver gekoppelter Plasma (ICP)-MS analysiert, was eine exakte Quantifizierung des Selengehalts der untersuchten Proteinproben ermöglichte. Für Wildtyp-FDH_{H140}UGA wurden 99.9 % Sec-Einbau und für die FDH_H-Varianten ¹⁴⁰UAC und ¹⁴⁰UAU 98.3 % be-

ziehungsweise 79.3 % Sec-Einbau ermittelt. Auch für alle anderen mit ICP-MS analysierten FDH_H-Varianten korreliert der Selengehalt direkt mit den spezifischen Aktivitäten (Tabelle S1, S3).

Um Sense-Codons erfolgreich zu Sec umzukodieren, ist die Gegenwart aller Komponenten des Sec-Apparates erforderlich. Diese beinhalten ein intaktes SECIS-Element, SelB und die Synthese von Sec auf einer tRNA^{Sec}-Variante, welche das komplementäre Anticodon zu einem entsprechenden Sense-Codon enthält. Wildtyp-Sec-tRNA^{Sec}_{UCA} ist nicht in der Lage ₁₄₀UAC oder ₁₄₀UAU mit Sec zu dekodieren. Sobald eine Komponente des Sec-Apparates fehlt, wird FDH_H zwar immer noch produziert, ist jedoch katalytisch völlig inaktiv und enthält Tyr an Position 140 (siehe die Hintergrundinformationen, Abbildung S4).

Vierzig weitere Codons zeigten eine weniger eindeutige Umkodierung an Position 140 von FDH_H. Dreißig hiervon (Gruppe III) ermöglichen die Umwandlung der ursprünglichen Bedeutung zu Sec mit 12–72 % Effektivität, wie anhand der spezifischen BV-Reduktion ermittelt wurde (Abbildung 2, Tabelle S1). Hierbei wurden zwei Proteinvarianten produziert: zum einen Sec-FDH_H und zum anderen FDH_H, welches eine kanonische Aminosäure an Position 140 enthält und folglich katalytisch inaktiv ist (Abbildungen S1, S2). Mithilfe von MS/MS konnte der Einbau sowohl von Sec als auch der kanonischen Aminosäure während der Umkodierung von GAA (Glu) gezeigt werden. Weiterhin wurde Sec-Einbau an FDH_H-Position 140 für die drei Codons UUC (Phe), CUC (Leu) und GCC (Ala) nachgewiesen (Abbildung S3). FDH_H-Varianten, die mit Codons aus der Gruppe III produziert wurden, zeigten darüber hinaus signifikant um den Faktor 8–12 erhöhte FDH_H-Proteinproduktionen im Vergleich zu Wildtyp-FDH_H-UGA. Die zehn Codons aus Gruppe IV ergaben nur 22–52 % Sec-Einbau und führten zu einem geringeren Anstieg der FDH_H-Produktion lediglich um das Ein- bis Sechsfache. In Übereinstimmung mit den anfänglichen In-vivo-Ergebnissen (Abbildung 1) erwiesen sich vier Codons (Gruppe V) als nicht zu Sec rekodierbar, wohingegen mit den beiden Arg-Codons CGA und AGG (Gruppe VI) nur wenig FDH_H produziert wurde, deren Translation vollständig frühzeitig an Position 140 abgebrochen wurde (Abbildung 2, S1 und Tabelle S1).

Um die Allgemeingültigkeit dieses neuartigen Sense-Codon-Umkodierungsmechanismus zu untersuchen, wurde das humane Selenoenzym Thioredoxin-Reduktase (TrxR) als Wildtyp mit UGA-kodiertem Sec und als Variante mit UAC rekodiertem Sec produziert (Abbildung 3 A). TrxR ist ein essentielles Selenoprotein und an der Aufrechterhaltung der zellulären Redoxbalance beteiligt.

Sec ist ein wichtiger Bestandteil des aktiven Zentrums von TrxR, da Sec-TrxR widerstandsfähiger gegen oxidative Inaktivie-

zung ist als das katalytisch weniger effiziente Cys-Ortholog.^[13] Da Sec-TrxR die Widerstandsfähigkeit der Zelle gegen reaktive Sauerstoffspezies erhöht, ist die Produktion von Sec-TrxR in Krebszelllinien und dessen Einfluss auf Onkogenese und Metastasierung in lymphatischem Gewebe Gegenstand zahlreicher Studien.^[14] Mittlerweile wird TrxR sogar als Zielprotein für neuartige Krebstherapien beschrieben.^[15] Aus den genannten Gründen ist zu erwarten, dass die effizientere Produktion von Sec-TrxR einen spürbaren Beitrag zum Feld der humanen Zellredoxbiologie leisten wird und Einfluss auf zukünftige therapeutische Entwicklungen haben wird.

Analog zu unseren Beobachtungen bei UAC-kodiertem Sec für FDH_H resultiert TrxR₅₅₀UAC (4.1 mg pro L Kulturvolumen) in vierfach gesteigerter Ausbeute an reinem Selenoprotein im Vergleich zu UGA-kodiertem Wildtyp-TrxR (0.9 mg pro L Kulturvolumen). Die spezifische Aktivität von TrxR₅₅₀UGA und TrxR₅₅₀UAC ist nahezu identisch (Abbildung 3 B). Während ausschließlich Sec-TrxR mit MS/MS nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3 C), wurde der Sec-Einbau in unabhängigen Messungen per ICP-MS auf 98.5 % und 95.1 % für Wildtyp-TrxR bzw. TrxR₅₅₀UAC quantifiziert (Tabelle S3).

Zu diesem Punkt bleibt es unklar, warum manche Codons effizienter rekodiert werden können als andere. Eine plausible Erklärung dafür könnte sein, dass die Häufigkeit, mit der ein Codon im Genom verwendet wird, mit seiner Rekodierbarkeit korreliert. Es wird angenommen, dass weniger verwendete Codons auch mit geringerer Effizienz translatiert werden und somit eher für den Umkodierungsprozess zugänglich wären. Genauso könnte die intrazelluläre Konzentration an aa-tRNA^{Sec}_{UCA}^[16] die Rekodierbarkeit von Codons be-

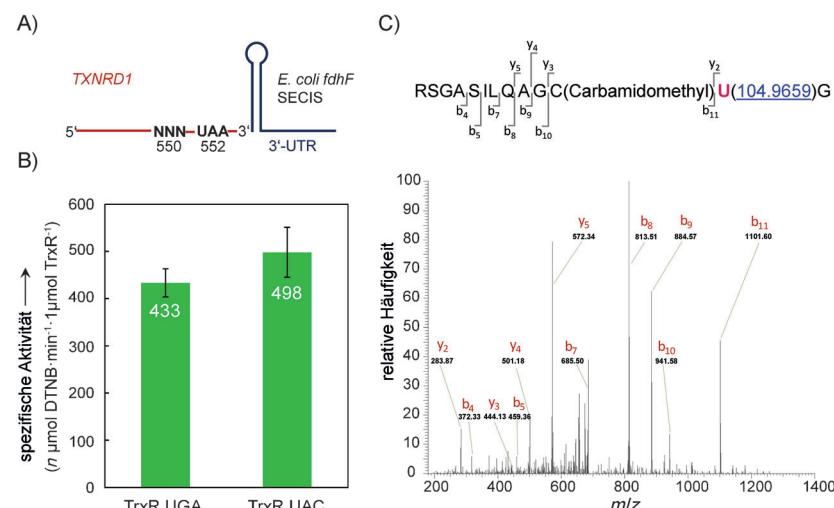


Abbildung 3. Rekodierung des Tyr-Codons UAC zu Sec in humaner TrxR1. A) Schematische Darstellung des genetischen Expressionkonstrukt für humanes TXNRD1. Ein *E. coli* fdhF SECIS-Element ist direkt hinter das UAA-Codon von TXNRD1 in der 3'-nichttranslatierten Region angefügt (UTR). B) In-vitro-Aktivitätstest mit den rekombinanten TrxR₅₅₀UGA und TrxR₅₅₀UAC-Varianten, welche in der Gegenwart von tRNA^{Sec}_{UCA} und tRNA^{Sec}_{GUA} produziert wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung nach vier Messungen an. C) Identifizierung des Sec-Einbaus in TrxR₅₅₀UAC mit MS/MS. Das Spektrum des Sec-Peptids, die Peptidsequenz und die Positionen der identifizierten b- und y-Ionen sind dargestellt. Sec wurde mithilfe der MASCOT-Software als Se-IAN-Cys-Modifikation von Cys nachgewiesen; Selen-Alkylierung (Se-CH₂-CONH₂).

einflussen. Es wäre denkbar, dass sich Codons, welche von selteneren aa-tRNAs erkannt werden, einfacher zu Sec umkodieren lassen. Nichtsdestotrotz konnte weder von der Häufigkeit eines Codons, noch von der Konzentration der komplementären aa-tRNA Spezies ein genereller Zusammenhang zur Rekodierbarkeit eines Codons abgeleitet werden (Abbildung S5). Hinzu könnte kommen, dass aufgrund von möglicherweise variierender Kompatibilität zwischen tRNA-Rückgrat und Anticodonschlaufe nicht alle Sec-tRNA^{Sec}_{NNN}-Spezies mit derselben Effizienz am Ribosom dekodiert werden können. Es ist weiterhin denkbar, dass die Mengen der jeweiligen kanonischen aa-tRNA-Spezies nicht ausreichend unterschiedlich sind, um spürbare Effekte auf die Konkurrenz mit Sec-tRNA^{Sec}_{NNN} auszuüben.

Basierend auf Protein-Kristallstrukturen deutet ein Strukturmodell des an das Ribosom angedockten Sec-Apparates (SelB, Sec-tRNA^{Sec} und mRNA/SECIS-Element) auf intensive Wechselwirkungen zwischen SelB und Regionen der 30S-Ribosomenuntereinheit, welche die Spezifität der mRNA-Dekodierung beeinflusst, hin.^[17] Um hieraus mechanistische Details der Sense-Codon-Umkodierung abzuleiten, werden weiterführende kinetische und strukturbiologische Analysen notwendig sein.

Während der natürlichen Dekodierung von UGA als Sec konkurriert ein translationaler Terminationsfaktor (RF2 bei *E. coli*)^[18] mit dem Sec-Einbau, was zur vorzeitigen Beendigung der Translation von FDH_H führen kann (Abbildung S4). Durch die Kodierung von Sec mit Sense-Codons entfällt die Konkurrenz durch den Terminationsfaktor. Infolgedessen wurden mit Ausnahme von zehn Codons in allen Fällen deutlich erhöhte Ausbeuten an Seleno-FDH_H erzielt. In diesem Zusammenhang bleibt unklar, warum UGA als das natürliche Sec-Codon fungiert, wenn im Gegensatz dazu die meisten anderen Codons zu erhöhter Sec-Protein-Produktion führen. Möglicherweise veranlasst die Knappheit des Spurenelements Selen in der Umwelt die Zelle dazu, den Gebrauch von Sec-Proteinen über die Konkurrenz mit RF2 zu limitieren. Nichtsdestotrotz könnte die Interaktion mit RF2 die Rekodierbarkeit bestimmter Sense-Codons beeinflussen. So ist zum Beispiel das Codon UGG durch seine Ähnlichkeit zu UGA prädestiniert, um von RF2 erkannt zu werden,^[19] womit sich auch erklären ließe, weshalb UGG zu den geringsten FDH_H-Ausbeuten aller Codons aus Gruppe II führte (Abbildung 2).

Wir prognostizieren, dass sich die Kodierung von Sec durch Sense-Codons zukünftig als praktikable und effiziente Methode zur Produktion von Sec-Proteinen etablieren wird. Darüber bietet diese Methode das Potenzial zahlreiche Codons mit anderen ncASs, die für medizinische und biotechnologische Anwendungen interessant sein könnten, als Sec zu rekodieren.

Oftmals unterliegen Proteine, welche an der Pathogenese gravierender humaner Krankheiten wie Krebs oder neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sein können, vielfältigen posttranslationalen Modifikationen (PTM). Hierbei wird angenommen, dass fehlerhaft modifizierte Proteine zu Defekten der intrazellulären Signaltransduktion führen und Aggregate bilden, die der eigentliche Auslöser für Krankheitssymptome sind. Die Synthese von Proteinen, die mehrere ncASs enthalten, ist unerlässlich, um PTMs biochemisch zu charakterisieren und um neuartige Therapeutika, die direkt auf fehlerhaft modifizierte Proteine abzielen, zu entwickeln. Innerhalb der vergangenen zehn Jahre ist es gelungen, durch Umkodierung der drei Nonsense-Codons bereits maximal zwei ncASs zeitgleich sequenzspezifisch in Proteine einzubauen.^[4b] In jüngster Zeit wurden weiterhin Methoden zur In-vitro-Proteinsynthese entwickelt, die Sense-Codon mit doppelter Bedeutung zur Produktion potenziell chemotherapeutischer Peptide, die zwei nc-As enthalten, verwenden.^[20] Darüber hinaus konnten in Minimalmedien in Abwesenheit bestimmter Aminosäuren Proteine mit bis zu drei ncASs hergestellt werden.^[21] Schließlich können durch die genomweite Umkodierung von Stopp-Codons ncASs in Proteine eingebaut werden. Ohne die Kontrolle eines SECIS-Elements führt dies allerdings zum unspezifischen Einbau der ncASs im gesamten Proteom, was unter anderem Effekte auf das Zellwachstum ausüben kann.^[22]

Als Konsequenz hieraus werden, um Proteine mit mehr als 23 verschiedenen Aminosäuren zu synthetisieren, zusätzliche rekodierbare Codons benötigt.^[23] Um dieses Fernziel zu erreichen, besteht die Notwendigkeit, entweder die Spezifität von SelB/SECIS zu modifizieren oder orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetasen dahingehend zu evolvieren, dass sie spezifisch tRNA^{Sec} mit ncASs beladen. Die erfolgreiche Synthese von Cys-tRNASEc durch SepCysS ist ein ermutigender Hinweis dafür, dass dieses Ziel erreichbar ist.^[24]

Die Tatsache, dass der Sec-Translationsapparat in der Lage ist, die Bedeutung von 58 aller 64 Codons zu ändern, zeigt an, dass es für Zellen immanent möglich ist, deutlich mehr Aminosäuren genetisch zu kodieren, als bislang angenommen wurde. Obwohl einige Codons bislang nur schlecht rekodiert werden, besteht doch die Möglichkeit, durch Selektion von Komponenten des Sec-Apparates die Stringenz der Umkodierung weiter zu erhöhen. Aufgrund der vollständigen Rekodierung mancher Codons mit hoher Spezifität ist es vorstellbar, dass auch in der Natur Beispiele existieren könnten, bei denen Sec durch andere Codons als UGA kodiert wird. Dies würde auf die Existenz von bislang unbekannten Sec-Proteinen hinweisen. Tatsächlich wurden mit bioinformatischen Methoden bereits mRNA-Strukturmotive, die SECIS-Elementen ähneln, gefunden. Diese wurden allerdings als evolutionäre Überreste interpretiert und keiner biologischen Funktion zugeordnet.^[25]

Falls weitere mit SECIS-Elementen verwandte mRNA-Motive in der Natur existierten oder sich solche Motive im Labor entwickeln ließen, wäre die Zahl an Aminosäuren, welche in einer Zelle kodiert werden können, im Prinzip unbegrenzt und keinesfalls auf 20 oder 23 beschränkt.

Eingegangen am 2. Oktober 2013
Online veröffentlicht am 25. November 2013

Stichwörter: Genetischer Code · RNA · Selenocystein · Sense-Codon-Umkodierung · Synthetische Biologie

[1] F. Zinoni, A. Birkmann, W. Leinfelder, A. Böck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 3156–3160.

- [2] M. P. Rayman, *Lancet* **2000**, 356, 233–241.
- [3] a) O. Agamy, B. B. Zeev, D. Lev, B. Marcus, D. Fine, D. Su, G. Narkis, R. Ofir, C. Hoffmann, E. Leshinsky-Silver, H. Flusser, S. Sivan, D. Söll, T. Lerman-Sagie, O. S. Birk, *Am. J. Hum. Genet.* **2010**, 87, 538–544; b) S. Seeher, Y. Mahdi, U. Schweizer, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2012**, 13, 337–346.
- [4] a) R. Krishnakumar, L. Prat, H. R. Aerni, J. Ling, C. Merryman, J. I. Glass, J. Rinehart, D. Söll, *ChemBioChem* **2013**, 14, 1969–1972; P. O’Donoghue, J. Ling, Y. S. Wang, D. Söll, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 594–598.
- [5] A. Ambrogelly, S. Paliora, D. Söll, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 29–35.
- [6] J. Yuan, P. O’Donoghue, A. Ambrogelly, S. Gundlapalli, R. L. Sherrer, S. Paliora, M. Simonovic, D. Söll, *FEBS Lett.* **2010**, 584, 342–349.
- [7] M. J. Berry, J. W. Harney, T. Ohama, D. L. Hatfield, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 3753–3759.
- [8] J. Xu, V. Croitoru, D. Rutishauser, Q. Cheng, E. S. Arnér, *Nucl. Acids Res.* **2013**, DOI: 10.1093/nar/gkt764.
- [9] G. Sawers, *Antonie van Leeuwenhoek* **1994**, 66, 57–88.
- [10] J. C. Boyington, V. N. Gladyshev, S. V. Khangulov, T. C. Stadtman, P. D. Sun, *Science* **1997**, 275, 1305–1308.
- [11] M. J. Axley, D. A. Grahame, T. C. Stadtman, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18213–18218.
- [12] C. Aldag, M. J. Bröcker, M. J. Hohn, L. Prat, G. Hammond, A. Plummer, D. Söll, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 1481–1485; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1441–1445.
- [13] G. W. Snider, E. Ruggles, N. Khan, R. J. Hondal, *Biochemistry* **2013**, 52, 5472–5481.
- [14] Y. C. Chen, K. S. Prabhu, A. M. Mastro, *Nutrients* **2013**, 5, 1149–1168.
- [15] J. Lu, A. Holmgren, *Antioxid. Redox Signaling* **2012**, 17, 1738–1747.
- [16] a) H. Dong, L. Nilsson, C. G. Kurland, *J. Mol. Biol.* **1996**, 260, 649–663; b) K. A. Dittmar, M. A. Sorensen, J. Elf, M. Ehrenberg, T. Pan, *EMBO Rep.* **2005**, 6, 151–157.
- [17] S. Yoshizawa, L. Rasubala, T. Ose, D. Kohda, D. Fourmy, K. Maenaka, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, 12, 198–203.
- [18] J. B. Mansell, D. Guevremont, E. S. Poole, W. P. Tate, *EMBO J.* **2001**, 20, 7284–7293.
- [19] a) D. V. Freistroffer, M. Kwiatkowski, R. H. Buckingham, M. Ehrenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 2046–2051; b) J. Sund, M. Ander, J. Aqvist, *Nature* **2010**, 465, 947–950.
- [20] Y. Goto, M. Iseki, A. Hitomi, H. Murakami, H. Suga, *ACS Chem. Biol.* **2013**, DOI: 10.1021/cb400549p.
- [21] S. Leptien, L. Merkel, N. Budisa, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 5576–5581; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 5446–5450.
- [22] I. U. Heinemann, A. J. Rovner, H. R. Aerni, S. Rogulina, L. Cheng, W. Olds, J. T. Fischer, D. Söll, F. J. Isaacs, J. Rinehart, *FEBS Lett.* **2012**, 586, 3716–3722.
- [23] M. J. Lajoie, A. J. Rovner, D. B. Goodman, H. R. Aerni, A. D. Haimovich, G. Kuznetsov, J. A. Mercer, H. H. Wang, P. A. Carr, J. A. Mosberg, N. Rohland, P. G. Schultz, J. M. Jacobson, J. Rinehart, G. M. Church, F. J. Isaacs, *Science* **2013**, 342, 357–360.
- [24] J. Yuan, M. J. Hohn, R. L. Sherrer, S. Paliora, D. Su, D. Söll, *FEBS Lett.* **2010**, 584, 2857–2861.
- [25] Y. Zhang, H. Romero, G. Salinas, V. N. Gladyshev, *Genome Biol.* **2006**, 7, R94.