

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DEPARTMENT CHEMIE
LEHRSTUHL FÜR BIOCHEMIE

Design einer polyspezifischen Pyrrolsyl-tRNA-Synthetase für den Einbau biotinylierter
unnatürlicher Aminosäuren

Adrian Hohl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Matthias Feige

Prüfer der Dissertation

1. Prof. Dr. Michael Groll
2. Prof. Dr. Kathrin Lang

Die Dissertation wurde am 05.10.2017 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.12.2017 angenommen.

Meiner Mutter

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom September 2013 bis September 2017 an dem Lehrstuhl für Biochemie an der Technischen Universität München angefertigt.

Ich möchte meinen Dank an meine Betreuer Prof. Dr. Jörg Eppinger und Prof. Dr. Michael Groll richten, die mir die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglicht und mich in dieser Zeit unterstützt habe.

Außerdem möchte ich mich bedanken:

Bei meinen Arbeitskollegen/innen Malvina Vogler, Anastassja Akal, Dominik Renn, Johannes Fischer, Dr. Michael Ochsenkühn, Dr. Xuechao Liu, Dr. Dinesh N. Sawant, Israa S. Al-Rowahi, Arwa Makki, Rkia Laamarti, Dr. Eva-Maria Huber, Bastian Bräuning, Alois Bräuer für die Unterstützung in allen theoretischen und praktischen Fragen.

Bei meinen Kollaborationspartnern Prof. Dr. Matthias Feige, Prof. Dr. Kathrin Lang und Yonatan Gebremariam Mideksa, insbesondere für die Unterstützung beim Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in humanen Zellen.

Bei Astrid König für ihre guten Ratschläge, die weit über wissenschaftliche Fragestellungen hinausführten.

Bei meinen Freunden und meinem Bruder Alexander Hohl. Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter Dr. Ludmilla Hohl, du warst stets ein Vorbild und Inspiration für mich. Durch deinen unermüdlichen Einsatz und deine Unterstützung hast du diese Arbeit ermöglicht.

Zuletzt möchte ich mich bei Nastia für deine Liebe und deine Unterstützung in den letzten Jahren bedanken. Ein ganz großes Danke geht auch an deine Familie.

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AaRS	Aminoacyl-tRNA-synthetase
Alock	N ^ε -allyloxycarbonyl-L-lysine
Amp ^r	Ampicillin Resistenzgen
APS	Ammoniumpersulfat
AU	arbitrary units
Bock	N ^ε -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-L-lysine
bp	Basenpaare
CFU	colony forming unit
Cm ^r	Chloramphenicol Resistenzgen
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonucleotidephosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Elektronenspray-Ionisation
<i>et. al.</i>	et alli, und andere
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal Bovine Serum
g	Gramm
h	hour
H-Brücke	Wasserstoffbrückenbindung
His6	Hexahistidine
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	kilo Dalton

L; l	Liter
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
M	Molarität
m	milli (10^{-3})
<i>M. Barkeri</i>	<i>Methanosarcina Barkeri</i>
<i>M. Mazei</i>	<i>Methanosarcina mazei</i>
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektroskopie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mTFP1	monomeric teal fluorescent protein
N-terminal	Amino-terminal
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optical density at 600 nm
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAR	Payload-to-antibody
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank
pH	negative dekadischer Logarithmus der H-ionen
PPi	Diphosphat
PTM	Posttranskriptionale Modifikation
Pyl	Pyrrolysine
PyIB	Methylornithin-Synthase
PyIC	Lysin-Methylornithin-Ligase
PyID	Pyrrolysine-Synthase
PyIRS	Pyrrolysyl-tRNA synthetase
<i>py/S</i>	Gen der Pyrrolysyl-tRNA synthetase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAM	S-adenosyl-L-methionin
SUMO	small ubiquitin-related modifier
Tet ^r	Tetracyclin Resistenzgen

Abkürzungen

tRNA	Transfer-RNA
tRNA ^{PyI}	pyrrolysyl-tRNA
U/min	Umdrehungen pro Minute
UAA	Unnatürliche Aminosäure
v/v	Volumen/Volumen
w/v	weight per volume
wt	Wildtype
λ_{em}	Wellenlänge der Emission
λ_{ex}	Wellenlänge der Anregung
μ	mikro (10^{-6})

Zusammenfassung

Die Pyrrolslyl-tRNA-Synthetase (PylRS) und die entsprechende tRNA^{Pyl} werden weithin genutzt, um das Amber-Stopp-Codon in bakteriellen und eukaryotischen Zellen für den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren (UAAs) neu zu definieren. Der Einbau neuer UAAs erfordert jedoch oft einen aufwändigen Engineering-Prozess des PylRS/tRNA^{Pyl}-Paares, der aus mehreren positiven und negativen Selektionszyklen besteht.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung einer schnellen und sensiblen Methode für die Generierung funktioneller PylRS/tRNA^{Pyl}-Paare. Eine PylRS-Mutantenbibliothek wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht, um eine große Anzahl von orthogonalen Varianten für den Einbau von 20 UAAs zu identifizieren. Sequenz-Substrat-Beziehungen dieser Varianten wurden verwendet, um die polyspezifische PylRS-Mutante HpRS zu entwickeln, die besonders gut die Bindung zwischen großen UAAs und der tRNA^{Pyl} katalysiert. HpRS besitzt ein breites Substratspektrum an Lysinderivaten, mit fluorierten, fluoreszierenden und erstmals biotinylierten Seitenketten.

Ausgehend von der HpRS-Sequenz wurde eine zweite Mutantenbibliothek entworfen, um eine optimierte PylRS-Variante für den Einbau von Biotin-Lysin zu identifizieren. Dabei konnte eine verbesserte Inkorporationseffizienz der UAAs Biotin-, d-Desthiobiotin- und 2-Iminobiotin-Lysin durch die entwickelte Variante BioRS erzielt werden. Der Einbau dieser drei Biotin-Analoga erlaubt aufgrund ihrer unterschiedlichen Bindungseigenschaften zu Streptavidin eine Vielzahl biotechnologischer Anwendungen. Um den Nutzen der verschiedenen UAAs darzustellen, wurde Biotin-Lysin in recA eingebaut. Das biotinylierte Protein wurde anschließend aus *E. coli*-Zelllysat isoliert und dessen Interaktionspartner identifiziert. Zusätzlich wurde 2-Iminobiotin-Lysin an einer exponierten Position des Proteins Anbu inkorporiert und die reversible pH-abhängige Bindung der UAA an Streptavidin ausgenutzt um Anbu in einem Schritt zu reinigen. Das BioRS/tRNA^{Pyl}-Paar wurden schließlich verwendet um die Biotinanaloga in ein fluoreszierendes Konstrukt in humanen Zellen einzubauen.

Zusammenfassend ist mit BioRS ein wertvolles Werkzeug für die *in vivo* Biotinylierung von Proteinen in Bakterien- und Säugetierzellen entstanden. Die geringe Größe der UAA-Seitenkette, die strenge Kontrolle über die Einbauposition im Protein und die

verschiedenen Biotin-Analoga eröffnen weitreichende Anwendungen für die hier vorgestellten biotinylierten UAAs in der Biochemie.

Abstract

The pyrrolysyl-tRNA synthetase (PylRS) and the corresponding tRNA^{Pyl} have been widely used to redefine the amber stop codon in bacterial and eukaryotic cells for the incorporation of unnatural amino acids (UAAs). However, the incorporation of new UAAs often requires a cumbersome engineering process of the PylRS/tRNA^{Pyl} pair consisting of repetitive cycles of positive and negative selection.

The present work describes the development of a fast and sensitive method based on fluorescence-activated cell sorting (FACS) for the generation of functional PylRS/tRNA pairs. Starting from a PylRS mutant library, our approach identified a substantial number of orthogonal variants for 20 structural diverse UAAs. Pocket-substrate relationships of these variants were exploited to engineer the polyspecific PylRS variant HpRS, which incorporates particularly well sterically demanding UAAs. HpRS accepts a broad range of lysine derivatives including highly fluorinated, fluorescent and for the first time biotinylated side chains.

Starting from the HpRS sequence, we designed a second mutant library in order to identify an improved variant for the incorporation of biotin lysine and biotin analogs. Here we present a PylRS variant, termed BioRS, which facilitates the incorporation of the three UAAs biotin, d-desthiobiotin and 2-iminobiotin lysine with improved incorporation efficiency over the original HpRS variant. These biotin analogs allow various biotechnological applications, based on their different binding properties to streptavidin.

To highlight the benefit of the different UAAs, we incorporated biotin lysine in recA to isolate the protein from *E. coli* cell lysate and to identify the interaction partners. 2-iminobiotin lysine was incorporated in Anbu and the reversible pH-dependent binding of the UAA to streptavidin was exploited to purify the protein in a single step.

Eventually, we transferred the *in vivo* biotinylation protocol to mammalian cells and genetically incorporated the biotin analogs into a fluorescent protein construct by BioRS. The engineered BioRS offers a valuable tool for the *in vivo* biotinylation of proteins in bacterial and mammalian cells. The small size of the UAA side chains, the strict control over the incorporation position of the protein and the different biotin analogs open up diverse applications in biochemistry.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.2 Pyrrolysin	2
1.3 Pyrrolyl-tRNA-Synthetase (PylRS)	4
1.4 Einbau von unnatürlichen Aminosäuren	7
1.5 Anwendung von UAAs	9
1.6 Biotinylierung	11
1.7 Anwendung von Biotin	13
1.8 Biotin-Alternativen	15
1.9 Gerichtete Evolution	16
2 Zielsetzung	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Unnatürliche Aminosäuren (UAAs)	20
3.1.2 Medium	20
3.1.3 Enzyme	21
3.1.4 Chemikalien	22
3.1.5 Verbrauchsmaterialien/Kits	23
3.1.6 Primer	24
3.1.7 Zellen	25
3.1.8 Plasmide	26
3.1.9 Instrumente	27
3.2 Methoden	28
3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	28
3.2.2 DNA-Isolation	28
3.2.3 Gelextraktion	28
3.2.4 PCR	29
3.2.5 DNA Ligation	30
3.2.6 DNA Restriktion	30
3.2.7 Gibson-Cloning	30
3.2.8 Transformation	30
3.2.9 SDS-PAGE	31
3.2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration	32
3.2.11 Herstellung der Plasmide	32
3.2.12 PylRS Mutatenbibliothek (erste)	34
3.2.13 PylRS Mutatenbibliothek (zweite)	35
3.2.14 Probenvorbereitung für FACS	35
3.2.15 UAA-Einbau durch PylRS	37
3.2.16 Pull-Down von mTFP1	38
3.2.17 Westerblot von mTFP1 aus <i>E. coli</i>	38
3.2.18 recA und Anbu Expression und Pull-Down	39
3.2.19 Auftauen von HEK-293T	39
3.2.20 Kultivierung von Zellen	40
3.2.21 Einbau von biotinylierten UAAs in HEK-Zellen	40

3.2.22 Proteinreinigung von mTFP1	41
3.2.23 Massenspektrometer	42
3.2.24 Protein Sequenzierung durch LC-MS/MS	42
3.2.25 Proteinidentifizierung	43
3.2.26 Homologiemodell der <i>M. barkeri</i> PylRS im Komplex mit Pyrrolysin	44
3.2.27 Homologiemodell der <i>M. barkeri</i> PylRS Mutanten im Komplex mit UAAs	44
4 Ergebnisse	45
4.1 Fluoreszenz als Detektionsmethode	45
4.2 Entwicklung einer UAA-Einbau-Methode	46
4.3 Sequenz-Substrat-Beziehung	54
4.4 Design einer polyspezifischen PylRS Variante	56
4.5 Einbau von biotinylierten UAAs	59
4.6 Einbau von Biotinanaloga	60
4.7 Pull-Down von mTFP1	62
4.8 Pull-Down von recA für die Identifikation von Interaktionspartnern	63
4.9 pH abhängige Reinigung von Anbu	65
4.10 Einbau der Biotinanaloga in HEK-293T-Zellen	68
5 Diskussion	70
5.1 Vorteile von FACS	70
5.2 Etablierung des Screens	71
5.3 Einbau von Biotinanaloga	73
5.4 Fluorierte und Dien UAAs	74
5.5 Ausblick	74
6 Literaturverzeichnis	76
7 Anhang	83
7.1 Codon-Optimierung von HpRS	83
7.2 ESI-TOF Daten	84
7.3 Übersicht aller PylRS Varianten	85
7.4 PylRS Varianten sortiert nach UAAs	88

1 Einleitung

1.1 Das zentrale Dogma der Biologie

Das zentrale Dogma der Biologie wurde 1958 von Francis Crick verfasst und beschreibt den Fluss der genetischen Information von DNA über RNA zum Protein [1]. Die DNA ist eine sehr robuste Struktur und ideal geeignet für die Langzeitspeicherung der genetischen Informationen. Der Doppelstrang garantiert eine Informationssicherung und die chemische Struktur von Desoxyribose, die im Vergleich zur Ribose weniger anfällig für Hydrolyse ist, sorgt für Stabilität. Während der Proteinbiosynthese wird die Information von der DNA in ein neues synthetisiertes Molekül der messenger-RNA (mRNA) transkribiert und zum Ribosom transportiert. Im Wesentlichen unterscheidet sich die RNA zur DNA durch die Bildung eines Einzelstranges dessen Rückgrat aus Ribose aufgebaut ist und durch die Basensubstitution von Thymin mit Uracil. Diese Unterschiede machen die mRNA weniger stabil, spiegeln aber auch deren Funktion als vorübergehender Informationsspeicher wider. Die Proteinbiosynthese findet an den Ribosomen statt, wo die mRNA als Blaupause der ursprünglichen Information der DNA wirkt. Die Translation der mRNA in die Aminosäuresequenz erfolgt in Triplet-Codons, dementsprechend codieren drei Basen der mRNA für eine Aminosäure. Die Translation wird gewöhnlich durch das Triplett AUG mit der Aminosäure Methionin initiiert. Die Aminosäuren binden nicht direkt an die mRNA, sondern werden über die transfer-RNA (tRNA) zum jeweiligen Codon der mRNA geführt. Die tRNA ist für jede Aminosäure einzigartig und bindet mit dem Anti-Codon das komplementäre Codon der mRNA [2]. Folglich werden die Aminosäuren nach der codierten Information auf der mRNA miteinander verbunden und bilden das naszierende Protein. Ein entscheidender Mechanismus ist die korrekte Verknüpfung zwischen der tRNA und der entsprechenden Aminosäure. Funktioniert dieser Prozess nicht präzise, ist das synthetisierte Protein fehlerhaft. Schlüssel-Enzym in diesem Kontrollverfahren ist die Aminoacyl-tRNA-Synthetase (AaRS). Dieses Enzym bindet die entsprechende tRNA und Aminosäure und

katalysiert die Acetylierung zwischen beiden [3]. Dabei ist die AaRS für jede Aminosäure einzigartig. Die meisten Organismen besitzen deshalb 20 AaRS gemäß den 20 Aminosäuren. AaRS sind Multi-Domain-Proteine und tragen grundsätzlich zwei Bindungsstellen, eine für die tRNA und die andere für die entsprechende Aminosäure. Die tRNA wird entweder durch das Anti-Codon oder durch die 3D-Struktur des Akzeptorstammes erkannt [3, 4]. Im ersten Schritt der Verknüpfung von der tRNA mit der Aminosäure wird ATP verbraucht, um die Aminosäure zu einem Aminoacyladenylat zu aktivieren (Abbildung 1). Anschließend wird die aktivierte Aminosäure auf das 3'-Ende der tRNA übertragen. Die geladene tRNA (Aminoacyl-tRNA) trägt letztlich zur Proteinbiosynthese bei.

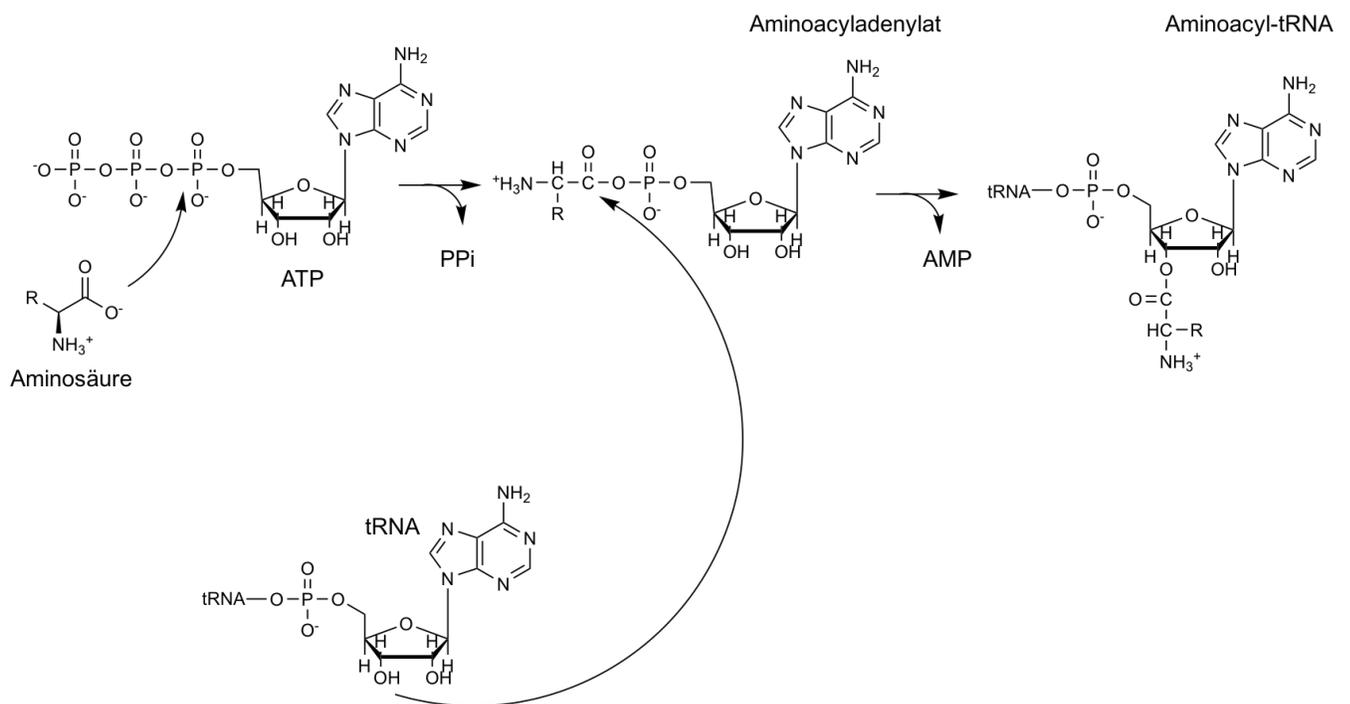


Abbildung 1. Beladung einer tRNA mit einer Aminosäure. ATP, Adenosintriphosphat; PPi , Diphosphat; AMP, Adenosinmonophosphat.

1.2 Pyrrolysin

Die Aminosäure Pyrrolysin wurde 2002 in dem Organismus *Methanosarcina barkeri* (*M. barkeri*) entdeckt [5, 6] und kommt in der Monomethylamin-Methyltransferase vor. Dieses Enzym ist für die Methanogenese in *M. barkeri* verantwortlich. Während fast alle

Proteine in der Natur durch 20 Aminosäuren aufgebaut werden, wird die Aminosäure Pyrrolysin bei der Proteinbiosynthese von wenigen methanogenen Archaeen und Bakterien verwendet [7]. Die *in vivo* Synthese von Pyrrolysin (Pyl) wird von den Enzymen PylB, PylC, PylD katalysiert. Im initialen Schritt wird Lysin durch das Enzym PylB in 3R-Methyl-D-ornithin umgewandelt [8]. Anschließend verbindet PylC die Aminogruppe eines zweiten Lysins mit dem 3R-Methyl-D-ornithin durch den Verbrauch von ATP. Pyrrolysin entsteht schließlich nach der Eliminierung einer Aminogruppe, einer Zyklisierung und Dehydrierung durch PylD [9, 10] (Abbildung 2).

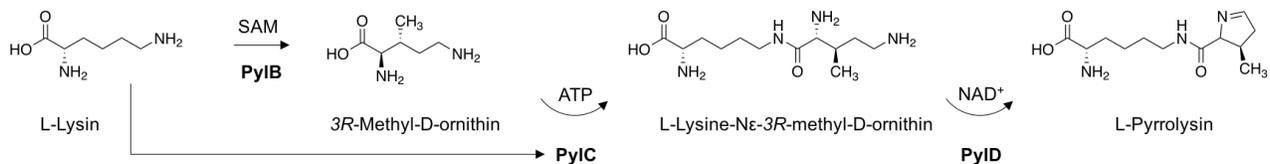


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Pyrrolysin-Biosynthese. SAM, S-adenosyl-L-methionin; ATP Adenosintriphosphat; NAD, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid; PylB, Methylornithin-Synthase; PylC, Lysin-Methylornithin-Ligase; PylD, Pyrrolysin-Synthase.

Pyrrolysin keine posttranslationale Modifikation, sondern wird während der Translation als Aminosäure eingebaut. Daher ist für die Proteinbiosynthese eine spezifische tRNA^{Pyl} und die Pyrrolyl-tRNA-Synthetase (PylRS) erforderlich [11]. Die tRNA^{Pyl} bindet über dessen Anti-Codon das Amber-Codon, welches üblicherweise als Stoppsignal für die Translation in Abwesenheit von Pyrrolysin dient. Die tRNA^{Pyl} besteht aus einer einzigartigen Struktur mit einem Anticodonstamm von sechs Basenpaaren im Gegensatz zu den üblichen fünf und einem kleinen variablen Arm von drei Basen (Abbildung 3). Das Gen *pylS* codiert für die Pyrrolyl-tRNA-Synthetase, welche für die Verknüpfung von Pyrrolysin und der tRNA^{Pyl} verantwortlich ist. Das PylRS/tRNA^{Pyl}-Paar reagiert nicht mit anderen AaRS, tRNAs oder Aminosäuren in der Zelle und wird daher als orthogonal bezeichnet. Dadurch ist es möglich dieses System in andere Organismen zu integrieren ohne Auswirkungen auf die bestehende Proteinbiosynthese zu befürchten [12, 13]. Außerdem ist das Amber-Codon unter den drei Stopp-Codons das seltenste, wodurch die Wirtszelle weniger gestört wird [14, 15].

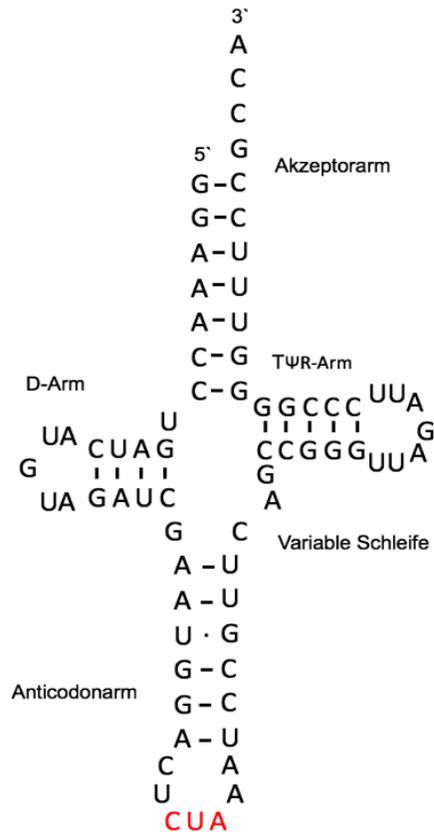


Abbildung 3. Sekundärstruktur der *M. barkeri* tRNA^{Pyl}. Das Anti-Codon ist rot markiert.

1.3 Pyrrolyl-tRNA-Synthetase (PylRS)

PylRS besteht aus einer variable N-terminalen Domäne mit einer tRNA-bindenden Region und einer konservierten C-terminalen katalytischen Domäne (Abbildung 4A) [11, 16]. Während die N-terminale Domäne unlöslich ist und zur Aggregation neigt, wurden mehrere Kristallstrukturen der katalytischen Domäne mit verschiedenen Substraten kristallisiert [17]. Die katalytische Domäne beherbergt eine tiefe hydrophobe Tasche für Pyrrolysin. In der *M. barkeri* PylRS bildet Arginin an der Position 295 eine Wasserstoffbrücke zur primären Carbonylgruppe des Substrates, eine zusätzliche Wasserstoffbrücke erfolgt über Tyrosin an Position 349 zum Pyrrolin Stickstoff und der primären Aminogruppe. Asparagin an Position 311 wird in der Literatur auch als Gatekeeper beschrieben und koordiniert Pyrrolysin über eine Wasserstoffbrücke zur sekundären Carbonylgruppe (Abbildung 4B) [18]. Im Gegensatz zu anderen AaRS zeigt

PyIRS eine enorme Toleranz gegenüber Modifikationen des Substrats. Viele AaRS hydrolysieren falsch geladene tRNAs über einen Kontrollmechanismus um eine hohe Genauigkeit des Aminosäureeinbaus zu gewährleisten [19]. Diese Funktion fehlt der PyIRS und erklärt zusammen mit der relativ unspezifischen hydrophoben Substratinteraktion dessen Substratflexibilität. Ungewöhnlich ist außerdem, dass PyIRS nicht direkt mit dem tRNA^{Pyl}-Anti-Codon CUA wechselwirkt. Mutationsexperimente haben gezeigt, dass Veränderungen im Anti-Codon eine Fehlübersetzung der mRNA verursachen [20]. Trotz der relativ unspezifischen Interaktion von PyIRS und tRNA^{Pyl} arbeitet das System aufgrund der außerordentlichen Struktur der tRNA^{Pyl} und der bemerkenswerten Größe der PyIRS-Bindungstasche orthogonal in den meisten Organismen. Die genannte Orthogonalität und die intrinsische Substrattoleranz machen dieses System zu einem wertvollen Werkzeug für den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren (UAAs) [21, 22].

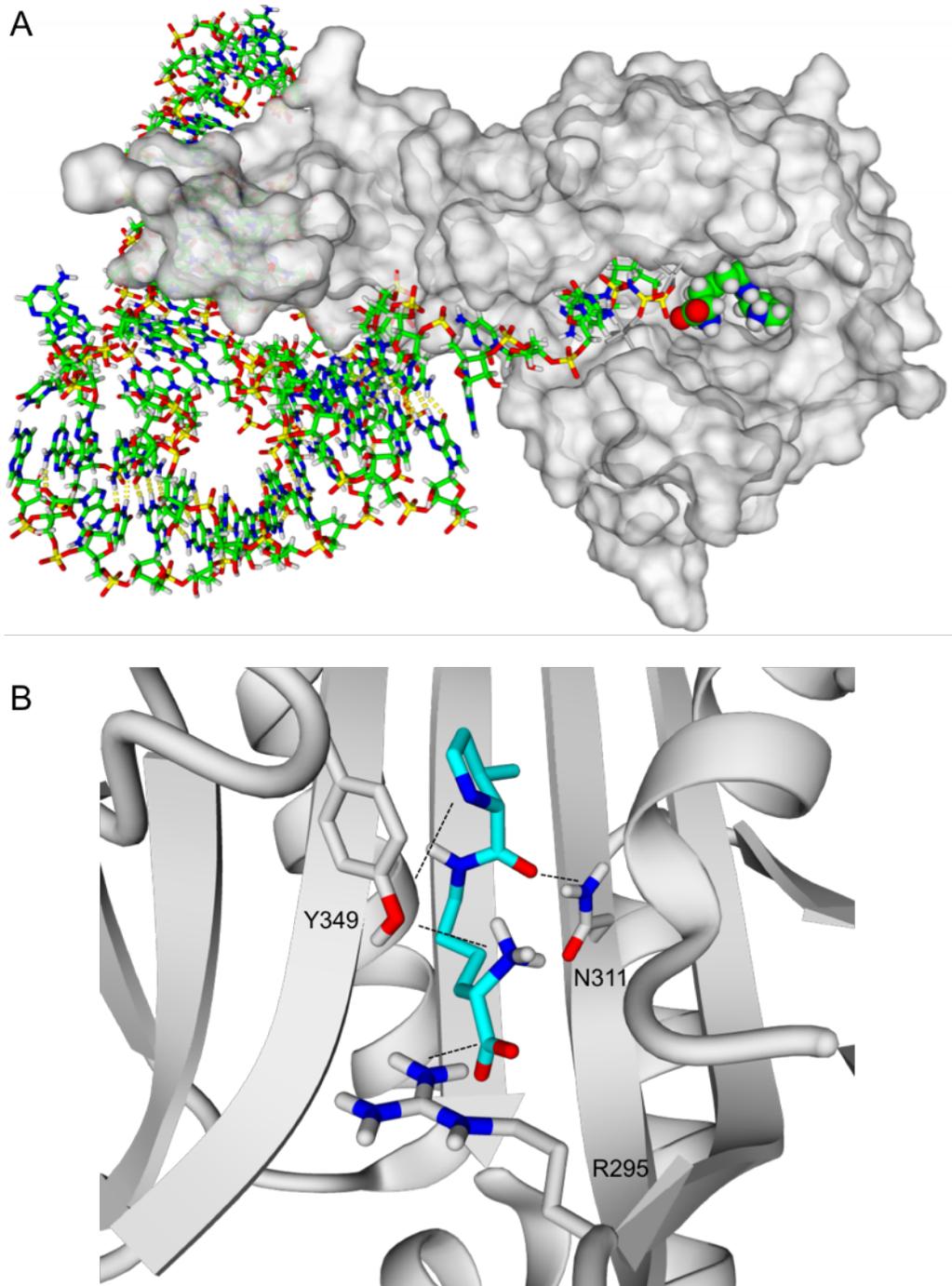


Abbildung 4. A) Wechselwirkung zwischen der *Methanosarcina mazei* PyIRS (graue Oberfläche), dem Substrat Pyrrolysin (Balldarstellung) und der *Desulfitobacterium hafniense* tRNA^{Pyl} (Stickdarstellung). Es handelt sich um eine Überlagerung der Kristallstrukturen PDB: 2ZCE und 2ZNI. B) Homologiemodell der *Methanosarcina barkeri* PyIRS Bindetasche in Komplex mit Pyrrolysin (cyan). Eingezeichnet sind Reste verantwortlich für die Substraterkennung. Wasserstoffbrücken zum Substrat sind mit gepunkteten Linien dargestellt.

1.4 Einbau von unnatürlichen Aminosäuren

Eine enorme Vielfalt an Proteinen ist erforderlich, um alle Aspekte lebender Zellen zu gewährleisten [23]. Da Proteine oftmals nur aus 20 Aminosäuren zusammengesetzt sind, ist regelmäßig die Hilfe von Cofaktoren oder posttranslationalen Modifikationen erforderlich um die gewünschte Funktion zu erreichen. Der Einbau von UAAs ist dabei ein eleganter Ansatz um in Proteine neue Funktionen oder Eigenschaften zu implementieren. UAAs besitzen wie kanonische Aminosäuren die typische Amino- und Carboxylgruppe am alpha-Kohlenstoff. Allerdings kann sich die Seitenkette deutlich von den 20 Standardamino­säuren unterscheiden und damit neue chemische Eigenschaften zum bestehenden genetischen Code beitragen. Das Design einer UAA ist dabei überwiegend durch die Permeabilität der Zellmembran und der Herstellung einer passenden AaRS eingeschränkt. Um einen Engineering-Prozess der AaRS zu umgehen, wurden in früheren Versuchen unnatürliche Aminosäuren mit einer tRNA chemisch verknüpft und zur *in vitro* Proteinsynthese oder zur Injektion in Zellen verwendet [24]. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Proteinausbeute mit dieser Methode sehr gering ist. In einem weiten Experiment wurde eine tRNA chemisch mit aromatischen UAAs beladen und dabei die Seitenkette systematisch vergrößert, um die Toleranz des Ribosoms bezüglich der Größe einer Aminosäure zu analysieren (Abbildung 5) [25, 26].

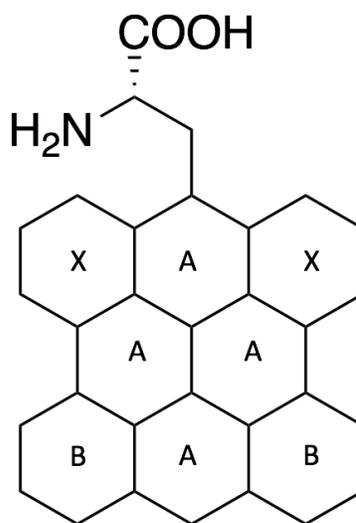


Abbildung 5. Flexibilität des Ribosoms in Bezug auf den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren. Positionen A werden vom Ribosom gut akzeptiert. Positionen B werden möglicherweise akzeptiert und Positionen X werden abgelehnt.

Für die Modellierung von Funktionen und Eigenschaften eines Proteins, hat sich der Einbau von UAAs in Proteine durch spezifische AaRS zu einer bewährten Methodik entwickelt [23, 27]. Heute ist ein erweiterter genetischer Code von über 150 UAAs verfügbar, der Klick-Chemie [28-32], photochemische Reaktivität [33-35], Metallionen-Bindungsstellen [36, 37], oder Mimik von posttranskriptionellen Modifikationen (PTM) beinhaltet [38-41] und für *in vivo* Anwendungen in Prokaryonten [42], Eukaryonten [43], einschließlich Pflanzen [44] und Säugetierzellen bereitstellt [45]. Das zentrale Element eines wirksamen und selektiven UAA-Einbausystems ist ein heterogenes und orthogonales AaRS/tRNA-Paar (Abbildung 6). Als erste AaRs wurde die *Methanococcus jannaschii* Tyrosyl-tRNA-Synthetase für den Einbau von UAAs in *E. coli* verwendet. Die katalytische Domäne von Tyrosyl-tRNA-Synthetase wurden dahingehend mutiert, dass statt des ursprünglichen Substrates Tyrosin eine UAA akzeptiert wurde. Das Anti-Codon der entsprechende tRNA^{Tyr} wurde zu CUA geändert um komplementär an das Amber-Codon zu binden [46]. Das PylRS/tRNA^{Pyl}-Paars wird in den letzten Jahren immer öfter für den Einbau von UAAs verwendet. Dieser Erfolg ist vor allem auf die intrinsische Substratflexibilität [47, 48], die Orthogonalität und die natürliche Bindung des Amber-Codons zurückzuführen [49].

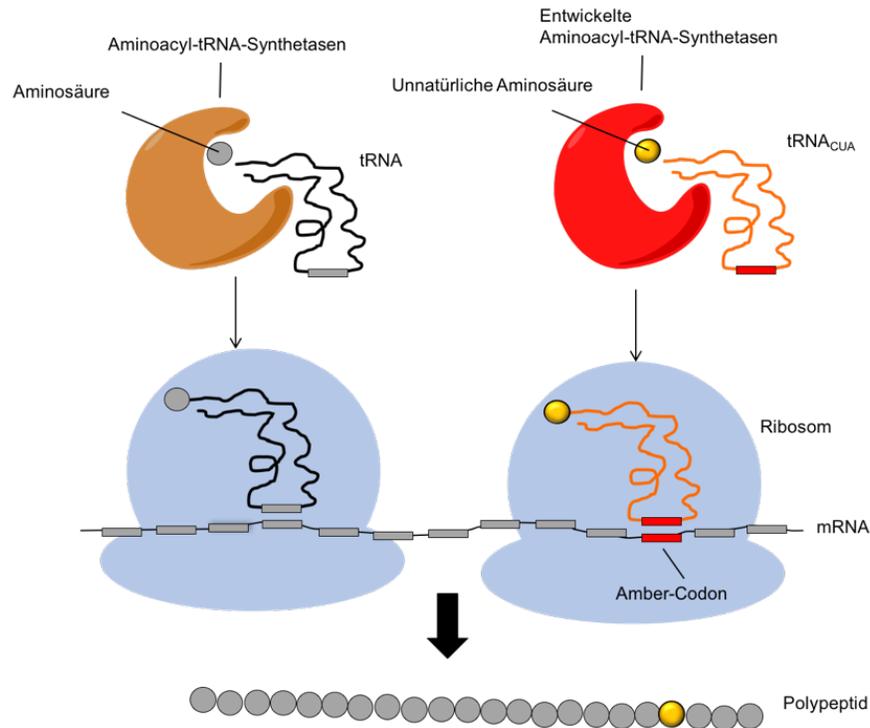


Abbildung 6. Voraussetzungen für den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in ein Protein. Eine UAA wird synthetisiert und muss von der Zelle aufgenommen werden. Eine geeignete Aminoacyl-tRNA-Synthetase muss vorhanden sein, um die UAA zu binden und auf die Suppressor-tRNA_{CUA} zu laden. Die unnatürlichen Aminosäuren werden an der Position des Amber-Codons eingebaut.

1.5 Anwendung von UAAs

Für unterschiedlichste industrielle Anwendungen bietet die Natur eine Vielzahl von Enzymen und Proteinen. Kanonische Aminosäuren bieten dabei nur unzureichende Möglichkeiten für eine positionsspezifische Modifikation, stattdessen werdend ungewollt mehrere Stellen auf einmal verändert und es entsteht ein heterogenes Produkt. Der *in vivo* Einbau von unnatürlichen Aminosäuren stellt ein wichtiges Instrument dar um die Eigenschaft von Proteinen zielgerichtet zu manipulieren. So können strukturelle Informationen gewonnen, Proteinfunktionen verändert, oder die Aktivität kontrolliert werden [50, 51].

UAAs bieten die einmalige Möglichkeit, bioorthogonale Reaktivität einzuführen (Abbildung 7). Dadurch können Proteine positionsspezifisch markieren oder

immobilisiert werden [52]. Insbesondere kupferfreie Klickreaktionen wurden verwendet, um Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren und somit zu lokalisieren [28, 31, 53, 54]. Diese Reaktionen sind bioorthogonal und werden von einem gespannten Ring angetrieben, um eine toxische Nebenwirkung vom Kupfer zu vermeiden. Fluoreszierende UAAs können auch direkt in das Protein eingebaut werden, so wurden Cumarin-, Dansyl- und Naphtylderivate genetisch in Proteine eingefügt und für Moleküldynamikstudien eingesetzt [55]. Die Anwendung von zwei verschiedenen Fluorophoren ermöglichte die Berechnung von Abständen über Fluoreszenz-Resonanz-Energieübertragung (FRET) [56]. Die extrem kleinen Radien der Fluorophore verbessern die Auflösung deutlich.

Antikörper haben einen enormen Einfluss auf Forschung und Medizin. Eine unspezifische Konjugation von Antikörpern kann für *In-vitro* Anwendungen ausreichend sein. Allerdings müssen therapeutische Antikörper höhere Qualitätsstandards erfüllen, weil die exakte Position der Modifikation und das Ladung-zu-Antikörper-Verhältnis die Wirksamkeit und die Pharmakokinetik des Antikörpers drastisch beeinflussen können [57-59]. Folglich müssen Stöchiometrie und Position einer Modifikation kontrollierbar sein, um Produktvariabilität zu vermeiden. UAAs können hierbei verwendet werden um homogene Antikörper-Wirkstoff-Konjugate zu produzieren [60-63].

In einem anderen Anwendungsfeld wurden fluorierte UAAs aufgrund der hohen Empfindlichkeit und der Abwesenheit in der Biologie in NMR-Studien eingesetzt. Dabei wurden die UAAs als molekulare Sonden für ¹⁹F-NMR-Studien zur Detektion von Ligandenbindungen eingesetzt. [64].

PTM können mit UAAs zielgenau integriert werden, um die Auswirkungen auf die Proteinfunktion zu untersuchen. So wurde zum Beispiel durch den Einbau der UAA Acetyl-Lysin die Herstellung von naturidentisch Histonen ermöglicht [39]. Andere Modifikationen wie Propionyl, Butyryl oder Succinyl können auch mit UAAs adressiert und ihre biologischen Funktionen enthüllt werden [65, 66]. Phosphoserin tritt natürlich in Folge der Veresterung von Serin und Phosphorsäure durch Kinasen auf. Dieses PTM trägt zu Protein-Protein-Wechselwirkungen bei. Der Einbau der UAA Phosphoserin wurde genutzt, um die Auswirkungen auf Proteinfunktionen zu untersuchen [67, 68].

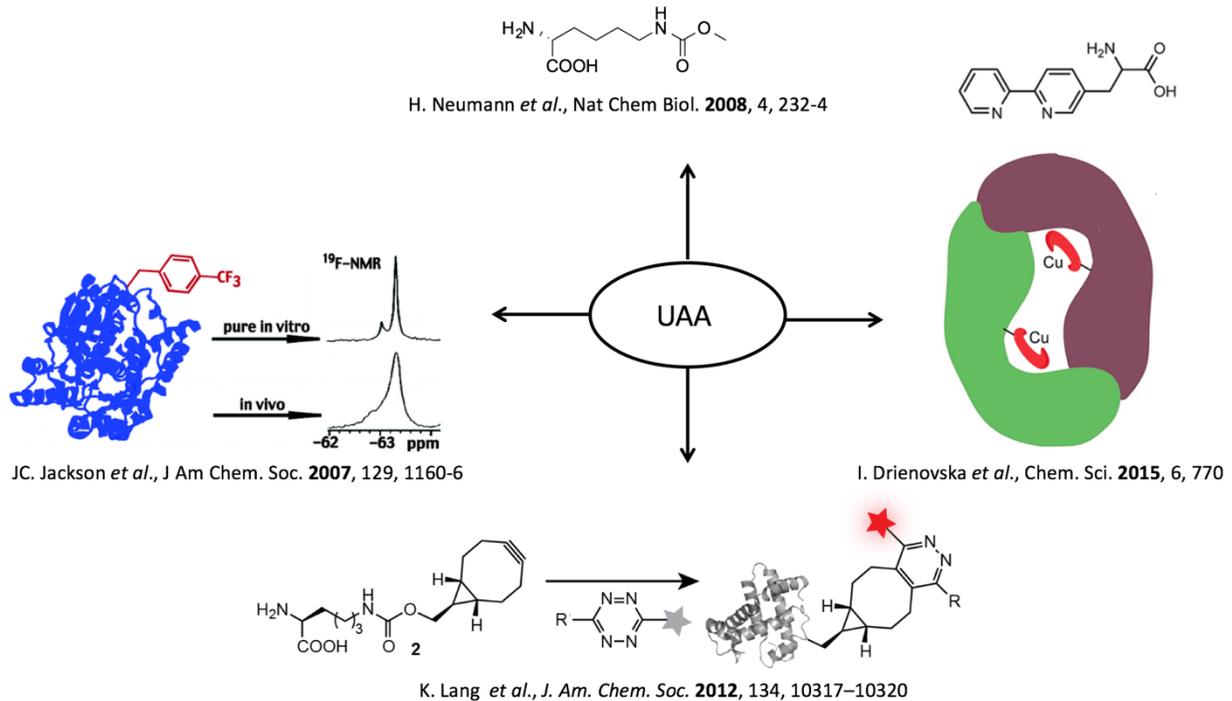


Abbildung 7. Anwendungsbeispiele für UAAs. Oben: posttranskriptionelle Modifikation; Recht: Metalloenzym. Links: NMR-Studie; Unten: Click-Chemie.

1.6 Biotinylierung

Biotin wurde als essentielle PTM in Carboxylasen für die CO₂-Fixierung gefunden. Dabei wird Biotin an die ε-Aminogruppe eines spezifischen Lysinrestes durch die Biotinprotein-Ligase kovalent verknüpft [69]. Das spezifische Lysin wird meist von der Konsensussequenz Ala-Met-Lys-Met flankiert. Hier dient Biotin als CO₂-Shuttle, das zwischen verschiedenen Untereinheiten der Carboxylase schwingt. Der intermediäre Carboxybiotin-Komplex ist mit einer Halbwertszeit von 100 min bei pH 8 sehr stabil [70, 71]. Neben der essentiellen Funktion als Cofaktor besitzt Biotin eine der höchsten Affinitäten in der Biologie zu Streptavidin (10⁻¹⁴ M) [72]. Daher wurde die Biotinylierung für viele biologische Anwendungen verwendet und bietet Vorteile gegenüber Immunoaffinitätsmethoden [73, 74]. Die hohe Affinität zu Streptavidin ermöglicht stringente Waschbedingungen während der Proteinreinigung und damit einen geringen Hintergrund von unspezifischen Wechselwirkungen. Die *in vivo* Biotinylierung wird durch eine endogene Biotin-Ligase oder häufiger durch die *E. coli* Biotin-Ligase BirA

durchgeführt [75]. Allerdings ist für die Biotinylierung eine Erkennungssequenz in Form des Akzeptorpeptid erforderlich, die an das gewünschte Protein fusioniert wird [76, 77]. Das 15 Aminosäuren lange Akzeptorpeptid wird üblicherweise am N-, C-Terminus oder in einer internen Loop integriert [76]. In Gegenwart von Biotin und ATP wird die Biotinylierung an dem spezifischen Lysin mit einer Ausbeute von 85-95% katalysiert.

Die fast irreversible Interaktion von Biotin zu Streptavidin bietet kaum Möglichkeiten ein biotinyliertes Protein vom Streptavidin zu lösen. Soll hingegen ein funktionales Protein wieder vom Streptavidin getrennt werden, steht eine breite Palette von kommerziellen Biotinylierungsreagenzien für die *in vitro* Markierung eines Zielproteins zur Verfügung. Zum Beispiel zeigen 2-Iminobiotin und Streptavidin eine pH-abhängige Affinität, so dass die Proteinelution unter relativ milden Bedingungen zustande kommt. Während 2-Iminobiotin bei basischem pH-Wert fest an Streptavidin bindet, fällt die Affinität bei pH 4 erheblich ab [78].

In Fällen, in denen das Zielprotein keine pH-Änderungen erlaubt, ist ein Biotin-Analogon mit einer intrinsischen niedrigen Affinität zu Streptavidin erforderlich. Der nicht schwefelhaltige Biotinvorläufer d-Desthiobiotin bindet nahezu mit gleicher Spezifität, aber weniger stark an Streptavidin (10^{-13} M kDa). Daher kann die Elution des Zielproteins unter physiologischen Bedingungen durch Zugabe eines Überschusses an Biotin erreicht werden (Tabelle 1) [79].

	Biotin	2-Iminobiotin	d-Desthiobiotin
K_d [mol/l]	10^{-14}	10^{-14} bei pH 11-12 < 10^{-3} bei pH 3-4	2×10^{-13}
Elution	Irreversibel	Saurer pH	Biotin
Anwendung	Pull-Down	Reinigung	Reinigung

Tabelle 1. Eigenschaften der Biotinanaloga

Der Einbau einer biotinylierten UAA würde die Notwendigkeit eines Akzeptorpeptids unnötig machen. Allerdings bleibt die Entwicklung einer spezifischen AaRS für biotinylierte UAAs bis heute ein Hindernis. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurde Biocytin chemisch einer tRNA zugesetzt und *in vitro* eingebaut oder in Zellen injiziert. Der erfolgreiche Einbau zeigte die Fähigkeit des Ribosoms, diese Struktur zu tolerieren [80, 81].

In einem alternativen Ansatz kann Biotin durch Synthese des gesamten Proteins unter Verwendung von Fmoc- oder Boc-Schutzgruppen eingeführt werden [82]. Allerdings weichen chemisch synthetisierte Proteine häufig zumindest geringfügig von natürlichen Äquivalenten ab, da während der zellulären Proteintranslation die Faltung in der Regel durch Helferproteine begleitet wird. Dadurch ist die Biotinylierung durch chemische Synthese auf Peptide mit weniger als 150 Aminosäuren beschränkt.

1.7 Anwendung von Biotin

Die starke Affinität von Streptavidin zu Biotin und die hohe Thermostabilität des Komplexes von 112 °C sind ideal für viele biochemischer Anwendungen (Abbildung 8). Zum Beispiel ist Streptavidin-Biotin eine attraktive Plattform für künstliche Enzyme. Die Arbeitsgruppe um Ward entwickelte Metalloenzyme durch eine Biotin-Verankerungstechnik [83]. Dabei wird ein biotinyliertes Metallzentrum in der Streptavidin-Tasche verankert. Streptavidin bildet eine chirale Umgebung um das Metallzentrum und begünstigt dadurch eine bestimmte Koordination des Substrates, was zu einer enantioselektiven Reaktion führt. Eine weitere Anwendung von Biotin-Streptavidin ist die *in vivo* Lokalisation von Molekülen in der natürlichen Umgebung um Funktion oder Interaktionspartner zu untersuchen. Die biotinylierten Proteine werden durch Streptavidin mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert [84]. Eine Strategie zur Identifizierung von Interaktionspartnern besteht darin, eine Biotin-Ligase an ein bestimmtes Protein zu fusionieren und das Akzeptorpeptid an den potentiellen Interaktionspartner anzubringen. Wenn beide Proteine wechselwirken, wird das Akzeptorpeptid biotinyliert und das Protein kann mittels Streptavidin isoliert und analysiert werden [85]. Eine weitere wichtige Anwendung ist die Affinitätsreinigung [86]. Besonders die Charakterisierung von schwer zu reinigenden Proteinen kann von diesem Ansatz profitieren.

Die hohe Affinität von Streptavidin-Biotin macht es zu einem vielversprechenden Werkzeug für neuartige Sensoren oder der positionsspezifischen Immobilisierung. So wurde zum Beispiel eine biotinyliertes Proteins an einen mit Streptavidin beschichteten Sensorchip immobilisiert. Anschließend wurde die Interaktionsdynamik mit anderen

Molekülen durch Oberflächenplasmonresonanz verfolgt [87]. Das Markieren eines Proteins mit 2-Iminobiotin oder d-Desthiobiotin ermöglicht durch die schwächere Interaktion zu Streptavidin das Recycling der Sensorchips, wodurch die Koste deutlich reduziert werden [78, 79]. Antikörper sind eines der wichtigsten therapeutischen Proteine. Unmodifizierte Antikörper haben allerdings in der Krebstherapie nicht den erwünschten Effekt. Deshalb werden oft zytotoxische Moleküle mit Antikörpern verbunden um die Wirksamkeit einer Antikörpertherapie zu erhöhen. So wurde ein monoklonaler biotinylierter Antikörper gegen einen Darmkrebs in Mäuse injiziert. In einem zweiten Schritt wurde radioaktiv markiertes Streptavidin injiziert und spezifisch an das Biotin des Antikörpers gebunden was eine gezieltere Strahlenbelastung zur Folge hatte [88, 89].

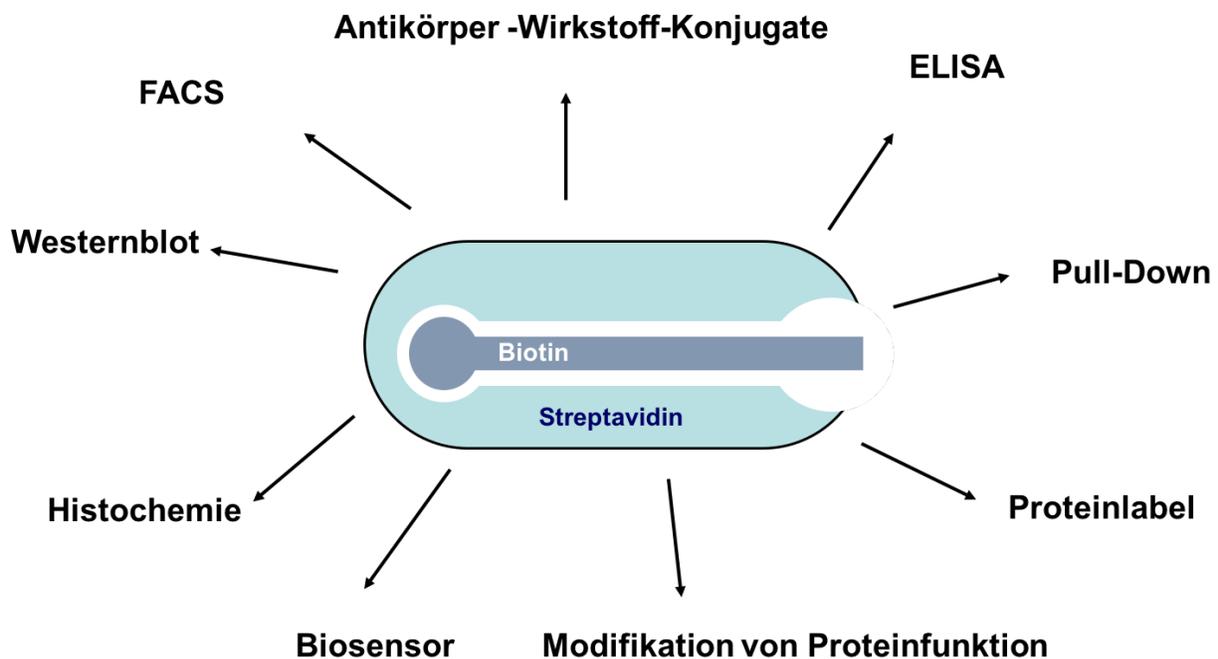


Abbildung 8. Anwendungsmöglichkeiten Biotin-Streptavidin-Interaktion.

1.8 Biotin-Alternativen

Verschiedenste Methoden wurden im Laufe der Zeit für die Proteinreinigung entwickelt, dabei gehören Affinitäts-Tags zu der am häufigsten verwendeten Technik. Das entsprechende Protein wird mit einer Sequenz fusioniert, die zu einer bestimmten Matrix eine Affinität aufweist und dadurch gereinigt werden kann. Eine der ersten Affinitäts-Tags war Protein A, diese hat eine hohe Affinität zu der konstanten Region von Immunglobulin G [90]. Das Polyhistidin-Affinitäts-Tag (His-Tag) ist weit verbreitet und umfasst zwei bis zehn aufeinanderfolgende Histidin-Reste. His-Tags wurden erstmalig für die Reinigung der Galactose-Dehydrogenase über eine Metallmatrix im Jahre 1991 genutzt [91]. Seitdem gehört das His-Tag zu den am verbreitetsten Proteinreinigungsmethode in der Biologie. Die Proteinelution wird über eine ansteigende Imidazolkonzentration erzielt. Die geringe Größe und Ladung des Tags beeinflusst das Fusionsprotein kaum.

Eine weitere Affinitätssequenz der Strep-Tag enthält acht Aminosäuren und binden an Streptavidin, allerdings ist die Affinität wesentlich geringer als im Fall von Biotin [92]. Deshalb kann die Elution durch die Zugabe von d-Desthiobiotin oder Biotin unter physiologischen Bedingungen erreicht werden. Eine Vielzahl von Affinitäts-Tags mit unterschiedlicher Länge und Eigenschaften wurden bisher entwickelt. Aus diesem Grund ist es wichtig Vor- und Nachteile jedes Tags vor dessen Einsatz in einem Experiment abzuwägen.

Neben Tags sind Antikörper aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität für ein bestimmtes Antigen weit verbreitet. Antikörper sind Polypeptide, die ausschließlich in reifen B-Lymphozyten des Immunsystems produziert werden. Antikörper wurden in einer großen Zahl von Anwendungen eingesetzt, da praktisch gegen jedes Antigen ein Antikörper entwickelt werden kann. Zu den Standardanwendungen zählen Westerblots, Immunpräzipitation oder Immunoassays [93, 94]. Außerdem können Antikörper genutzt werden, um Proteine im Gewebe oder Zellen über Fluoreszenz zu lokalisieren [95]. Auch können ganze Zellen für die FACS-Analyse markiert werden [96].

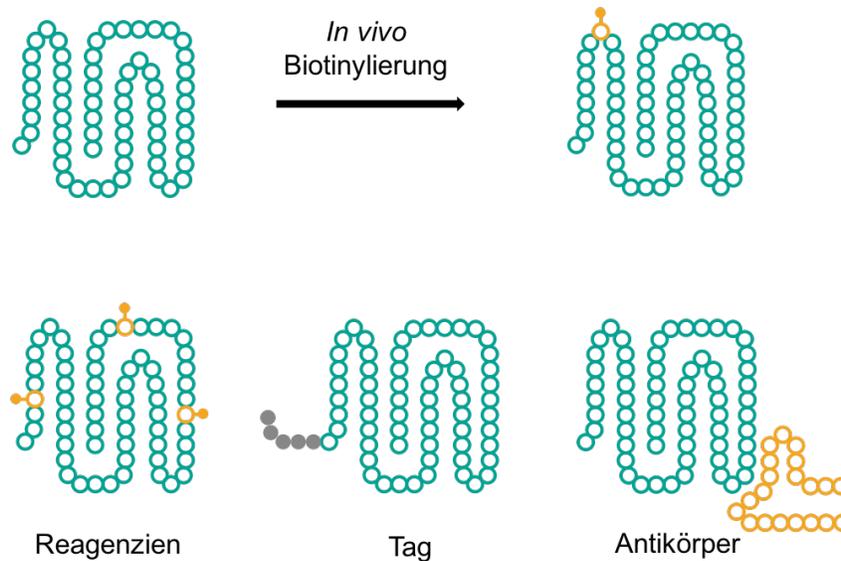


Abbildung 9. Proteinmarkierung durch Biotin. Die *in vivo* Biotinylierung durch eine Biotin-Ligase erfolgt an einem spezifischen Lysin. Alternative Methoden für die Proteinmarkierung sind Reagenzien, Tags oder Antikörper.

1.9 Gerichtete Evolution

Die Gerichtete Evolution ist eine Strategie zur Verbesserung oder Veränderung der Eigenschaften eines Proteins [97, 98]. Im ersten Schritt wird dabei ein Pool von Mutanten des Proteins generiert um genetische Vielfalt zu erzeugen. Im zweiten Schritt werden aus diesen Pool Mutanten mit den gewünschten Verbesserungen gesucht. Auf Basis der positiven Selektion von Mutanten wird erneut eine Mutationsbibliothek erzeugt und der gesamte Prozess wiederholt sich bis keine Verbesserung mehr eintritt.

Dabei ist es unmöglich den gesamten Mutationsraum eines Polypeptids abzudecken, da die vollständige Randomisierung eines typischen Proteins von 100 Aminosäuren zu einer Anzahl von 10^{130} Varianten führen würde. Die Randomisierung eines kleinen Peptids von 10 Aminosäuren würde bereits mit 10^{13} Möglichkeiten die Grenzen bestehender Selektionsverfahren übersteigen. Infolgedessen wird die Gerichtete Evolution in iterativen Schritten durchgeführt. Die Erzeugung einer Mutantenbibliothek kann grundsätzlich zufällig oder gerichtet geschehen.

Die zufällige Mutagenese wird verwendet, wenn die Struktur des Proteins unbekannt ist oder wenn vorteilhafte Mutation nicht in der direkten Umgebung des aktiven Zentrums

gefunden werden sollen [99]. Mutationen werden in das Gen nach dem Zufallsprinzip durch chemische Methoden oder unter Verwendung einer Polymerase mit hoher Fehlerrate eingebaut. Die Mutationsrate liegt dabei in der Größenordnung von 10^{-6} [100]. Mutationen können außerdem durch eine PCR mit erhöhten Magnesiumkonzentration oder der Verwendung von dNTP-Analoga erzeugt werden [101]. Aufgrund des willkürlichen Charakters dieses Ansatzes werden die Bibliotheken jedoch sehr groß und die Verbesserungen sind in der Regel weniger signifikant als bei einem gerichteten Ansatz. Darüber hinaus sind kooperative Effekte von zwei oder drei gleichzeitig auftretenden Mutationen schwieriger zu beobachten.

Fokussierte Mutationsbibliotheken werden durch die gerichtete Mutagenese erzeugt. Dieser Ansatz erfordert Strukturkenntnisse des Zielproteins, um Eigenschaften direkt adressieren zu können [102]. Hier werden Mutationen an genau definierten Positionen mit Primern oder Genblöcken eingebaut [103]. Kritische Positionen können mit allen 20 Aminosäuren oder nur einem Satz von Aminosäuren entsprechend der Eigenschaften randomisiert werden. Die Wahrscheinlichkeit große Veränderungen vorzunehmen und kooperative Effekte zwischen Mutationen zu finden, ist deutlich höher als bei der zufälligen Mutagenese.

Je nachdem welche Eigenschaft eines Proteins verbessert werden soll, muss das Selektionsverfahren angepasst werden. Für die Erweiterung des genetischen Codes müssen AaRS Mutanten die Bindung zwischen einer UAA und einer spezifischen tRNA katalysieren. Dabei müssen die AaRS, die tRNA und die UAA exklusive miteinander interagieren. Die Substratflexibilität bereits bestehender orthogonaler AaRS/tRNA-Paare kann für den Einbau neuer UAAs ausgenutzt werden, um somit den zeitaufwendigen Evolutionsprozess zu umgehen [21]. Die Substratflexibilität beschränkt sich in der Regel auf kleine Veränderungen. Der Einbau von strukturell neuen UAAs erfordert eine *de novo* Evolution eines geeigneten AaRS/tRNA-Paares. Dabei werden großen Mutantenbibliotheken (10^7 - 10^9) erzeugt [104-108] und alle nicht-funktionalen sowie nicht-orthogonalen AaRS-Varianten infolge mehrere positive und negative Selektionsrunden eliminiert [23, 109]. AaRS Mutantenbibliotheken werden am häufigsten auf Agarplatten selektiert (Abbildung 10). Dabei dient ein Antibiotikaresistenzgen mit Amber-Codon oft als Selektionsfilter. Nur wenn eine UAA durch eine bestimmte AaRS eingebaut wird, kann eine vollständige Antibiotikaresistenz

ausgeprägt werden und die jeweilige Zelle überlebt. Als negative Selektion wird das toxische Protein Barnase mit einem Amber-Codon verwendet. Unterdrückt eine entsprechende AaRS das Stoppsignal in Abwesenheit einer UAA, wird die Barnase aktiv und die Zelle stirbt [39, 46, 110]. Allerdings benötigt diese Art der Selektion stringente Wachstumsbedingungen, was zu einem langsamen Wachstum, sowie einer geringen Überlebensrate der Zellen führen kann [39, 46]. Der Selektionsdruck kann dabei nur schwierig verändert werden [111]. Die Durchflusszytometrie bietet als alternatives Verfahren, die Möglichkeit den Selektionsdruck schnell anzupassen. Zusätzlich erfolgt das Zellenwachstum unter optimalen Bedingungen in Vollmedium [112-114].

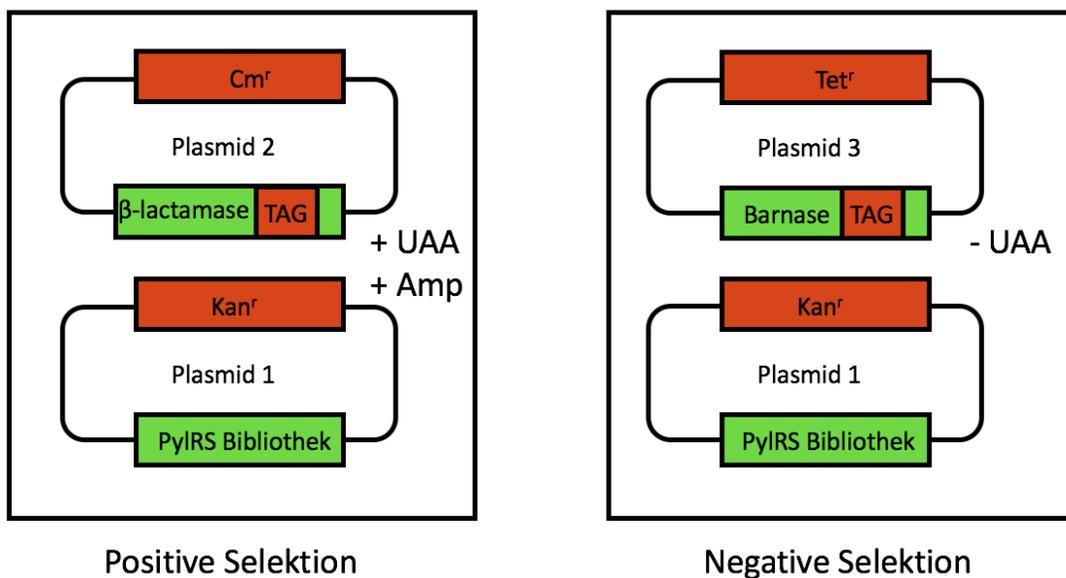


Abbildung 10. Evolution von AaRS-Varianten in *E. coli*-Zellen auf Agarplatten. Insgesamt sind drei Plasmide für die positive und negative Selektion erforderlich. Plasmid 1 codiert für die AaRS Bibliothek, Plasmid 2 codiert für eine β -Lactamase mit einem Amber-Codon (TAG), Plasmid 3 codiert für das toxische Protein Barnase mit einem Amber-Codon (TAG). Cm^r , Chloramphenicol Resistenzgen; Tet^r , Tetracyclin Resistenzgen; Amp^r , Ampicillin Resistenzgen. Die positive Selektion erfolgt in Gegenwart der getesteten UAA auf Agar mit Ampicillin (+AMP) und Plasmid 1, 2. Die negative Selektion der AaRS-Varianten erfolgt in Abwesenheit der UAA und in der Anwesenheit von Plasmid 1, 3. Mehrere iterative Selektionsrunden werden mit zunehmender antibiotischer Konzentration durchgeführt um das System zu verbessern.

2 Zielsetzung

Der Einbau von UAAs mit neuen strukturellen Eigenschaften in ein Protein, erfordert oft einen langwierigen Engineering-Prozess einer AaRS [21]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine Selektionsmethode mit höherer Sensitivität und Effizienz als bestehende Verfahren zu etablieren. Der UAA-Einbau sollte mit einem Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden um mittels Durchflusszytometrie eine schnelle und schonende Selektionsmethode zu etablieren.

Während einige AaRS-Varianten nur ein Substrat akzeptieren, zeigen andere eine gewisse Substratflexibilität. Der Mechanismus hinter diesen unterschiedlichen Eigenschaften wurde kaum untersucht [21]. Die etablierte Selektionsmethode sollte verwendet werden, um eine polyspezifische PylRS-Variante zu entwickeln.

Biotinylierte UAAs würden eine wertvolle Erweiterung des genetischen Codes darstellen, da die starke Interaktion von Biotin zu Streptavidin bereits seit langem für verschiedene biochemische Anwendungen genutzt wird [83, 85]. Allerdings gibt es keine passende AaRS, die die Bildung einer entsprechende Aminoacyl-tRNA katalysiert. Deshalb sollte eine PylRS entwickelt werden, die den Einbau von verschiedenen biotinylierten UAAs ermöglicht.

Letztendlich sollte der Einbau dieser Biotinanaloga in *E. coli*- und humanen Zellen durchgeführt werden. Die verschiedenen Anwendungsbereiche der biotinylierten UAAs sollten an mehreren Modellproteinen demonstriert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Unnatürliche Aminosäuren (UAAs)

UAA 1 (Sigma-Aldrich), UAAs 15-17 (Sirius Fine Chemicals, Bremen, Deutschland) und UAAs 24-27, 30-33, 35 (SUNGYOUNG Chemical Limited, Shanghai, China) wurden von kommerziellen Quellen gekauft. UAA 34 wurde nach Luo *et. al* hergestellt (42). UAA 2-14, 18-23, 28, 29 wurden nach einem modifizierten Verfahren von Li *et al.* (43) hergestellt.

3.1.2 Medium

LB medium

Peptone	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0.5 % (w/v)
NaCl	0.5 % (w/v)
Für Platten: Agar	2 % (w/v)

SOC medium

Peptone	2 % (w/v)
Hefeextract	0.5 % (w/v)
MgSO ₄	10mM
NaCl	10mM
KCl	2.5mM
Glucose	20mM

M9 medium

Na ₂ HPO ₄	48 mM
----------------------------------	-------

KH ₂ PO ₄	22 mM
NaCl	9 mM
NH ₄ Cl	19 mM
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0.1 mM
Glucose	0.4 % (w/v)

10 x UAA Induktionsmedium

10 mM IPTG
 2% Arabinose
 20 mM UAA
 In LB medium

Konditioniertes Medium

Konditioniertes Medium wurde verwendet, um die Überlebensrate von Zelle nach FACS zu verbessern. Um konditionierte Medien zu erzeugen, wurden *E. coli* BL21-Kulturen, die in LB (OD₆₀₀ ~ 1,0) gezüchtet wurden, bei 8000 g, 4 ° C für 20 min zentrifugiert und der Überstand wurde durch einen 0,22 µm Cellulosefilter (Millipore, Bedford, MA) filtriert.

3.1.3 Enzyme

ApaI	New England Biolabs
BglII	New England Biolabs
DpnI	New England Biolabs
HindIII	New England Biolabs
NcoI	New England Biolabs

NdeI	New England Biolabs
NheI	New England Biolabs
PciI	New England Biolabs
Phusion® DNA Polymerase	New England Biolabs
SacI	New England Biolabs
Sall	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
XbaI	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs
Trypsin	Sigma-Aldrich
Chymotrypsin	Sigma-Aldrich
SUMO Protease	Fisher Scientific

3.1.4 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Merck
2-Propanol	Fisher Scientific
Agarose	Biozym
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Biocytin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Fisher Scientific
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth
EDTA-freier Protease-Inhibitor	Roche
Ethanol 96%	Fisher Scientific
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich
Hepes	Sigma-Aldrich

HRP-Substrat	Merck
Imidazol	Abcr
IPTG	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
L-Arabinose	Sigma-Aldrich
LB Agar (Lennox)	Sigma-Aldrich
LB-Medium (Lennox)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Acros
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Methanol	Sigma-Aldrich
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth
Natriumhydroxid	Fisher Scientific
Natriumphosphat-dibasisches Dihydrat	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid	Carl Roth
Salzsäure (37%)	VWR
Tetracyclin-Hydrochlorid	Carl Roth
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Sigma-Aldrich
Triton-X	Fluka
Trypton / Pepton aus Casein	Carl Roth

3.1.5 Verbrauchsmaterialien/Kits

Amicon 10 KDa	Millipore
8-Well- μ -Slides	Ibidi
96-well Platte (schwarz)	Thermo Fisher Scientific
96-well Platte (transparent)	Thermo Fisher Scientific
Cellulosefilter	Millipore

Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Invitrogen
Einwegküvetten UVette®	Eppendorf AG
Electroporation cuvettes 1mm	Carl Roth
Falcon tube 15 mL	Sarstedt
Gibson Assembly® Cloning Kit	New England Biolabs
His SpinTrap	GE Healthcare
HisTrap HP Ni-NTA column	GE Healthcare
HRP substrate Immobilon	Merck
PageRuler™ Plus Prestained Protein	Fisher Scientific
Ladder, 10 to 250 kDa	
PCR tubes 0.2 mL	Sarstedt
peqGOLD DNA Ladder Mix (100-10,000 bp)	Peqlab
Plasmid Miniprep Kit	Peqlab
PVDF membrane	Merck
QuikChange Lightning	Agilent
QuikChange Multi Site-Directed	Agilent
Mutagenesis	
Transparent 96 well plate	Sigma-Aldrich
Zip-Tip	Millipore

3.1.6 Primer

Alle Oligonukleotide wurden von Integrated DNA Technologies hergestellt und in ddH₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/μL verdünnt. Die Arbeitskonzentration der Primer betrug 10 pmol/μL.

Primer	Sequenz 5' → 3'
L1	CCCGGCTGAATACGTTGAACGTT BNT GGTATCAACAACGACACC
L2	TGCTGTTGTTGGTCCGCGTTCT SYGG ACCGTGA ANDT GGTATTGA

```

CAAACCGTG
L3      TGCTGTTGTTGGTCCGCGTTCTSYGGACCGTGAAVMAGGTATTGA
CAAACCGTG
L4      TTGGTCCGCGTTCTSYGGACCGTGAATGGGGTATTGAC
pET303_f GAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTGTTTGTGAGCTTAGTCA
TGCCCCGCGCC
pET303_r CGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTGCTCATCAGCA
AAAAACCCCTCAAGACC
Lib_seq_f AGATCTATGGACAAAAAACCGCTG
Lib_seq_r GTCGACTTACAGGTTGGTAG
mTFP_128_f CGAGAACTTCCCCCCTAGGGCCCCGTG
mTFP_128_r CACGGGGCCCTAGGGGGGGAAGTTCTCG

```

Fett geschriebene Buchstaben zeigen Mutationen

3.1.7 Zellen

***E. coli*-Zellen**

Alle Klonierungsschritte wurden in TOP10 *E. coli* (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt, FACS und Proteinexpressionsexperimente wurden mit *E. cloni* EXPRESS BL21 (DE3) (Lucigen, Middleton, WI) durchgeführt.

Humane Zellen

HEK-293T

Zellmedien/ Lösungen	Zusätze
Dulbeccos MEM (Biochrome)	+ 10 % FCS (PAN TM Biotech GmbH) + 1 % L-Alanyl-L-Glutamin (Biochrome AG)
Opti-MEM (Gibco, Invitrogen)	
PBS (Biochrom)	
Trypsin/EDTA (Biochrom)	
GeneCellin (BioCellChallenge)	
Torpedo (Ibidi)	

3.1.8 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBioRS	pEVOL303_BioRS ohne mTFP1	Diese Arbeit
pET303_Anbu _{TAG71}	Expression von Anbu mit Amber-Stop-Codon an Position 71	Diese Arbeit
pET303_recA _{TAG36}	Expression von recA mit Amber-Stop-Codon an Position 36	Diese Arbeit
pET303/CT-His	High-copy, amp ^r	Thermo Fisher Scientific
pEVOL303	PyIRS Wildtype, cam ^r	
pEVOL303_BioRS	pEVOL303 mit Variante BioRS	Diese Arbeit
pEVOL303_HpRS	pEVOL303 mit Variante HpRS	Diese Arbeit
pEVOL303_Lib	pEVOL303 mit PyIRS-Bibliothek	Diese Arbeit
pmCherry-TAG-EGFP-HA	Expression von pmCherry-TAG-EGFP, amp ^r	
pMmBioRS -U6-PyIT	Expression von M. mazei PyIRS BioRS, amp ^r	Diese Arbeit
pMmPyIRS-U6-PyIT	Expression von M. mazei PyIRS Wildtyp, amp ^r	
pET303_mTFP _{TAG128}	Expression von mTFP1 mit Amber-Stop-Codon an Position 128	Diese Arbeit

3.1.9 Instrumente

Laborgerät	Modell	Firma
Chromatographie	prime plus	GE Healthcare
Durchflusszytometers	BD Influx	BD Biosciences
Elektroporation	PowerPac Basic Power Supply	BioRad
Geldokumentation	G:BOX	Syngene
Gelelektrophorese	Bio-Rad Power Pac HV system	Bio-Rad
HPLC		Agilent Technologies
HPLC	UltiMate™ 3000 UHPLC	ThermoFisher
Imager	Versa Doc 4000MP	Bio-Rad
Massenspektrometer	maXis HD™	Bruker
Massenspektrometer		Thermo Fisher Scientific
Mikroskop	DMi8	Leica
Platereader	Infinite M1000	Tecan, Zurich, Switzerland
Säule	C18	Acclaim PepMap
Sonifier	Branson Digital Sonifier 250	G. Heinemann
Sonifier	Branson Digital Sonifier 250	G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd, GER)
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Scientific
Thermomixer	Thermomixer Compact	Eppendorf
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA Works Inc.
Waage	LSM 200	PCE Group
Zellzähler	CountessII	Thermo Scientific
Zentrifuge	Varifuge 3.0 R	Heraeus Sepatech
Zentrifuge	Cool-Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge	SIGMA 3-30K	SIGMA

3.2 Methoden

3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese wurde für die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten verwendet. Zu diesem Zweck wurden DNA-Proben mit DNA-Auftragspuffer gemischt und auf 1% (w/v) Agarose Gele zusammen mit einer DNA-Leiter geladen. Die Elektrophorese wurde in Tris-Acetat-EDTA (TAE) -Puffer für 45 min bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt. Die Gele wurden für 30 min in einer Lösung von 1 mg/L Ethidium gefärbt. DNA-Banden wurden mit UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht.

<u>DNA-Auftragspuffer (10x)</u>	Tris/HCl, pH 8.2	10 mM
	EDTA	1 mM
	Glycerol	50% (v/v)
	Xylene cyanol	0.25% (w/v)
	Bromphenol Blau	0.25% (w/v)
<u>TAE Puffer (50x)</u>	Tris/acetate, pH 8.2	2 M
	EDTA	100 mM

3.2.2 DNA-Isolation

Für die Plasmid-Isolierung von *E. coli* wurden peqGOLD Plasmid Miniprep Kits I oder II (Peqlab) verwendet. NucleoSpin® 96 Plasmid Kit (Macherey-Nagel) wurde für eine Hochdurchsatz-Plasmid-Reinigung angewendet. Gereinigte Plasmide wurden bei 4 ° C gelagert.

3.2.3 Gelextraktion

Eine gewünschte Band wurde unter UV-Licht (365 nm) aus einem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit (PeQlab) gereinigt. Die DNA wurde mit einem Nanodrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Scientific) quantifiziert.

3.2.4 PCR

Verschiedene PCR-Varianten wurden in dieser Arbeit verwendet, um DNA-Fragmente zu erzeugen oder Mutationen einzufügen. Ein PCR-Ansatz enthielt folgende Bestandteile:

Quantity	Reagent
1 μL	Template DNA (50ng/ μL)
1 μL	Phusion/ Q5 (5U/ μL)
2,5 μL	Forward Primer (5 pmol/ μL)
2,5 μL	Reverse Primer (5 pmol/ μL)
10 μL	5 x Reaction Buffer
1 μL	dNTP (10 mM)
32 μL	ddH ₂ O

Die Reaktion wurde wie folgt ausgeführt:

Initiale Denaturierung	98°C	0:30 min	
Denaturierung	98°C	0:10 min	} 35-45 Zyklen
Primer-Bindung	50-60 °C	0:30 min	
Verlängerung	72 °C	1:00 min	
Finale Verlängerung	72 °C	10:00 min	
Kühlung	4°C	∞	

3.2.5 DNA Ligation

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe. Das Enzym wird verwendet, um zwei DNA-Fragmente zu ligieren. Vor der Ligation wurde die DNA 5 min für 55 ° C erhitzt und anschließend für 10 min auf Eis abgekühlt. 1 unit T4 liagse wurde mit 100 ng DNA in einem Volumen von 20 µL aufgetragen. Die Reaktion wurde in einem Vektor: Insert-Verhältnis 1: 3 durchgeführt. Die Ligation wurde bei 1 Stunde bei Raumtemperatur oder 16 ° C über Nacht inkubiert.

3.2.6 DNA Restriktion

Es wurden 5-10 Units Enzym pro µg DNA verwendet. Die doppelte Menge wurde angewendet, wenn das Enzym eine reduzierte Aktivität von 50% im NEBuffer aufweist. Bei Bedarf wurde BSA hinzugefügt. Die Reaktion wurde 3 Stunden bei 37°C durchgeführt.

3.2.7 Gibson-Cloning

Gibson-Cloning wurde verwendet um mehrere Fragmente in einem Schritt zu ligieren. Die Reaktion wurde mit dem Gibson-Cloning Kit (New England Biolabs) bei 50 ° C, 1 h in einem Thermocycler durchgeführt.

3.2.8 Transformation

Für die Transformation wurden elektrokompente Zellen verwendet. Die Zellen wurden immer auf Eis gehalten. Wenn nicht anders angegeben, wurden 1 µL Plasmid auf 40 µL elektrokompenten *E. coli*-Zellen in einer Küvette mit einem 1 mm Spalt pipettiert. Nach einem Puls von 2,5 kV erholten sich die Zellen in 1 mL vorgewärmtem SOC-Medium bei 37 ° C für 60 min. Die Erholungszeit nach der Transformation der Mutantenbibliothek wurde auf 45 min reduziert, um eine unerwünschte Zellverdopplung zu vermeiden. Die Zellen wurden auf Agar mit geeigneten Antibiotika plattiert und über Nacht inkubiert.

Kolonien wurden am nächsten Tag in flüssigem Medium mit geeigneten Antibiotika angeimpft und über Nacht kultiviert. 15 mL Kultur wurden für 2500 g, 10 min zentrifugiert und das Zellpellet wurde in 1 mL LB/30% Glycerin resuspendiert und bei -80 ° C gelagert.

3.2.9 SDS-PAGE

Die Analyse von Proteinen gemäß ihrer ungefähren Größe wurde durch SDS-Polyacrylamidgele durchgeführt. Proteinproben wurden zusammen mit Proteinlade-Puffer, auf 95 °C für 5 min erhitzt und auf ein 15% SDS-Gel zusammen mit einem molekularen Marker geladen. Die Elektrophorese wurde für 45 min bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel in Laufpuffer durchgeführt und danach in der Coomassie-Färbelösung für 30 min gefärbt. Entfärbt wurde in 10% Essigsäure für mindestens 1 h.

	Trenngel (15%)	Sammelgel (4%)
Acylamid-Lösung	7.5 mL	1 mL
Trenngel Puffer	5 mL	-
Sammelgel Puffer	-	5 mL
ddH ₂ O	7.5 mL	4 mL
APS (10% (v/v))	100 µL	100 µL
TEMED (1% (v/v))	10 µL	10 µL
<u>Acylamid-Lösung</u>	Acrylamid	39% (w/v)
	Bisacrylamide	1.2% (w/v)
<u>Trenngel Puffer</u>	Tris/HCl, pH 8.8	1.5 M
	SDS	0.4 % (w/v)
<u>Sammelgel Puffer</u>	Tris/HCl, pH 6.8	0.5 M
	SDS	0.4 % (w/v)

<u>Proteinlade -Puffer</u>	Tris/HCl, pH 6.8	60 mM
	Glycerol	30 % (v/v)
	Saccharose	10 % (w/v)
	SDS	5 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.02 % (w/v)
	β -Mercaptoethanol	3 % (v/v)
	Glycine	192 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
<u>Färbelösung</u>	Coomassie Brilliant Blue R250	0.05 % (w/v)
	Isopropanol	25 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
<u>Entfärbelösung</u>	Essigsäure	10 % (v/v)

3.2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteinlösungen wurde nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz bestimmt. Die Extinktion der Proteine wurde bei 280 nm auf einem NanoDrop gemessen. Der molare Extinktion Koeffizient ϵ wurde mit dem Programm ExpASy anhand der Proteinsequenz bestimmt.

3.2.11 Herstellung der Plasmide

1) Das Plasmid pEVOL303 entstand durch die Liaktion des Plasmids pEVOL [108] mit dem kommerziell erhältlichen pET303/CT-His (Thermo Fisher Scientific) durch Gibson-Klonierung (Abbildung 11). Vor der Ligation wurde pEVOL mit den einzigartigen Restriktionsstellen SacI und PciI verdaut und der erforderliche Bereich von pET303

wurde unter Verwendung der Primer pET303_f und pET303_r (siehe 3.1.6 Primer) amplifiziert. Das resultierende Plasmid pEVOL303 trägt einen p15A Ori, ein Chloramphenicol-Resistenzgen und ein *M. barkeri pylrs* Gen unter Kontrolle eines pBAD-Promotors, sowie die entsprechende tRNA^{Pyl} vor einem proK-Promotor. *mTFP1* mit einem N-terminalen 6xHis- und SUMO-Tag ist durch einen T7-Promotors induzierbar. Das Amber-Codon wurde unter Verwendung der Primer mTFP_128_f und mTFP_128_r (siehe 3.1.6 Primer) an Position 128 des *mTFP1* Gens eingefügt. 2) pEVOL303_BioRS codiert für die PylRS Variante BioRS. 3) pBioRS wurde aus pEVOL303_BioRS hergestellt, die mTFP1-codierende Region wurde zwischen den beiden Restriktionsstellen von ApaI entfernt. 4) recA und Anbu wurden in der multiplen Klonierungsstelle von pET303 unter Verwendung der Restriktionsstellen XbaI und XhoI ligiert. 5) HEK-293T wurden mit pmCherry-TAG-EGFP-HA und pMmPylRS-U6-PyIT cotransfiziert, beide enthalten vier Kopien der optimierten Pyrrolyl-tRNA (U25C) [32, 115]. pMmPylRS-U6-PyIT codiert für den *M. mazei* Wildtyp PylRS, der durch die BioRS-Variante ersetzt wurde, um pMmBioRS -U6-PyIT zu erhalten.

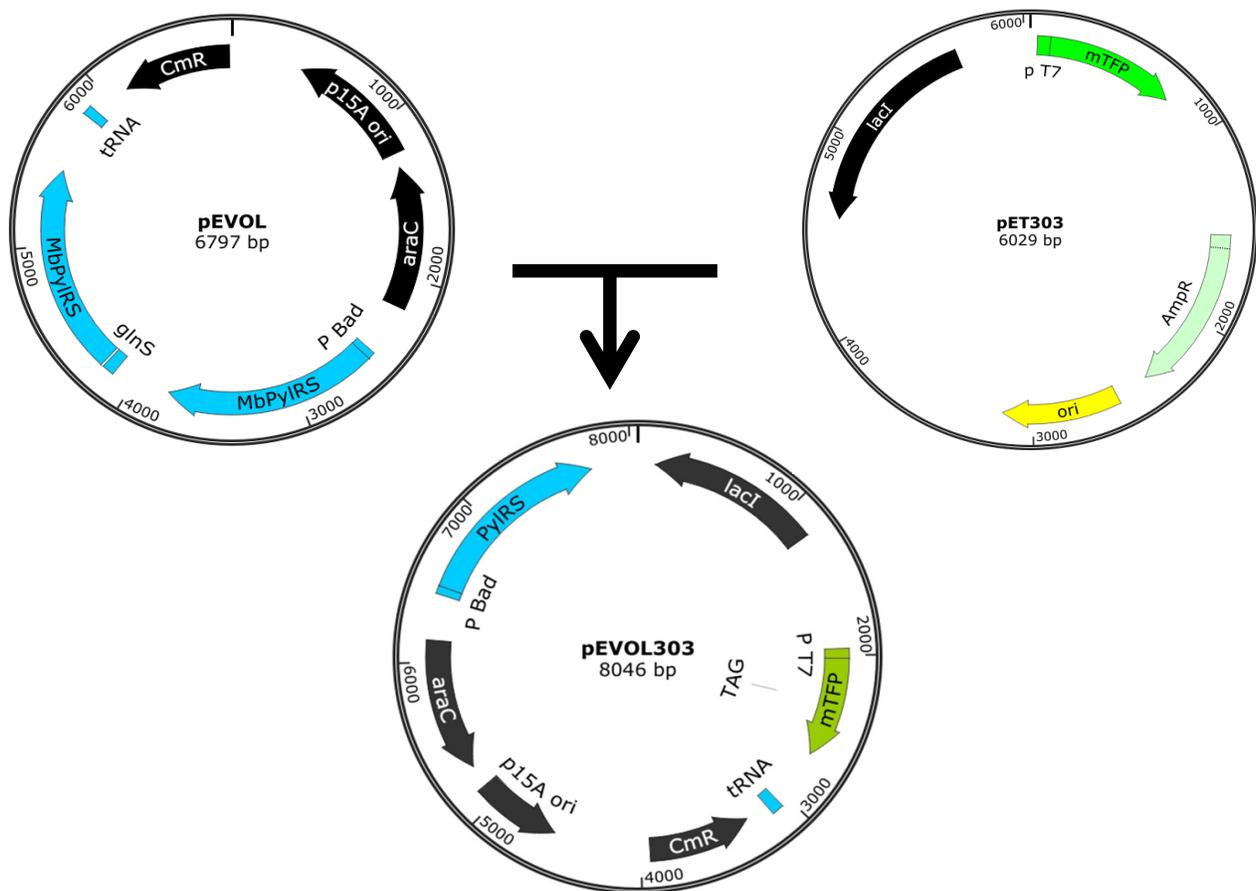


Abbildung 11. Design von pEVOL303. pEVOL codiert für eine induzierbare und eine konstitutive exprimierende Kopie von *M. barkeri* *pylS* (MbPylRS, blau). Zusätzlich befindet sich die entsprechende $tRNA^{Pyl}$ (blau) auf pEVOL. Das Plasmid pET303 codiert für das mTFP1 (mTFP, grün) unter Kontrolle eines T7-Promoters (p T7, grün). pEVOL303 enthält einen p15A-Replikationsursprung (p15A, schwarz), einen Chloramphenicol-Acetyltransferase-Marker (CmR; Black), mTFP1_{TAG128} unter der Kontrolle eines T7-Promoters (grün), eine Kopie von *pylS* (PylRS, blau) unter der Kontrolle von a pBAD-Promotor (p Bad, blau) und die $tRNA^{Pyl}$ kontrolliert durch einen proK-Promoter (blau), *lac* Repressor (*lacI*, schwarz); *araC* Repressor gene (*araC*, schwarz).

3.2.12 PylRS Mutatenbibliothek (erste)

Die *M. barkeri* PylRS Variante mit der Mutation Y349F diente als Ausgangspunkt für die Mutatenbibliothek. Die sechs Positionen Y271, L274, C313, M315, V370, I378 der Bibliothek wurden auf der Grundlage eines Homologiemodells der Kristallstrukturen (PDB 4Q6G und 4CS3) abgeleitet. Eine Auswahl an Aminosäuren wurde

entsprechend ihrer Eigenschaften an den 6 Positionen der PyIRS-Bibliothek eingefügt. Die Bibliothek besitzt 95.040 Mutanten. Um eine gleichmäßige Verteilung aller Mutanten zu gewährleisten, wurde die Mutantenbibliothek kommerziell von der Firma Life Technologies (Thermo Fisher Scientific) zusammengestellt. Die Bibliothek wurde in pEVOL303 über die Restriktionsstellen Sall und BglII eingeführt. Das resultierende Plasmid pEVOL303_Lib wurde unter Verwendung eines Standard-Elektroporationsprotokolls in *E. coli* BL21-Zellen transformiert. Die Transformation resultierte in 1×10^7 CFU.

3.2.13 PyIRS Mutatenbibliothek (zweite)

Die PyIRS-Mutante (Y271A, L274V, C313V, M315Y, Y349F, V370R), wurde als Ausgangspunkt für die Mutantenbibliothek mit den Positionen M241, L372, W376 und einer resultierenden Vielfalt von 912 Mutanten verwendet. Die Bibliothek wurde mit degenerierten Primern L1, L2, L3, L4 (siehe 3.1.6 Primer) unter Verwendung des QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) erzeugt. Das resultierende Plasmid pEVOL303_Lib wurde direkt in *E. coli* BL21 transformiert.

PyIRS-Bibliothek	Position <i>M. barkeri</i>	Größe	Absicht	Herstellung
1	271, 274, 313, 315, 370, 378	65340	Einbau großer UAAs	(Invitrogen)
2	241, 372, 376	912	Verbesserter Einbau biotinylierter UAAs	Degenerierte Primer L1, L2, L3, L4

3.2.14 Probenvorbereitung für FACS

E. coli-Zellen wurden mit pEVOL303_Lib transformiert und in 50 mL LB/Cm-Medium inokuliert, das mit 25 µg/mL Chloramphenicol (Cm) versehen wurde. Die Zellen wurden bis zu einer OD600 von 0,7 inkubiert. Anschließend wurden 450 µL der Zellen in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µL Induktionsmedium (10 mM UAA, 10 mM IPTG, 1%, w/v Arabinose) induziert und für 16 h bei 37 °C, 700 U/min inkubiert. Induktionsmedium ohne UAA wurde der Negativkontrolle hinzugefügt. Die Zellen wurden auf eine Endkonzentration von 1×10^7 Zellen/mL verdünnt und zweimal mit M9-Minimalmedium gewaschen, dem 25 µg/mL Chloramphenicol zugefügt wurde. Am Anfang eines FACS-Experiments wurde die Negativkontrolle untersucht, um die Diskriminierung von kanonischen Aminosäuren durch die PylRS-Mutantenbibliothek sicherzustellen. Die Durchflusszytometrie erfolgte mit einem BD Influx (BD Biosciences), der mit einem 457 nm Laser zur Anregung und einem Bandpassfilter 480/40 für die mTFP1 Fluoreszenzdetektion betrieben wurde. Der Sortiermodus wurde auf 1.0 Drop Single eingestellt. Das Sortierfenster wurde basierend auf dem Fluoreszenzsignal der ersten 1×10^5 Zellen jeder Probe eingestellt. Die Zellen innerhalb des Fensters wurden in einer 96-Well-Platte (Sigma-Aldrich), die mit konditioniertem Medium mit 25 µg/mL Chloramphenicol versetzt wurde, sortiert. Das Wachstum der sortierten Zellen wurde über Nacht bei 37 °C, 300 U/min fortgesetzt. Die Sequenz jeder Kultur wurde mit dem Primer Lib_seq_f und Lib_seq_r (siehe 3.1.6 Primer) bestimmt. Jedes pEVOL303 wurde erneut in *E. coli* transformiert und wie zuvor die mTFP1_{TAG128} Induktion ausgeführt. Der Einbau von UAAs durch eine PylRS-Variante wurden durch ein fluoreszierendes mTFP1 bestätigt. Die Fluoreszenz wurde in einer schwarzen 96-well Platte (Thermo Fisher Scientific) mit einem Infinite M1000 Platereader (Tecan, Zürich, Schweiz), durch eine Anregung bei 462 nm und eine Emission bei 492 nm, gemessen (Abbildung 12).

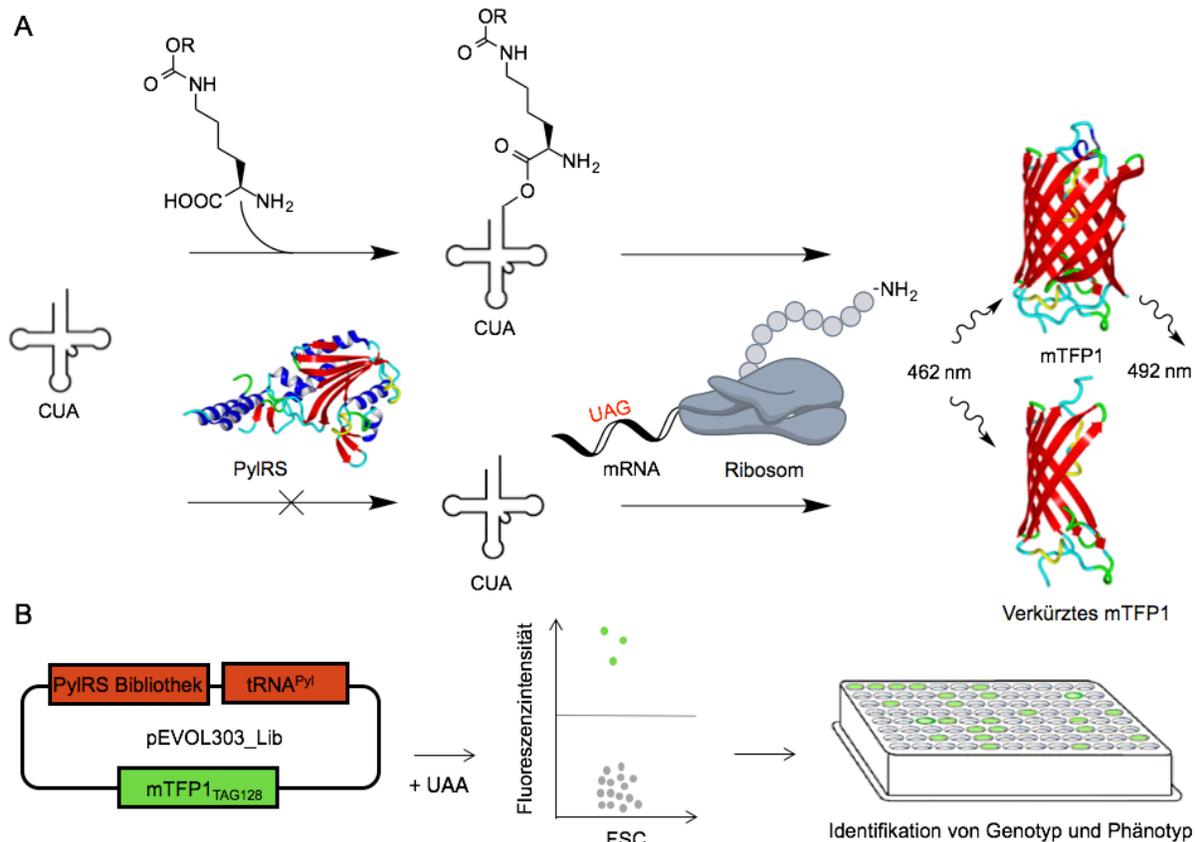


Abbildung 12. UAA-Einbauscreen basierend auf FACS. A) Die Unterdrückung des Amber-Stopp-Codons durch eine geladene tRNA^{Pyl} an Position 128 von mTFP1 führt zu einem fluoreszierenden Produkt (λ_{em} 462 nm, λ_{ex} 492 nm). Das Fehlen einer geladenen tRNA^{Pyl} führt zu einem verkürzten, nicht fluoreszierenden Produkt. B) Das Plasmid pEVOL303_Lib codiert für die PyIRS-Bibliothek, tRNA^{Pyl} und mTFP1_{TAG128}. *E. coli*-Zellen, die pEVOL303_Lib besitzen, werden mit der zu testenden UAA inkubiert. Die mTFP1 Fluoreszenzintensität und die Vorwärtsstreuung (FSC) jeder Zelle wird mit FACS analysiert. Fluoreszierende Zellen (grün), die einen Grenzwert überschreiten, werden von nicht-fluoreszierenden Zellen (grau) getrennt und in eine 96-Well-Platte sortiert. Anschließend wird PyIRS sequenziert.

3.2.15 UAA-Einbau durch PyIRS

Der Einbau wurde mit allen PyIRS Varianten gleich durchgeführt. *E. coli*-Zellen wurden entweder mit den zwei Plasmiden pEVOL und pET303_mTFP1 oder pEVOL303 transformiert. Eine einzelne Kolonie wurde von einer LB/Cm-Agarplatte gepickt und in 50 mL LB/Cm-Medium inokuliert und über Nacht inkubiert. Die Übernachtskultur wurde mit frischen LB/Cam-Medien verdünnt (1:100) und bis zu OD600 1,5 wachsen gelassen. Die mTFP1-Expression wurde durch 1 mM UAA, 1 mM IPTG, 0,1%, w/v Arabinose induziert und die Inkubation bei 37 C für 16 h, 700 U/min fortgesetzt. Die Fluoreszenz

wurde wie beschrieben gemessen. Zellen wurden bei 5,000 x g für 10 min pelletiert und entweder mit Ultraschall (20 % Amplitude, Zeit: 40 s, Puls an/aus: 20 s) oder bei 75 °C für 20 min aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden bei 10,000 x g für 10 min entfernt.

3.2.16 Pull-Down von mTFP1

In Vorbereitung des Pull-Down-Experiments wurde nach dem UAA-Einbau in mTFP1 überschüssige UAAs durch eine 10 kDA-Zentrifugalfiltereinheit (Millipore) vom Zelllysate entfernt. Dabei wurde mit drei Mal mit 5 mL PBS für UAA **35**, **38** oder Waschpuffer (50 mM Ammoniumcarbonatpuffer, pH 11, 500 mM NaCl) für UAA **37** gewaschen. Die Fluoreszenzintensität von *E. coli*-Lysat, das mTFP1 Wildtyp oder mTFP1_{UAA 35, 37, 38} enthielt, wurde in einer schwarzen 96-Well-Platte (Thermo Fisher Scientific) mit einem Infinite M1000 Platereader ausgelesen (Tecan, Zürich, Schweiz) (Anregung bei 462 nm, Emission bei 492 nm). Die Zelllysate wurden mit PBS oder Waschpuffer verdünnt, um dieselben mTFP1-Konzentrationen für jede Probe auf Basis des Fluoreszenzsignals zu erhalten. 200 µL des normalisierten Zelllysats wurden mit 50 µL Dynabeads für 1 Stunde inkubiert. Die Beads wurden dreimal mit 200 µL PBS oder Waschpuffer gewaschen und anschließend in 200 µL Laemmli-Puffer resuspendiert und gekocht. Das Zelllysate, das Cleared-Lysat (nach Pull-Down) und das Eluat wurden auf einem 12%-gen SDS-Gel analysiert.

3.2.17 Westerblot von mTFP1 aus *E. coli*

Zelllysate wurde mit Beladungspuffer gekocht und auf einem 12%-gen SDS-Gel analysiert. Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Merck, Darmstadt, Deutschland) übertragen. Die Membran wurde in MTBST (5% Milch, 1x TBS, 0,05% Tween) für 3 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Die Blots wurden untersucht und mit dem primären Antikörper α -His-Maus-monoklonalem IgG (# 37-2900, ThermoFisher) bei einer 1: 1000-Verdünnung in TBST über Nacht bei 4 ° C inkubiert, gefolgt von dem HRP-konjugierten sekundären Antikörper-Ziegen- α -Maus-IgG (# W4028, Promega, Madison, WI, USA) bei einer 1: 10000 Verdünnung in MTBST für 1 Stunde bei

Raumtemperatur. Die Waschschrirte wurden in TBS mit 0,05% Tween-20 durchgeföhrt. Die Chemilumineszenz-Detektion wurde mit dem HRP-Substrat Immobilon (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeföhrt.

3.2.18 recA und Anbu Expression und Pull-Down

Für den Einbau von UAA **35** in recA wurden pBioRS und pET303_recA_{TAG36} in *E. coli* cotransformiert. Die Proteinexpression wurde wie bei mTFP1 durchgeföhrt. Für den Einbau von UAA **37** in Anbu wurden pBioRS und pET303_Anbu_{TAG7} in *E. coli* cotransformiert. Die Proteinexpression wurde wie für unter 3.2.15 beschrieben durchgeföhrt. Die Zellen wurden nach der Proteinexpression pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Proben wurden lysiert und direkt von überschüssiger UAA durch eine 10 kDA-Zentrifugalfiltereinheit (Millipore) befreit. Dynabeads (Invitrogen) wurden dem Lysat zugesetzt, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und von dem Cleared-Lysat getrennt. Nicht-spezifische Proteine wurden durch drei aufeinanderfolgende Waschschrirte mit PBS (pH 7,4) mit 0,1% Tween 20 für recA oder Waschpuffer (50 mM Ammoniumcarbonatpuffer, pH 11, enthaltend 500 mM NaCl) für Anbu entfernt.

Die Elution von recA wurde bei 95 °C für 10 min durchgeföhrt. Die Elution von Anbu wurde durch Elutionspuffer (50 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 4,0, enthaltend 500 mM NaCl) ausgelöst. Die Proben wurden auf SDS-PAGE-Gelen analysiert und weiter durch MS/MS analysiert.

3.2.19 Auftauen von HEK-293T

Die Zellen befanden sich für eine Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff. Beim ersten Schritt wurden die Zellen in einem 37 °C Wasserbad angetaut und in ein entsprechendes Kulturmedium aufgenommen. Durch anschließendes Zentrifugieren bei 1200 U/min für 3 Minuten bei RT kann wurde das Pellet vom zytotoxischen Gefrierschutzmittel DMSO entfernt. Die Zellen wurden in 15 mL Medium resuspendiert und in einer 75 cm² Kulturflasche bei 37 °C, 5% CO₂ kultiviert.

3.2.20 Kultivierung von Zellen

Das Splitten oder Passagieren der Zellen wurde stets nach demselben Ablauf durchgeführt und etwa alle 4 Tage wiederholt. Dabei ist zu beachten, dass auf der einen Seite dichter Bewuchs zu Kontaktinhibition der Zellen führt und auf der anderen Seite ein sehr dünn besiedelter Zellrasen, aufgrund fehlender Stimuli, schlecht wächst. Zu Beginn des Splittens wurde das alte Medium abgesaugt, das durch einen Farbumschlag des Indikators eine mögliche Kontamination oder den fortgeschrittenen Metabolismus anzeigt. Tote Zellen und andere Verunreinigungen wurden anschließend mit PBS gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden durch die Zugabe von Trypsin/EDTA gelöst. Das EDTA dient als Chelator und komplexiert Ca^{2+} , das für Adhäsionsmoleküle wie Integrine essentiell ist. Trypsin spaltet als Protease dagegen die Verbindung der Zelle mit der Kulturflasche. Die Proteasereaktion wurde durch die Zugabe von Vollmedium gestoppt. Durch mechanisches Auf- und Abpipettieren wurden eventuelle Aggregate und Reste des Zellrasens gelöst. Im letzten Schritt wurden die Zellen je nach Anwendung und Bedarf in einem Verhältnis von 1:3 - 1:10 in eine neue Kulturflasche mit vorgelegtem Medium passagiert.

3.2.21 Einbau von biotinylierten UAAs in HEK-Zellen

HEK-293T-Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) mit L-Ala-L-Gln (AQmedia, Sigma-Aldrich), 10% (v/v) fötalem Rinderserum (Biochrom) und 1% (v/v) antibiotika-antimykotische Lösung (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amphotenicin B, 10 mg/mL Streptomycin und 10.000 Einheiten Penicillin, Sigma-Aldrich) ergänzt und bei 37 °C, 5% CO_2 inkubiert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen auf 8-Well- μ -Slides (Poly-L-lysin beschichtet) in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO_2 bei 37 °C gezüchtet. Die Zellen wurden mit den Plasmiden pmCherry-TAG-EGFP-HA und pMmBioRS-U6-PylT im Verhältnis von 1: 1 bei 60-80% Konfluenz transient transfiziert. Dabei wurde das Reagenz Torpedo oder GeneCellin gemäß der Bedienungsanleitung verwendet. Für die Positivkontrolle wurden Zellen mit den Plasmiden pmCherry-TAG-EGFP-HA und pMmPyIRS-U6-PylT transfiziert. UAAs wurden in 100 mM NaOH gelöst und später mit der gleichen Menge 100 mM HCl neutralisiert. Die Zellen wurden in Abwesenheit und in

Gegenwart von 0,5 mM UAA **35**, **37**, **38** und N ϵ - (tert.-Butoxycarbonyl) -L-lysin (Bock) gezüchtet. Einen Tag nach der Inkubation bei 37 °C wurde die mCherry_EGFP Expression mit einem Leica DMI8 invertierten Mikroskop (10X Objektiv) überwacht. Für den Western-Blot wurden die HEK-293T-Zellen in 6-Well-Schalen gezüchtet und wie oben erwähnt cotransfiziert. 0,5 mM der UAAs wurden jeweils zu den Zellen zugegeben. Für die Negativkontrolle diente statt der UAA die gleiche Menge an sterilem ddH₂O. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit eiskalten PBS gewaschen und mit NP-40-Lysepuffer (150 mM NaCl, NP-40 1%, Tris 50 mM, pH 8.0) mit Protease-Inhibitor, für 20 min auf Eis lysiert. Zelltrümmer und Lysat wurden 15 min, 4 °C bei 20 000 U/min zentrifugiert. 40 μ L des Überstandes wurden mit Laemmli-Puffer zur Quantifizierung der Proteinexpression gemischt. Das verbleibende Lysat wurde mit einem 10 kDA-Zentrifugalfiltereinheit (Millipore) gereinigt und mit PBS oder Waschpuffer (50 mM Ammoniumcarbonatpuffer, pH 11, enthaltend 500 mM NaCl) für UAA **37** äquilibriert. Dynabeads (Invitrogen) und Zelllysat wurden anschließend zusammen für drei Stunden bei 4 °C inkubiert. Verunreinigungen wurden durch drei Waschschrte unter Verwendung von NP-40-Waschpuffer (200 mM DTT, Natriumborat, pH 9.6, 0.1% NP-40) oder 50 mM Ammoniumcarbonatpuffer, pH 11, 500 mM NaCl für UAA **37** entfernt. Die Beads wurden mit Laemmli-Puffer versehen und gekocht. Proben vor und nach dem Pull-Down wurden auf einem 12% SDS-Gel analysiert. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde in MTBST (5% Milch, 1x TBS, 0,05% Tween) für 3 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Die Proteine wurden mit dem primären Antikörper anti-HA (selbst hergestellt in Maus, Memphis) 1:1000 in MTBST über Nacht bei 4 °C inkubiert, gefolgt von dem sekundären HRP markierten IgG Antikörper α -Maus (hergestellt in Ziege, Santa Cruz, sc-2031) 1:10000 in MTBST für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Chemilumineszenz-Detektion wurde mit dem HRP-Substrat (Merck) durchgeführt.

3.2.22 Proteinreinigung von mTFP1

Die Zellen wurden nach der mTFP1 Expression bei 5,000 g, 15 min pelletiert und mit PBS gewaschen und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer (100 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10%, v/v Glycerin) resuspendiert und bei 75 °C für

20 min inkubiert. Die Zelltrümmer wurde durch Zentrifugation (60.000 x g, 30 min bei 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde auf eine mit Lyse-Puffer äquilibrierte HisTrap HP Ni-NTA-Säule (GE Healthcare) geladen. Protein wurde durch Erhöhung der Konzentration von Imidazol (20 bis 500 mM) im Lysepuffer eluiert. SUMO-Protease wurde dem eluierten Protein zugesetzt und über Nacht bei 4 °C gegen ddH₂O dialysiert. Das dialysierte Protein wurde durch ein HisTrap HP Ni-NTA Säule geleitet, um das verbleibende N-terminale 6xHis- und SUMO-Tag zu entfernen. mTFP1 wurde durch 10-minütiges inkubieren bei 75 ° C weiter gereinigt und bei 60 000 x g für 30 min, 4 °C zentrifugiert. Das gereinigte Protein befand sich im Überstand.

3.2.23 Massenspektrometer

0,04 mM des gereinigten Proteins wurde durch Massenspektrometrie unter Verwendung eines MaXis HDTM ESI-TOF (Bruker) analysiert. Vor der Messung wurde die Probe in eine HPLC (Agilent Technologies, C4-Säule, Säulenvolumen 5 mL) injiziert. Die chromatographische Trennung erfolgte bei einer konstanten Flussrate von 0,5 µL/min und einem Gradienten zu 80% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure über 8 min.

3.2.24 Protein Sequenzierung durch LC-MS/MS

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die gewünschten Regionen wurden aus der SDS-PAGE ausgeschnitten, zerkleinert und im ersten Schritt mit 50 mM Ammoniumbicarbonat/ 50% Acetonitril (v/v) und im zweiten Schritt mit 100% Acetonitril entfärbt. Die Disulfidbindungen wurden mit 10 mM 1,4-Dithiothreitol in 100 mM Ammoniumbicarbonat reduziert. Freie Thiolgruppen wurden in 55 mM Iodacetamid in 100 mM Ammoniumbicarbonat alkyliert, um Disulfidbindungen zu verhindern. Die Proben wurden von Überschuss an Alkylierungsmitteln durch Waschen mit 100 mM Ammoniumbicarbonat und 100% Acetonitril gereinigt. Trypsin-Verdau wurde mit 12,5 ng/µL Trypsin für 12-16 Stunden durchgeführt. Chymotrypsin-Verdau wurde mit 25 ng/µL für 12-16 Stunden durchgeführt. Die Extraktion der Peptid-Fragmente wurde im ersten Schritt in 5% Essigsäure, 50% Acetonitril und im zweiten Schritt in 0,1%

Trifluoressigsäure, 75% Acetonitril durchgeführt. Die getrocknete Probe wurde in 1 mL 0,1%-iger Trifluoressigsäure in ddH₂O resuspendiert und mit Zip-Tip® entsalzt. Die NanoLC MS/MS-Analyse wurde mit einem On-line-System durchgeführt, das aus einem Nano-Pumpen-UltiMate™ 3000 UHPLC Binär-HPLC-System (Dionex, ThermoFisher) mit einem Q-Exactive HF-Massenspektrometer (ThermoFisher, Deutschland) besteht. Die Peptide wurden in 20 µL Probenpuffer (3% ACN, 0,1% Ameisensäure) resuspendiert und 2 µL wurden davon in eine Vorsäule mit den Maßen 300 µm×5 mm (Acclaim PepMap, 5 µm Teilchengröße) injiziert. Nach dem Beladen wurden die Peptide über C18 Kapillarsäule (75 µm × 15 cm, 100 Å, 3 µm Partikelgrößen) eluiert. Die Peptide wurden in die MS mit einer Fließgeschwindigkeit von 300 nL/min unter Verwendung eines 40 min-Gradienten von 5% bis 40% der mobilen Phase B eluiert. Die mobile Phase A bestand aus 0,1% Ameisensäure in H₂O und die mobile Phase B bestand aus 80% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure. Das Massenspektrometer wurde im positiven und datenabhängigen Modus mit einem einzigen MS-Scan (350-1400 m/z bei 60 000 Auflösung (bei 200 m/z im Profilmodus) gefolgt vom MS/MS-Scans der 10 intensivsten Ionen mit einer Auflösung von 15 000. Fragmentierung wurden durchgeführt unter Verwendung einer höheren Kollisionsdissoziation (HCD) bei normalisierter Kollisionsenergie von 28% und unter Verwendung eines Isolationsfensters von 1,8 m/z.

3.2.25 Proteinidentifizierung

Die RAW-Dateien vom Q-Exactive HF wurden mit Proteome Discoverer Version 1.4 (Thermo Scientific) in eine Mascotdatei (mgf) umgewandelt. Diese Dateien wurden an MASCOT v2.3 (Matrix Sciences Ltd, Großbritannien) zur Datenbanksuche übermittelt. Die Massentoleranz wurde auf 20 ppm für Vorläufer und 0,5 Da für das MS/MS-Fragment-Ion eingestellt. Die festen Modifikationen wurden auf Carbamidomethyl und als variable Modifikationen wurden die Oxidation von Methionin eingestellt. UAAs wurden manuell als Lysinmodifikation eingestellt. Die MASCOT-Ergebnisdateien wurden mit der Software Scaffold v4.1.1 (Proteome Software Inc. USA) zur Validierung von Peptid- und Proteinidentifikationen mit einer Schwelle von 95% unter Verwendung des Prophet-Algorithmus verarbeitet.

3.2.26 Homologiemodell der *M. barkeri* PylRS im Komplex mit Pyrrolysin

Die Homologiemodelle wurden mit der YASARA Struktur, Version 14.7.17 [116] erstellt. Die katalytische Domäne von *M. barkeri* PylRS diente als Vorlage für das YASARA Homologiemodellierungsmakro mit dem konservativen "langsamen" Protokoll mit den folgenden Parametereinstellungen: Anzahl der PSI-BLAST-Iterationen: 10; maximal zulässiger BLAST E-Wert zum Template: 0,5; Maximale Anzahl der zu verwendenden Vorlagen: 15; maximale Anzahl von Template mit derselben Sequenz: 3; maximaler Oligomerisierungszustand: 4; Maximale Anzahl von Ausrichtungsvariationen pro Template: 4; Maximale Anzahl von Konformationen pro Schleife: 200; Maximale Anzahl an Resten, die zu den Termini hinzugefügt wurden: 20. Das resultierende Homologiemodell basiert auf zwei Strukturen (hauptsächlich pdb: 4Q6G mit einer Schleife von den Resten 99-107 und pdb: 4CS3) von *M. mazei* PylRS-Varianten (beide Sequenzen haben eine 98%-ige Homologie mit dem Template). Der YASARA-Algorithmus führt eine sekundäre Strukturvorhersage durch, eine Schleifenaufbau- und Aminosäure-Rotamer-Auswahl, gefolgt von einer Energieminimierung.

3.2.27 Homologiemodell der *M. barkeri* PylRS Mutanten im Komplex mit UAAs

Mutationen der Varianten CysKRS oder HpRS wurden in das PylRS-Homologiemodell eingeführt, gefolgt von einer in Silico-Umwandlung des gebundenen Pyrrolysinliganden in die entsprechende UAA. Anschließend wurden mit Ausnahme der Mutationsstellen und der UAA-Seitenkette alle Reste im Modell für eine molekulardynamische Simulation (50 ps, T = 300K) mit YASARAs empfohlenem Kraftfeld (AMBER 2003) [117] eingefroren. Danach wurde die Energie der freien Reste minimiert. Der MD-Zyklus wurde wiederholt, bis eine Überlagerung mit dem Vorgängermodell keine signifikanten Änderungen der freien Reste aufwies.

4 Ergebnisse

4.1 Fluoreszenz als Detektionsmethode

Fluoreszenz-Screens wurde bereits häufig genutzt, um den Einbau einer UAA durch ein PyIRS/tRNA^{PyI}-Paar nachzuweisen [118]. Dabei beruht die Methode auf einem fluoreszierenden Reporterprotein, wie z.B. GFP oder mTFP1, welches ein Amber-Stopp-Codon an einer geeigneten Stelle des Gens enthält. Wird das Reporterprotein zusammen mit einem PyIRS/tRNA^{PyI}-Paar in Anwesenheit einer zu testenden UAA exprimiert, kann der UAA-Einbau an dem Amber-Codon durch ein Fluoreszenzsignal angezeigt werden, wenn die PyIRS die entsprechende UAA auf die tRNA^{PyI} lädt. Sind die UAA und das PyIRS/tRNA^{PyI}-Paar nicht miteinander kompatibel, führt das Fehlen einer beladenen tRNA^{PyI} zum Abbruch der Translation am Amber-Codon. Das dadurch verkürzte Reporterprotein ist nicht fluoreszent.

Die Position des Amber-Codons kann die Einbaueffizienz einer UAA stark beeinflussen [119]. Um diesen Effekt bei mTFP1 zu untersuchen, wurde ein Amber-Codon jeweils an den Positionen 2, 3, 128, 188, 200, 204 des Gens eingefügt. Das *M. Barkeri* PyIRS/tRNA^{PyI}-Paar wurde zusammen mit jeweils einer Amber-Varianten von mTFP1 in Abwesenheit und Anwesenheit der gut einbauenden UAA N ϵ -allyloxycarbonyl-L-lysine (Alock) (1mM) in *E. coli* exprimierte (Abbildung 13) [47]. Die Proben wurden anschließend gewaschen, die Zellzahl normiert und die Fluoreszenz von mTFP1 wurde bei einer Anregung von 462 nm bestimmt. Die Fluoreszenzwerte zwischen den mTFP1-Varianten mit unterschiedlichen Amber-Positionen unterschieden sich erheblich.

So führte die Expression von mTFP1 mit einem Amber-Codon an den Positionen 188, 200, 204 zu einem deutlichen Fluoreszenzsignal in Abwesenheit von Alock, was den ungewollten Einbau einer endogenen Aminosäure nahelegt. Das Amber-Codon an den Positionen 2, 3 und 128 terminierte hingegen die Translation von mTFP1 in Abwesenheit der UAA, folglich konnte kein Fluoreszenzsignal gemessen werden. mTFP1 mit einem Amber-Codon an Position 128 (mTFP_{TAG128}) zeigte in Gegenwart von Alock ein starkes Fluoreszenzsignal und bot damit die beste Sensitivität für den Nachweis

eines UAA-Einbaus. Folglich wurde mTFP1_{TAG128} für nachfolgende Experimente als Reporterprotein verwendet. mTFP1-Wildtyp (WT) besitzt kein Amber-Codon und wurde als Referenzwert herangezogen. Als Negativkontrolle dienten nicht-induziert *E. coli*-Zellen, die mit dem Plasmid pET303_mTFPwt transformiert wurden.

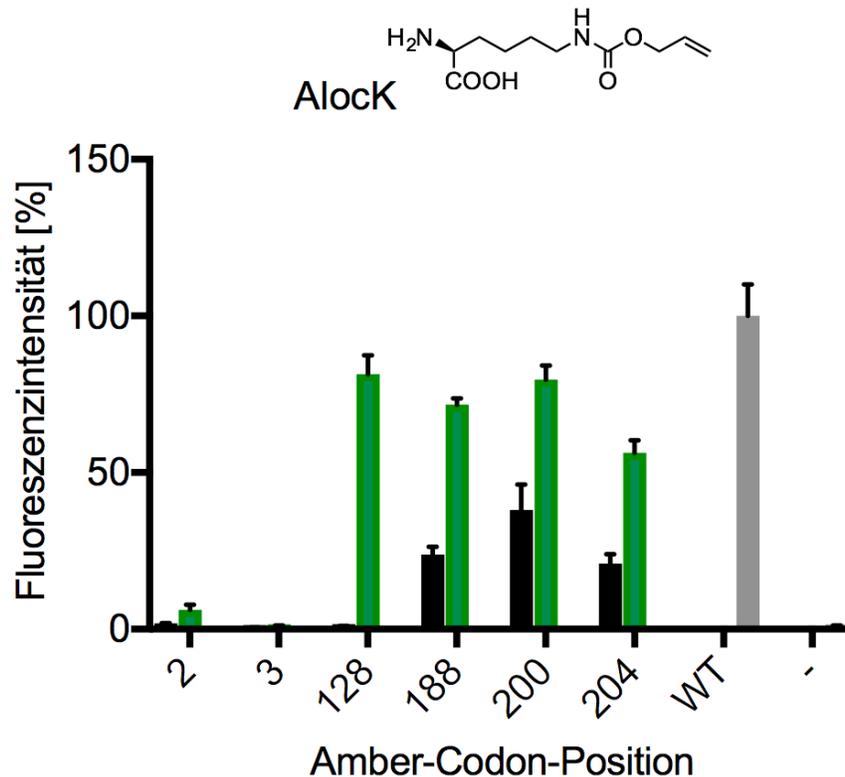


Abbildung 13. Einfluss der Position eines Amber-Codons in mTFP1 auf die Einbaueffizienz von Alock. Normierte Fluoreszenzintensitäten von mTFP1 mit jeweils einem Amber-Codon an der Position 2, 3, 128, 188, 200, 204. Die Expression der mTFP1-Varianten und des WT PylRS/tRNA^{Pyl}-Paares erfolgte in Abwesenheit (schwarze Balken) oder in Gegenwart von 1 mM Alock (grüne Balken) in *E. coli*. WT mTFP1 ohne Amber-Codon (WT, grauer Balken) diente als Positivkontrolle. *E. coli* ohne exprimiertes mTFP1 dienten als Negativkontrolle (-). Versuche wurden in Triplets durchgeführt.

4.2 Entwicklung einer UAA-Einbau-Methode

Die gezielte Evolution von Proteinen hat sich als Methode der Wahl etabliert, um die Eigenschaften von Enzymen zu verbessern oder zu verändern [99]. In der Regel bestimmen drei Elemente die Effizienz des Screening-Prozesses: i) Bibliotheksdesign, ii) Wahl des Reporters und iii) Screening-Methodik. Alle drei Elemente sollten nicht nur

kompatibel sein, sondern in etwa den gleichen Durchsatz zulassen, um zu vermeiden, dass sie zu einem Engpass werden.

i) Bibliotheksdesign

Im ersten Schritt wurde eine Mutantenbibliothek von *M. barkeri* PyIRS auf Basis eines Homologiemodells entworfen (Abbildung 14A). Die Bibliothek wurde entwickelt, um PyIRS-Varianten zu identifizieren, die den Einbau von insbesondere sperrigen und sterisch anspruchsvollen UAAs ermöglichen. Die Mutation Y349F wurde bereits in der Literatur beschrieben und verstärkt die Aminoacylierungseffizienz von UAAs durch PyIRS [47]. Y349F wurde deshalb als Ausgangspunkt der Bibliothek verwendet. Die Position N311 wurde nicht verändert, da Asparagin eine H-Brücke mit dem Carbamat-carbonyl von UAAs bildet und als Selektivitätsfilter die Orthogonalität von PyIRS aufrecht erhält [18]. Die Position V370 befindet sich in einer flexiblen Region, wobei die Mutation V370R aufgrund einer kleinen Verschiebung der β 7- β 8-Haarnadel, die durch eine H-Brücke zwischen Arginin und den Aminosäuren F349 und D351 verursacht wird, die Flexibilität der Synthetase erhöht [120]. Die Variabilität an Position 370 wurde deshalb auf Valin und die positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin beschränkt. Die Positionen Y271, L274, C313, M315, I378 bedecken größtenteils die Bindungstaschenoberfläche und stehen im direktem Kontakt mit dem Substrat. Daher sollte die Einführung kleinerer Reste an diesen Positionen das Volumen der Tasche erhöhen und die Aminoacylierung von größeren UAAs ermöglichen. Diesen Annahmen folgend wurden die Positionen Y271, L274, C313, M315, Y349, V370, I378 ausgewählt und eine PyIRS-Bibliothek mit $9,5 \times 10^4$ Varianten entworfen (Abbildung 14B). Die Bibliothek wurde nicht codon-redundant designet und die Codon-Nutzung wurde für *E. coli* optimiert, um eine gleiche Repräsentation aller Varianten zu gewährleisten.

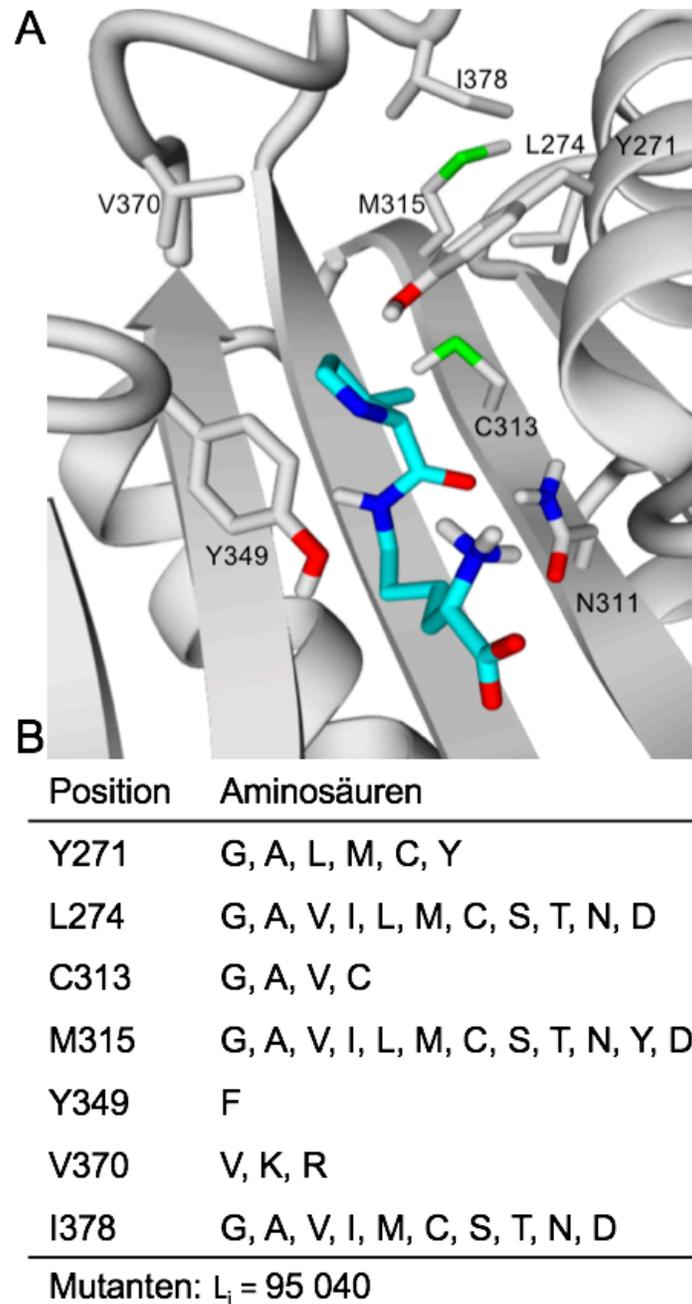


Abbildung 14. (A) Homologiemodell von *M. Barkeri* PylRS in komplex mit Pyrrolysin (cyan) (B) Design der *M. Barkeri* PylRS Bibliothek.

Da alle Sequenzen in der Bibliothek theoretisch mit der gleichen Wahrscheinlichkeit auftreten, wird die Beziehung zwischen der Bibliotheksgröße L_i , der Probengröße T_i (Anzahl der Klone) und der Wahrscheinlichkeit P_i , mit der eine bestimmte Sequenz in der Probe auftritt, durch Gleichung 1 definiert [121].

$$P_i = \left(1 - e^{-\frac{T_i}{L_i}} \right) \quad (1)$$

Entsprechend erfordert die Berücksichtigung von 99% aller Varianten der Bibliothek einen Oversampling-Faktor T_i/L_i von 4,6. In Bezug auf der hier entworfenen Bibliothek mit einer Größe von $9,5 \times 10^4$ Mitgliedern (L_i) müssen $4,4 \times 10^5$ PyIRS- Mutanten (T_i) analysiert werden. Eine vollständige redundante Saturierung aller 20 Aminosäuren auf den sechs Positionen der Bibliothek würde zu $6,4 \times 10^7$ Möglichkeiten führen und erforderte die Analyse von $2,9 \times 10^8$ Varianten, was die Reproduzierbarkeit eines Screens überschreitet [122].

ii) Wahl des Reporters

Auf Fluoreszenz basierende Screens bieten wahrscheinlich die schnellste Detektion eines UAA-Einbaus, daher wurde das fluoreszierende Protein mTFP1 mit einem Amber-Codon an Position 128 als Reportersystem etabliert [123]. Wird das Amber-Codon durch den Einbau einer UAA erfolgreich unterdrückt, emittiert mTFP1 bei einer Anregungswellenlänge von 462 nm ein Fluoreszenzsignal, das dem verkürzten Protein fehlt (siehe 4.1). Die erforderlichen genetischen Komponenten für den Fluoreszenzscreen wie mTFP1_{TAG128} und das PyIRS/tRNA^{Pyl}-Paar wurden in dem Plasmid pEVOL303 (Abbildung 11) kombiniert. pEVOL303 besitzt Bereiche der Plasmide pEVOL [108] und pET303 und codiert für die unabhängig induzierbaren Promotorsysteme pBAD für PyIRS und T7 für mTFP1. Im Gegensatz zu pEVOL mit zwei Kopien *pylS* besitzt pEVOL303 nur eine Kopie. Die Amber-Codon-Suppression von pEVOL303 wurde mit pET303 und pEVOL in *E. coli* in der Anwesenheit von Alock (1mM) verglichen (Abbildung 15). Beide Vektor-Systeme codieren für das selbe PyIRS/tRNA^{Pyl}-Paar und den mTFP1_{TAG128} Reporter. pEVOL303 zeigte eine geringfügig reduzierte Einbaueffizienz von Alock, die durch das Fehlen einer *pylS* Kopie erklärt werden könnte. Allerdings wurde mTFP_{WT} etwa 30% besser mit pEVOL303 exprimiert als mit den Plasmiden pET303 und pEVOL. Die geringere genetische Last auf *E. coli*-Zellen durch die Ausprägung nur einer Antibiotikaresistenz könnten diesen positiven

Effekt verursachen.

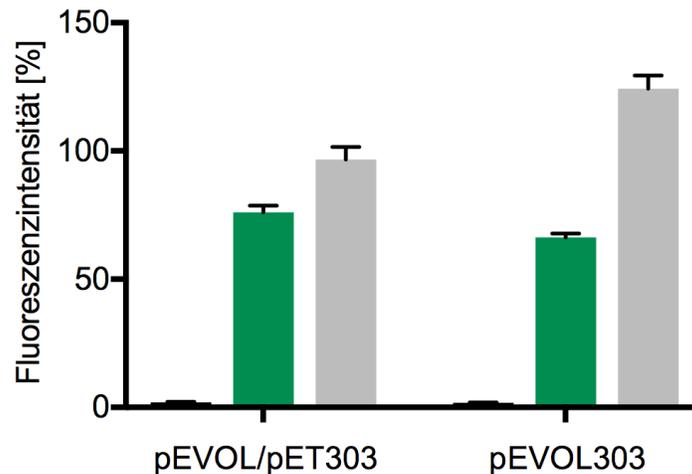


Abbildung 15. Vergleich der Einbaueffizienz von Alock durch das Zwei-Plasmid-System pEVOL, pET303_mTFP und das Ein-Plasmid-System pEVOL303 in *E. coli*. Der Einbau von Alock erfolgte in mTFP_{TAG128} bei einer UAA Konzentration von 0 mM (schwarze Balken) oder 1 mM (grüne Balken). Expression von WT mTFP1 (grauer Balken). Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen erhoben.

iii) Screening-Methodik

Zellassays auf Agarplatten werden am häufigsten verwendet, um AaRS für den Einbau neuer UAAs zu entwickeln [23], obwohl FACS eine vielversprechende Alternative bietet und bereits erfolgreich für die Entwicklung der Tyrosyl-tRNA-Synthetasen (TyrRS) eingesetzt wurde [112]. Der hier beschriebene FACS-Aufbau nutzt die intrinsische Diskriminierung von kanonischen Aminosäuren durch PylRS und besteht aus nur einer positiven Selektionsrunde basierend auf der Fluoreszenz von mTFP1 (Abbildung 12). Die hergestellte PylRS-Bibliothek wurde in pEVOL303 kloniert und in *E. coli* transformiert. Die Expression von mTFP_{TAG128} wurde mit 1 mM Alock oder ohne UAA für die Negativkontrolle durchgeführt. Nach dem UAA-Einbau wurden die Proben auf 1×10^7 Zellen/ml verdünnt, in M9-Minimalmedium gewaschen und mit FACS analysiert. Zellen dessen Vorwärtsstreuung und Fluoreszenzsignal sich innerhalb des eingestellten Grenzwertes befanden, wurden einzeln in eine 96-Well-Platte sortiert.

Die Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle wurde vor jedem Experiment überwacht,

um die Orthogonalität der Bibliothek zu überprüfen. Das Fluoreszenzsignal der Negativkontrolle lag immer unter dem eingestellten Grenzwert, folglich wurden keine kanonischen Aminosäuren eingebaut (Abbildung 16A, linker Plot). Dagegen zeigten einige Zellen, die mit Alock kultiviert wurden, ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal (Abbildung 16A, rechter Plot).

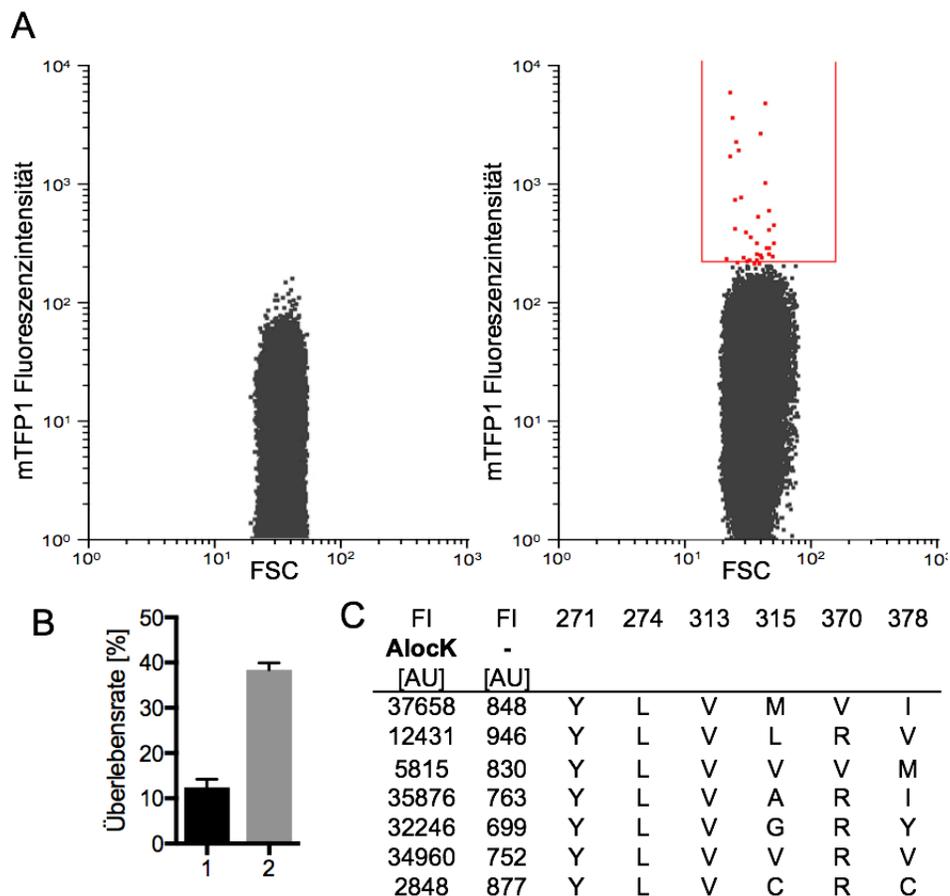


Abbildung 16. Identifizierung von PyIRS-Varianten für den Einbau von Alock. A) (Linker Plot) *E. coli* mit pEVOL303_Lib wurden ohne UAA kultiviert und mittels FACS analysiert. (Rechter Plot) *E. coli* mit pEVOL303_Lib wurden mit 1 mM Alock kultiviert. Fluoreszierende Zellen (rot) innerhalb eines Grenzwertes (rote Linie) wurden von nicht-fluoreszierenden Zellen (schwarz) getrennt; Vorwärtsstreuung (FSC). B) Überlebensrate von sortierten Zellen in LB-Medium (1) und konditioniertem Medium (2). Ergebnis wurde aus fünf unabhängigen Experimenten gewonnen. C) Die sechs Bibliothekspositionen (Position 271, 274, 313, 315, 370, 378) der sieben sortierten PyIRS-Varianten für Alock sind abgebildet. Die Einbaueffizienz in mTFP1_{TAG128} wird durch die Fluoreszenzintensität (FI) ohne (-) und mit 1 mM Alock (1) dargestellt.

Die positiven Zellen erschienen als heterogene Population mit verschiedenen

Fluoreszenzintensitäten. Dieser Intensitätsunterschied könnte auf verschiedene PyIRS-Varianten hindeuten, die AlocK unterschiedlich gut einbauen. Positive Zellen wurden separat in eine 96-Well-Platte mit vorgelegtem konditioniertem Medium sortiert. *E. coli*-Zellen zeigten dabei eine 3-fach verbesserte Überlebensrate im konditionierten Medium als im unbehandeltem LB-Medium (Abbildung 16B). Das konditionierte Medium enthält unter anderem sekretierte Wachstumsfaktoren von *E. coli*, die das Anwachsen der Zellen verbesserten. Die Sequenzierung von pEVOL303_Lib bestätigte, dass sieben verschiedene PyIRS-Varianten AlocK eingebaut haben (Abbildung 16C).

Die sequenzierten Plasmide wurden erneut separat in *E. coli* transformiert und der orthogonale Einbau von AlocK wurde in Anwesenheit und Abwesenheit der UAA basierend auf der jeweiligen Fluoreszenzintensität überprüft. In allen Fällen stimmten die Fluoreszenzmessungen mit den FACS-Ergebnissen überein und zeigten keine signifikant erhöhte Hintergrundexpression von mTFP1 in Abwesenheit der UAA (Abbildung 16C).

Der FACS-Screen wurde wie beschrieben verwendet um den Einbau der UAAs **1-23** (Abbildung 17) durch die PyIRS-Bibliothek zu untersuchen. Die UAAs können in drei strukturell verschiedene Klassen unterteilt werden (Abbildung 17). Klasse I (**1-14**) tragen einen linearen aliphatischen Schwanz. Die unterschiedlichen Kettenlängen der UAAs erlauben eine systematische Analyse der Inkorporationseffizienz durch PyIRS. Aliphatische UAAs scheinen gut von PyIRS eingebaut zu werden. So führte die Zugabe von **1-8** und **10-14** zu einem starken Fluoreszenzsignal von mTFP1 (Abbildung 16C und 7.4). UAA **9** überschreitet mit 11 Kohlenstoffatomen nach der Carbamatfunktion die maximale Länge und wurde dementsprechend nicht eingebaut. *E. coli*-Zellen verklumpen nach der Zugabe von UAA **9** (siehe Diskussion). Die lange hydrophobe Seitenkette interagiert möglicherweise mit der Zellmembran und verhindert somit die Aufnahme in die Zelle.

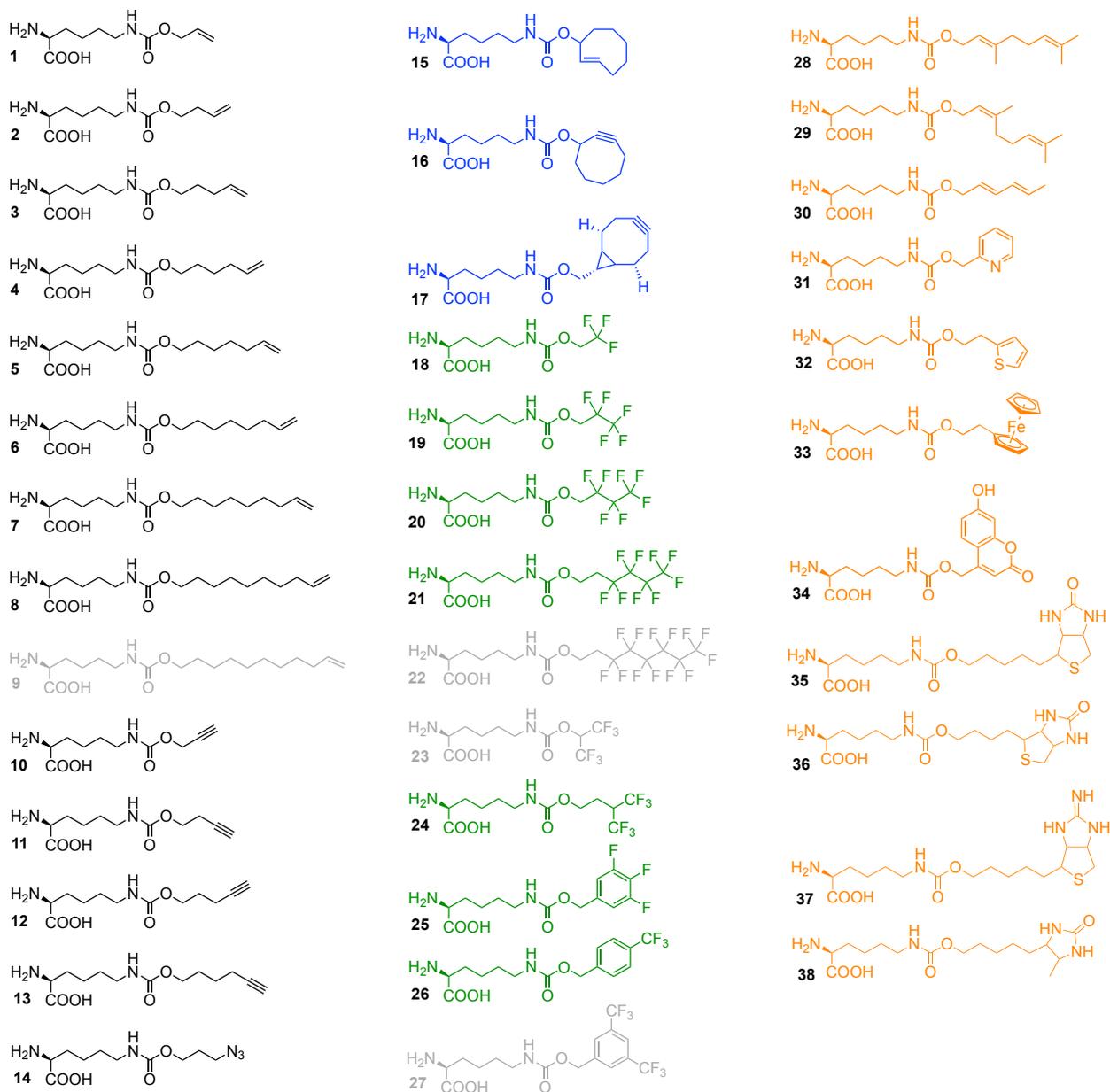


Abbildung 17. Strukturen der getesteten UAs. Lineare Alkene, Alkine und Azide (schwarz); cyclische Alkene und Alkine (blau); fluorierte Seitenketten (grün); diverse Funktionalitäten (orange). Strukturen in grau zeigen UAs, die nicht eingebaut wurden. Nummerierung ist entsprechend der Bezeichnung im Text.

Klasse II besteht aus zyklischen UAs **15-17**, die in kupferfreien Klick-Bikonjugationen verwendet wurden [124]. Die Seitenketten sind sperriger als Klasse I und die UAs wurden 4-10-fach schlechter durch Varianten der PyIRS-Bibliothek eingebaut (siehe Fluoreszenzwerte in 7.4). Klasse III umfasst die fluorierten UAs **18-23**. Fluor fehlt im Wesentlichen in der Biologie [125]. Der Einbau von fluorierten UAs würde es

ermöglicht, die außergewöhnlichen Eigenschaften von Fluor im Protein-Engineering zu nutzen. Die C-F-Bindung ist länger als eine C-H-Bindung und somit sterisch anspruchsvoller. Während der Einbau von **18-21** über die spezifische Fluoreszenz von mTFP1 nachgewiesen wurde (siehe Fluoreszenzwerte in 7.4), konnten keine fluoreszierenden Zellen nach der Zugabe von UAA **22** und **23** mittels FACS detektiert werden. Die fluorierte Seitenkette von **21** scheint die maximale Länge für unsere PyIRS-Bibliothek zu definieren. Die kurze UAA **23** mit einer Verzweigung direkt nach dem Carbamat wurde ebenfalls nicht eingebaut. Eine fluorierte Verzweigung direkt nach dem Carbamat scheint von PyIRS nicht toleriert zu werden.

Insgesamt wurden 151 PyIRS-Varianten sequenziert und 20 der getesteten 23 UAAs konnten eingebaut werden. Von den 151 PyIRS-Varianten waren 41 Sequenzen redundant und 110 Sequenzen wurden einmalig gefunden. Dabei wurden 17 polyspezifische Varianten identifiziert, die mehr als eine UAA akzeptierten (siehe Tabelle in Abschnitt 7.3).

4.3 Sequenz-Substrat-Beziehung

Die Sequenzen der PyIRS-Varianten wurden für die jeweiligen UAAs analysiert, um Unterschiede in der Bindungstasche für den Einbau kleiner und großer Reste zu bestimmen. In einem zweiten Schritt wurden die 110 einzigartigen Sequenzen miteinander verglichen, um ein allgemeines Konzept für die Gestaltung einer polyspezifischen Variante abzuleiten. Die Sequenzen wurden gemäß der eingebauten UAAs in eine Heatmap zusammengefasst (Abbildung 18). Dargestellt ist die Frequenz mit der eine Aminosäure an eine der sechs PyIRS-Bibliothekspeditionen auftrat. Die Mutation Y349F wurde in der Heatmap nicht berücksichtigt. Im Allgemeinen ist zu sehen, dass die 20 eingebauten UAAs aufgrund ihrer unterschiedlichen Strukturen der Seitenketten auch verschiedene strukturelle Ansprüche an die PyIRS-Bindetasche haben.

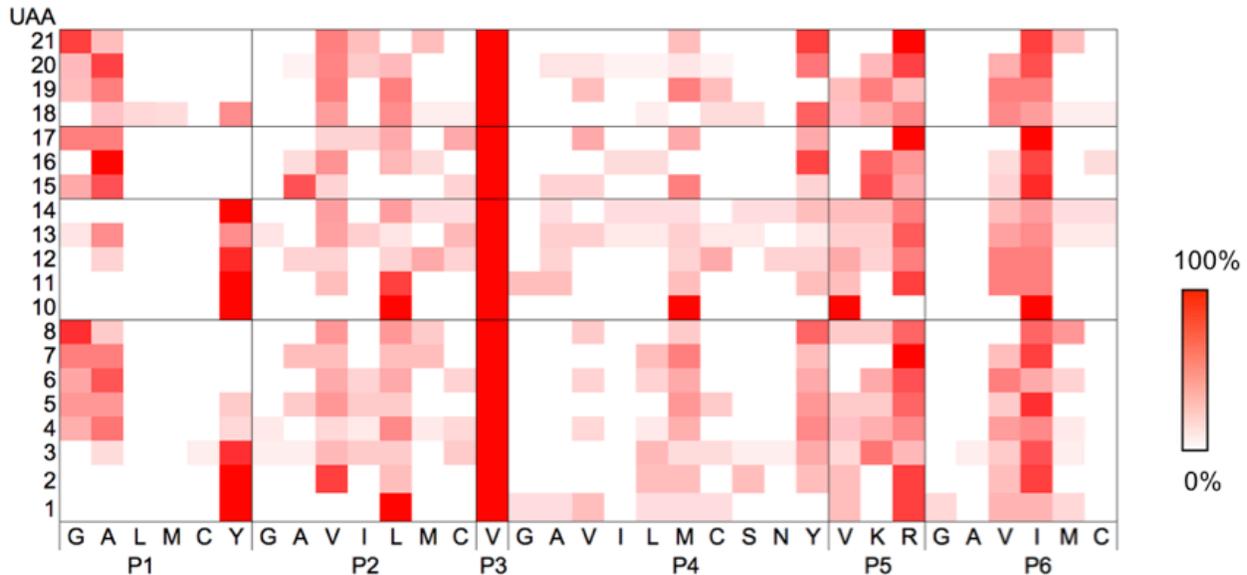


Abbildung 18. Heatmap der sechs variablen Positionen (P1=Y271, P2=L274, P3=C313, P4=M315, P5=V370, P6=I378) aller identifizierten PylRS-Varianten der UAAs **1-23**. Aminosäuren werden als 1-Buchstaben-Code dargestellt. Die Farbintensität gibt die relative Häufigkeit einer Mutation an (weiß: 0%, rot 100%). Mutationen, die in keiner sequenzierten PylRS-Variante vorgekommen sind, wurden aus der Heatmap entfernt. Keine PylRS-Variante wurde für die UAA **9, 22, 23** gefunden.

Position P1 (Y271) bildet den Boden der Bindungstasche und variiert daher stark mit der UAA-Größe. Tyrosin ist an dieser Stelle für die kurzen UAAs **1, 2, 10, 11** sowie **17** stark konserviert. Alanin trat dagegen für die größeren UAAs **4-8, 13, 15, 16, 19** und **20** am häufigsten an P1 auf. Die längste fluorierte UAA **21** weist eine Selektion für Glycin auf (Abbildung 18). Die Mutation Y271A wurde bereits in der Literatur für den Einbau von großen UAAs beschrieben [47, 126].

Ein ähnlicher Trend wurde für Position P2 (L274) beobachtet, diese Position begrenzt das hintere Ende der Bindungstasche. Während Leucin für kleine UAAs **1, 10** und **11** bevorzugt wird, treten die kürzeren Aminosäuren Valin und Alanin mit einer höheren Häufigkeit für UAAs **15, 16, 20** und **21** auf. Die Position P3 (C313V) ist in allen sortierten Varianten streng konserviert. Die Mutation C313V wurde bereits in früheren Studien beschrieben [127]. Die Position P4 (M315) scheint für kleine UAAs sehr variable zu sein. Dagegen ist die Mutation M315Y für die größeren UAAs **8, 16, 20, 21** häufiger zu finden.

Die Positionen P5 (V370) und P6 (I378) wurden durch die unterschiedlichen UAAs kaum beeinflusst. Die Mutation V370R und I378 erscheinen mit der höchsten Frequenz unter allen sortierten Varianten.

4.4 Design einer polyspezifischen PylRS Variante

Ein orthogonales AaRS/tRNA-Paar wird in der Regel für eine spezifische UAA entwickelt. In einigen Fällen kann das Paar allerdings bis zu 40 verschiedene UAAs mit ähnlichen Strukturmerkmalen einbauen [128]. Um eine polyspezifische Variante für größere UAAs zu entwerfen, wurden Sequenz-Substrat-Beziehungen aus der Heatmap abgeleitet (Abbildung 18). Die Mutationen Y271A, L274V, C313V, M315Y, Y349F und V370R wurden kombiniert, um eine PylRS-Variante mit den gewünschten Eigenschaften zu erhalten. Die entsprechende Variante wurde als HpRS (highly-promiscuous-tRNA-Synthetase) bezeichnet.

Das Substratspektrum von HpRS wurde mit den UAAs **1-35** getestet (Abbildung 17). Das HpRS/tRNA^{Pyl} Paar und mTFP1_{TAG128} wurde dafür mit den UAAs (1mM) **1-35** in *E. coli* exprimiert. Der UAA-Einbau wurde anhand der Fluoreszenzintensität vom mTFP1 verfolgt (Abbildung 19A-C). Zusätzlich wurde die Expression von mTFP1 mittels SDS-PAGE (Abbildung 19E) und ESI-TOF (siehe 7.2 ESI-TOF Daten) bestätigt. Der Einbau der UAAs **1-8, 10-21, 24-26, 28-35** konnte nachgewiesen werden.

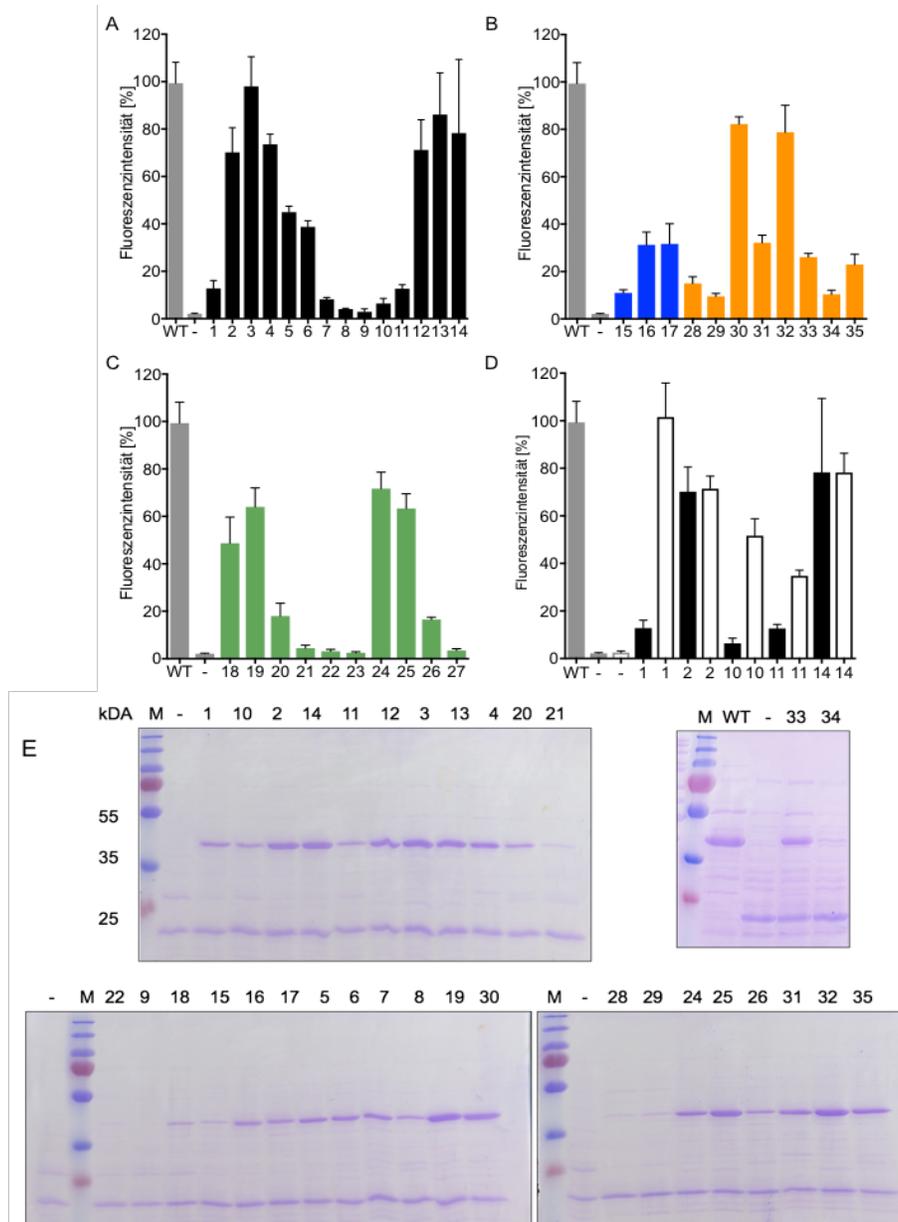


Abbildung 19. Einbau der UAAs 1-35 in mTFP1_{TAG128} durch HpRS in *E. coli*. Der UAA-Einbau in mTFP1_{TAG128} wurde über die Fluoreszenzintensität verfolgt. Die Fluoreszenz wurden auf das Signal von WT mTFP1 (WT, grauer Balken) normiert. Als Negativkontrolle wurde *E. coli* ohne UAA kultiviert (-, grauer Balken). Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. A) Inkorporationsprofil von HpRS für Alkene 1-9 (Schwarz) und Alkine 10-13 (Schwarz) und Azid 14 (Schwarz). B) UAAs mit gespannten zyklischen Ringen 15-17 (blau) und mit mehreren Funktionalitäten 28-35 (orange). C) Fluorierte UAAs 18-27 (grün). D) Vergleich der mTFP1_{TAG128} Fluoreszenzintensitäten in Gegenwart von 1, 2, 10, 11, 14 und HpRS (solide Balken) oder CysKRS (hohle Balken). E) SDS-Gel von hitzebehandelten *E. coli*-Zellysat nach UAA-Einbau von 1-35 in TFP1_{TAG128} durch HpRS. Das mTFP1-Konstrukt besitzt ein Molekulargewicht von etwa 38 kDA. Das Verkürzte mTFP1 bis zum Amber-Codon hat ein Molekulargewicht von etwa 24 kDA.

HpRS toleriert ein breites Substratspektrum von Lysin-Carbamaten mit diversen Merkmalen wie aliphatischen Ketten, fluorierten Resten, cyclischen Strukturen und eine Biotinylierung. In Übereinstimmung mit den vorausgesagten Eigenschaften ist HpRS besonders gut geeignet um UAAs mit größeren Seitenketten **3**, **4**, **13** einzubauen und zeigt hingegen nur eine moderate Akzeptanz für die kleinsten getesteten UAAs **1**, **10**. Basierend auf der Heatmap ist die Mutation C313V ausreichend, um eine optimierte PyIRS Variante für den Einbau von kleinen UAAs zu erzeugen. Tatsächlich zeigte diese Synthetase, die zuvor als CysKRS veröffentlicht wurde [127], eine bessere Einbaueffizienz der kleinen UAAs **1**, **10**, **11** als HpRS (Abbildung 19D). Homologiemodelle von HpRS und CysKRS geben weitere Einblicke in die beobachteten Struktur-Substrat-Beziehungen (Abbildung 20).

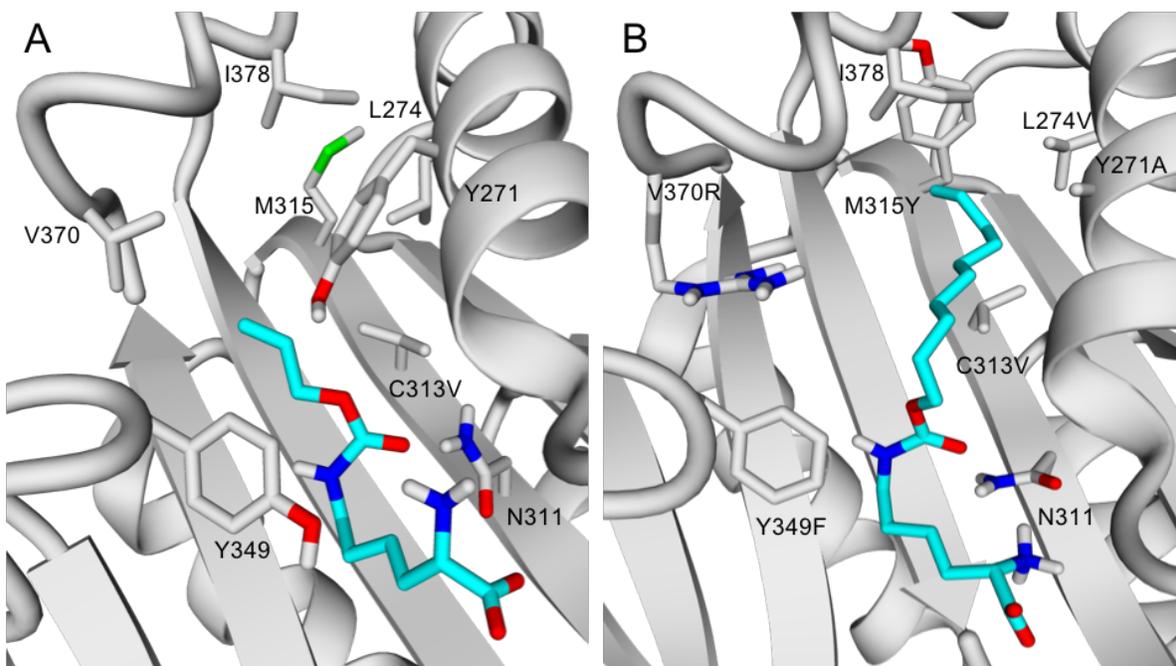


Abbildung 20. Vergleich der Bindungstaschen von HpRS und CysKRS. A) Homologiemodell von *M. barkeri* CysKRS im Komplex mit UAA **1** (cyan). B) Homologiemodell von *M. barkeri* HpRS im Komplex mit UAA **21** (cyan).

Unter den sechs Mutationen, die zu HpRS führen, beeinflusst Y271A am stärksten die Form der Bindungstasche. Der Austausch von Tyrosin zu Alanin öffnet einen großen Hohlraum. Die Mutation L274V erzeugt einen zusätzlichen Raum. Die Einführung von Tyrosin an Position 315 könnte theoretisch eine H-Brücke zu dem Substrat herstellen. Diese Wechselwirkung könnte den Einbau fluorierter Reste verbessern, die für die Ausbildung schwacher H-Brücken bekannt sind [129]. Insgesamt scheint die Bindungstasche von CysKRS und HpRS in Bezug auf das Volumen signifikant unterschiedlich zu sein. Während HpRS einen großen Rest in der Bindungstasche unterbringen kann, ist CysKRS für kleinere UAAs optimiert.

4.5 Einbau von biotinylierten UAAs

Die polyspezifischen PylRS-Varianten HpRS ermöglichte erstmalig den Einbau einer biotinylierten UAA. In einer zweiten PylRS-Bibliothek sollte die HpRS-Sequenz als Ausgangspunkt verwendet werden um eine optimierte PylRS-Variante für den Einbau biotinylierter UAAs zu finden. Die Positionen M241, L372, W376 wurden aufgrund der Nähe zum Biotinrest für eine kleine PylRS-Bibliothek bestehend aus 912 Varianten ausgewählt. Die Mutanten wurden zusammen mit der tRNA^{Pyl} und mTFP1_{TAG128} in Anwesenheit von UAA **35** (1mM) in *E. coli* exprimiert. Fluoreszierende Zellen wurden, wie beschrieben, mittels FACS in konditionierten Medium sortiert. Vier positiven Varianten wurden für UAA **35** sequenziert. Die PylRS-Variante mit den Mutationen M241A, Y271A, L274V, C313V, M315Y, Y349F, V370R führte basierend auf der Fluoreszenzintensität zu dem stärksten Einbau der UAA **35** (Abbildung 21). Aufgrund der Optimierung für die biotinylierte UAA **35** wurde diese Mutante als BioRS bezeichnet. Die Einbaueffizienz von UAA **35** wurde von BioRS in Vergleich zu HpRS verdoppelt.

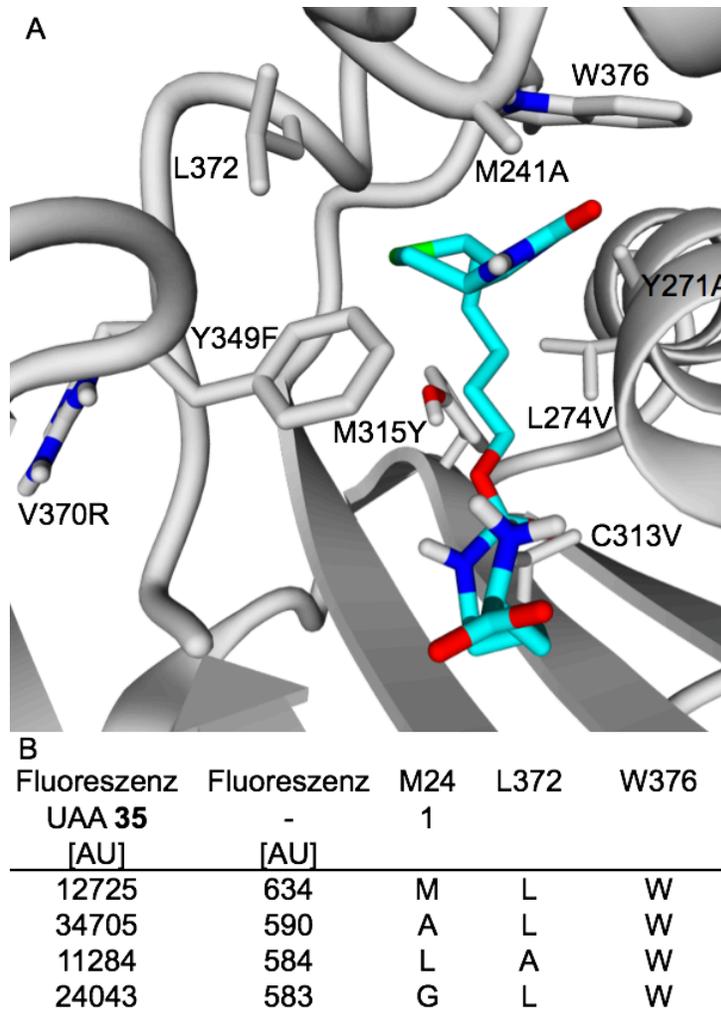


Abbildung 21. (A) Homologiemodell von BioRS im Komplex mit UAA 35 (cyan). BioRS-spezifische Aminosäuren wurden dargestellt. (B) Fluoreszenzsignal von sortierten Varianten der zweiten PylRS Mutantenbibliothek in Abwesenheit (-) und Gegenwart von UAA 35.

Zur Anschauung wurde ein Homologiemodell von BioRS erstellt. Dabei wurde die UAA 35 in die Bindetasche modelliert und die Energie der Struktur minimiert (Abbildung 21A). Die UAA 35 biegt sich in dem Modell, aufgrund der beträchtlichen Länge der Seitenkette. Die Mutation M241A vergrößert die Bindungstasche von BioRS und verbessert somit den Einbau von UAA 35. Mutationen an den Positionen L372 und W376 führten dagegen zu keiner Verbesserung.

4.6 Einbau von Biotinanaloga

Nach dem erfolgreichen Einbau von UAA **35** in mTFP1 durch BioRS, wurde das Substratspektrum der neuen PylRS untersucht. BioRS ermöglichte zusätzlich den positionsspezifischen Einbau der kürzeren biotinylierten UAA **36** und der Biotinanaloga UAA **37** und **38**. Eine SDS-PAGE des Zelllysates (Abbildung 22A) und eine Fluoreszenzmessung der *E. coli*-Zellen (Abbildung 22D) zeigten die UAA-abhängige Expression des Proteins mTFP1 und die Diskriminierung der 20 kanonischen Aminosäuren in Abwesenheit der UAAs an. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch einen anti-His sensitiven Western-Blot desselben Zelllysats bestätigt (Abbildung 22B). Das natürlich vorkommende Biotin ist dagegen kein geeignetes Substrat für BioRS. mTFP1 wurde nach dem UAA-Einbau mit Hilfe des N-terminale His-Sumo-Tags aus einer 1-Liter-Zellkultur gereinigt. Das gereinigte mTFP1_{UAA 35-38} wurde auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 22C) und die ESI-TOF-Analyse ergab jeweils eine Masse von 25424,5 Da, 25410,6 Da, 25423,5 Da und 25380,5 Da, in Übereinstimmung mit den berechneten Massen von 25423,8 Da, 25409,8 Da, 25422,9 Da, 25379,8 Da (siehe ESI-TOF Daten in 7.2). Aufgrund des signifikant besseren Einbaus von UAA **35** im Vergleich zu UAA **36** wurden die nachfolgende Experimente mit **35** durchgeführt.

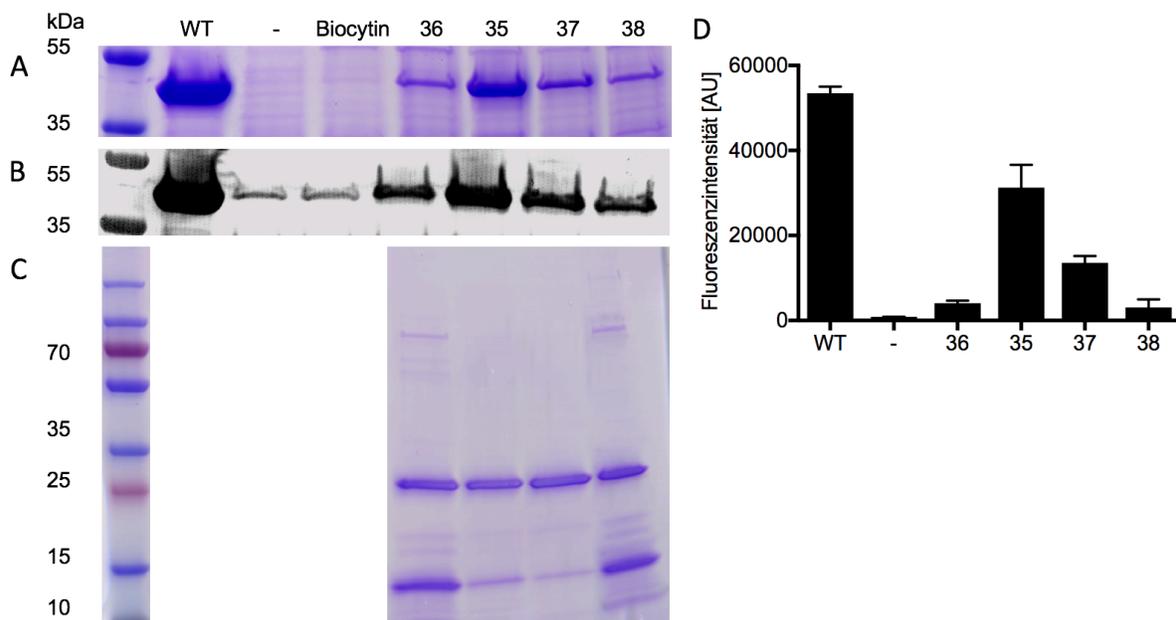


Abbildung 22. A) Denaturierende SDS-PAGE von *E. coli*-Zelllysaten. Einbau der UAAs **35-38** und Biotin in mTFP1_{TAG128} durch das BioRS/tRNAPyl-Paars. WT mTFP1 (WT) und die Negativkontrolle mTFP1_{TAG128} (-) wurden ohne UAA exprimiert. (B) Western-Blot-Analyse desselben *E. coli*-Zelllysaten mit einem anti-His-Antikörpers. (C) SDS-Gel von gereinigtem mTFP1 ohne N-terminalen Sumo-His-Tag. Eingebaut wurde die UAAs

35-38 (D) Fluoreszenzsignal von *E. coli*-Zellen. Das BioRS/tRNA^{Pyl}-Paar wurde entweder mit WT mTFP1 (WT) oder mit mTFP1_{TAG128} in der Gegenwart von **35-38** exprimiert. Die Negativkontrolle (-) wurde in Abwesenheit einer UAA durchgeführt. mTFP1 mit Sumo-His-Tag besitzt eine Masse von etwa 38 kDA. mTFP1 ohne Sumo-His hat eine Masse von etwa 25 kDA. Verkürztes mTFP1 ohne Sumo-His-Tag hat eine Masse von etwa 15 kDA.

4.7 Pull-Down von mTFP1

Die UAAs Biotin-, 2-Iminobiotin - und d-Desthiobiotinlysin wurden in mTFP1_{TAG128} durch BioRS eingebaut, um die Isolierung des Proteins aus dem Zelllysat zu testen. Als Referenz wurde zusätzlich mTFP1-Wildtyp exprimiert. Die Zelllysate wurden mit PBS gemäß ihrer Fluoreszenzintensität verdünnt, um gleiche Konzentrationen an exprimierten mTFP1 zu erhalten (Abbildung 23A). Da 2-Imminobiotin eine pH-abhängige Affinität zu Streptavidin besitzt, wurden Verdünnungen oder Waschschrte für UAA **37** immer mit einem basischen Waschpuffer (pH 11) durchgeführt.

Die überschüssigen UAAs wurden aus den Zelllysaten durch einen 10 kDA Zentrifugalfilter gewaschen. Anschließend wurden die Zelllysate zusammen mit Streptavidin-beschichteten Dynabeads für 1 Stunde inkubiert. Die Dynabeads wurden wieder entfernt und das Cleared-Lysat (nach Behandlung mit Dynabeads) wurde auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 23B). Während mTFP1-Wildtyp immer noch als sichtbare Bande in dem Cleared-Lysat auftrat, wurde mTFP1 mit einer eingebauten UAA von den Dynabeads aus dem Lysat entfernt. Die Dynabeads wurden dreimal mit PBS oder Waschpuffer (pH 11) im Falle von UAA **37** gewaschen, um unspezifische gebundene Proteine zu entfernen. In einem abschließenden Schritt wurden die verbleibenden Proteine von den Dynabeads durch Erhitzen auf 95 °C in Laemmli-Puffer eluiert. Die Proben wurden von den Dynabeads getrennt und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 23C). Nur mTFP1 mit eingebauter UAA wurde von den Dynabeads im letzten Schritt eluiert, was auf eine effiziente Retention aufgrund der Wechselwirkung zwischen Biotin/Biotin-Analoga und Streptavidin zurückzuführen ist.

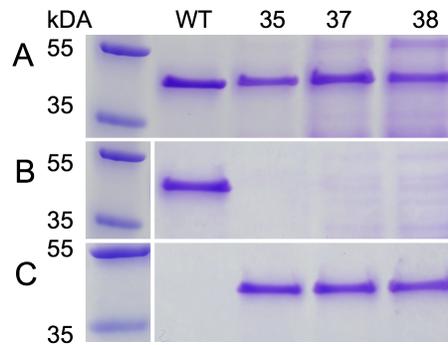


Abbildung 23. Biotinanaloga zur Isolation von mTFP1 aus *E. coli*-Zelllysaten. (A) SDS-PAGE-Analyse von Zelllysaten, die entweder WT mTFP1 (WT) oder mTFP1_{TAG128} mit eingebauter UAA **35**, **37**, **38** enthalten. (B) Cleared-Lysat nach der Behandlung mit Dynabeads. (C) Eluat von gewaschenen Dynabeads. Das mTFP1-Konstrukt hat eine Masse von etwa 38 kDA.

4.8 Pull-Down von *recA* für die Identifikation von Interaktionspartnern

Als nächstes wurde der Focus auf *recA* gelegt. Das Protein *recA* ist ein gut untersuchtes multifunktionales Enzym mit einem Netzwerk von Interaktionspartnern. Proteinmodifikationen können die Interaktionsstellen von *recA* stören und somit die natürliche Funktion behindern. Die geringe Größe von biotinylierten UAAs im Vergleich zu herkömmlichen Reinigungs-TAGs verringert die Wahrscheinlichkeit eine Interaktionsstelle zu behindern. Biotinlysin wurde für die Isolation von *recA* an der exponierten Position 36 inkorporiert. Der UAA-Einbau in *recA* wurde für 16 Stunden in Gegenwart von UAA **35** (1 mM) durch das BioRS/tRNA^{Pyl}-System in *E. coli* durchgeführt. UAA **35** markiertes *recA* wurde aus dem Zelllysate mit Dynabeads isoliert und nach drei aufeinanderfolgenden Waschschritten mit PBS (0,1% Tween-20) bei 95 °C in Laemmli-Puffer eluiert. Das SDS-Gel des Zelllysats und des Eluats zeigen eine Bande bei etwa 38 kDa, was der Masse von *recA* entspricht und einen erfolgreichen Pull-Down in Gegenwart von UAA **35** anzeigt (Abbildung 24A). Die *recA*-spezifische Bande bei 38 kDa konnte dagegen nicht in Abwesenheit von UAA 35 gefunden werden (Abbildung 24A).

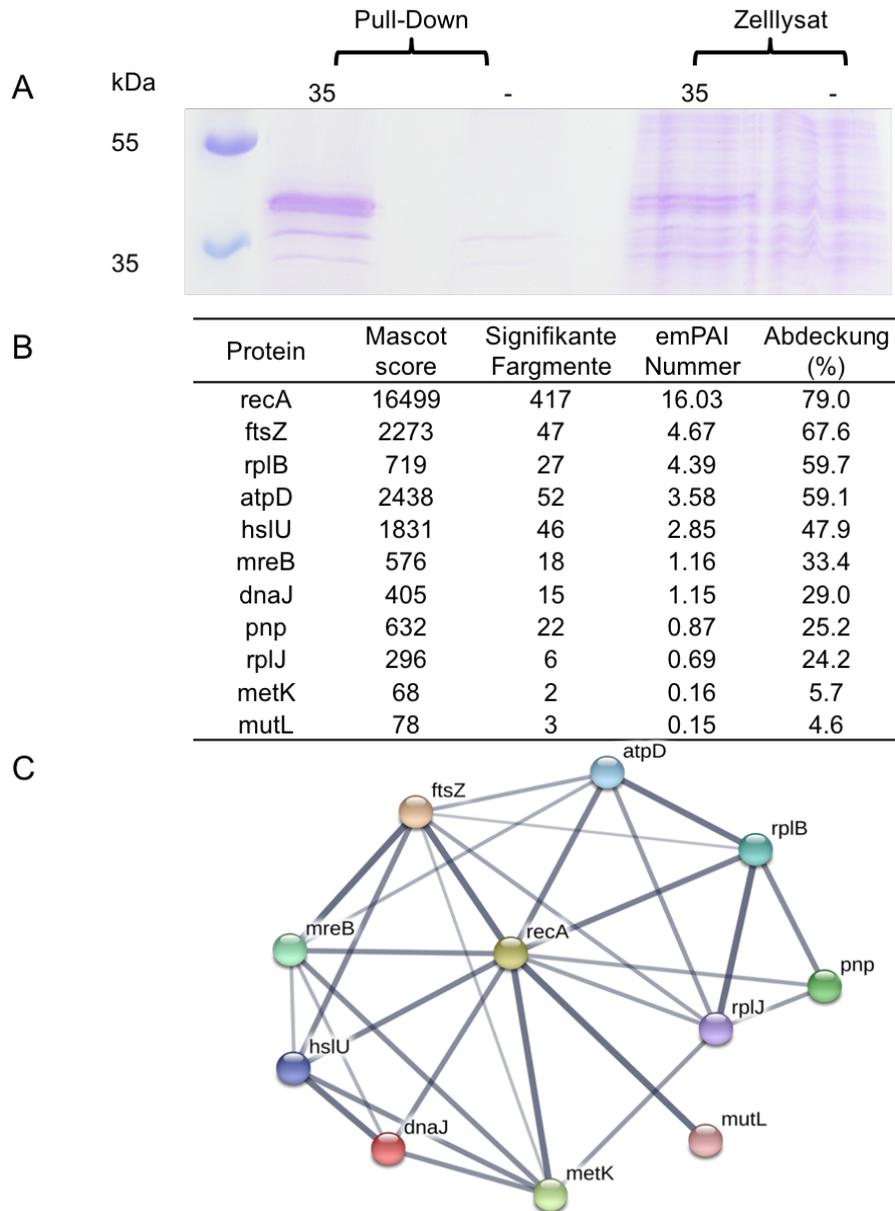


Abbildung 24. Analyse von *recA* mittels UAA 35. A) SDS-PAGE-Analyse von *E. coli*-Zelllysaten. *recA*_{TAG36} wurde zusammen mit dem BioRS/tRNA^{Pyl} Paar in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit von UAA 35 exprimiert. *recA*_{UAA35} wurden aus dem Zelllysate durch ein Pull-Down mit Dynabeads isoliert. B) MS/MS Analyse der Proteinbanden nach dem Pull-Down. Identifizierte Proteine basieren auf der Mascot-Datenbanksuche C) Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk von *recA*. Die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung wird durch die Linienstärke angezeigt.

Das Bande von recAs wurden ausgeschnitten und mit MS/MS analysiert. Die Mascot-Analyse der Fragmente ergab eine Sequenzabdeckung von 79% für recA. Desweiteren wurden 10 mögliche Interaktionspartner von recA identifiziert (Abbildung 24B). Zur besseren Veranschaulichung wurde das Netzwerk der identifizierten Proteine mit dem Programm STRING berechnet (Abbildung 24C) [130]. Die Linien zeigen die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und die Dicke der Linien repräsentiert die Wahrscheinlichkeit der Interaktion, die durch STRING bestimmt wurden. Der positionsspezifische Einbau der UAA 35 wurde durch einen tryptischen Verdau bestätigt (Abbildung 25).

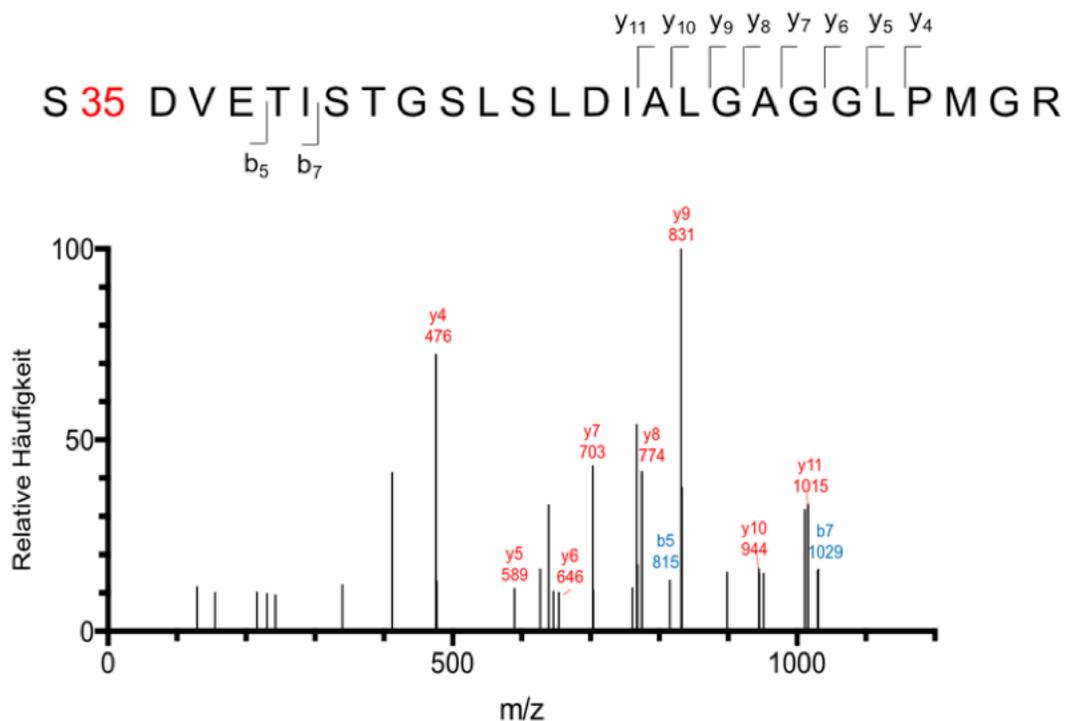


Abbildung 25. Tryptischer Verdau von recA exprimiert in *E. coli*. MS/MS-Analyse der b und y Ionen bestätigte den Einbau von UAA 35 an Position 36 (35 rot angezeigt) in dem abgebildeten Fragment.

4.9 pH abhängige Reinigung von Anbu

Die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin ist nahezu irreversibel. Der Einsatz von UAA 35 ist deshalb auf Anwendungen beschränkt, die eine hohe Selektivität und

Bindungsaffinität erfordern. Wenn ein funktionelles Protein von Streptavidin wieder gelöst werden soll, wird ein Elutionsmechanismus benötigt. 2-Iminobiotin und d-Desthiobiotin sind Biotinanaloga mit pH-abhängiger bzw. reduzierter Affinität zu Streptavidin, was eine reversible Bindung ermöglicht. Um die pH-abhängige Proteinreinigung durch UAA **37** zu demonstrieren, wurde Anbu als Modellprotein ausgewählt. Es wird vermutet, dass Anbu ein Vorläufer des Proteasoms darstellt, jedoch wurde bisher keine proteolytische Funktion nachgewiesen [130]. Ein Amber-Codon wurde an der exponierten Position 71 in das Gen eingefügt (PDB: 5NYP). Nach der Expression von Anbu_{TAG71} mit UAA **37** (1 mM) wurde das *E. coli*-Zelllysate mit dem basischen Waschlösungspuffer (pH 11) äquilibriert. Das Zelllysate wurden anschließend zusammen mit Dynabeads für eine Stunde inkubiert. 2-Iminobiotin bindet bei pH-Werten > 10 mit hoher Affinität an Streptavidin und bleibt daher an den Dynabeads haften. Der Streptavidin-2-Iminobiotin-Komplex dissoziiert jedoch bei einem sauren pH-Wert < 5 und das Protein kann wieder von den Beads getrennt werden. Das Zelllysate, das Cleared-Lysate (nach Dynabeads Behandlung), Waschlösungsschritte der Beads und das eluierte Proteine wurden auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 26A). Eine Bande bei 30 kDa zeigte die erfolgreiche Reinigung von Anbu durch UAA **37** an. Die Bande wurde ausgeschnitten und weiter mit MS/MS analysiert. Die Mascot-Suche ergab eine 95% Sequenzabdeckung von Anbu (Abbildung 26B) und der Einbau von UAA **37** an Position 71 wurde durch einen chemotryptischen Verdau bestätigt (Abbildung 26C). Damit wurde das Protein Anbu in nur einem pH-abhängigen Reinigungsschritt durch die starke und spezifische Affinität von 2-Iminobiotin zu Streptavidin isolieren.

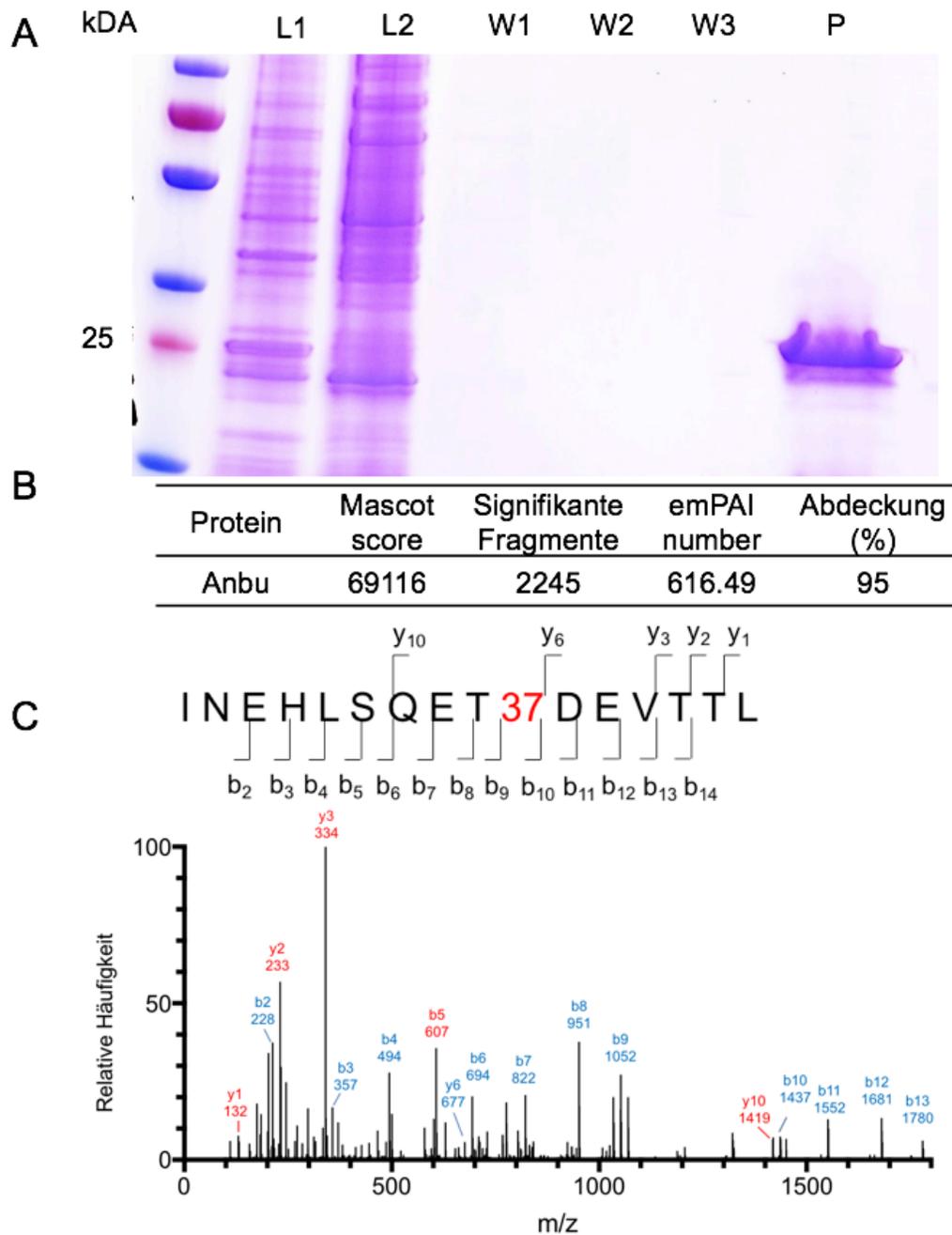


Abbildung 26. A) SDS-PAGE-Analyse von Anbu_{UAA37}. *E. coli*-Zelllysat mit Anbu_{UAA37} (L1), Cleared-Lysat nach der Behandlung mit Dynabeads (L2), Waschschrirte der Beads (W1, W2 und W3), eluiertes Protein Anbu (P). B) MS/MS-Analyse der Proteinbande (P). C) Die MS/MS-Analyse der b und y Ionen bestätigte den Einbau von UAA 37 an Position 71 (37 rot markiert) in dem abgebildeten Fragment.

4.10 Einbau der Biotinanaloga in HEK-293T-Zellen

Die UAAs **35**, **37** und **38** wurden in humanen Zellen genetisch codiert. Dafür wurden die Plasmide pmCherry-TAG-EGFP-HA und pMmBioRS-U6-PylIT in HEK-293T-Zellen cotransfiziert. Das Plasmid pmCherry-TAG-EGFP-HA codiert für das fluoreszierende Reporterkonstrukt mCherry-TAG-EGFP-HA (Abbildung 27A) und pMmBioRS-U6-PylIT codiert für BioRS. Zellen, die beide Plasmide besaßen, wurden ohne und mit UAA (0,5 mM) für 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden mCherry-TAG-EGFP-HA und PylRS in HEK-293T-Zellen coexprimiert. Als Substrat für die PylRS diente die gut einbauende UAA N ϵ -(tert-Butoxycarbonyl) -L-lysins (Bock) [131]. Die Zugabe der UAAs führte zu einer Amber-Codon-Suppression zwischen mCherry und EGFP, so dass ein rotes (mCherry) sowie ein grünes (EGFP) Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte (Abbildung 27B). Das Fehlen eines EGFP-Signals in Abwesenheit einer UAA (-) zeigte die Orthogonalität des BioRS/tRNA^{Pyl}-Paares in humanen Zellen. Die Expression des mCherry-TAG-EGFP-HA-Konstrukts wurde zusätzlich durch einen anti-HA sensitiven Western-Blot im Zelllysate nachgewiesen (Abbildung 27B). Die gleichen Zelllysate wurden zusammen mit Dynabeads für 3 Stunden inkubiert. Unspezifische Proteine wurden anschließend von den Beads mit NP-40-Waschpuffer oder Waschpuffer (pH 11) im Falle von UAA **37** entfernt. Proteine wurden bei 95 °C in Laemmli-Puffer eluiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit einem anti-HA sensitiven Western-Blot analysiert. Der Western-Blot bestätigte, dass nur pmCherry-EGFP-HA (57 kDA) mit inkorporierter UAA **35**, **37** oder **38** durch die Dynabeads isoliert wurden (Abbildung 27C). Unter der Bande von pmCherry-EGFP-HA wurde eine unbekannte Bande detektiert. pmCherry-EGFP-HA mit eingebautem Bock konnte dagegen nach dem Pull-Down nicht mehr nachgewiesen werden.

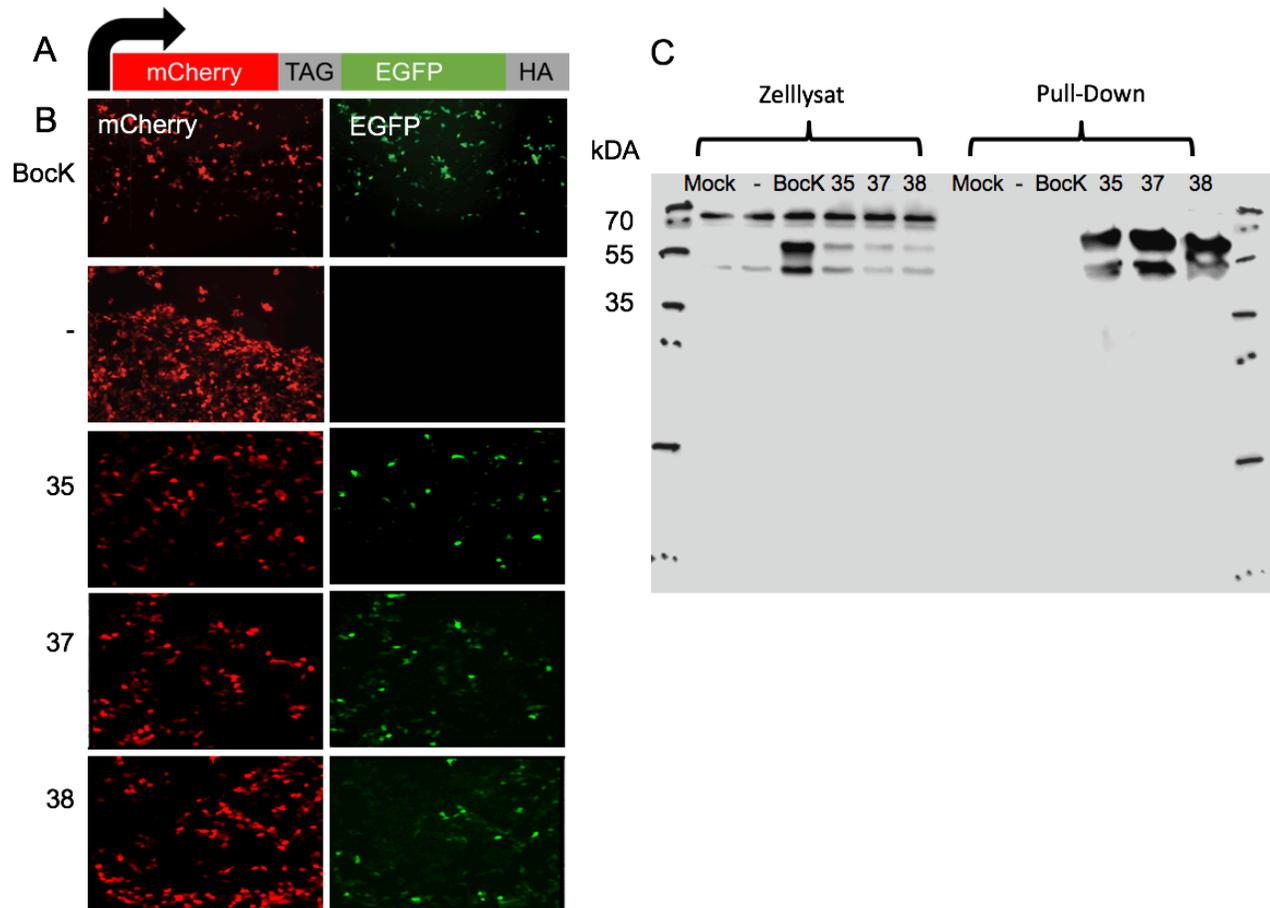


Abbildung 27. Einbau von Biotinanaloga in humanen Zellen. A) Abbildung des Reporterkonstruktes mit einem Amber-Codon (TAG) zwischen mCherry und EGFP, sowie einem C-terminalen HA-Tag (HA). B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK 293T-Zellen, die das PylRS/tRNA^{Pyl}-Paar und mCherry-TAG-EGFP-HA in Gegenwart von BockK exprimierten. HEK 293T-Zellen, die das BioRS/tRNA^{Pyl}-Paar und mCherry-TAG-EGFP-HA in Abwesenheit (-) und in Anwesenheit der UAAs **35**, **37**, **38** exprimierten. C) Western-Blot-Analyse von mCherry-EGFP-HA mit inkorporierten BockK, **35**, **37** oder **38** in Zelllysate. Western-Blot-Analyse von mCherry-EGFP-HA mit inkorporierten BockK, **35**, **37** oder **38** isoliert mit Dynabeads (Pull-Down). Mock-Zellen besitzen kein Plasmid. Expression von mCherry-TAG-EGFP-HA und des BioRS/tRNA^{Pyl}-Paares ohne UAA (-). Detektion der Proteine erfolgte mit einem anti-HA-Antikörper.

5 Diskussion

5.1 Vorteile von FACS

Das Engineering von AaRS/tRNA-Paaren ist für den Einbau neuer UAAs ein umständlich, allerdings unumgänglicher Prozess, um den genetischen Code weiter auszubauen. Das PylRS/tRNA-Paar ist das System der Wahl, wenn eine UAA durch die Amber-Codon-Suppression in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen eingebaut werden soll. Im Gegensatz zu anderen AaRS/tRNA-Paaren, die erst verändert wurden um orthogonal in einer Wirtszelle zu arbeiten, zeigt das PylRS/tRNA^{Pyl}-System eine natürliche Diskriminierung der 20 kanonischen Aminosäuren und interagiert nicht mit anderer AaRSs oder tRNAs [49].

Der Engineering-Prozess besteht in der Regel aus der Herstellung einer großen AaRS-Mutanten-Bibliothek mit 10^8 - 10^9 Varianten und einem nachfolgenden Screening, um passende Varianten zu identifizieren. Fokussiertere Bibliotheken haben aufgrund der erheblich höheren Frequenz von erfolgsversprechenden Varianten gezeigt, dass sie eine höhere Qualität für die gerichteten Evolution gewährleisten [122]. Darüber hinaus überschreiten große Bibliotheken meistens die Transformationseffizienz von Expressionsstämmen, was zu einer ungewollten Verkleinerung der Bibliothek führt.

Zellassays auf festem Selektions-Medium werden standardmäßig für die Evolution von AaRS/tRNA-Paare genutzt, da diese Methode die Selektion von sehr vielen Mutanten gleichzeitig zulässt [23]. Allerdings leiden die Zellen unter dem harten und kaum einstellbaren Selektionsdruck, was zu einem langsamen Zellwachstum und niedrigen Überlebensraten führt [113]. Daher werden auch vorteilhafte Varianten fahrlässig durch diese Art der Selektion eliminiert.

FACS stellt eine vielversprechende Alternative zu Assays auf festen Selektions-Medium dar und wurde schon erfolgreich zum Screening von AaRS-Bibliotheken genutzt [112, 113, 132]. Es können bis zu 10^8 Zellen mittels FACS analysiert werden, so dass eine Mutantenbibliothek eine Größe von etwa 2×10^7 Varianten nicht überschreiten darf um eine 99%-ige Abdeckung aller Sequenzen durch das Screening zu gewährleisten [121]. FACS ermöglicht ein schonendes Zellwachstum in Vollmedium und die einmalige

Möglichkeit, den Selektionsdruck, der durch einen festgelegten Grenzwert dargestellt wird, anzupassen. So können vorteilhafte PylRS-Varianten, die möglicherweise andere Assays/ Screening-Methoden nicht überlebt hätten, identifiziert werden. Abschließend bietet FACS die Möglichkeit eines schnellen und sensiblen Auslesens, was wiederum zu einer hohen Diversität von positiven Mutanten führt. Allerdings wurden FACS-Experimente nicht an die intrinsische Orthogonalität von PylRS angepasst und umfassten daher mehrere negative und positive Selektionsrunden, was den Screen sehr zeitintensiv machte. Eine zeitliche Optimierung des Screens erfolgt durch die Beibehaltung des Selektionsfilter N311 von *M. barkeri* PylRS, da kanonische Aminosäuren somit diskriminiert [18] werden und negative Selektionsrunden aus dem Screen entfernt werden können.

5.2 Etablierung des Screens

In der vorliegenden Arbeit wurde ein schneller und sensibler FACS-Screen, bestehend aus nur einer positiven Selektionsrunde, etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass eine relativ kleine PylRS-Bibliothek mit sechs Positionen ($9,5 \times 10^4$ Varianten) ausreicht, um mit unserer Screening-Methode 151 orthogonale PylRS-Varianten für den Einbau von 20 strukturellen verschiedenen UAAs zu identifiziert. Im Gegensatz zu anderen Screens, bei denen ein AaRS/tRNA-Paar mit der höchsten UAA-Einbaueffizienz gesucht wird, identifiziert der beschriebene FACS-Screen ein breites Spektrum von Varianten, die alle den Einbau einer UAA katalysieren. Dementsprechend wurden 16 verschiedene PylRS-Varianten für den Einbau der UAA **20** bestimmt (siehe 7.4 PylRS Varianten für den Einbau von **20**). Der geringe zeitliche Aufwand der Methode führt zu weniger Zellgenerationen und damit zu einer höheren Empfindlichkeit, da die Möglichkeit einer zufälligen Mutation innerhalb des Amber-Codons, die ein falsch- positives Signal verursachen würde, verringert wird. Die Überlebensrate der Zellen während des gesamten Engineering-Prozesses muss dennoch sorgfältig überwacht werden, um die Komplexität der Bibliothek nicht zu reduzieren. Es konnte gezeigt werden, dass konditioniertes Medium die Überlebensrate von Zellen nach dem FACS-Screen um das 3-fach verbesserte. Es ist anzunehmen, dass Einzelzellen aufgrund des Mangels an

Wachstumsfaktoren im frischen LB-Medium schlechter anwachsen. Wohingegen konditioniertes Medium einen Mix von sekretierten wachstumsfördernden Faktoren durch *E. coli*-Zellen bietet.

Darüber hinaus hat ein Ein-Plasmidsystem einen positiven Effekt auf das Zellüberleben im Vergleich zu einem Zwei-Plasmidsystem aufgrund der reduzierten genetischen Last, die von zwei Antibiotikaresistenzen ausgeht [113]. Zusätzlich verbessert sich deutlich die Transformationseffizienz mit nur einem Plasmid. Infolgedessen wurde das Ein-Plasmidsystem pEVOL303 entworfen, das alle erforderlichen genetischen Bestandteile für den FACS-Screen vereint.

Die Sequenz-Substrat-Informationen aus den 151 funktionellen PylRS-Varianten wurden verwendet um die Schlüsselmutationen Y271A, L274V, C313V, M315Y, Y349F und V370R zu ermitteln. Die Kombination aus diesen beschriebenen Mutationen führte zu der Erzeugung einer polyspezifischen PylRS-Variante für den Einbau besonders große UAAs. Die Variante mit der Bezeichnung HpRS ermöglichte den Einbau von 31 der getesteten 35 UAAs, nur **9, 22, 23, 27** wurden nicht inkorporiert. Die Ursache hierfür konnte nicht abschließend geklärt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die UAAs schlicht zu sperrig für die PylRS-Bindetasche waren oder ein Zellmembran-Permeabilitätsproblem vorlag. Es konnten Anhaltspunkte für den letzteren Fall gefunden werden, da *E. coli*-Zellen nach der Zugabe von UAA **9** im Medium akkumulierten (Abbildung 28). Die hydrophobe Seitenkette der UAA **9** blieb möglicherweise in der Zellmembran haften und vernetzte so die *E. coli*-Zellen.

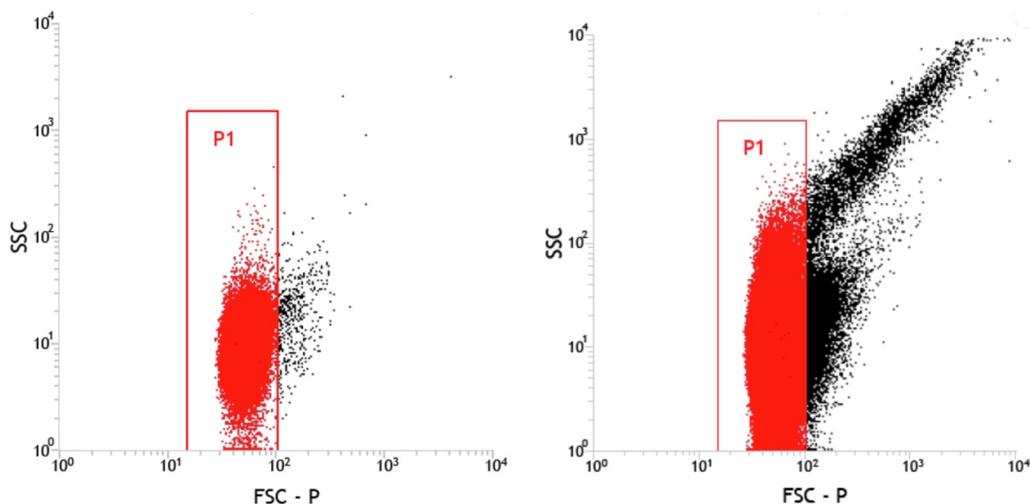


Abbildung 28. FACS-Analyse. Vorwärts- (FSC-P) und Seitwärts-Streuung (SSC) von *E. coli*-Zellen in der Gegenwart von 1 mM UAA **1** (links) und UAA **9** (rechts).

Aus dem Substratspektrum von HpRS ergibt sich eine klare Strukturvoraussetzung für einzubauende UAAs. So ist für den effizienten Einbau fluorierter UAAs ein Linker aus einem oder zwei Kohlenstoffatomen zwischen dem Carbamat und einer Verzweigung erforderlich. Dies wurde durch die UAA **24**, die im Gegensatz zu UAA **23** eine hohe Einbaueffizienz zeigte, anschaulich dokumentiert. Das Substratspektrum von HpRS beinhaltet klickbare, fluorierte, fluoreszierende und biotinylierte UAAs. Zusammenfassend ist HpRS ein multifunktionelles Werkzeug für zelluläre Anwendungen und bietet einen idealen Ausgangspunkt für weitere Mutantenbibliotheken. HpRS fügt mit dem Einbau von biotinyliertem UAAs eine komplett neue Klasse UAAs zum Repertoire des genetischen Codes hinzu. Biotinylierten UAAs können beispielsweise eingesetzt werden um Proteine aufgrund der starken Wechselwirkung von Biotin an Streptavidin zu isolieren oder zu markieren [72].

5.3 Einbau von Biotinanaloga

Mit BioRS wurden erstmalig Biotin-Lysine und zwei weitere Biotin-Lysinanaloga zu dem genetischen Code von Bakterien- und Säugetierzellen hinzugefügt. Diese UAAs können positionsspezifisch an praktisch jeder exponierten Position eines Proteins eingebaut werden. Die kleine Größe der UAAs hat eine geringere Tendenz, als herkömmliche Reinigungs-Tags, die Proteinstruktur oder Proteinfunktion zu stören.

Die drei eingebauten Biotin-Analoga bieten unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu Streptavidin. Aufgrund der fast irreversiblen Bindung an Streptavidin ist UAA **35** ein hervorragendes Werkzeug für Experimente, die stringente Waschbedingungen erfordern. Das multifunktionelle Protein recA wurde erfolgreich mit UAA **35** isoliert und 10 Interaktionspartner konnten so identifiziert werden. Damit wurde gezeigt, dass entscheidende Interaktionsstellen von recA nicht durch den UAA-Einbau beeinflusst wurden.

UAA **37** bietet dagegen die Möglichkeit ein Protein über einen pH-abhängigen Schritt zu eluieren. Auf diese Weise wurde Anbu in einem Schritt aus dem Zelllysat gereinigt. Außerdem ermöglichen 2-Iminobiotin und Desthiobiotin möglicherweise die Diskriminierung von natürlich biotinylierten Proteinen aufgrund der unterschiedlichen

Bindungseigenschaften, was zu einer verbesserten Sensitivität eines Pull-Downs führen würde.

5.4 Fluorierte und Dien UAAs

Obwohl der Fokus dieser Arbeit auf biotinylierten UAAs lag, konnten auch einige andere interessante Strukturen zum ersten Mal eingebaut werden.

So wurden erstmals eine Reihe von fluorierten UAAs in Proteine inkorporiert. Die ungewöhnlichen physiochemischen Eigenschaften von fluorierten Seitenketten wie extreme chemische Inertheit und thermische Stabilität [125, 133], können verwendet werden um Proteine zu modifizieren. So konnte bereits mit chemischer Fluorierung die Proteinstabilität verbessert werden, wobei bei dieser Methode die positionsspezifische Veränderung eines Proteins problematisch ist [134, 135]. Der Einbau von fluorierten UAAs könnte diesen Ansatz vereinfachen.

Eine andere vielversprechende UAA ist das Dien Lysin **30**. Eine ultraschnelle Kupferfreie Klickreaktion zwischen einem Triazolinedion und einem Dien könnte das Markieren von Proteinen in Echtzeit ermöglichen [136]. Die gut einbauende UAA **30** könnte somit verwendet werden, um eine Klickreaktion in Sekunden ohne Hilfe eines Katalysators mit einem Triazolinedion auszuführen. Ungewiss ist allerdings noch, ob diese Reaktion vollständig bioorthogonal abläuft.

5.5 Ausblick

Der hier etablierte Screen bietet einige Vorteile über bereits bestehende Methoden zur Selektion von PylRS-Varianten. So könnten die Schnelligkeit und die Sensibilität unserer Methode dazu genutzt werden um neue Strukturen in Proteine einzubauen und somit den genetischen Code zu erweitern. Dabei ist der etablierte Screen nicht nur auf die gerichtete Evolution von PylRS Varianten beschränkt, auch die tRNA^{Pyl} könnte auf diese Weise für den Einbau einer UAA optimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte der positionsspezifische Einbau von Biotinanaloga gezeigt werden. Dieser Ansatz könnte aufgrund der starken Affinität von Biotin zu Streptavidin die Untersuchungen von Proteinen vereinfacht. Zusätzlich könnte UAA **35** verwendet werden, um ein künstliches Enzym mit Biotin als Cofaktor zu erzeugen. Die *in vivo* Biotinylierung benötigt hingegen eine relativ lange Erkennungssequenz und schränkt somit die Gestaltung eines künstlichen Wirtsproteins ein. Der wesentliche Vorteil der genetisch codierten Biotinylierung gegenüber herkömmlichen chemischen Biotinylierungsreagenzien ist das resultierende homogene Produkt. Folglich könnte unser Ansatz verwendet werden um eine positionsgerichtete Proteinimmobilisierung durchzuführen. Auch die Herstellung von Antikörper-Arzneimittelkonjugaten, die eine strenge Kontrolle über die Modifikationsstelle und das Payload-zu-Antikörper-Verhältnis verlangt, ist denkbar.

6 Literaturverzeichnis

1. Crick, F., *Central dogma of molecular biology*. Nature, 1970. **227**(5258): p. 561-3.
2. Crick, F.H., *The origin of the genetic code*. J Mol Biol, 1968. **38**(3): p. 367-79.
3. Woese, C.R., et al., *Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(1): p. 202-36.
4. Giege, R., M. Sissler, and C. Florentz, *Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(22): p. 5017-35.
5. Srinivasan, G., C.M. James, and J.A. Krzycki, *Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA*. Science, 2002. **296**(5572): p. 1459-62.
6. Hao, B., et al., *A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase*. Science, 2002. **296**(5572): p. 1462-6.
7. Rother, M. and J.A. Krzycki, *Selenocysteine, pyrrolysine, and the unique energy metabolism of methanogenic archaea*. Archaea, 2010. **2010**.
8. Quitterer, F., et al., *Crystal structure of methylornithine synthase (PylB): insights into the pyrrolysine biosynthesis*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012. **51**(6): p. 1339-42.
9. Gaston, M.A., et al., *The complete biosynthesis of the genetically encoded amino acid pyrrolysine from lysine*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 647-50.
10. Longstaff, D.G., et al., *A natural genetic code expansion cassette enables transmissible biosynthesis and genetic encoding of pyrrolysine*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(3): p. 1021-1026.
11. Yanagisawa, T., et al., *A novel crystal form of pyrrolysyl-tRNA synthetase reveals the pre- and post-aminoacyl-tRNA synthesis conformational states of the adenylate and aminoacyl moieties and an asparagine residue in the catalytic site*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2013. **69**(Pt 1): p. 5-15.
12. Takimoto, J.K., et al., *Stereochemical basis for engineered pyrrolysyl-tRNA synthetase and the efficient in vivo incorporation of structurally divergent non-native amino acids*. ACS Chem Biol, 2011. **6**(7): p. 733-43.
13. Chen, P.R., et al., *A facile system for encoding unnatural amino acids in mammalian cells*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(22): p. 4052-5.
14. Nakamura, Y., T. Gojobori, and T. Ikemura, *Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 292.
15. Xie, J. and P.G. Schultz, *An expanding genetic code*. Methods, 2005. **36**(3): p. 227-38.
16. Mukai, T., et al., *Adding l-lysine derivatives to the genetic code of mammalian cells with engineered pyrrolysyl-tRNA synthetases*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(4): p. 818-22.
17. Yanagisawa, T., et al., *Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the catalytic domain of pyrrolysyl-tRNA synthetase from the methanogenic archaeon Methanosarcina mazei*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2006. **62**(Pt 10): p. 1031-3.
18. Wang, Y.S., et al., *The de novo engineering of pyrrolysyl-tRNA synthetase for genetic incorporation of L-phenylalanine and its derivatives*. Molecular Biosystems, 2011. **7**(3): p. 714-717.
19. Delarue, M., *Aminoacyl-tRNA synthetases*. Curr Opin Struct Biol, 1995. **5**(1): p. 48-55.
20. Ambrogelly, A., et al., *Pyrrolysine is not hardwired for cotranslational insertion at UAG codons*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(9): p. 3141-3146.

21. Cooley, R.B., P.A. Karplus, and R.A. Mehl, *Gleaning Unexpected Fruits from Hard-Won Synthetases: Probing Principles of Permissivity in Non-canonical Amino Acid-tRNA Synthetases*. *Chembiochem*, 2014. **15**(12): p. 1810-1819.
22. Katayama, H., et al., *Pyrrolysine analogs as substrates for bacterial pyrrolysyl-tRNA synthetase in vitro and in vivo*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012. **76**(1): p. 205-8.
23. Liu, C.C. and P.G. Schultz, *Adding New Chemistries to the Genetic Code*. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 79, 2010. **79**: p. 413-444.
24. Hendrickson, T.L., V. de Crecy-Lagard, and P. Schimmel, *Incorporation of nonnatural amino acids into proteins*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 147-76.
25. Hohsaka, T., et al., *Adaptability of nonnatural aromatic amino acids to the active center of the E. coli ribosomal A site*. *FEBS Lett*, 1993. **335**(1): p. 47-50.
26. Hohsaka, T., et al., *Efficient incorporation of nonnatural amino acids with large aromatic groups into streptavidin in in vitro protein synthesizing systems*. *Journal of the American Chemical Society*, 1999. **121**(1): p. 34-40.
27. Dumas, A., et al., *Designing logical codon reassignment - Expanding the chemistry in biology*. *Chemical Science*, 2015. **6**(1): p. 50-69.
28. Lang, K., et al., *Genetic Encoding of Bicyclononynes and trans-Cyclooctenes for Site-Specific Protein Labeling in Vitro and in Live Mammalian Cells via Rapid Fluorogenic Diels-Alder Reactions*. *Journal of the American Chemical Society*, 2012. **134**(25): p. 10317-10320.
29. Borrmann, A., et al., *Genetic Encoding of a Bicyclo[6.1.0]nonyne-Charged Amino Acid Enables Fast Cellular Protein Imaging by Metal-Free Ligation*. *Chembiochem*, 2012. **13**(14): p. 2094-2099.
30. Plass, T., et al., *Amino Acids for Diels-Alder Reactions in Living Cells*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2012. **51**(17): p. 4166-4170.
31. Lang, K. and J.W. Chin, *Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins*. *Chem Rev*, 2014. **114**(9): p. 4764-806.
32. Lang, K., et al., *Genetically encoded norbornene directs site-specific cellular protein labelling via a rapid bioorthogonal reaction*. *Nature Chemistry*, 2012. **4**(4): p. 298-304.
33. Lin, S.X., et al., *Site-Specific Incorporation of Photo-Cross-Linker and Bioorthogonal Amino Acids into Enteric Bacterial Pathogens*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. **133**(50): p. 20581-20587.
34. Ai, H.W., et al., *Probing Protein-Protein Interactions with a Genetically Encoded Photocrosslinking Amino Acid*. *Chembiochem*, 2011. **12**(12): p. 1854-1857.
35. Gautier, A., et al., *Genetically Encoded Photocontrol of Protein Localization in Mammalian Cells*. *Journal of the American Chemical Society*, 2010. **132**(12): p. 4086-4088.
36. Xie, J., W. Liu, and P.G. Schultz, *A Genetically Encoded Bidentate, Metal-Binding Amino Acid*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. **46**(48): p. 9239-9242.
37. Luo, X.Z., et al., *Stabilizing Protein Motifs with a Genetically Encoded Metal-Ion Chelator*. *Cell Chemical Biology*, 2016. **23**(9): p. 1098-1102.
38. Liu, W.R., Y.-S. Wang, and W. Wan, *Synthesis of proteins with defined posttranslational modifications using the genetic noncanonical amino acid incorporation approach*. *Molecular BioSystems*, 2011. **7**(1): p. 38-47.
39. Neumann, H., S.Y. Peak-Chew, and J.W. Chin, *Genetically encoding N-epsilon-acetyllysine in recombinant proteins*. *Nature Chemical Biology*, 2008. **4**(4): p. 232-234.
40. Nguyen, D.P., et al., *Genetically Encoding N-epsilon-Methyl-l-lysine in Recombinant Histones*. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131**(40): p. 14194-14195.

41. Virdee, S., et al., *Traceless and Site-Specific Ubiquitination of Recombinant Proteins*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(28): p. 10708-10711.
42. Srinivasan, G., C.M. James, and J.A. Krzycki, *Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: Charging of a UAG-decoding specialized tRNA*. Science, 2002. **296**(5572): p. 1459-1462.
43. Hancock, S.M., et al., *Expanding the genetic code of yeast for incorporation of diverse unnatural amino acids via a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNA pair*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(42): p. 14819-24.
44. Li, F.H., et al., *Expanding the Genetic Code for Photoclick Chemistry in E.coli, Mammalian Cells, and A.thaliana*. Angewandte Chemie-International Edition, 2013. **52**(37): p. 9700-9704.
45. Greiss, S. and J.W. Chin, *Expanding the Genetic Code of an Animal*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(36): p. 14196-14199.
46. Wang, L., et al., *Expanding the genetic code of Escherichia coli*. Science, 2001. **292**(5516): p. 498-500.
47. Yanagisawa, T., et al., *Multistep Engineering of Pyrrolysyl-tRNA Synthetase to Genetically Encode Nε-(o-Azidobenzoyloxycarbonyl) lysine for Site-Specific Protein Modification*. Chemistry & Biology, 2008. **15**(11): p. 1187-1197.
48. Polycarpo, C.R., et al., *Pyrrolysine analogues as substrates for pyrrolysyl-tRNA synthetase*. Febs Letters, 2006. **580**(28-29): p. 6695-6700.
49. Wan, W., J.M. Tharp, and W.R. Liu, *Pyrrolysyl-tRNA synthetase: An ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2014. **1844**(6): p. 1059-1070.
50. Neumann-Staubitz, P. and H. Neumann, *The use of unnatural amino acids to study and engineer protein function*. Curr Opin Struct Biol, 2016. **38**: p. 119-28.
51. Chin, J.W., *Expanding and reprogramming the genetic code of cells and animals*. Annu Rev Biochem, 2014. **83**: p. 379-408.
52. Tyagi, S. and E.A. Lemke, *Single-molecule FRET and crosslinking studies in structural biology enabled by noncanonical amino acids*. Curr Opin Struct Biol, 2015. **32**: p. 66-73.
53. Plass, T., et al., *Genetically encoded copper-free click chemistry*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(17): p. 3878-81.
54. Nikic, I., et al., *Minimal tags for rapid dual-color live-cell labeling and super-resolution microscopy*. Angew Chem Int Ed Engl, 2014. **53**(8): p. 2245-9.
55. Luo, J., et al., *Genetically Encoded Optochemical Probes for Simultaneous Fluorescence Reporting and Light Activation of Protein Function with Two-Photon Excitation*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(44): p. 15551-15558.
56. Wang, K., et al., *Optimized orthogonal translation of unnatural amino acids enables spontaneous protein double-labelling and FRET*. Nat Chem, 2014. **6**(5): p. 393-403.
57. Hamblett, K.J., et al., *Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(20): p. 7063-7070.
58. Boswell, C.A., et al., *Impact of Drug Conjugation on Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Anti-STEAPI Antibody-Drug Conjugates in Rats*. Bioconjugate Chemistry, 2011. **22**(10): p. 1994-2004.
59. Jackson, D., et al., *In Vitro and In Vivo Evaluation of Cysteine and Site Specific Conjugated Herceptin Antibody-Drug Conjugates*. Plos One, 2014. **9**(1).
60. Sun, S.B., P.G. Schultz, and C.H. Kim, *Therapeutic applications of an expanded genetic code*. Chembiochem, 2014. **15**(12): p. 1721-9.
61. Kim, C.H., et al., *Synthesis of bispecific antibodies using genetically encoded unnatural amino acids*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(24): p. 9918-21.

62. Axup, J.Y., et al., *Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(40): p. 16101-6.
63. Tian, F., et al., *A general approach to site-specific antibody drug conjugates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(5): p. 1766-71.
64. Jones, D.H., et al., *Site-specific labeling of proteins with NMR-active unnatural amino acids*. J Biomol NMR, 2010. **46**(1): p. 89-100.
65. Gattner, M.J., M. Vrabel, and T. Carell, *Synthesis of epsilon-N-propionyl-, epsilon-N-butyryl-, and epsilon-N-crotonyl-lysine containing histone H3 using the pyrrolysine system*. Chemical Communications, 2013. **49**(4): p. 379-381.
66. Kim, C.H., et al., *Site-Specific Incorporation of epsilon-N-Crotonyllysine into Histones*. Angewandte Chemie-International Edition, 2012. **51**(29): p. 7246-7249.
67. Park, H.S., et al., *Expanding the genetic code of Escherichia coli with phosphoserine*. Science, 2011. **333**(6046): p. 1151-4.
68. Rogerson, D.T., et al., *Efficient genetic encoding of phosphoserine and its nonhydrolyzable analog*. Nat Chem Biol, 2015. **11**(7): p. 496-503.
69. Lietzan, A.D. and M. St Maurice, *Functionally diverse biotin-dependent enzymes with oxaloacetate decarboxylase activity*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014. **544**: p. 75-86.
70. Waldrop, G.L., H.M. Holden, and M. St Maurice, *The enzymes of biotin dependent CO2 metabolism: What structures reveal about their reaction mechanisms*. Protein Science, 2012. **21**(11): p. 1597-1619.
71. Tong, L., *Structure and function of biotin-dependent carboxylases*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013. **70**(5): p. 863-891.
72. Green, N.M., *Avidin and streptavidin*. Methods Enzymol, 1990. **184**: p. 51-67.
73. Kim, J., et al., *Use of in vivo biotinylation to study protein-protein and protein-DNA interactions in mouse embryonic stem cells*. Nat Protoc, 2009. **4**(4): p. 506-17.
74. Dundas, C.M., D. Demonte, and S. Park, *Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2013. **97**(21): p. 9343-53.
75. Cronan, J.E., Jr., *Biotinylation of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(18): p. 10327-33.
76. Beckett, D., E. Kovaleva, and P.J. Schatz, *A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation*. Protein Sci, 1999. **8**(4): p. 921-9.
77. Chen, I., et al., *Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase*. Nat Methods, 2005. **2**(2): p. 99-104.
78. Fudem-Goldin, B. and G.A. Orr, *2-Iminobiotin-containing reagent and affinity columns*. Methods Enzymol, 1990. **184**: p. 167-73.
79. Hirsch, J.D., et al., *Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation*. Anal Biochem, 2002. **308**(2): p. 343-57.
80. Gallivan, J.P., H.A. Lester, and D.A. Dougherty, *Site-specific incorporation of biotinylated amino acids to identify surface-exposed residues in integral membrane proteins*. Chemistry & Biology, 1997. **4**(10): p. 739-749.
81. Watanabe, T., et al., *Position-specific incorporation of biotinylated non-natural amino acids into a protein in a cell-free translation system*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **361**(3): p. 794-799.

82. Winkler, D.F. and P.L. McGeer, *Protein labeling and biotinylation of peptides during spot synthesis using biotin p-nitrophenyl ester (biotin-ONp)*. *Proteomics*, 2008. **8**(5): p. 961-7.
83. Ward, T.R., *Artificial Metalloenzymes Based on the Biotin-Avidin Technology: Enantioselective Catalysis and Beyond*. *Accounts of Chemical Research*, 2011. **44**(1): p. 47-57.
84. Tanaka, K., et al., *Cell surface biotinylation by azaelectrocyclization: Easy-handling and versatile approach for living cell labeling*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012. **20**(6): p. 1865-1868.
85. Fernandez-Suarez, M., T.S. Chen, and A.Y. Ting, *Protein-protein interaction detection in vitro and in cells by proximity biotinylation*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(29): p. 9251-+.
86. de Boer, E., et al., *Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. **100**(13): p. 7480-7485.
87. Morgan, H. and D.M. Taylor, *A Surface-Plasmon Resonance Immunosensor Based on the Streptavidin Biotin Complex*. *Biosensors & Bioelectronics*, 1992. **7**(6): p. 405-410.
88. Yao, Z.S., et al., *Improved Targeting of Radiolabeled Streptavidin in Tumors Pretargeted with Biotinylated Monoclonal-Antibodies through an Avidin Chase*. *Journal of Nuclear Medicine*, 1995. **36**(5): p. 837-841.
89. Zhang, M.L., et al., *Improved intratumoral penetration of radiolabeled streptavidin in intraperitoneal tumors pretargeted with biotinylated antibody*. *Journal of Nuclear Medicine*, 1998. **39**(1): p. 30-33.
90. Kimple, M.E., A.L. Brill, and R.L. Pasker, *Overview of affinity tags for protein purification*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2013. **73**: p. Unit 9 9.
91. Lilius, G., et al., *Metal Affinity Precipitation of Proteins Carrying Genetically Attached Polyhistidine Affinity Tails*. *European Journal of Biochemistry*, 1991. **198**(2): p. 499-504.
92. Skerra, A. and T.G.M. Schmidt, *Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins*. *Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Pt A*, 2000. **326**: p. 271-304.
93. Blake, M.S., et al., *A Rapid, Sensitive Method for Detection of Alkaline-Phosphatase Conjugated Anti-Antibody on Western Blots*. *Analytical Biochemistry*, 1984. **136**(1): p. 175-179.
94. Peltz, G.A., B. Gallis, and B.M. Peterlin, *Monoclonal-Antibody Immunoprecipitation of Cell-Membrane Glycoproteins*. *Analytical Biochemistry*, 1987. **167**(2): p. 239-244.
95. Yan, P., et al., *Immunohistochemical localization of hTERT protein in human tissues*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2004. **121**(5): p. 391-397.
96. Herzenberg, L.A., et al., *The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: A view from Stanford*. *Clinical Chemistry*, 2002. **48**(10): p. 1819-1827.
97. Coelho, P.S., et al., *Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes*. *Science*, 2013. **339**(6117): p. 307-10.
98. Jespers, L.S., et al., *Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen*. *Biotechnology (N Y)*, 1994. **12**(9): p. 899-903.
99. Packer, M.S. and D.R. Liu, *Methods for the directed evolution of proteins*. *Nat Rev Genet*, 2015. **16**(7): p. 379-94.

100. Greener, A., M. Callahan, and B. Jerpseth, *An efficient random mutagenesis technique using an E. coli mutator strain*. Mol Biotechnol, 1997. **7**(2): p. 189-95.
101. Zaccolo, M., et al., *An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues*. J Mol Biol, 1996. **255**(4): p. 589-603.
102. Cherny, I., et al., *Engineering V-type nerve agents detoxifying enzymes using computationally focused libraries*. ACS Chem Biol, 2013. **8**(11): p. 2394-403.
103. Tang, L., et al., *Construction of "small-intelligent" focused mutagenesis libraries using well-designed combinatorial degenerate primers*. Biotechniques, 2012. **52**(3): p. 149-58.
104. Pai, J.C., K.C. Entzminger, and J.A. Maynard, *Restriction enzyme-free construction of random gene mutagenesis libraries in Escherichia coli*. Analytical Biochemistry, 2012. **421**(2): p. 640-648.
105. You, C. and Y.H.P. Zhang, *Easy preparation of a large-size random gene mutagenesis library in Escherichia coli*. Analytical Biochemistry, 2012. **428**(1): p. 7-12.
106. Ryu, Y.H. and P.G. Schultz, *Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in Escherichia coli*. Nature Methods, 2006. **3**(4): p. 263-265.
107. Xie, J.M. and P.G. Schultz, *An expanding genetic code*. Methods, 2005. **36**(3): p. 227-238.
108. Young, T.S., et al., *An Enhanced System for Unnatural Amino Acid Mutagenesis in E. coli*. Journal of Molecular Biology, 2010. **395**(2): p. 361-374.
109. Cropp, T.A., J.C. Anderson, and J.W. Chin, *Reprogramming the amino-acid substrate specificity of orthogonal aminoacyl-tRNA synthetases to expand the genetic code of eukaryotic cells*. Nature Protocols, 2007. **2**(10): p. 2590-2600.
110. Wang, Y.-S., et al., *A genetically encoded photocaged N ϵ -methyl-L-lysine*. Molecular BioSystems, 2010. **6**(9): p. 1557.
111. Wang, L., et al., *Addition of the keto functional group to the genetic code of Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(1): p. 56-61.
112. Santoro, S.W., et al., *An efficient system for the evolution of aminoacyl-tRNA synthetase specificity*. Nature Biotechnology, 2002. **20**(10): p. 1044-1048.
113. Kuhn, S.M., et al., *Engineering of an Orthogonal Aminoacyl-tRNA Synthetase for Efficient Incorporation of the Non-natural Amino Acid O-Methyl-L-tyrosine using Fluorescence-based Bacterial Cell Sorting*. Journal of Molecular Biology, 2010. **404**(1): p. 70-87.
114. Link, A.J., et al., *Discovery of aminoacyl-tRNA synthetase activity through cell-surface display of noncanonical amino acids*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(27): p. 10180-10185.
115. Schmied, W.H., et al., *Efficient Multisite Unnatural Amino Acid Incorporation in Mammalian Cells via Optimized Pyrrolysyl tRNA Synthetase/tRNA Expression and Engineered eRF1*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(44): p. 15577-15583.
116. Krieger, E. and G. Vriend, *New ways to boost molecular dynamics simulations*. J Comput Chem, 2015. **36**(13): p. 996-1007.
117. Duan, Y., et al., *A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations*. J Comput Chem, 2003. **24**(16): p. 1999-2012.
118. Tharp, J.M., et al., *Genetic Incorporation of Seven ortho-Substituted Phenylalanine Derivatives*. ACS chemical biology, 2014. **9**(4): p. 884-890.

119. Phillips-Jones, M.K., F.J. Watson, and R. Martin, *The 3' Codon Context Effect on UAG Suppressor tRNA is Different in Escherichia coli and Human Cells*. Journal of Molecular Biology, 1993. **233**(1): p. 1-6.
120. Schneider, S., et al., *Structural Insights into Incorporation of Norbornene Amino Acids for Click Modification of Proteins*. Chembiochem, 2013. **14**(16): p. 2114-2118.
121. Firth, A.E. and W.M. Patrick, *Statistics of protein library construction*. Bioinformatics, 2005. **21**(15): p. 3314-3315.
122. Reetz, M.T., D. Kahakeaw, and R. Lohmer, *Addressing the numbers problem in directed evolution*. Chembiochem, 2008. **9**(11): p. 1797-1804.
123. Ai, H.W., et al., *Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging*. Biochemical Journal, 2006. **400**(Pt 3): p. 531-540.
124. Nikić, I., et al., *Minimal Tags for Rapid Dual-Color Live-Cell Labeling and Super-Resolution Microscopy*. Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**(8): p. 2245-2249.
125. Buer, B.C. and E.N.G. Marsh, *Fluorine: A new element in protein design*. Protein Science, 2012. **21**(4): p. 453-462.
126. Schmidt, M.J., et al., *A Genetically Encoded Spin Label for Electron Paramagnetic Resonance Distance Measurements*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(4): p. 1238-1241.
127. Nguyen, D.P., et al., *Genetically Encoded 1,2-Aminothiols Facilitate Rapid and Site-Specific Protein Labeling via a Bio-orthogonal Cyanobenzothiazole Condensation*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(30): p. 11418-11421.
128. Miyake-Stoner, S.J., et al., *Generating Permissive Site-Specific Unnatural Aminoacyl-tRNA Synthetases*. Biochemistry, 2010. **49**(8): p. 1667-1677.
129. Parsch, J. and J.W. Engels, *C-F center dot center dot center dot H-C hydrogen bonds in ribonucleic acids*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(20): p. 5664-5672.
130. Valas, R.E. and P.E. Bourne, *Rethinking proteasome evolution: two novel bacterial proteasomes*. J Mol Evol, 2008. **66**(5): p. 494-504.
131. Nguyen, D.P., et al., *Genetic Encoding and Labeling of Aliphatic Azides and Alkynes in Recombinant Proteins via a Pyrrollysyl-tRNA Synthetase/tRNACUA Pair and Click Chemistry*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(25): p. 8720-8721.
132. Yoo, T.H. and D.A. Tirrell, *High-throughput screening for Methionyl-tRNA synthetases that enable residue-specific incorporation of noncanonical amino acids into recombinant proteins in bacterial cells*. Angewandte Chemie-International Edition, 2007. **46**(28): p. 5340-5343.
133. Lemal, D.M., *Perspective on Fluorocarbon Chemistry*. The Journal of Organic Chemistry, 2004. **69**(1): p. 1-11.
134. Lee, K.-H., et al., *Fluorous Effect in Proteins: De Novo Design and Characterization of a Four- α -Helix Bundle Protein Containing Hexafluoroleucine*. Biochemistry, 2004. **43**(51): p. 16277-16284.
135. Pendley, S.S., Y.B. Yu, and T.E. Cheatham, *Molecular dynamics guided study of salt bridge length dependence in both fluorinated and non-fluorinated parallel dimeric coiled-coils*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2009. **74**(3): p. 612-629.
136. Billiet, S., et al., *Triazolinediones enable ultrafast and reversible click chemistry for the design of dynamic polymer systems*. Nature chemistry, 2014. **6**(9): p. 815-821.

7 Anhang

7.1 Codon-Optimierung von HpRS

ATGGACAAAAAACCGCTGGATGTTCTGATTAGCGCAACCGGTCTGTGGATGAGCCGC
ACCGGTACACTGCATAAAATCAAACATCATGAAGTGAGCCGCAGCAAAATCTATATT
GAAATGGCATGTGGTGATCATCTGGTGGTGAATAATAGCCGTAGCTGTCGTACCGCA
CGTGCATTTTCGTCATCACAAATATCGTAAAACCTGTAAACGTTGCCGTGTTAGCGAC
GAAGATATTAACAATTTTCTGACCCGTAGCACCGAAAGCAAAAATTCAGTTAAAGTT
CGTGTGTTGTGAGCGCACCGAAGGTTAAAAAAGCAATGCCGAAAAGCGTTAGTCGTGC
GCCGAAACCTCTGGAAAATAGCGTTAGCGCAAAAGCAAGCACCAATACCAGCCGTA
GCGTTCCGAGTCCGGCAAAAAGCACCCCGAATAGCAGCGTTCCGGCAAGCGCACCG
GCACCGAGCCTGACACGTAGCCAGCTGGATCGTGTTGAAGCACTGCTGAGTCCGGAA
GATAAAATCAGCCTGAATATGGCAAAACCGTTTCGTGAACTGGAACCGGAACTGGTT
ACCCGTCGTAAAAATGATTTTCAGCGTCTGTATACCAACGATCGCGAAGATTATCTG
GGTAAACTGGAACGTGATATTACCAAATTTTTCGTGGATCGCGGTTTCCTGGAAATC
AAAAGCCCGATTCTGATTCCGGCAGAATATGTTGAACGTATGGGCATTAATAACGAT
ACCGAACTGAGCAAGCAGATTTTTCGCGTTGATAAAAATCTGTGTCTGCGTCCGATG
CTGGCACCGACACTGGCAAATTATGTTTCGCAAACTGGATCGTATTCTGCCTGGTCCG
ATTAAAATCTTTGAAGTTGGTCCGTGCTATCGCAAAGAAAGTGATGGTAAAGAACAC
CTGGAAGAGTTTACCATGGTTAATTTTGTTCAGTATGGTAGCGGTTGCACCCGTGAA
AATCTGGAAGCACTGATTAAAGAGTTTCTGGACTATCTGGAAATCGACTTTGAAATT
GTTGGTGATAGCTGCATGGTTTTTGGTGATACCCTGGATATTATGCATGGTGATCTGG
AACTGAGTAGCGCAGTTGTTGGTCCGCGTAGCCTGGATCGCGAATGGGGTATTGATA
AACCGTGGATTGGTGCAGGTTTTTGGTCTGGAACGTCTGCTGAAAGTTATGCACGGCT
TTAAAAACATTAAACGTGCAAGCCGTTCCGAGAGCTATTACAATGGTATTAGCACCA
ACCTGTAA

7.2 ESI-TOF Daten

ESI-TOF Daten für mTFP1₁₂₈UAA

UAA	Erwartete Masse (Da)	Gemessene Mass (Da)	± Masse (Da)
WT ^{a)}	25154.5	25154.7	0.2
1	25252.6	25251.8	0.8
2	25266.6	25265.1	1.5
3	25280.7	25280.2	0.5
4	25294.7	25294.4	0.3
5	25308.7	25306.2	2.5
6	25322.7	25320.9	1.8
7	25336.8	25334.9	1.9
8	25350.8	25349.3	1.5
9	25364.8	NA	NA
10	25250.6	25250.2	0.4
11	25264.6	25264.4	0.2
12	25278.6	25277.3	1.3
13	25292.7	25291.4	1.3
14	25295.6	25293.4	2.2
15	25320.7	25318.9	1.8
16	25318.7	25318.5	0.2
17	25344.7	25342.3	2.4
18	25294.6	25293.1	1.5
19	25344.6	25342.2	2.4
20	25394.6	25394.6	0.0
21	25458.6	25457.1	1.5
22	25558.6	NA	NA
23	25362.6	NA	NA
24	25390.6	25389.1	1.5
25	25356.6	25355.5	1.1
26	25370.7	25368.5	2.2
27	25438.7	NA	NA
28	25348.8	25347.8	1.0
29	25348.8	25347.5	1.3
30	25292.7	25290.5	2.2
31	25303.6	25302.1	1.5
32	25322.7	25321.4	1.3
33	25438.6	25437.1	1.5
34	25386.7	25384.6	2.1
35	25423.8	25424.5	0.7
36	25409.8	25410.6	0.8
37	25422.9	25423.5	0.6
38	25379.8	25380.5	0.7

a) WT: Asn auf Position 128

7.3 Übersicht aller PyIRS Varianten

Insgesamt wurden 151 PyIRS Varianten identifiziert (110 einzigartig; 41 redundat). Die folgende Liste enthält die sechs variablen Positionen aller 110 PyIRS Varianten und die jeweils eingebauten UAAs. Das mehrfache Auftreten einer PyIRS für die gleiche UAA wurde nicht berücksichtigt.

Variante	Position						UAA
	271	274	313	315	370	378	
1	Y	L	V	M	V	I	1, 4, 10, 12, 13, 14
2	Y	L	V	L	R	V	1
3	Y	L	V	V	V	M	1
4	Y	L	V	A	R	I	1
5	Y	L	V	G	R	Y	1
6	Y	L	V	V	R	V	1
7	Y	L	V	C	R	C	1
8	Y	V	V	S	R	I	2
9	Y	V	V	L	R	V	2
10	Y	V	V	M	V	I	2
11	Y	V	V	Y	R	I	2, 11
12	Y	A	V	N	K	A	3
13	C	L	V	L	R	I	3
14	Y	V	V	S	K	I	3
15	Y	I	V	L	K	I	3
16	Y	C	V	C	K	V	3
17	A	L	V	Y	K	M	3, 18
18	Y	C	V	L	K	I	3
19	Y	V	V	Y	K	I	3
20	Y	G	V	Y	R	V	3
21	Y	V	V	M	R	I	3
22	A	C	V	L	V	I	3
23	Y	I	V	Y	K	I	3
24	Y	I	V	Y	V	I	3
25	Y	V	V	C	R	V	3, 18
26	A	V	V	Y	R	I	3, 5, 7, 16, 18, 20, 21
27	A	I	V	V	R	V	4, 13, 20
28	Y	C	V	M	V	V	4
29	G	L	V	M	K	V	4
30	A	L	V	Y	K	V	4, 16, 20
31	A	L	V	Y	R	I	4
32	G	L	V	Y	R	I	4, 17

33	Y	G	V	V	R	I	4
34	A	V	V	L	R	I	4, 6, 7, 8, 20
35	G	M	V	M	V	I	4
36	A	V	V	M	R	I	4
37	A	C	V	Y	K	M	4, 13
38	A	L	V	Y	V	V	4
39	G	L	V	M	R	I	5, 7, 8, 17
40	Y	A	V	C	V	V	5
41	G	V	V	M	R	I	5
42	A	I	V	Y	K	I	5, 20
43	G	L	V	V	R	V	6
44	A	L	V	M	K	M	6
45	A	C	V	Y	R	V	6
46	A	I	V	M	K	V	6
47	G	V	V	Y	R	I	6, 8, 20, 21
48	G	M	V	M	R	I	7, 8, 21
49	A	A	V	Y	R	V	7, 8
50	G	M	V	M	R	V	7
51	Y	L	V	M	R	I	11
52	Y	L	V	A	R	V	11
53	Y	L	V	G	R	V	11
54	Y	C	V	C	V	V	12
55	Y	M	V	C	K	V	12
56	Y	V	V	N	R	I	12
57	A	M	V	Y	R	V	12
58	Y	A	V	A	R	I	12
59	A	I	V	M	R	V	13
60	Y	Y	V	V	R	V	13
61	Y	V	V	A	R	C	13
62	Y	C	V	S	R	I	13
63	G	V	V	L	V	I	13
64	Y	G	V	A	R	V	13
65	A	C	V	I	R	I	13
66	A	V	V	C	K	I	13, 20
67	Y	V	V	L	R	I	14
68	Y	L	V	I	R	I	14
69	Y	M	V	N	R	V	14
70	Y	V	V	A	V	M	14
71	Y	V	V	Y	K	M	14
72	Y	C	V	S	R	C	14
73	Y	L	V	Y	K	V	14

74	G	C	V	Y	K	I	15
75	A	A	V	V	K	I	15
76	A	A	V	L	K	I	15
77	G	A	V	L	R	I	15
78	A	A	V	L	R	V	15
79	A	V	V	A	K	I	15
80	A	A	V	I	K	I	16
81	A	L	V	Y	K	I	16, 18
82	A	V	V	L	K	I	16
83	A	V	V	Y	R	C	16
84	A	M	V	Y	R	I	16
85	A	C	V	Y	R	I	17
86	A	C	V	V	R	I	17
87	G	I	V	C	R	I	17
88	M	L	V	Y	R	I	18
89	Y	C	V	Y	R	C	18
90	L	M	V	Y	R	I	18
91	Y	V	V	V	R	V	18
92	F	V	V	S	V	V	18
93	Y	L	V	L	K	V	18
94	Y	V	V	Y	K	V	18
95	M	L	V	Y	V	I	18
96	Y	L	V	S	R	V	18
97	A	L	V	V	K	V	19
98	Y	V	V	C	R	I	19
99	G	L	V	M	V	I	19
100	A	L	V	M	K	V	19
101	A	L	V	A	R	I	20
102	A	I	V	A	R	I	20
103	A	L	V	Y	R	V	20
104	G	L	V	M	K	I	20
105	G	I	V	Y	R	V	20
106	A	L	V	M	R	V	20
107	A	V	V	V	K	I	20
108	A	A	V	I	R	I	20
109	A	V	V	Y	R	V	20
110	A	I	V	Y	R	M	21

7.4 PylRS Varianten sortiert nach UAAs

Im Folgenden wurden die sechs variablen Positionen aller 151 sequenzierten PylRS-Varianten und die jeweilige mTFP1_{TAG128} Fluoreszenzintensität mit und ohne UAA aufgelistet.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position 271, 274, 313, 315, 370, 378
12725	634	Y V V S R I
10685	590	Y V V L R V
27119	584	Y V V M V I
12952	583	Y V V Y R I

PylRS Varianten für den Einbau von **2**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position 271, 274, 313, 315, 370, 378
1117	835	Y A V N K A
4577	832	C L V L R I
17916	719	Y V V S K I
16731	736	Y I V L K I
30127	892	Y C V C K V
8801	788	A L V Y K M
30104	792	Y C V L K I
27050	894	Y V V Y K I
10820	760	Y G V Y R V
28240	924	Y V V M R I
10229	753	A C V L V I
27983	726	Y I V Y K I
31070	774	Y I V Y V I
29733	811	Y V V C R V
43366	973	A V V Y R I

PylRS Varianten für den Einbau von **3**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position 271, 274, 313, 315, 370, 378
13105	925	Y L V M V I
22225	621	A I V V R V
35811	751	Y C V M V V
24430	852	G L V M K V
28568	797	A L V Y K V
30905	1090	A L V Y R I
21685	794	G L V Y R I
31526	826	Y G V V R I
28183	788	A V V L R I
18057	629	G M V M V I
31313	896	A V V M R I

27161	847	A C V Y K M
26942	740	A L V Y V V

PyIRS Varianten für den Einbau von **4**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
19771	736	G L V M R I
11353	701	Y A V C V V
14207	770	G V V M R I
17592	763	A V V Y R I
9819	718	A I V Y K I

PyIRS Varianten für den Einbau von **5**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
11790	814	G L V V R V
6941	759	A L V M K M
13108	732	A C V Y R V
11375	772	A V V L R I
8494	687	A I V M K V
14852	811	G V V Y R I

PyIRS Varianten für den Einbau von **6**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
2035	807	G M V M R I
2515	785	A V V L R I
2101	711	A A V Y R V
3204	731	G L V M R I
2153	726	G M V M R V
5202	810	A V V Y R I

PyIRS Varianten für den Einbau von **7**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
1795	792	G V V Y R I
1776	855	G M V M R I
2035	796	A V V L R I
3731	721	A A V Y R V
1621	697	G L V M R I

PyIRS Varianten für den Einbau von **8**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
19216	584	Y L V M V I

PyIRS Varianten für den Einbau von **10**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
35952	728	Y V V Y R I
15042	799	Y L V M R I
15530	744	Y L V A R V
5284	708	Y L V G R V

PyIRS Varianten für den Einbau von **11**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
16048	725	Y C V C V V
14042	819	Y L V M V I
4424	794	Y M V C K V
4093	730	Y V V N R I
9320	739	A M V Y R V
9760	709	Y A V A R I

PyIRS Varianten für den Einbau von **12**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
12721	711	A I V M R V
9220	685	Y Y V V R V
11843	746	Y V V A R C
9017	721	Y L V M V I
25631	763	A C V Y K M
15801	739	Y C V S R I
6442	716	G V V L V I
2114	581	A I V V R V
27521	679	Y G V A R V
21348	739	A C V I R I
17872	758	A V V C K I

PyIRS Varianten für den Einbau von **13**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
34644	581	Y V V L R I
32398	713	Y L V I R I
22698	642	Y M V N R V
29593	620	Y V V A V M
29064	678	Y V V Y K M
12593	613	Y C V S R C
34624	584	Y L V M V I
10389	565	Y L V Y K V

PyIRS Varianten für den Einbau von **14**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378

2821	773	G C V Y K I
2669	850	A A V V K I
2582	672	A A V L K I
3278	688	G A V L R I
3113	741	A A V L R V
3264	834	A V V A K I

PyIRS Varianten für den Einbau von **15**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz z-UAA	Position 271, 274, 313, 315, 370, 378
3869	765	A A V I K I
6572	659	A L V Y K I
5119	728	A V V L K I
13125	845	A V V Y R I
8927	755	A L V Y K V
9911	782	A V V Y R C
4284	720	A M V Y R I

PyIRS Varianten für den Einbau von **16**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position 271, 274, 313, 315, 370, 378
8862	726	G L V Y R I
12820	750	G L V M R I
13649	791	A C V Y R I
11364	793	A C V V R I
10851	664	G I V C R I
13115	751	G L V M R I

PyIRS Varianten für den Einbau von **17**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position 271, 274, 313, 315, 370, 378
14541	769	M L V Y R I
12883	734	Y C V Y R C
11590	778	L M V Y R I
14874	641	Y V V V R V
1599	709	F V V S V V
25904	828	Y L V L K V
11625	702	A L V Y K I
22850	796	A V V Y R I
9941	742	Y V V Y K V
12033	783	M L V Y V I
17972	707	A L V Y K M
18905	743	Y L V S R V
15234	714	Y V V C R V

PyIRS Varianten für den Einbau von **18**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
17947	672	ALVVKV
9925	781	YVVCRI
21319	788	GLVMVI
25113	867	ALVMKV

PylRS Varianten für den Einbau von **19**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
2466	724	ALVARI
2932	766	AIVARI
5705	762	GVVYRI
2974	707	AVVYRI
9739	747	ALVYRV
9544	733	GVVYRI
4747	817	GLVMKI
2060	706	GIVYRV
4234	727	ALVYKV
4427	659	ALVMRV
3903	738	AIVYKI
3088	718	AVVVKI
2424	676	AVVLRI
1923	723	AAVIRI
3605	680	GVVYRI
2436	704	AVVCKI
4740	706	AVVYRV
8552	795	AVVYRI
2603	741	AIVVRV

PylRS Varianten für den Einbau von **20**.

Fluoreszenz +UAA	Fluoreszenz -UAA	Position
		271, 274, 313, 315, 370, 378
1666	847	AIVYRM
1861	730	GMVMRI
1158	780	GVVYRI
1209	743	GVVYRI
2062	617	AVVYRI

PylRS Varianten für den Einbau von **21**.