

Analyse funktioneller Komplexe des Ribosoms in Regulations- und Terminationsprozessen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Oliver Vesper

aus Lüneburg

August 2007

Gutachter:

1. Prof. Dr. Knud H. Nierhaus

2. Prof. Dr. Petra Knaus

Disputation am 26.11.2007

Zusammenfassung

Parameter zweier *in vitro* Systeme zur Analyse der Proteinsynthese in *E. coli* wurden analysiert und verbessert. Die optimierten Systeme wurden zum Studium ausgesuchter Antibiotika und ihrer Hemmechanismen, sowie zur Funktionsanalyse der Ribosomenfaktoren LepA, RelA und der Terminationsfaktoren RF2 und RRF angewendet. Ferner wurde die toeprint Methode zur Bestimmung der Ribosomenposition auf einer speziell entworfenen mRNA unter *in vivo* nahen Bedingungen eingeführt.

Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt:

1. Wir optimierten unser Standard Poly(U) abhängiges Poly(Phe) System zu einem robusten *in vitro* System und erzielten statistisch 100 bis 300 eingebaute Phenylalaninreste per Ribosom mit nicht fraktionierten Poly(U) bzw. 800 bis 1000 eingebaute Phenylalaninreste per Ribosom mit Poly(U)-Ketten von 1400 Nukleotiden. Dieses System zeichnet sich durch folgende Merkmale aus: (i) Die Konzentration von 4,5 mM Mg^{2+} erscheint optimal gemessen an Syntheseleistung und -genauigkeit. (ii) Der hohe Phenylalanin-Einbau erlaubt eine genaue Messung der Fehlerrate mit einer Auflösungsgrenze von 1:10000 (ein Fehleinbau per 10000 eingebauten Phenylalaninen). Das System weist einen Fehleinbau von etwa 1:3000 bezüglich der nah-verwandten Aminosäure Leucin auf, was der *in vivo* Genauigkeit entspricht. (iii) Signifikanten Fehleinbau konnten nur für Fehlpaarungen in der „wobble“ Position des Codons (dritte Codonposition), jedoch nicht in der mittleren Position und kaum in der ersten Position des A-Stellen Codons beobachtet werden. Dies gilt auch dann, wenn der Fehleinbau um einen Faktor von 20 bis 30 durch Streptomycin oder durch eine Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration verstärkt wurde. Diese Beobachtung führte zu einer genaueren Definition der Begriffe kognat, nah-kognat und nicht-kognat über die Wahrscheinlichkeit des Fehleinbaus und die damit gekoppelten dramatischen Unterschiede in dem GTP Verbrauch, im Gegensatz zu der bisher vorherrschenden, zu simplen Betrachtung der Fehlpaarungen (Szaflarski und Vesper *et al.* Publikation in Vorbereitung).

Des weiteren konnten wir in diesem System ein nicht-enzymatisches Recycling der Ribosomen nachweisen und eine Recyclingzeit von ca. 300 Sekunden bestimmen.

2. Die Einführung der toeprint Methode in den Methodenpool der Arbeitsgruppe war - in Kombination mit der Puromycinreaktion – entscheidend für die Entdeckung einer neuen ribosomalen Funktion eines in unserer Gruppe entdeckten ribosomalen Elongationsfaktors,

des Proteins LepA, welches zu den konserviertesten Proteinen überhaupt gehört und den wir vorschlagen EF4 zu nennen. Die neue Funktion von EF4 ist überraschenderweise eine Rücktranslokation der tRNAs von E- und P- Stellen in die P- und A- Stellen während der Elongation, was offenbar zur Steigerung der Genauigkeit der Proteinsynthese unter Stressbedingungen von großer Bedeutung ist. Das konnten wir in zwei verschiedenen gekoppelten Transkriptions-/Translationssystemen belegen.

3. Widersprüchliche Daten zu den bekannten Aminoglykosid-Effekten auf die A-Stellen Besetzung konnten aufgelöst werden. Insbesondere haben wir festgestellt, dass einige Aminoglykoside eine Rücktranslokation des Ribosoms auslösen können (jedoch nicht das Aminoglykosid Hygromycin), während andere, nicht-verwandte Antibiotika wie Viomycin und Edein ebenfalls einen starken Rücktranslokationseffekt aufweisen.

4. Für Pilotexperimente zur Analyse der Termination und des Ribosomenrecyclings konnten *in vitro* Systeme etabliert werden. Der wichtigste Befund war, dass die E-tRNA Entlassung durch die Terminationsfaktoren der Klasse 1 (hier RF2) und nicht durch RRF, ein Faktor der Klasse 2, ausgelöst wird, eine Fragestellung, die bislang nicht bearbeitet werden konnte.

Summary

Parameters of two *in vitro* systems for the analysis of protein synthesis in *E. coli* were analyzed and improved. The optimized systems were applied for a study of selected antibiotics and their inhibition mechanisms, and in addition for the functional analysis of ribosomal factors LepA, RelA and the termination factors RF2 and RRF. Eventually, the toeprint method for the determination of the ribosome position on specifically designed mRNAs was introduced under *in vivo* near conditions.

The following results were achieved:

1: We optimized our standard poly(U) dependent poly(Phe) system achieving a robust system with statistically 100 to 300 incorporated Phe residue per ribosome with non-fractionated poly(U) and 800 to 1.000 Phe per ribosome with poly(U) chains of 1.400 nucleotides. This system is characterized by the following features: (i) The concentration of 4.5 mM Mg^{2+} represents an optimum concerning both rate and accuracy. (ii) The high Phe incorporation allows a precise assessment of the mis-incorporation rate with a resolution limit of 1:10,000 (one mis-incorporated amino acid per 10,000 incorporated Phe). The system shows a misreading of 1:3,000 concerning the near-cognate amino acid Leu, which corresponds nicely to the *in vivo* accuracy. (iii) A significant mis-incorporation was observed only at a mis-reading of the codon-“wobble” position (third Codonposition), rather than at the middle position and hardly at the first position of the A-site codon. This is also true, when the mis-incorporation was boosted 20- to 30-fold by streptomycin or an increase of the Mg^{2+} concentration, respectively. This observation led to an improved definition of the terms “cognate, near-cognate and non-cognate” *via* the probability of mis-incorporation including the coupled and dramatically different GTP consumption, in contrast to the prevailing and too simple consideration of the mis-pairings (Szaflarski and Vesper et al., publication in preparation).

Furthermore, a non-enzymatic recycling of ribosomes with a recycling time of about 300 sec was observed.

2: The introduction of the toeprint method in our group was – together with the puromycin reaction – instrumental for the detection of a new ribosomal function of an elongation factor, the protein LepA, which was detected in our group. This protein belongs to one of the most conserved proteins known, and we suggest to call it “EF4”. The new function of Ef4 is surprisingly a back-translocation of tRNAs from the E and P sites to the P and A sites,

respectively. This seems to be important for an increase of the accuracy of protein synthesis under stress conditions. This we could confirm in two different coupled transcription-translation systems.

3: Controversial data of known aminoglycoside effects on the A-site occupation could be resolved. In particular, we demonstrated a back-translocation of some but not all aminoglycosides, and also non-related antibiotics such as viomycin and edeine were found to be strong back-translocators.

4: We established *in vitro* systems for pilot experiments concerning termination and ribosome-recycling. The most important result was that the E-tRNA release was triggered by the termination factors of class I (here RF2) rather than RRF, a factor of class 2. This issue could not hitherto be analyzed.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	3
SUMMARY	5
INHALTSVERZEICHNIS.....	7
0 ABKÜRZUNGEN	10
1 EINLEITUNG	14
1.1 PROTEINBIOSYNTHESE	14
1.2 STRUKTUR DES RIBOSOMS	14
1.3 ABLAUF DER PROTEINBIOSYNTHESE	23
1.3.1 <i>Initiation</i>	24
1.3.2 <i>Elongation</i>	25
1.3.3 <i>Elongationsmodelle</i>	26
1.4 TERMINATION DER PROTEINBIOSYNTHESE	30
1.4 RIBOSOMRECYCLING	31
1.5 INHIBITION DER PROTEINBIOSYNTHESE DURCH ANTIBIOTIKA	34
1.6 ZIELSETZUNG	35
2 MATERIAL UND METHODEN	37
2.1 BEZUGSQUELLEN VON CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	37
2.2 BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	41
2.2.1 <i>Bakterienstämme</i>	41
2.2.2 <i>Plasmide</i>	43
2.3 PUFFER, LÖSUNGEN UND MIKROBIOLOGISCHE MEDIEN	45
2.3.1 <i>Gellösungen und Elektrophoresepuffer</i>	45
2.3.2 <i>Pufferlösungen</i>	47
2.3.3 <i>Mikrobiologische Medien</i>	49
2.3.4 <i>Puffer und Lösungen für in vitro Systeme</i>	49
2.4 ANALYTISCHE METHODEN	53
2.4.1 <i>Photometrische Konzentrationsbestimmungen</i>	53
2.4.2 <i>Radioaktivitätsmessung</i>	55
2.4.3 <i>Elektrophoresen</i>	55
2.4.4 <i>Analytische Dichtegradienten-Zentrifugation</i>	60
2.4.5 <i>High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) zur Bestimmung der Dipeptidformation</i>	61
2.4.6 <i>Westernblot zur Detektion vom Hexahistidin-markierten Proteinen</i>	61
2.4.7 <i>RNA Sequenzierung durch Reverse Transkription</i>	62
2.4.8 <i>Toeprint Experiment für Ribosomale Komplexe unter in vivo-nahen Pufferbedingungen</i>	62
2.5 MIKROBIOLOGISCHE UND MOLEKULARGENETISCHE METHODEN	63
2.5.1 <i>Anzucht und Konservierung von E. coli</i>	63
2.5.2 <i>Herstellung von transformationskompetenten Zellen für die Elektroporation</i>	63
2.5.3 <i>Transformation mittels Elektroporation</i>	64
2.5.4 <i>Restriktionsverdau von DNA</i>	64
2.5.5 <i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	65
2.5.6 <i>Ligation und Transformation unter Verwendung des Topo TA Kloning Kit (Invitrogen)</i>	66
2.5.7 <i>Synthese von kurzen dsDNA-Fragmenten mittels Klenow-Reaktion</i>	67
2.5.8 <i>In vitro Transkription mittels T7-Polymerase</i>	68
2.5.9 <i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	69
2.5.10 <i>Klonierung des RFF-Gens (DR1510) aus Deinococcus radiodurans</i>	70
2.5.10.1 <i>Klonierungsstrategie</i>	70
2.5.10.2 <i>Primerauswahl</i>	71
2.5.11 <i>Überexpression von Hexahistidinmarkierten Proteinen</i>	71
2.6 PRÄPARATIVE METHODEN	72
2.6.1 <i>Plasmidisolierung</i>	72

2.6.2	Reinigung von DNA über Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	72
2.6.3	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion	73
2.6.4	Ethanol-Präzipitation von DNA	73
2.6.5	Präparative Aufreinigung von mRNA aus Polyacrylamidgelen	73
2.6.6	Herstellung ³² P-markierte Oligonukleotiden.....	74
2.6.7	Fraktionierung von Poly(U)	75
2.6.8	Isolierung von Ribosomen, ribosomalen Untereinheiten und Reassoziaton zu „reassozierten“ 70S76	
2.6.9	Isolierung und Aufreinigung von Polysomen.....	78
2.6.10	Isolierung von Oligonukleotiden und NTPs mittels HPLC.....	79
2.6.11	Entfernung von EF-G von POST Ribosomen.....	81
2.6.12	Reinigung von hexahistidinmarkierten Proteinen (Ni-NTA Spin Kit).....	83
2.7	IN VITRO-SYSTEME	83
2.7.1	Watanabe Assay.....	83
2.7.2	Verwendete mRNA für Watanabe und Elongationssystem	89
2.7.3	Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese.....	90
2.7.4	Poly (U)-abhängige Poly(Phe/Leu)-Synthese.....	90
	(Misinkorporationstest)	90
2.7.5	Elongationssystem für heteropolymere mRNA und EF-Tu Aktivitätstest.....	91
2.7.6	In vitro (p)ppGpp Synthese durch RelA.....	91
2.7.7	RTS 100 High Yield E. coli Kit (Roche).....	92
2.8	COMPUTERGESTÜTZTE METHODEN.....	93
2.8.1	Sekundärstrukturanalyse von RNA.....	93
2.8.2	Sequenzvergleiche von Genen aus verschiedenen Organismen.....	93
3	ERGEBNISSE	94
3.1	OPTIMIERUNG DER POLY(U) ABHÄNGIGEN POLYPHENYLALANINSYNTHESE (POLY(PHE) SYNTHESE)	94
3.1.1	Optimierung des Energiereregationssystems der Poly(Phe) Synthese	95
3.1.2	Optimierung der Magnesiumkonzentration.....	98
3.1.3	Recycling in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese	100
3.1.4	Fehlerrate in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese	101
3.1.5	Ausmaß des Fehleinbaus verschiedener Aminosäuren.....	102
3.2	OPTIMIERUNG DES WATANABE EXPERIMENTE.....	104
3.2.1	Test des modularen Puffersystems des Watanabe Experiments und Puromycinreaktion.....	105
3.2.2	Watanabe Assay zur funktionellen Testung der MF-mRNA.....	108
3.2.4	Analyse von MF-mRNA, MFStop-mRNA und 8Codon-mRNA.....	110
3.2.5	Optimierung des nicht-enzymatischen Watanabe Experiments	116
3.2.6	Optimierung des enzymatischen Watanabe Experiments	122
3.3	ETABLIERUNG DES TOEPRINT EXPERIMENTS	130
3.3.1	Position des Ribosoms auf der mRNA und mRNA Sequenzierung.....	131
3.4	ANWENDUNG DER IN VITRO SYSTEME.....	139
3.4.1	Herstellen von ribosomalen Komplexen, die den Regulationsfaktor RelA tragen.....	139
3.4.2	In vitro Analyse der LepA Funktion.....	146
3.4.3	LepA unabhängige Rücktranslokation.....	151
3.4.4	EF-G abhängige Translokation.....	152
3.4.5	Bedeutung der LepA abhängigen Rücktranslokation für die Proteinsynthese.....	155
3.4.6	Auswirkungen von Aminoglykosid-Antibiotika auf die Proteinsynthese.....	160
3.5	TERMINATION UND RIBOSOMRECYCLING.....	165
3.5.1	Test der Aktivität von isoliertem RF2	165
3.5.2	RF3 stimuliert die Peptidhydrolyse durch katalytischen Mengen an RF2.....	166
3.5.3	RF2 setzt die E-Stellen tRNA aus Terminationskomplexen frei.....	167
3.6	RIBOSOMRECYCLING.....	169
3.6.1	Test der Aktivität von isoliertem Ribosomrecycling Faktor (RRF).....	169
3.6.1.2	Polysomen break-down Assay im Polyamin-Puffer.....	171
3.6.2	Wirkung von RRF und EF-G auf Modell Post-Terminations-komplexe	172
ANHANG	174
3.7	ANALYSE VON ANTISENSE OLIGONUKLEOTIDEN DES PEPTIDYLTRANSFERASE ZENTRUMS.....	174
3.7.1	Hemmung der Poly(Phe) Synthese durch Antisense Oligonukleotide gegen rRNA.....	175
3.7.2	Bindung von Peptidyl-tRNA in Gegenwart von Antisense Oligonukleotiden des P Loop.....	176
4	DISKUSSION.....	178
4.1	PUFFERSYSTEME UND IN VIVO BEDINGUNGEN	178
4.2	POLY(U) ABHÄNGIGE POLY(PHE) SYNTHESE	180

4.3 ANALYSE DER GENAUIGKEIT DER <i>IN VITRO</i> PROTEINSYNTHESE, DEFINITIONEN VON NAH- UND NICHT-COGNATEN tRNAs	181
4.4 RECYCLING DER RIBOSOMEN IN DER POLY(PHE) SYNTHESE.....	185
4.5 OPTIMIERUNG DER MICROREAKTIONEN IN EINEM ELONGATIONS-ZYKLUS (WATANABE)	186
4.6 TRANSLOKATION UND RÜCKTRANSLOKATION DES RIBOSOMS.....	187
4.6.1 Translokation durch EF-G	189
4.7.2 <i>LepA (EF 4) ist ein Elongationsfaktor, der durch Rücktranslokation des POST zum PRE Zustand Translationsfehler vermeidet</i>	190
4.6.3 <i>Effekte der Aminoglykosid-Antibiotika in vitro</i>	195
4.7 TERMINATION UND RIBOSOMRECYCLING: OFFENE FRAGEN UND ERSTE HINWEISE	200
4.7.1 <i>Die E-Stellen tRNA wird nach der Hydrolyse der Esterbindung der Peptidyl-tRNA der P-Stelle durch Klasse I Terminationsfaktoren freigesetzt</i>	200
4.7.2 <i>Ribosomrecycling: Konsens oder Kontroverse?</i>	201
5. LITERATURVERZEICHNIS	206
6. VERZEICHNIS EIGENER PUBLIKATIONEN.....	223
8. DANKSAGUNG.....	225

0 Abkürzungen

Translations-spezifische Abkürzungen

30S	kleine ribosomale Untereinheit von <i>E. coli</i> (30S)
50S	große ribosomale Untereinheit von <i>E. coli</i> (50S)
70S	<i>E. coli</i> Ribosom (Sedimentationskoeffizient (70S))
Aa	Aminosäure, Aminoacyl-
Aa-tRNA	Aminoacyl-tRNA
AcAa-tRNA	N-Acetyl-Aminoacyl-tRNA
AcPhe-tRNA ^{Phe}	N-Acetyl-Phenylalanyl-tRNA ^{Phe}
A - Y	Aminosäuren nach dem „Ein-Buchstabencode“
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
GDPNP	Guanosin-5'-(β-γ-Imino)-Triphosphat
GDPCP	Guanosin-5'-(β-γ-Methylen)-Triphosphat
GDPN	Guanylyldiphosphoamidat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
dNDP	Desoxy-Nukleosid-5'-Dinophosphat
dNMP	Desoxy-Nukleosid-5'-Monophosphat
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EF-G	Elongationsfaktor G
EF-G*GTP	Koplex aus Elongationsfaktor G und GTP
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
EF-Ts	Elongationsfaktor Ts
EM	Elektronenmikroskopie
h1-h45	Helices der <i>E. coli</i> 16S rRNA
H1-H101	Helices der <i>E. coli</i> 23S rRNA
HPLC	hochauflösende Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatographie)

IF	bakterieller Initiationsfaktor
IF1	bakterieller Initiationsfaktor 1
IF2	bakterieller Initiationsfaktor 2
IF3	bakterieller Initiationsfaktor 3, Antiassoziationsfaktor
Kryo EM	Kryoelektronenmikroskopie
L1-L36	<i>E. coli</i> Proteine der großen ribosomalen Untereinheit
Lys	Lysin
mRNA	Boten-RNA
NDP	Nukleosid-5'-Diphosphat
NMP	Nukleosid-5'-Monophosphat
NTP	Nukleosid-5'-Triphosphat
nt(s)	Nukleotid(e)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
Phe	Phenylalanin
PK	Puruvatkinase
Poly(U)	homopolymere Uridin-RNA
Poly(A)	homopolymere Adenosin-RNA
POST	Posttranslokationaler Zustand des Ribosomens
PRE	Prätranslokationaler Zustand des Ribosomens
PTF	Peptidyltransferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP(s)	Ribonukleoprotein Partikel
RRF	Ribosomrecycling Faktor
rRNA	ribosomale RNA
S1-S21	<i>E. coli</i> Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit
S-30	Lysat der <i>E. coli</i> Zellen nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer
S-100	Überstand nach Zentrifugation des S-30 Lysates mit 100000 g
tRNA	Transfer-RNA
tRNA ^{bulk}	tRNA-Gemisch
tRNA ^{aa}	aminosäurespezifische tRNA
fMet- tRNA _f ^{Met}	Formyl-Methionin-tRNA _f ^{Met} ; Initiator-tRNA

Chemikalien

AA	Acrylamid
AcOH	Essigsäure
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAA	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
Bpb	Bromphenolblau
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EtOH	Ethanol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
IPTG	Isopropyl-thio- β -D-Galaktosidose
MeOH	Methanol
Mes	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MQ	salzfeies, steriles, RNase freies Wasser (Milli Pore Aufbereitungsanlage)
NaOAc	Natriumacetat
PAA	Polyacrylamid
Pipes	Piperazine-N-N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp	Spermin
Spd	Spermidin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Xc	Xylencyanol

Einheiten, Sonstiges

Å	Ångström
A_x	Extinktion einer Substanzmenge in einem Lösungsvolumen von 1 ml und einer Küvettschichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von
$\lambda=$	Wellenlänge in nm
CPM	Zählereignisse pro Minute
DPM	Zerfälle pro Minute
f.c.	Endkonzentration
x g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
min	Minute
n	Anzahl
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedbergeinheit für den Sedimentationskoeffizient ($1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$)
s	Sekunde
üN	über Nacht, d.h. länger als 10 Stunden
% v/v	Konzentrationsangabe in ml pro 100 ml Lösungsmittel
Vol	Volumen oder Volumina
% w/v	Konzentrationsangabe in g pro 100 ml Lösungsmittel