

3 Ergebnisse

Zur Analyse der Proteinbiosynthese *in vitro* stehen bereits spezifische Systeme zur Verfügung, die die verschiedenen Aspekte der Initiation, Elongation, Termination und des Ribosomrecyclings beleuchten. Die erhaltenen Ergebnisse sind unter den verwendeten Pufferbedingungen zu beurteilen, denn es ergaben sich Differenzen in der Interpretation bei Verwendung unterschiedlicher Pufferbedingungen (Hirokawa et al., 2006; Nierhaus, 2006a; Spahn and Nierhaus, 1998; Vesper and Wilson, 2006; Wilson et al., 2002; Wilson et al., 2000). Die Einführung eines Polyamin-Puffersystems für Elongations-Systeme aus *E. coli* (Bartetzko and Nierhaus, 1988; Rheinberger and Nierhaus, 1987) erleichterten die Untersuchung der E-Stellen Eigenschaften erheblich (Gnirke et al., 1989). Eine weitere Optimierung der *in vitro* Systeme der Proteinsynthese mit dem Ziel eine Situation zu simulieren, die möglichst nah an die Bedingungen und Verhältnisse innerhalb einer lebenden Zelle heranreichen, sollten erfolgen. Die Verbesserung der Systeme soll neue Aufschlüsse über die Funktion von Regulationsproteinen (LepA, RelA) und Hemmstoffen der Proteinsynthese (Antibiotika und Antisense Oligonukleotide gegen rRNA) ermöglichen. Die Verbesserung der Herstellung von definierten ribosomalen Komplexen für die Strukturanalyse und den biochemischen Nachweis der Abläufe der noch wenig bekannten Prozesse der Termination und des Ribosomrecycling wird angestrebt.

3.1 Optimierung der Poly(U) abhängigen

Polyphenylalaninsynthese (Poly(Phe) Synthese)

Die Proteinbiosynthese *in vivo* in *E. coli* schreitet mit einer Rate von 10-20 Peptidbindungen pro Sekunde und einer Fehlerrate von ungefähr ein Fehleinbau pro 3000 - 10000 Aminosäuren voran (Bouadloun et al., 1983; Kennel and Riezman, 1977; Kjeldgaard and Gausing, 1974; Kurland, 1982; Wagner et al., 1982). *In vitro* Systeme zur Proteinsynthese mit isolierten Ribosomen und tRNAs unter Verwendung von Poly Uridin (Poly(U)) als mRNA zeigten große Abweichungen von der *in vivo* ermittelten Rate der Proteinsynthese (Traub and Nomura, 1968). Durchschnittlich konnten nur Raten von 0,05 Aminosäuren pro Sekunde oder weniger erreicht werden. Die anfänglichen Probleme der *in vitro* Systeme bestanden im Wesentlichen in den verwendeten Pufferbedingungen und der geringen Aktivität der isolierten

Ribosomen (Gavrilova et al., 1976; Gavrilova et al., 1981; Jelenc, 1980; Wagner et al., 1982). Verbesserungen der Systeme wurden durch Optimierungen der Pufferbedingungen und Einführung des so genannten Polymix-Puffersystems gegenüber den konventionellen Puffersystemen erzielt. In diesem System konnte über wenige Sekunden eine *in vivo* vergleichbare Rate von etwa acht Aminosäuren pro Sekunde und eine Fehlerrate von ein Fehleinbau pro 3000 Aminosäuren erzielt werden (Jelenc, 1980; Wagner et al., 1982)

Die Analyse der Zusammensetzung des Zytoplasmas aus *E. coli* und *Salmonella spez.* (Neidhardt, 1987; Tabor and Tabor, 1985) in Bezug auf die Ionenkonzentrationen wurden zum Aufbau eines verbesserten *in vitro* Systems herangezogen. Bartetzko et al. präsentierten ein verbessertes Ammonium/ Polyaminsystem mit geringer Magnesiumkonzentration zur Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese (Bartetzko and Nierhaus, 1988). Dieses System zeigte über längere Zeit (60 Sekunden) eine *in vivo* vergleichbare Translationsrate und Fehlergenauigkeit. Der entscheidende Vorteil aber war, dass in diesem System bis zu 50% der isolierten Ribosomen aktiv sind, während unter Polymixbedingungen anfangs nur 10% aktive Ribosomen detektiert wurden (Bartetzko and Nierhaus, 1988; Jelenc, 1980; Wagner et al., 1982). Weitere deutliche Verbesserungen erfolgten durch die Verwendung von reassozierten Ribosomen (Bommer et al., 1996) und der Einführung eines Energieregenerationssystems.

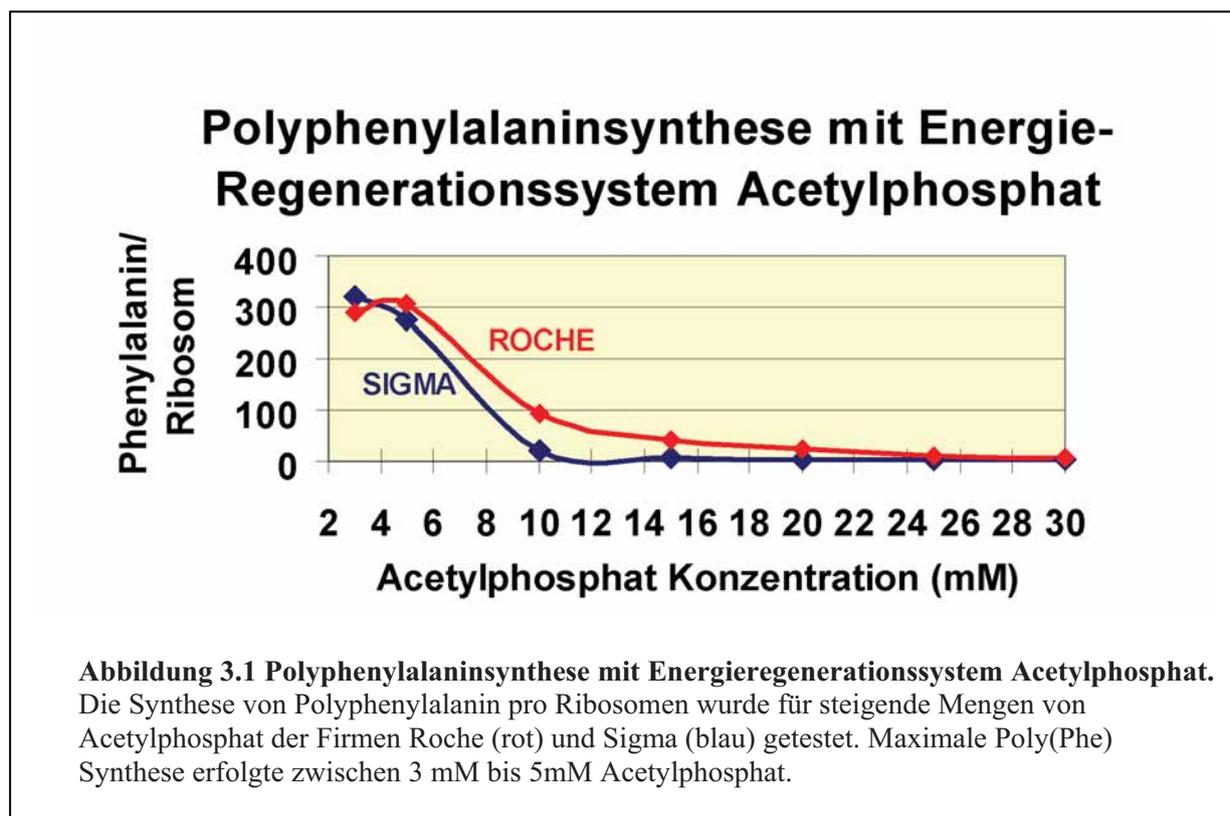
3.1.1 Optimierung des Energieregenerationssystems der Poly(Phe)

Synthese

Die hier dargestellten Optimierungen der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese sind in Zusammenarbeit mit Yoshika Teraoka entstanden. Auf der Basis des Magnesium/ Ammonium/ Polyaminsystems zur Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese (Bartetzko and Nierhaus, 1988) erfolgte die Optimierung bezüglich des Energieregenerationssystems aus ATP/ GTP und Acetylphosphat und bezüglich der Magnesiumkonzentration. Ein häufig verwendetes Energieregenerationssystem nutzt Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase (PK) zur Regenerierung der energiereichen Verbindungen ATP und GTP. In anderen Systemen wird Kreatinphosphat und Kreatinkinase verwendet. PEP ist, wie Kreatinphosphat, eine der teureren Verbindungen eines Translationssystems. Außerdem birgt PEP den Nachteil, dass bei der Regeneration anorganisches Phosphat entsteht. Die Erhöhung der Konzentration von anorganischem Phosphat kann zur Komplexbildung von Magnesiumionen führen. Dadurch kann die Konzentration an freien Magnesiumionen herabgesetzt werden, was die

Proteinsynthese nachteilig beeinflusst. Ein weiterer Nachteil ist der hohe RNase Anteil, der in einigen Lots der käuflichen Enzyme enthalten ist (Márquez, 2002). Ein günstigeres und effizienteres System zur Regenerierung von ATP, das ohne Zugabe von isolierten Enzymen auskommt, ist die Kombination von Acetylphosphat und Acetatkinase (E.C.2.7.2.1). Acetylphosphat (AcP) ist bei neutralem pH-Wert gut wasserlöslich und die Acetatkinase ist Bestandteil des verwendeten S100 Extrakts und muss nicht zusätzlich zugegeben werden.

AcP-Konzentrationen von 3 mM bis 25 mM wurden in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) getestet. Es zeigte sich, dass eine Konzentration oberhalb von 5 mM AcP zu einer deutlichen Reduktion der Poly(Phe) Synthese führt (siehe Abbildung 3.1). Im Konzentrationsbereich um 4 mM konnten eine maximale Synthese von durchschnittlich 300 Phe per Ribosom in einer Stunde synthetisiert werden. Die weitere Optimierung des Energieregenerationssystems erfolgte für Konzentrationen von 0 mM zu 4 mM AcP und der Ermittlung der optimalen Konzentration an ATP und GTP im Regenerationssystem.



Die Ergebnisse der Poly(Phe) Synthese bei Verwendung der verschiedenen Kombinationen der energiereichen Komponenten (AcP, GTP und ATP) sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Synthesemenge der Phe per Ribosom mit der Kombination der energiereichen Verbindungen, in der jeweils 2 mM jeder der drei Komponenten (AcP, ATP und GTP) vorhanden war, entsprach einem Einbau von 190 Phe/70S und wurde zum einfacheren Vergleich willkürlich auf 100% gesetzt. Ein Farbcode zur Kennzeichnung der höchsten Polyphenylalaninsynthese per Ribosom wurde verwendet. Weiß zeigt eine Verschlechterung des System, grün zeigt eine leichte Steigerung der Phe Synthese per Ribosom (100%-120%). Orange Felder weisen auf eine Steigerung auf 121% bis 140% hin. Die roten Bereiche zeigen die deutlichste Verbesserung der Poly(Phe) Synthese. Zwei „rote Inseln“ der höchsten Aktivität wurden gefunden: a) für 3mM ATP und 3mM GTP ohne AcP und b) 1-3 mM ATP, 1 mM GTP und 4 mM AcP (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Energieregenerierendes System für die Polyphenylalaninsynthese

Die Synthese von 190 Phe/Ribosom für die Kombination 3 mM GTP, 3 mM ATP und 1 mM Acetylphosphat (AcP) wurde 100% gesetzt.

GTP (mM)	ATP (mM)	Acetylphosphate (mM)				
		0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
		%	%	%	%	%
0,0	0,0	2,6	1,1	2,2	2,2	0,7
	1,0	32,9	32,4	36,1	52,9	72,8
	2,0	49,0	43,6	49,7	81,4	105,9
	3,0	56,8	58,0	66,7	114,5	121,3
	4,0	107,1	76,6	81,4	89,1	50,7
1,0	0,0	2,6	2,7	3,3	3,6	3,7
	1,0		62,8	69,9	102,9	144,9
	2,0	94,2	77,7	83,6	124,6	150,0
	3,0	136,1	60,1	97,8	134,8	150,0
	4,0	91,0	80,3	26,2	47,8	23,5
2,0	0,0	3,2	4,3	2,2		2,9
	1,0	94,8	79,8	90,7		139,7
	2,0	114,2	87,2	100,0	131,9	137,5
	3,0	127,1	95,2	106,0	139,1	105,9
	4,0	116,8	41,0	7,7	5,8	8,8
3,0	0,0	3,2	3,2	2,7	2,9	2,9
	1,0	115,5	81,9	95,1		133,1
	2,0	134,8	99,5	98,9	121,7	95,6
	3,0	141,3	100,0	68,3	87,7	23,5
	4,0	53,5	9,6	71,0	4,3	6,6
4,0	0,0	3,2	2,1	2,2	1,4	2,2
	1,0	60,0	33,0	7,1	5,1	6,6
	2,0	31,6	4,8	3,8	3,6	5,9
	3,0	7,7	2,1	1,1	2,2	4,4
	4,0	3,2	1,6	1,6	3,6	2,2

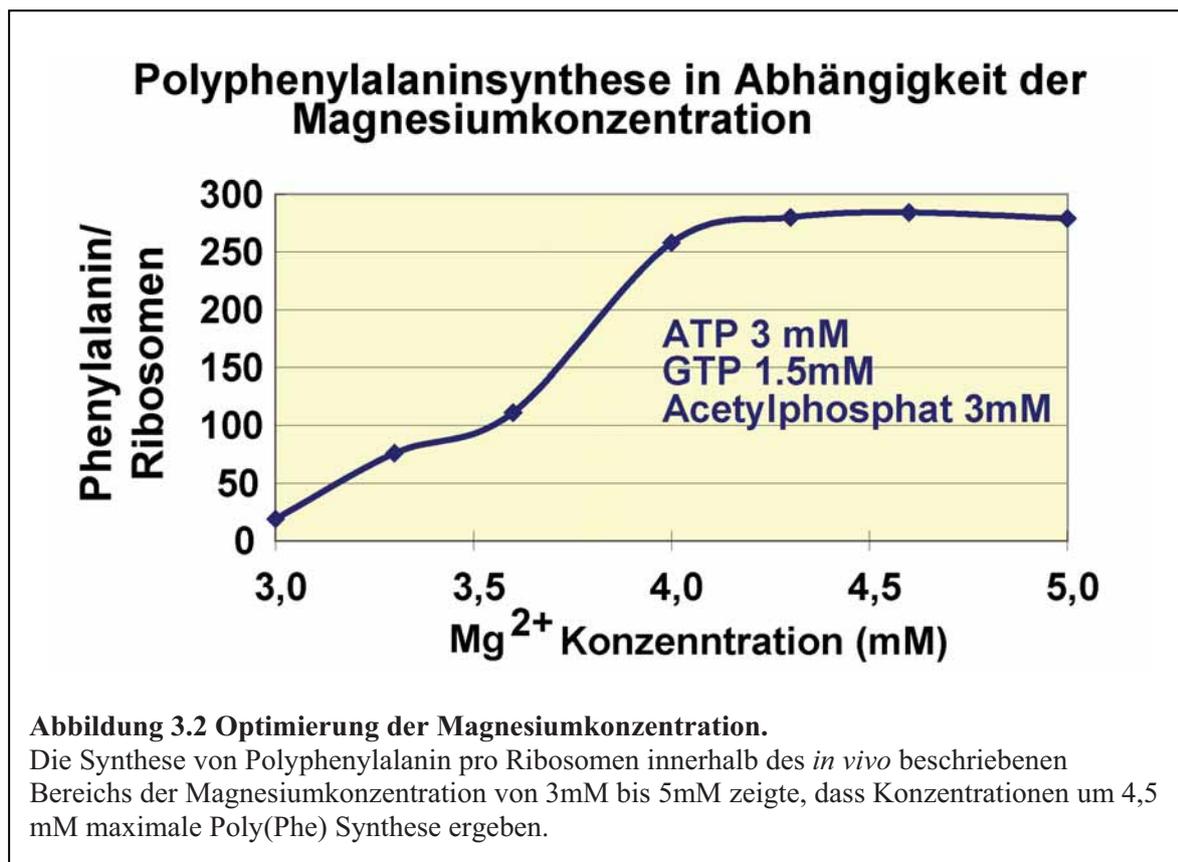
100-120 %

120-140 %

> 141 %

3.1.2 Optimierung der Magnesiumkonzentration

Die Optimierung der Magnesiumkonzentration der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese erfolgte bezüglich der *in vivo* beschriebenen Magnesiumkonzentrationen in *E. coli* (Neidhardt, 1987). Konzentrationen von 3 mM bis 5 mM Magnesiumacetat wurden verwendet. Bei Magnesiumkonzentrationen oberhalb von 4 mM zeigte sich eine gleich bleibende Poly(Phe) Synthese von über 280 Phenylalanin/Ribosom (Abbildung 3.2).



Die Feinabstimmung der Konzentrationen von ATP, GTP und AcP ergab eine maximale Synthese von 284 Phe per Ribosom bei Verwendung von 3 mM ATP, 1,5 mM GTP und 5 mM AcP unter optimierten Magnesiumbedingungen von 4,5 mM Magnesiumacetat im Polyamin-Puffersystem.

Eine weitere Verbesserung der Poly(Phe) Synthese brachte die Verwendung von fraktioniertem Poly(U). Ketten von 1400 Nukleotiden (nt) und mehr zeigten bei einer Magnesiumkonzentration von 4,5 mM Magnesiumacetat und dem oben beschriebenen Regenerationssystem eine maximale Synthese von 1065 (± 82) Phe/ Ribosom (Abbildungen 3.3A).

Vergleich langes und kurzes Poly U

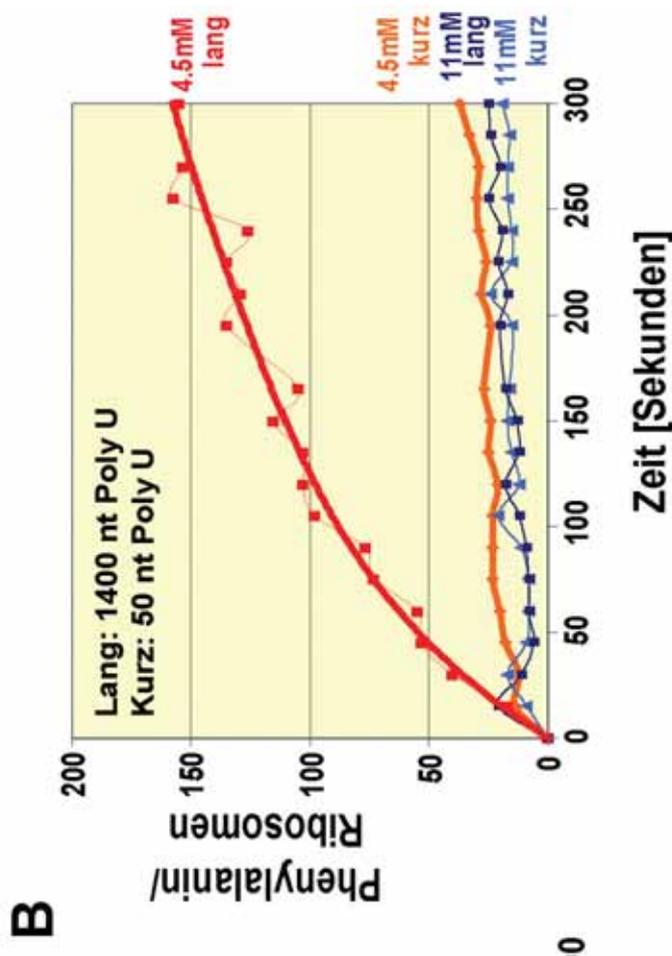
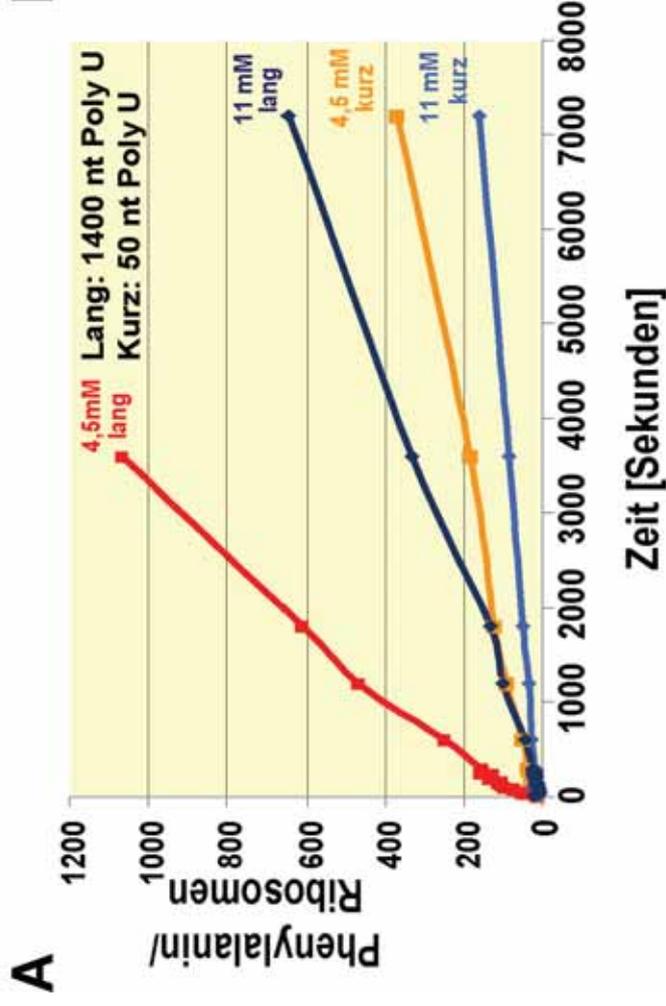


Abbildung 3.3 Poly(Phe) Synthese in Gegenwart von kurzen oder langen Poly(U)
 Vergleich der Poly(Phe) Synthese im optimierten Polyaminpuffersystem (4,5 mM) mit dem konventionellen Puffersystem (11 mM) im Zeitfenster von 7200 Sekunden (2 Stunden) (A) und im Zeitfenster von 300 Sekunden (B) für lange (1400 nt) und kurze (50 nt) Ketten von Poly(U). Die Angabe der mM in der Abbildung bezieht sich auf die Konzentration der Magnesiumionen im System. **4,5 mM** repräsentiert das Polyaminsystem: HEPES 20 mM, pH 7,6 bei 0°C, Ammoniumacetat 150mM, **Magnesiumacetat 4,5mM**, β -Mercaptoethanol 4mM, Spermidin 2mM und Spermin 0,05 mM; **11 mM** zeigt das konventionelle Puffersystem aus: HEPES Puffer pH 7,6 bei 0°C, **11 mM Magnesiumacetat**, 150 mM Ammoniumacetat, 4 mM β -Mercaptoethanol an.

3.1.3 Recycling in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese

Die kinetische Analyse der Poly(Phe) Synthese mit kurzen und langen Poly(U) unter optimierten Pufferbedingungen zeigte, dass bei Verwendung von kurzen Poly(U) ein Recycling der Ribosomen erfolgt, siehe Abbildung 3.3B. Der Vergleich der Synthese von Poly(Phe) mit kurzen (50 nt \pm 10%) und langen Ketten (1400 nt \pm 10%) Poly(U) im oben beschriebenen *in vivo*-nahem Polyaminsystem (HEPES 20 mM, pH 7,6 bei 0°C, Ammoniumacetat 150 mM, Magnesiumacetat 4,5 mM, β -Mercaptoethanol 4 mM, Spermidin 2mM und Spermin 0,05 mM) mit dem so genannten konventionellen Puffersystem (hier HEPES Puffer pH 7,4, 11 mM Magnesiumacetat, 150 mM Ammoniumacetat, 4 mM β -Mercaptoethanol, keine Polyamine) ergab, dass die Rate der Polyphenylalaninsynthese (mit 0,2 Phenylalanin/Sekunde/Ribosom) im Polyaminsystem fünf bis zehnfach schneller als im konventionellen System ist. Die initiale Rate der Synthese zeigt einen noch deutlicheren Unterschied mit 8 Phenylalanin/Sekunde/Ribosom im Polyaminsystem gegenüber 0,2 Phenylalanin/Sekunde/Ribosom im konventionellen System. Dies entspricht der *in vivo* Rate der Proteinbiosynthese. Für die Synthese von 35 Phenylalanin/Ribosom im Polyaminsystem wurde bei Verwendung von kurzer Poly(U) mRNA 300 Sekunden benötigt. Bei Verwendung von langer Poly(U) mRNA wurde für die gleiche Anzahl der Phe-Einbauten nur 40 Sekunden benötigt. Eine kurze Kette Poly(U) mit 50 Nukleotiden (\pm 10%) kodiert für 15-18 Phe. Daraus ergibt sich, dass bei der Synthese von 35 Phenylalanin im Durchschnitt mindestens ein Recycling der kurzen Poly(U)-Ketten erfolgt sein muss. Für die Synthese von 35 Phe in Gegenwart von langen Poly(U) (1400 \pm 10%) kann davon ausgegangen werden, dass ein Recycling nicht notwendig ist, so dass die benötigten 40 Sekunden reine Synthesezeit sind. Somit ergibt sich im System mit kurzen Poly(U) eine Summe aus Synthesezeit (40 Sekunden) plus Recycling von insgesamt 300 Sekunden. Die Zeit für ein Recycling kann daher mit 260 Sekunden angenommen werden. Ein weiterer Beweis, das Recycling der Ribosomen stattfindet, ist der Nachweis der Synthese von 350 Phenylalanin/Ribosom nach 2 Stunden (7.200 Sekunden) in Gegenwart von kurzen Poly(U) Ketten, die nur für 15-18 Phenylalanine kodieren. Bei Verwendung von langen Poly(U) werden ca. 1000 Sekunden benötigt um 350 Phenylalanin/Ribosom zu synthetisieren. Daraus ergibt sich: bei 7200 Sekunden, abzüglich 1000 Sekunden für die Synthesezeit, eine Zeit von 6200 Sekunden für die Recyclingphasen. Es müssen bei 50 Nukleotiden, 15-18 Phenylalanine per Poly(U) Kette, ca. 20 Recyclingschritte angenommen werden. Daraus folgt eine Recycling-Zeit von 310 Sekunden.

3.1.4 Fehlerrate in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese

Obwohl die Syntheserate für die Endpunktmessung nach 60 Minuten *in vitro* noch ca. zwei Größenordnungen von der *in vivo* Geschwindigkeit entfernt ist, lassen sich aufgrund der großen Anzahl der eingebauten Phenylalaninreste Analysen der Fehlerhäufigkeit von falsch eingebauten Aminosäuren *in vitro* durchführen. Leucin ist eine Aminosäure, dessen korrespondierende tRNA ein nah-verwandtes Anticodon (nah-cognate) zum Anticodon der tRNA^{Phe} zeigt. Diese Aminosäure wird häufig für die Analyse von Fehlern in der Proteinsynthese eingesetzt. Zur Analyse des Fehleinbaus von Leucin oder anderen Aminosäuren im Poly(U) abhängigen Polyphenylalaninsynthese System wurden 15 μM tRNA^{bulk} (Mischung aller zellularen tRNA Spezies) und 2,5 μM tRNA^{Phe} zur Kompensierung des hohen Bedarfs an Phe-tRNA^{Phe} für die Polyphenylalaninsynthese eingesetzt. Die Verwendung der tRNA^{bulk} Menge reflektiert die *in vivo* Konzentration der tRNAs (Berg and Kurland, 1997; Dong et al., 1996), so dass neben den *in vivo*-nahen Pufferbedingungen auch die relativen Verhältnisse der Translationskomponenten der *in vivo* Situation entsprechen. 46 individuelle tRNA Spezies sind in tRNA^{bulk} aus *E. coli* vorhanden, und jede in geringerer Konzentration als 1 μM . Um eine effektive und spezifische Beladung der tRNA mit der entsprechenden Aminosäure zu gewährleisten, sollte die zugegebene Aminosäure mindestens im drei bis fünf-fachem Überschuss gegenüber der tRNA vorliegen. Diese *in vitro* Bedingungen zeigten optimale Beladung bei Verwendung von S100 Extrakt (persönlich Mitteilung von E. Einfeldt). Der Nachweis der fehlerhaft eingebauten Aminosäure erfolgt durch Verwendung von radioaktiv markierten Aminosäuren. Hierfür wurde die spezifische Aktivität des Phenylalanins auf etwa 10 dpm/pmol (¹⁴C) eingestellt. Dies ergibt bei einer Synthese von 800 Phenylalaninen per Ribosom ca. 8000 dpm/Ribosom, bzw. 40000 dpm/Assay mit 5 pmol Ribosomen. Bei einem erwarteten Fehler von eins zu 3000, sollte die spezifische Aktivität der zur Untersuchung des Fehleinbaus verwendeten Aminosäure (hier z.B. Leucin) bei 3000 dpm/pmol bis 10000 dpm/pmol (³H) liegen, um gegenüber der Polyphenylalaninsynthese gut nachweisbar zu sein. Die Analyse der Fehleinbauten von Leucin in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration zeigte, dass bei einer Konzentration zwischen 4 mM und 4,5 mM Magnesiumacetat eine maximale Synthese von 845 (± 51) Phe per Ribosom bei gleichzeitiger geringer Fehlerhäufigkeit erreicht wird, siehe Abbildung 3.4.

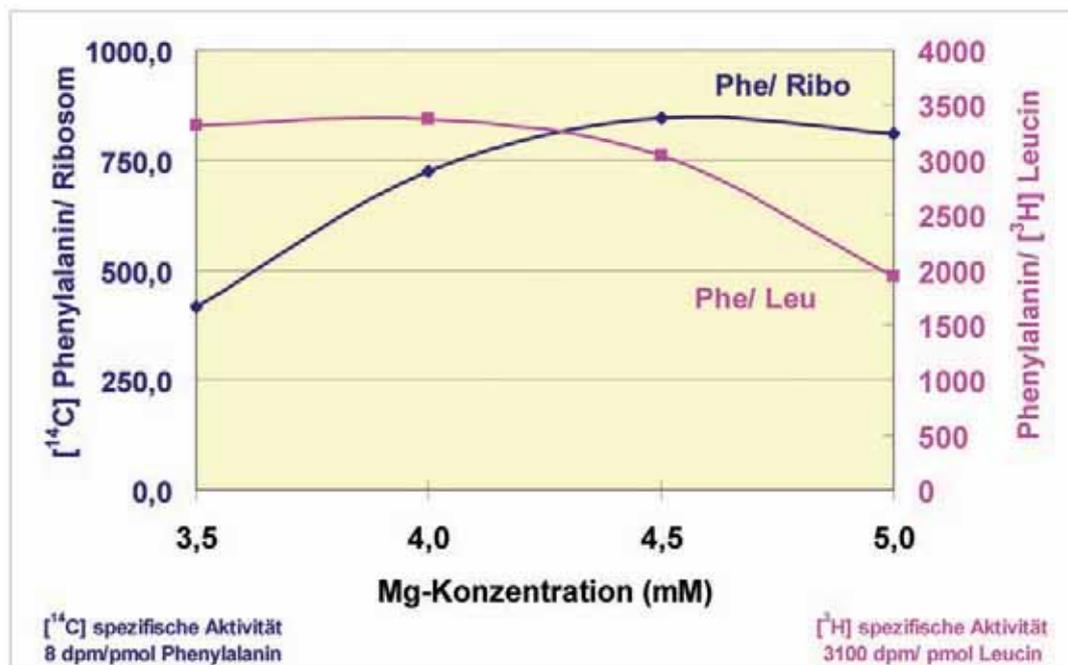


Figure 3.4 Fehleinbau von Leucin in der Polyphenylalaninsynthese

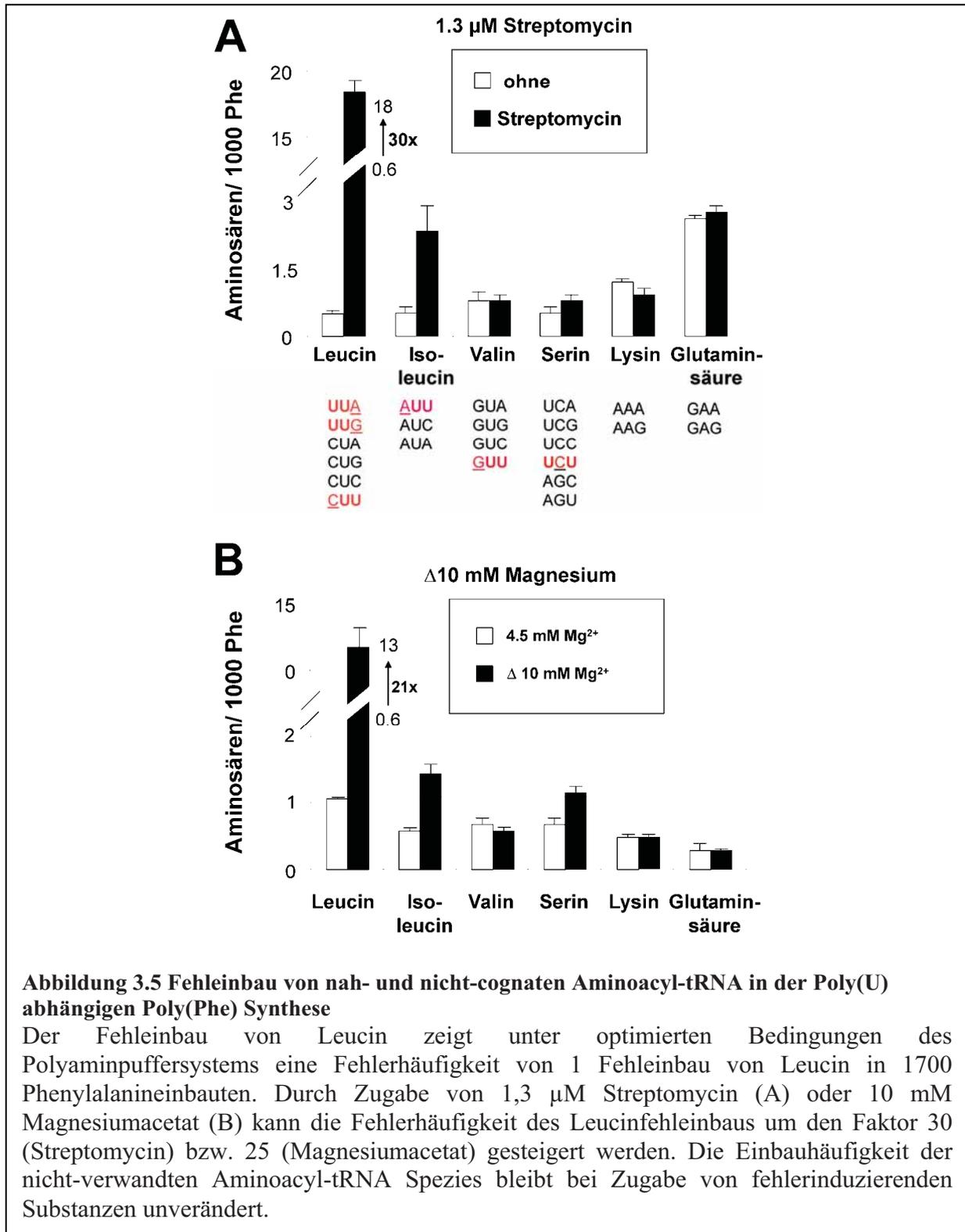
Das optimale Verhältnis zwischen Geschwindigkeit und Genauigkeit der Polyphenylalaninsynthese wird bei einer Magnesiumkonzentration um 4,5 mM Magnesiumacetat erreicht. Das Ausmaß der Poly(Phe) Synthese und die Menge an Phenylalanin pro Leucineinbau wurden nach 50 Minuten ermittelt. Bei steigender Magnesiumkonzentration nimmt das Ausmaß der pro Ribosomen eingebauten Phenylalanine (Phe/Ribo) von 400 auf 800 zu. Die reziproke Darstellung des Fehleinbaus von Leucin pro Phenylalanin (Leu/Phe), hier also Phe/Leu, sinkt bei steigender Magnesiumkonzentration, der fehlerhafte Einbau des Leucin steigt mit steigender Magnesiumkonzentration.

Die Fehlerhäufigkeit des Leucineinbau per Phenylalanineinbau wurde hier reziprok, als Phenylalanin per Leucineinbau (Phe/Leu), dargestellt. Während die Synthesemenge des Poly(Phe) bei Magnesiumkonzentrationen von 3,5 mM bis 4,5 mM Magnesium ansteigt, sinkt die Menge an Phenylalanin per Leucineinbau (der Fehler steigt). Ein optimales Verhältnis zwischen Geschwindigkeit (Phenylalanin/Ribosom/Zeit) und Genauigkeit (Leucin/Phenylalanin) der *in vitro* Proteinsynthese wird im Konzentrationsbereich um 4,5 mM Magnesium erreicht, hier entspricht Syntheseleistung und Fehlerhäufigkeit Werten die *in vivo* gezeigt wurden.

3.1.5 Ausmaß des Fehleinbaus verschiedener Aminosäuren

Die große Anzahl der Phenylalanineinbauten im optimierten Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthesystem erlaubt die Prüfung der Fehlerhäufigkeit von Aminosäuren, die von nicht-cognaten Aa-tRNA bereit gestellt werden. Zur Analyse, ob ein Einbau von Aminosäuren, die

von nicht-cognate Aminoacyl-tRNA stammen erfolgt, wurden die Aminosäuren Isoleucin (AUU nah- und AUC/A nicht-cognat) Valin (GUX, nah- oder nicht-cognate) Lysin (AAA/G Codon, nicht-cognate) und Glutaminsäure (GAA/G, nicht-cognate) ausgewählt und mit der Fehlerhäufigkeit von Leucin (CUU, nah-cognat) verglichen, siehe Abbildung 3.5



Die Analyse der Kontrollen in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese zeigten nur geringe Unterschiede zwischen den verwendeten nah-cognaten und nicht-cognaten Aminoacyl-tRNAs. Um eine bessere Auflösung des Signals gegenüber dem Hintergrund zu erhalten, wurden zwei Fehler induzierende Strategien angewendet. Streptomycin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das bekannt dafür ist, die Fehlerhäufigkeit der Proteinsynthese zu erhöhen. In der Poly(U) abhängigen Polyphenylalaninsynthese zeigt die Verwendung von 1,3 μ M Streptomycin einen dreißigfachen Anstieg der Fehlerrate für die nahe verwandte Aminosäure Leucin (nah-cognate Codon-Anticodon-Wechselwirkung), während die Fehlerrate der nicht-cognaten Aminoacyl-tRNAs keine Veränderung gegenüber der Kontrolle zeigten (siehe Abbildung 3.5). Die Erhöhung der Fehlerrate der Proteinsynthese kann auch durch Erhöhung der Magnesiumkonzentration (z.B. um 10 mM auf 14,5 mM) erfolgen. Auch hier zeigt sich, dass die nahverwandte Aminosäure Leucin fünfundzwanzigfach häufiger falsch eingebaut wurde. Hingegen zeigen alle drei nicht-cognaten Aminosäuren keine Veränderung durch die Erhöhung der Magnesiumkonzentration. Durch Fehler induzierende Substanzen wird selektiv die Fehlerhäufigkeit von nah-verwandten (nah-cognaten) Aminoacyl-tRNAs erhöht, nicht aber die Fehlerhäufigkeit der nicht verwandten Aminoacyl-tRNAs. Dies Ergebnis bestätigt, dass nicht verwandte Aminoacyl-tRNAs durch die reziproke Kopplung der E- und A-Stelle den Selektionsprozess in der A-Stelle nicht beeinflussen.

3.2 Optimierung des Watanabe Experimente

Die Analyse der Prozesse der Proteinbiosynthese durch biochemische und strukturbiologische Methoden erfordern spezifische Systeme, die sich durch gute Reproduzierbarkeit und Bildung möglichst homogener ribosomaler Komplexe auszeichnen. Für die Anwendung isolierter Systeme ist es von besonderer Wichtigkeit, die zahlreichen verwendeten Komponenten auf ihre Aktivität zu prüfen. Dabei bauen häufig die Aktivitätsteste der verschiedenen Experimente aufeinander auf. Insbesondere bei der Anwendung des stellenspezifischen tRNA Bindungstest (Watanabe, 1972) mit einigen Modifikationen (Bommer et al., 1996) (Watanabe Experiment) ist das Zurückgreifen auf ein bestehendes System von entscheidender Bedeutung. Obwohl die Testung der Einzelkomponenten generell möglich ist, erweist sich ein *de novo* Aufbau als sehr zeitaufwendig. Hingegen können Einzelkomponenten im bestehenden System durch vergleichende Analyse mit geringem Zeitaufwand getestet werden. Ein einmal aufgebautes System dient als Referenz für die Optimierungsschritte des Systems. Das Watanabe Experiment dient nicht nur zur Analyse der Prozesse des Elongationszyklus

der Proteinsynthese, sondern bietet ein System aus Ribosomen, mRNA, tRNAs und Elongationsfaktoren, das zur Bildung definierter ribosomaler Komplexe genutzt werden kann. Auch die Analyse von Ribosomen-assoziierten Proteinfaktoren oder von Hemmstoffen der Proteinsynthese (Antibiotika, Antisense-Oligonukleotide oder Ribosomen-inaktivierungsproteinen) kann im Watanabe Experiment untersucht werden.

Die für die Poly(U) abhängige Poly(Phe) Synthese etablierten Pufferbedingungen von HEPES-KOH 20 mM, pH 7,6, 0° C; Magnesiumacetat 4,5 mM, Kaliumacetat 150 mM, β -Mercaptoethanol 4 mM, Spermidin 2 mM und Spermin 0,05 mM werden auch im Watanabe Experiment eingesetzt.

Im Watanabe Experiment erfolgt im ersten Schritt (Prä-Inkubation) die Programmierung der Ribosomen und die Auswahl des Leserasters durch spezifische Bindung einer tRNA in der ribosomalen P-Stelle (Bildung des 70S Initiationskomplex, P_i). Anschließend kann die Zugabe einer weitere tRNA in der Haupt-Inkubation zur Bildung des ersten Elongationskomplexes im PRE Zustand erfolgen. Durch Zugabe von Elongationsfaktor G (EF-G) und der energiereichen Verbindung GTP kann der PRE Zustand in den POST Zustand überführt werden (Translokationsreaktion). Im vierten Schritt erfolgt der Nachweis der gebundenen tRNAs durch Filtration der ribosomalen Komplexe durch ein Nitrozellulosefilter. Hierbei bleiben die ribosomalen Komplex auf dem Filter zurück, während ungebundene tRNAs fortgewaschen werden. Die Beurteilung der Position der tRNAs erfolgt durch Puromycin Reaktion. Die P-tRNA (P-Stellen tRNA) kann nur mit dem A-Stellen tRNA-Analog Puromycin (PM) reagieren, wenn die A-Stelle frei von tRNA ist (Operative Definition der Bindepositionen; (Bommer et al., 1996)). Dies ist im P_i und im POST Zustand der Fall. Der PRE Zustand zeigt keine PM Reaktivität (Abbildung 3.6A-C).

3.2.1 Test des modularen Puffersystems des Watanabe Experiments und Puromycinreaktion

Das Watanabe Experiment ist ein modular aufgebautes isoliertes *in vitro*-System. Jedes Modul kann einzeln durch Vergleich mit dem jeweils bestehen System auf die Funktionsfähigkeit geprüft werden.

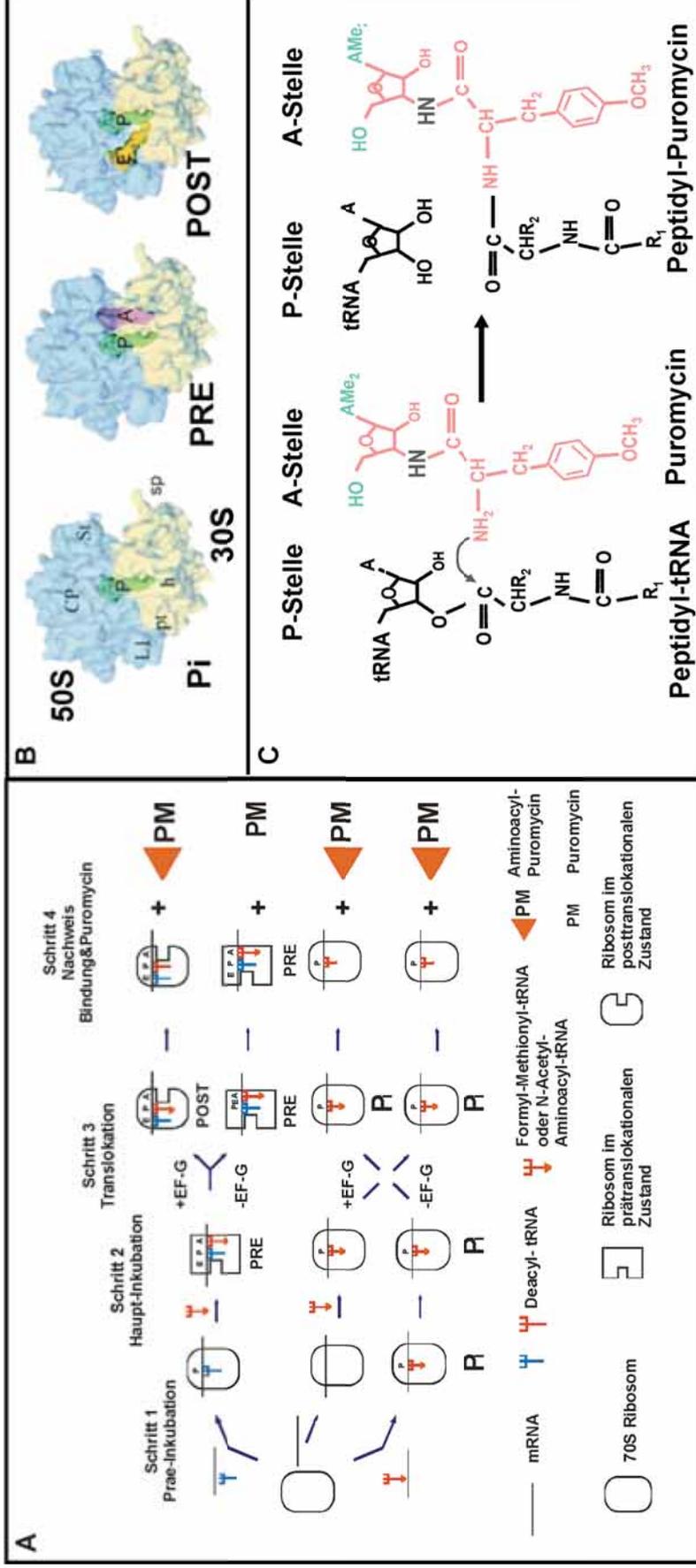


Abbildung 3.6 Watanabe Experiment zur Bildung der drei definierten ribosomalen Zustände

A) Schematische Darstellung des Watanabe Experiments

B) 3D Rekonstruktionen der Ribosomalen Komplexe aus kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Pi= Initiationskomplex mit tRNA in der P-Stelle; PRE= Prätranslokationaler Komplex mit tRNAs in A- und P-Stelle; POST= Posttranslokationaler Komplex mit tRNA in P- und E-Stelle (adaptiert aus (Agrawal et al., 2000). L1 Protein L1; CP (central protuberance) zentrale Ausstülpung; St (stalk) L7/L12 Stiel; pt (platform) Plattform, h (head) Kopf, sp (spur) Sporn; P tRNA in der P-Stelle; A tRNA in der A-Stellen, E tRNA in der E-Stelle

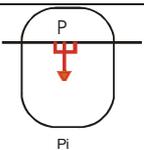
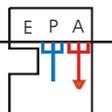
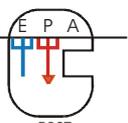
C) Schematische Darstellung der Puromycin Reaktion. Von der Aminogruppe des Puromycin erfolgt der nukleophile Angriff auf das Carbonyl-C-Atom der Esterbindung der Peptidyl-tRNA. Durch Peptidyltransfer entsteht Peptidyl-Puromycin und eine deacylierte tRNA in der P-Stelle.

Um die Puffermodule zu testen, erfolgte die Durchführung unter Verwendung von Poly(U) mRNA, 10 pmol 70S Ribosomen/Aliquot, dem zweifachen Überschuss an deacyl-tRNA^{Phe} und dem 1,5-fachem Überschuss an N-Acetyl-[³H]-Phe-tRNA^{Phe} (AcPhe-tRNA^{Phe}) in den entsprechenden Inkubationsschritten des Watanabe Experiments (siehe 2.7.1).

Die Bildung der drei funktionellen Zustände, P_i-, PRE und POST (siehe Abbildung 3.6 B) wurde zur Testung der Puffermodule untersucht, Tabelle 3.2. Die Ergebnisse des Standard-Systems dienen als Referenz für die Untersuchung isolierter mRNAs. Für das Standardsystem wurden die typischerweise erhaltenen spezifischen Bindungswerte (ν) der tRNA für die P_i-, PRE- und POST-Zustände nachgewiesen, 78% und 79% im Initiationskomplex (P_i) und 57% im PRE Zustand, sowie 60% im POST Zustand. Die stellenspezifische Bindung der tRNAs von 93% in der P-Stelle für den P_i-Zustand und von 94% in der A-Stelle für den PRE Zustand entsprechen den erwarteten Werten (K.H. Nierhaus und V. Marquez, persönliche Mitteilung). Die Bestimmung der stellenspezifischen Bindung der tRNA, der Lokalisation der tRNAs in den Bindestellen des Ribosoms, erfolgte durch die Puromycinreaktion (siehe Abbildung 3.6C).

Tabelle 3.2 Ergebnisse eines Standardexperimentes des Watanabe Assays

Stellenspezifische Bindung von N-Acetyl-[³H]-Phe-tRNA^{Phe} (AcPhe-tRNA^{Phe}) an die mit Poly(U) programmierten 70S Ribosomen.

Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (ν) von AcPhe-tRNA ^{Phe} pmol /pmol 70S Ribosom	Lokalisation der AcPhe-tRNA ^{Phe}	
			P-Stelle	A-Stelle
 Pi-Zustand	-	0,78	93%	7%
	+	0,79		
 PRE-Zustand	-	0,57	6%	94%
 Post-Zustand	+	0,60	-	-

3.2.2 Watanabe Assay zur funktionellen Testung der MF-mRNA

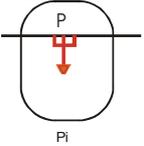
Die Funktionsanalyse der MF-mRNA, die als Standard für eine heteropolymere mRNA eingesetzt wird, kann ebenfalls im Watanabe Experiment erfolgen (siehe 2.7.1). Die MF-mRNA ist eine 48nt lange mRNA die im codierenden Bereich die zwei Codone für Methionin und Phenylalanin trägt. Der Test der beiden codierenden Positionen (M für Methionin und F für Phenylalanin) erfolgt in zwei getrennten Experimenten. Das Startcodon AUG wird auf die stellenspezifische Bindung von Formyl-[¹⁴C]-Methionyl-tRNA^{Met}_f (fMet-tRNA^{Met}_f) geprüft. Das zweite Codon der MF-mRNA kann bezüglich der Bildung der drei funktionellen Zustände im Watanabe Experiment durch Bindung von N-Acetyl-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} (Ac-Phe-tRNA^{Phe}) geprüft werden. Die stellenspezifische Bindung von Ac-Phe-tRNA^{Phe} wird vor und nach der Blockierung der P-Stelle mit deacyl-tRNA^{Met}_f untersucht.

3.2.2.1 Etablierung des P_i-Zustandes mit fMet-tRNA^{Met}_f für MF-mRNA

Die Durchführung erfolgte mit 10 pmol 70S/Aliquot, dem 6-fachem molaren Überschuss an MF-mRNA (bezogen auf 70S) und dem 1,5-fachem molaren Überschuss an Formyl-[¹⁴C]-Methionyl-tRNA^{Met}_f (siehe 2.7.1). Das Ergebnis dieses Experiments ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3 Ergebnisse der P_i-Komplexbildung mit Formyl-[¹⁴C]-Methionyl-tRNA^{Met}_f im Watanabe Assay für MF-mRNA

Stellenspezifische Bindung von Formyl-[¹⁴C]-Methionyl-tRNA^{Met}_f an das erste Codon der mit MF-mRNA programmierten 70S Ribosomen.

Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (v) von Formyl-[¹⁴ C]-Methionyl-tRNA ^{Met} _f  pmol/pmol 70S Ribosom	Lokalisation der Formyl-[¹⁴ C]-Methionyl-tRNA ^{Met} _f 	
			P-Stelle	A-Stelle
 Pi-Zustand	-	0,77	92%	8%
	+	0,68		

Der Vergleich des Ergebnisses für MF-mRNA mit dem Standard-Experiment (Poly(U) mRNA, Tabelle 3.2) zeigte, dass die spezifische Bindung (v) der Formyl-[^{14}C]-Methionyl-tRNA $_{f}^{\text{Met}}$ an die mit MF-mRNA programmierte 70S Ribosomen mit 0,77 pmol/pmol 70S (77%) ohne EF-G Zugabe (ohne Translokation der in der A-Stelle gebundenen tRNA durch EF-G) und mit 0,68 pmol/pmol 70S (68%) nach Zugabe von EF-G (mit Translokation der in der A-Stelle gebundenen tRNA durch EF-G) etwas unter den Bindungswerten im Standardexperiment lag (siehe Tabelle 3.2). Die Prüfung der stellenspezifischen Bindung zeigte, dass die Formyl-[^{14}C]-Methionyl-tRNA $_{f}^{\text{Met}}$ zu 92% in die P-Stelle dirigiert wird (siehe Tabelle 3.3). Dieses Ergebnis spricht für eine starke Codon-Anticodon-Wechselwirkung des in der P-Stelle lokalisierten Startcodons der MF-mRNA mit der Formyl-[^{14}C]-Methionyl-tRNA $_{f}^{\text{Met}}$ und einer guten Qualität der mRNA Präparation.

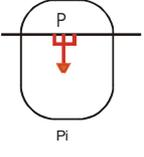
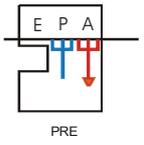
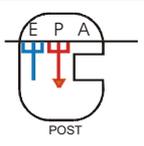
3.2.2.2 Etablierung der drei funktionellen Zustände unter Verwendung von N-Acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA $^{\text{Phe}}$ für MF-mRNA

Zur Prüfung der zweiten Position der MF-mRNA erfolgte die Durchführung des Watanabe Assays mit 5 pmol 70S/Aliquot, 6-fachem molaren Überschuss an MF-mRNA (bezogen auf 70S) und 1,5-fachem molaren Überschuss an AcPhe-tRNA $^{\text{Phe}}$ (siehe 2.7.1). Die spezifische Bindung (v) der AcPhe-tRNA $^{\text{Phe}}$ und die stellenspezifische Bindung der tRNA im P_i , PRE und POST Zustand wurden untersucht (siehe Tabelle 3.4). Die Werte der spezifischen Bindung (v) der N-Acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA $^{\text{Phe}}$ fielen mit 0,55 pmol/pmol 70S ohne Translokation der in der A-Stelle gebundenen tRNA durch EF-G und mit 0,57 pmol/pmol 70S mit Translokation der in der A-Stelle gebundenen tRNA durch EF-G für den P_i -Komplex geringer als im Standardexperiment aus. Für die spezifische Bindung (v) im Experiment zur Etablierung der PRE und POST Zustände wurden höhere Werte erhalten (siehe Tabelle 3.4). Die stellenspezifische Bindung der AcPhe-tRNA $^{\text{Phe}}$ in der P-Stelle zeigte für den P_i -Komplex mit 100% und für die stellenspezifische Bindung in der A-Stelle für den PRE Komplex mit 94%, dass die tRNA durch Codon-Anticodon-Wechselwirkung spezifisch in die ribosomalen Bindungsstellen geleitet wird. Der PRE Zustand zeigte mit 0,70 pmol/pmol 70S der in der A-Stelle gebundenen AcPhe-tRNA $^{\text{Phe}}$ und der POST Zustand mit 0,65 pmol/pmol 70S der AcPhe-tRNA $^{\text{Phe}}$ eine geringfügig verbesserte stellenspezifische Bindung gegenüber dem Standard Experiment mit Poly(U) (Tabelle 3.2). Die Translokation, der in der A-Stelle gebundenen tRNA im PRE Zustand, durch EF-G in die P-Stelle des POST Zustandes, konnte

durch die Puromycin Reaktion nachgewiesen werden. Auch die zweite Position der verwendeten MFmRNA zeigt Codon-spezifische Bindung der tRNA.

Tabelle 3.4 Ergebnisse der Pi, PRE und POST Komplexbildung mit N-Acetyl-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} im Watanabe Assay für MF-mRNA

Stellenspezifische Bindung von N-Acetyl-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} an das zweite Codon der mit MF-mRNA programmierten 70S Ribosomen

Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (v) von AcPhe-tRNA ^{Phe}  pmol/pmol 70S Ribosom	Lokalisation der AcPhe-tRNA ^{Phe} 	
			P-Stelle	A-Stelle
 Pi Pi-Zustand	-	0,55	100%	0%
	+	0,57		
 PRE PRE-Zustand	-	0,70	6%	94%
 POST Post-Zustand	+	0,65	-	-

3.2.4 Analyse von MF-mRNA, MFStop-mRNA und 8Codon-mRNA

Die Synthese von mRNAs durch *in vitro* Transkription von DNA Konstrukten unter der Kontrolle des T7 Promotors ermöglicht die gezielte Herstellung von mRNAs. Hierbei erfolgt der Aufbau der DNA Konstrukte in einer Weise, dass die kodierenden Bereiche der mRNA mit den nicht-kodierenden Bereichen möglichst keine Sekundärstrukturen ausbilden können. Weiterhin ist darauf zu achten, dass nur bestimmte Codone gewählt werden können, da nicht alle 46 tRNA Spezies als isolierte tRNAs erhältlich sind. Zusätzliche besondere Anforderungen, wie ein Stopp Codon für die Analyse der Termination oder ein ausgedehnter 3' nicht translatierter Bereich als Voraussetzung für das toeprint Experiment, lassen sich in die DNA Konstrukte einfügen. Die Qualitätskontrolle der hergestellten mRNA erfolgt im

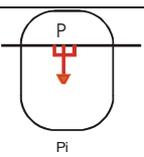
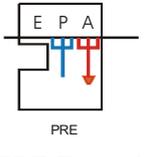
Watanabe Experiment durch vergleichende Analyse mit der heteropolymeren MF-mRNA. Die drei funktionellen Komplexe des Ribosoms (Pi, PRE und POST) können mit den zu untersuchenden mRNAs hergestellt und analysiert werden. Durch Verwendung von zwei radioaktiv markierten tRNAs, N-Acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA^{Phe} (AcPhe-tRNA^{Phe}) und deacyl-[^{32}P]-tRNA^{Met}, können die ersten beiden Codone simultan analysiert werden.

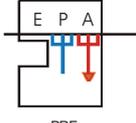
3.2.4.1 Analyse von MF mRNA als Standard heteropolymere mRNA

Die Analyse der stellenspezifischen Bindung, der Translokation und der Peptidyltransferase-Reaktion für MF-mRNA wurden als Referenz für die beiden anderen heteropolymeren mRNAs (MFStop und 8Codon-mRNA) herangezogen. Es wurden spezifische Bindungswerte der radioaktiv-markierten tRNAs erhalten, die nur geringe Abweichungen zum vorigen Experiment zeigen (vgl. 3.4 und 3.5).

Tabelle 3.5 Ergebnisse der Pi, PRE und POST Komplexbildung mit deacyl-[^{32}P]-tRNA^{Met} und N-Acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA^{Phe} im Watanabe Assay für MF-mRNA

Stellenspezifische Bindung von deacyl-[^{32}P]-tRNA^{Met} an das erste Codon und N-Acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA^{Phe} (AcPhe-tRNA^{Phe}) an das zweite Codon der mit MF-mRNA programmierten 70S Ribosomen

Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (ν) von AcPhe-tRNA ^{Phe}  pmol/pmol 70S Ribosom	Lokalisation der AcPhe-tRNA ^{Phe} 	
			P-Stelle	A-Stelle
 Pi Pi-Zustand	-	0,64	100%	0%
	+	0,64		
 PRE PRE-Zustand	-	0,57	6%	94%
 POST Post-Zustand	+	0,61	-	-

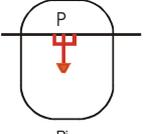
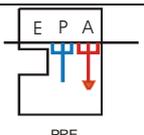
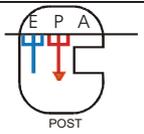
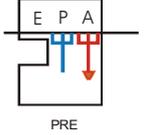
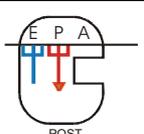
Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (v) von deacyl-[³² P]-tRNA ^{Met}  pmol/pmol 70S Ribosom	Lokalisation der deacyl-[³² P]-tRNA ^{Met} 	
			P-Stelle	A-Stelle
 PRE-Zustand	-	0,67	-	-
 Post-Zustand	+	0,54	-	-

3.2.4.2 Analyse von MFStop-mRNA

Die MFStop-mRNA wurde als einfache mRNA für die Analyse von Terminationsprozessen entworfen. Dem codierenden Bereich folgt das Stoppcodon UAA, das die Analyse beider Klasse I Terminationsfaktoren erlaubt. Außerdem trägt die mRNA einen ausgedehnten 3' Bereich zur toeprint Analyse. Analytische Präparationen der MFStop mRNA konnten für erste Pilotexperimente der Termination eingesetzt werden, aber die Synthese im präparativen Maßstab zeigte deutliche Abweichungen im Watanabe Experiment. Im Vergleich der Bindungswerte der MFStop-mRNA mit der MF-mRNA zeigte sich deutlich, dass eine Verwendung der MFStop-mRNA der präparativen Transkription für weitere Experimente nicht möglich ist. Obwohl die Bindung der Ac[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} im P_i Komplex mit 50% annähernd die Werte der Bindung im Vergleichsexperiment mit MF-mRNA erreicht, zeigt sich für den PRE und POST Zustand, wenn die P-Stelle mit deacyl-[³²P]-tRNA^{Met} blockiert ist, dass die Bindung der Ac[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} auf 12% im PRE Zustand bzw. 11% im POST Zustand abfällt. Die Bindung der deacyl-[³²P]-tRNA^{Met} zeigt für PRE und POST mit 71% bzw. 67%, dass die P-Stelle effizient mit deacyl-[³²P]-tRNA^{Met} blockiert ist. Eine simultane Bindung beider tRNAs ist nicht möglich. Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich bei Verwendung einer mRNA, die im zweiten Codon (AAA) für Lysin codiert (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.6 Ergebnisse der Pi, PRE und POST Komplexbildung mit deacyl-[³²P]-tRNA^{Met} und N-Acetyl-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} im Watanabe Assay für MFStop-mRNA

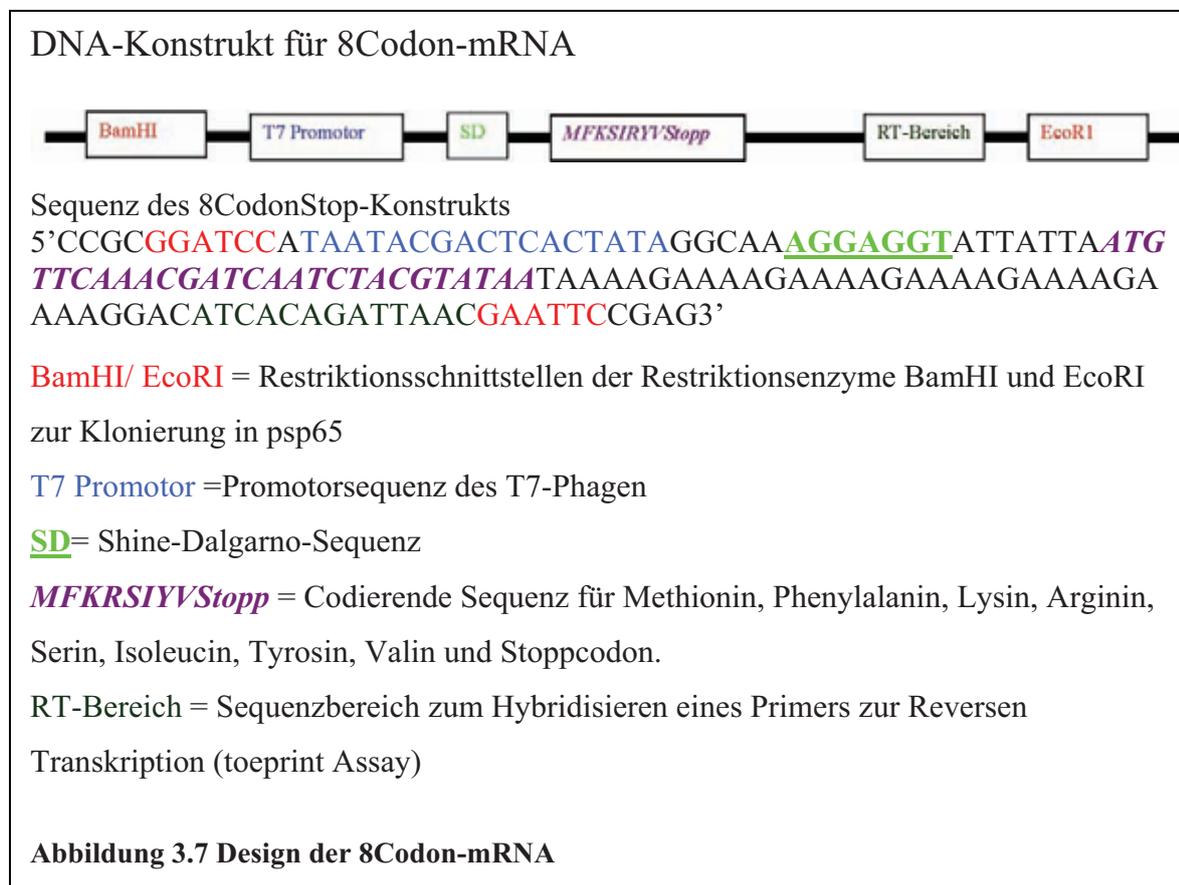
Stellenspezifische Bindung von deacyl-[³²P]-tRNA^{Met} an das erste Codon und N-Acetyl-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} (Ac[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}) an das zweite Codon der mit MFStop-mRNA programmierten 70S Ribosomen

Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (v) von Ac[¹⁴ C]Phe-tRNA ^{Phe}  pmol/pmol 70S Ribosom	Lokalisation der Ac[¹⁴ C]Phe-tRNA ^{Phe} 	
			P-Stelle	A-Stelle
 Pi Pi-Zustand	-	0,50	100%	0%
	+	0,49		
 PRE PRE-Zustand	-	0,12	36%	64%
 POST Post-Zustand	+	0,11	-	-
Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (v) von deacyl-[³² P]-tRNA ^{Met}  pmol/pmol 70S Ribosom	Lokalisation der deacyl-[³² P]-tRNA ^{Met} 	
			P-Stelle	A-Stelle
 PRE PRE-Zustand	-	0,71	-	-
 POST Post-Zustand	+	0,67	-	-

Die Analyse des DNA Konstrukts, das zur Herstellung der MFStop-mRNA eingesetzt wurde, erfolgte durch Sequenzanalyse und zeigte eine korrekte Codonabfolge im DNA Konstrukt. Der Fehler in der Codonabfolge der MFStop-mRNA muss daher in der *in vitro* Transkription erfolgt sein.

3.2.4.3 Analyse der 8Codon-mRNA

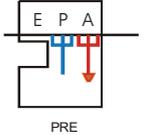
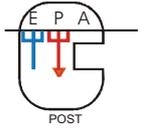
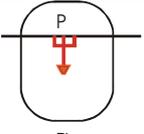
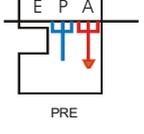
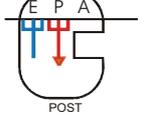
Eine weitere mRNA, die zur Analyse der Termination und zum Einsatz in toeprint Experimenten entworfen wurde, ist die 8Codon-mRNA. Die 8Codon mRNA zeichnet sich durch einen codierenden Bereich von 8 Codonen (MFKRSIYV) aus, sie trägt im 5' UTR eine Shine-Dalgarno Sequenz und einen ausgeprägten 3' Bereich für die toeprint Analyse, siehe Abbildung 3.7. Weiterhin ist diese mRNA arm an Sekundärstrukturen.



Die Analyse der *in vitro* transkribierten 8Codon-mRNA im Watanabe Experiment ist in Tabelle 3.7 dargestellt, auch hier wurden die ersten beiden Codone bezüglich der Bindung von tRNAs, N-Acetyl-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} (AcPhe-tRNA^{Phe}) und deacyl-[³²P]-tRNA^{Met} untersucht.

Tabelle 3.7 Ergebnisse der Pi, PRE und POST Komplexbildung mit deacyl-[³²P]-tRNA^{Met} und N-Acetyl-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} im Watanabe Assay für 8Codon-mRNA

Stellenspezifische Bindung von deacyl-[³²P]-tRNA^{Met} an das erste Codon (A) und N-Acetyl-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} (Ac[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}) an das zweite Codon (B) der mit 8Codon-mRNA programmierten 70S Ribosomen.

Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (v) von deacyl-[³² P]-tRNA ^{Met}  pmol/pmol 70S Ribosom	Lokalisation der deacyl-[³² P]-tRNA ^{Met} 	
			P-Stelle	A-Stelle
 PRE-Zustand	-	0,50	-	-
 Post-Zustand	+	0,52	-	-
Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (v) von Ac[¹⁴ C]Phe-tRNA ^{Phe}  pmol/pmol 70S Ribosom	Lokalisation der Ac[¹⁴ C]Phe-tRNA ^{Phe} 	
			P-Stelle	A-Stelle
 P _i -Zustand	-	0,48	92%	8%
	+	0,45		
 PRE-Zustand	-	0,35	8%	92%
 Post-Zustand	+	0,40	-	-

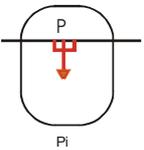
Obwohl die Bindung von deacyl-[^{32}P]-tRNA $_{f}^{\text{Met}}$ an das erste Codon und von N-Acetyl-[^{14}C]Phe-tRNA $^{\text{Phe}}$ an das zweite Codon der mit 8Codon-mRNA programmierten Ribosomen geringer ausfällt als in dem Vergleichsexperiment mit MF-mRNA, zeigte die stellenspezifische Bindung der tRNAs, dass die tRNAs spezifisch in die P-Stelle bzw. in die A-Stelle dirigiert werden. Dies spricht für hervorragende Qualität der mRNA Präparation. Die Bindungswerte (v) von 35% bzw. 40% im PRE bzw. POST Zustand erfordern eine Optimierung des Watanabe Experiments um homogenere Komplexe zu bilden.

Die Bindung von $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_{f}^{\text{Met}}$ an das erste Codon der mit 8Codon-mRNA programmierten 70S Ribosomen fällt mit 0,59 bzw. 0,52 nach Zugabe von EF-G bereits etwas höher als die Bindungswerte der $\text{Ac}[{}^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ aus, siehe Tabelle 3.8.

Die Verwendung der 8Codon mRNA wurde gegenüber der MFStop-mRNA bevorzugt. Eine erneute Präparation der MFStop-mRNA ist in Vorbereitung, da eine fehlerhafte *in vitro* Transkription bei der verwendeten Präparation erfolgte.

Tabelle 3.8 Ergebnisse der Pi Komplexbildung mit $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_{f}^{\text{Met}}$ im Watanabe Assay für 8Codon-mRNA

Stellenspezifische Bindung von $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_{f}^{\text{Met}}$ an das erste Codon der mit 8Codon-mRNA programmierten 70S Ribosomen.

Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (v) von $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_{f}^{\text{Met}}$	Lokalisation der $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_{f}^{\text{Met}}$	
			P-Stelle	A-Stelle
 Pi-Zustand	-	0,59	--	--
	+	0,52		

3.2.5 Optimierung des nicht-enzymatischen Watanabe Experiments

Die Optimierung des Watanabe Experiments zur Bildung von definierten ribosomalen Komplexen erfolgte für die heteropolymere MF-mRNA (D10-7). Die MF-mRNA zeigte bereits mit ca. 60% Besetzung der tRNA Positionen gute Bindungseigenschaft. Die Spezifität der Bindung lag bei über 90%, vgl. Tabelle 3.5.

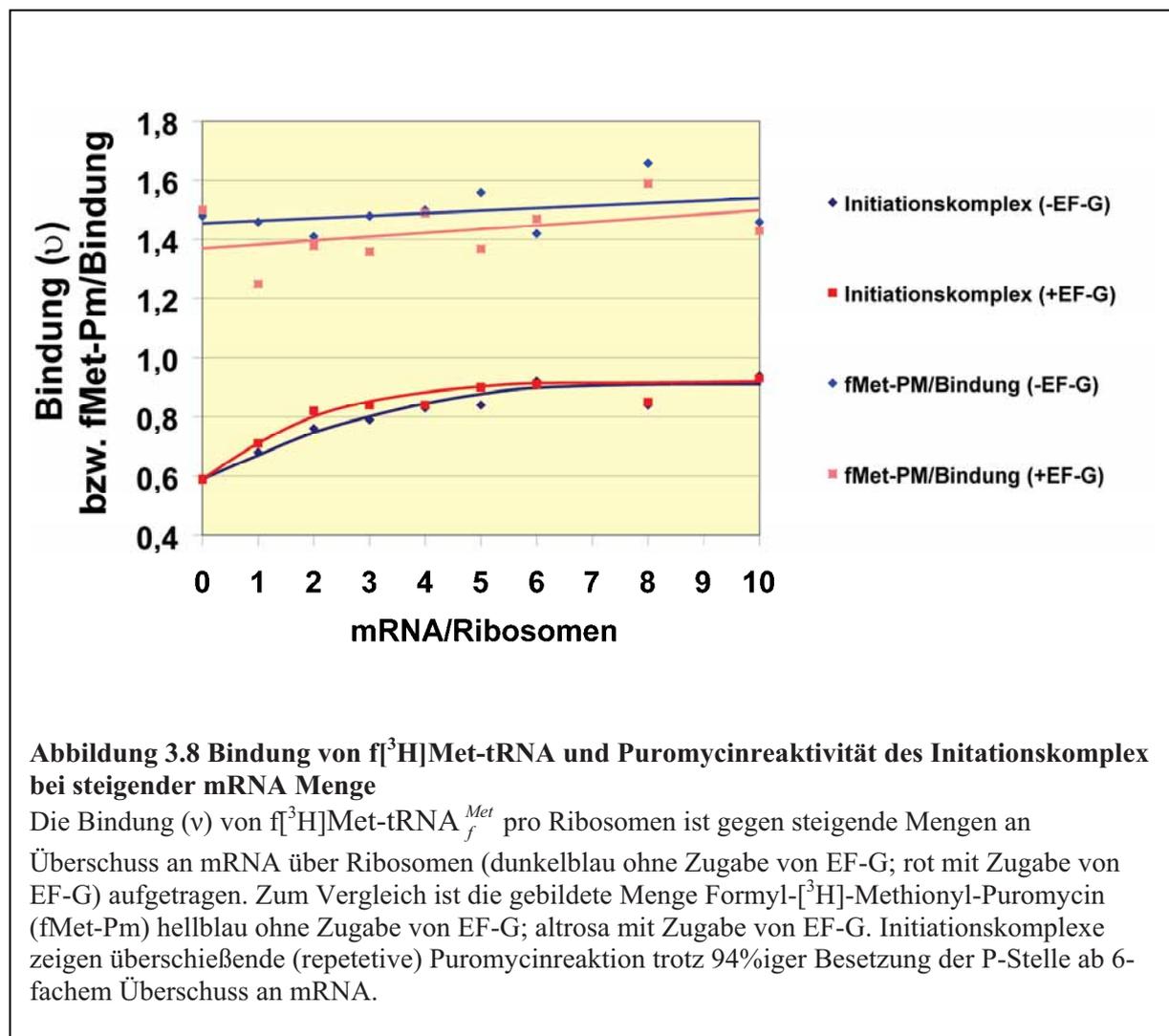
3.2.5.1 Optimierung der eingesetzten mRNA Menge (Bindung und Puromycin Reaktion)

Die erste Optimierung der Herstellung der ribosomalen Komplexe erfolgte bezüglich der mRNA Menge die zur Programmierung der Ribosomen im ersten Schritt des Watanabe Experiments eingesetzt wurde.

Steigende MF-mRNA Mengen wurden mit re-assoziierten 70S Ribosomen und dem zweieinhalb-fachem Überschuss an $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ über Ribosomen inkubiert. Die Inkubationszeit im Programmierungsschritt (Prä-Inkubation) betrug 15 Minuten, anschließend erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten (Haupt-Inkubation) in der weitere tRNAs zugegeben werden können. Im Translokationsschritt erfolgte die Zugabe von katalytischen Mengen EF-G zu einem Teil der ribosomalen Komplexe. Die Translokationsreaktion wurde für 10 Minuten inkubiert. Nach der Translokationsreaktion wurden die Komplexe aufgeteilt und es erfolgte der Nachweis der Bindung der $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ in Nitrozellulosefilter-Test. Die Auswertung der Bindung von $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ im Nitrocellulose-Filter-Bindungstest ist in der Abbildung 3.8 dargestellt. Bei Verwendung von $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ im 2,5-fachem Überschuss lässt sich eine Besetzung von 94% bei zehnfachem Überschuss an mRNA erreichen.

Die Peptidyltransferreaktion ist die zentrale enzymatische Aktivität der großen Untereinheit des Ribosoms. Eine Peptidyltransferreaktion von der Peptidyl-tRNA auf die Aminoacyl-tRNA kann nur erfolgen, wenn beide tRNAs spezifisch in ihren Bindestellen platziert sind. Das Antibiotikum Puromycin (PM) ist ein Analog des Akzeptorarmbereichs einer Aminoacyl-tRNA und kann in die ribosomale A-Stelle binden und an der Peptidyltransferreaktion teilnehmen (Abbildung 3.6C). Diese Antibiotikaeigenschaft kann zum spezifischen Nachweis der stellenspezifischen Bindung von Peptidyl-tRNAs in der P-Stelle herangezogen werden. Bei nicht-programmierten Ribosomen kommt es zu einer deutlichen Überreaktion von Puromycin mit $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ zu $f[{}^3\text{H}]\text{Met-Pm}$. 5,3 pmol $f[{}^3\text{H}]\text{Met-Pm}$ werden detektiert, obwohl im Bindungsexperiment nur 3,6 pmol $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ pro 6 pmol Ribosom gebunden haben. Diese Überreaktion wird als repetitive Puromycinreaktion bezeichnet. In der repetitiven Puromycinreaktion reagiert die an das Ribosom gebundene $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ mit Puromycin zu $f[{}^3\text{H}]\text{Met-Pm}$ und deacyl-tRNA $_f^{\text{Met}}$. Die deacyl-tRNA $_f^{\text{Met}}$ diffundiert vom Ribosomen und bietet Platz zur Bindung einer weiteren $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$, die wiederum mit

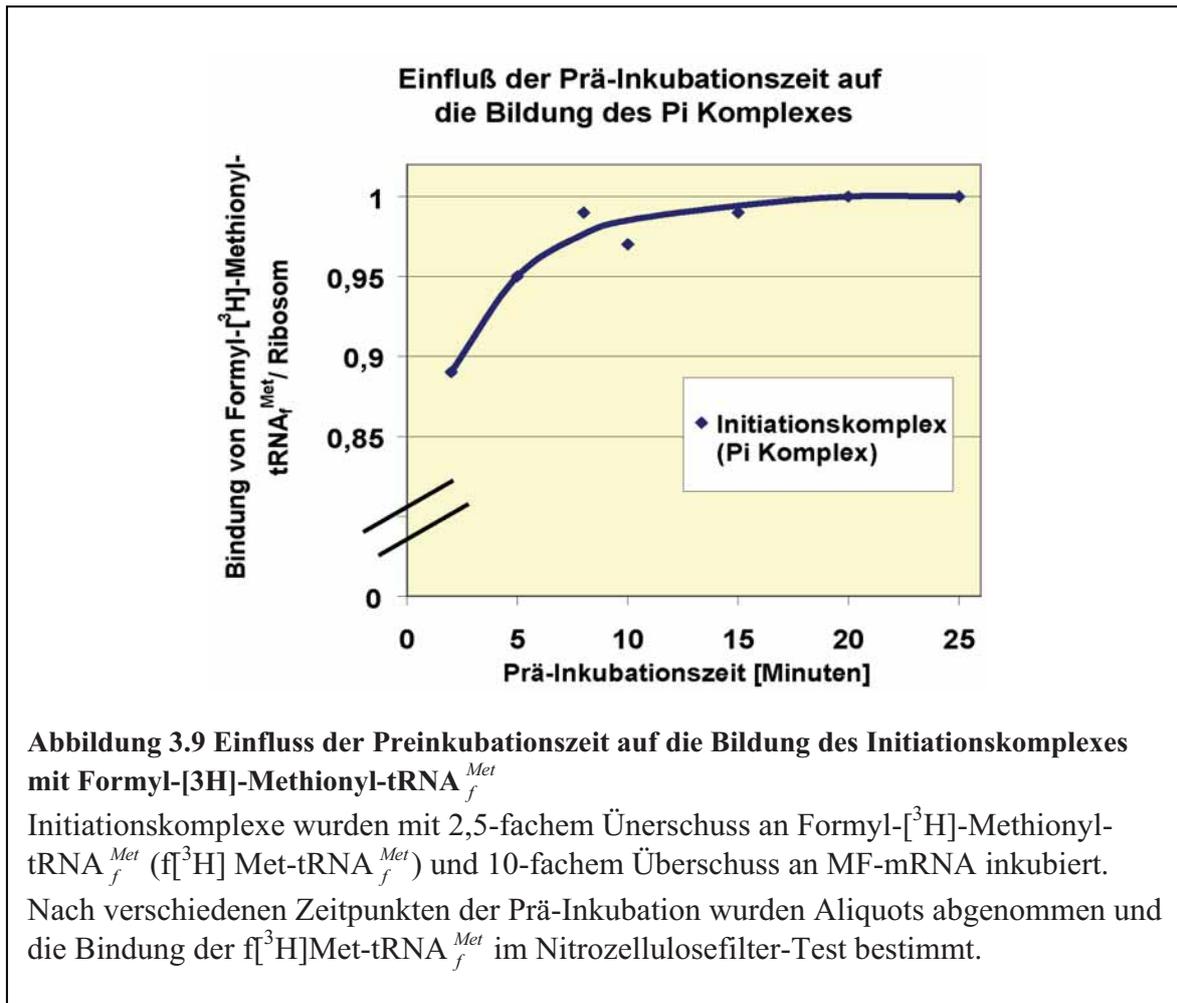
einem weiteren Molekül Puromycin reagieren kann. Die repetitive Puromycinreaktion konnte durch Erhöhung der mRNA Menge nicht unterbunden werden, obwohl Bindungswerte bis zu 94% ($5,6 \text{ pmol f}[^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}} / 6 \text{ pmol Ribosom}$) bei zehnfachem Überschuss an mRNA erreicht werden. Hier besteht die Möglichkeit, dass ein größerer Anteil an nicht-programmierte Ribosomen vorliegt, als aus dem Bindungsexperiment erwartet wurde oder wahrscheinlicher, dass der geringe Anteil der nicht-programmierten Ribosomen über die lange Inkubationszeit von 15 Minuten erheblich zu der umgesetzten Menge an $\text{f}[^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ beiträgt.



3.2.5.2 Einfluss der Prä-Inkubationszeit zur Bildung des Initiationskomplexes

Die Analyse des Einfluss der Prä-Inkubationszeit (1 Schritt des Watanabe Experiments) zur Bindung von mRNA und Initiator-tRNA $\text{f}[^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ zur Bildung des Initiationskomplexes ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

Bei Verwendung von 10-fachem Überschuss an mRNA und 2,5-fachem Überschuss an $f[{}^3\text{H}]$ Met-tRNA $_{f}^{\text{Met}}$ über 70S erfolgt die Bildung des Initiationskomplexes bereits nach zwei Minuten zu 90%, nach 8 Minuten bis 10 Minuten kann die maximale (100%ige) Besetzung der Ribosomen mit $f[{}^3\text{H}]$ Met-tRNA $_{f}^{\text{Met}}$ (1 pmol $f[{}^3\text{H}]$ Met-tRNA $_{f}^{\text{Met}}$ 1 pmol 70S Ribosom) erreicht werden. Die 100%ige Bindung von $f[{}^3\text{H}]$ Met-tRNA $_{f}^{\text{Met}}$ bleibt auch bei 25 Minuten Inkubationszeit bestehen. Dies spricht für ein stabiles RNase freies System.

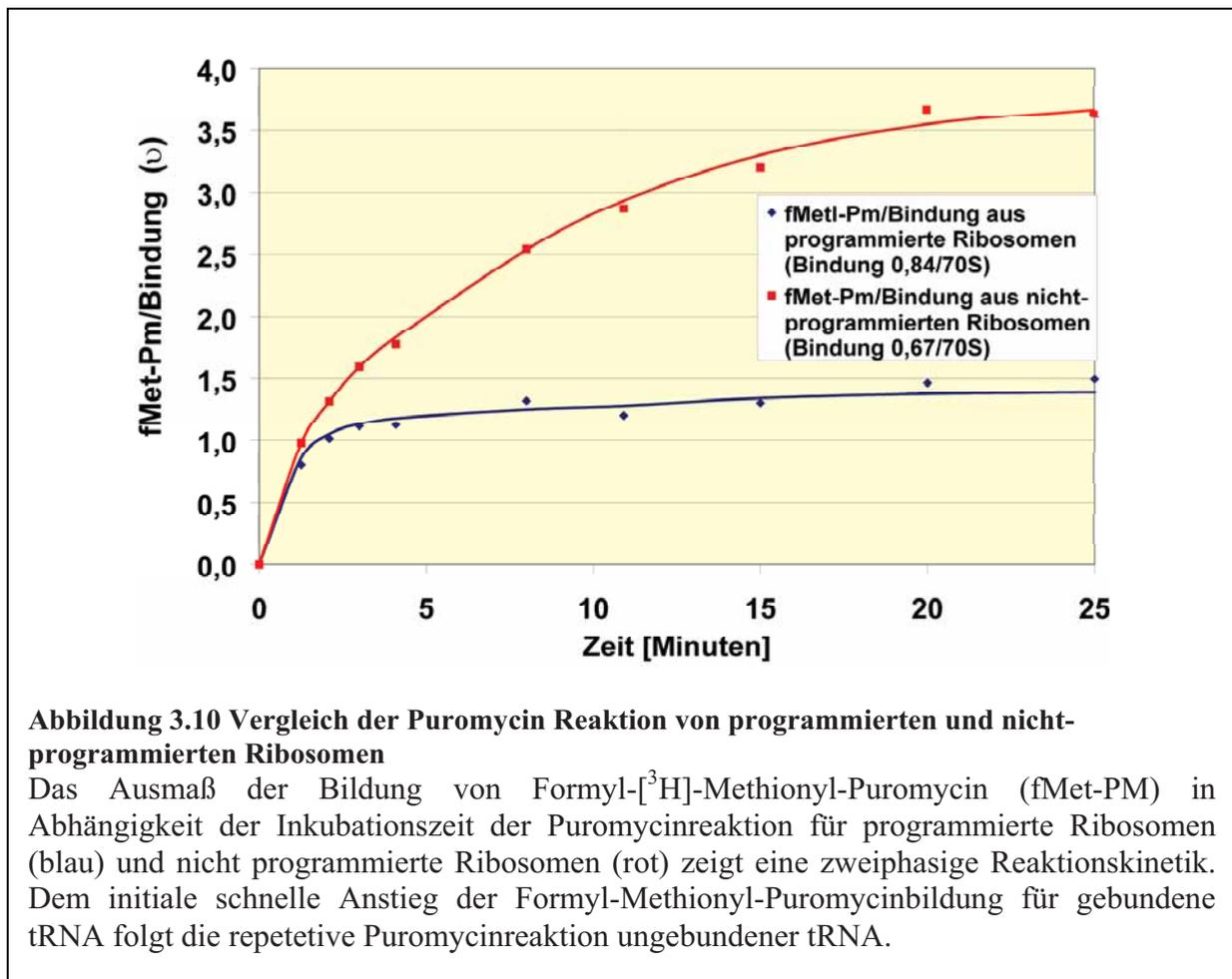


3.2.5.3 Puromycin-Kinetik: Vergleich programmierte und nicht-programmierte Ribosomen

Die repetitive Puromycinreaktion der Initiationskomplexe bildet mehr $f[{}^3\text{H}]$ -Met-Pm als $f[{}^3\text{H}]$ Met-tRNA $_{f}^{\text{Met}}$ im Bindungstest nachgewiesen werden konnte. Da die Bestimmung der Lokalisation der tRNA durch Puromycinreaktion erfolgt, sollte ein verlässlicher Zeitpunkt der Inkubationszeit zur Bestimmung der Puromycinreaktivität gewählt werden. Der Vergleich von programmierten Ribosomen mit nicht-programmierten Ribosomen soll Aufschluss über den Anteil der repetitiven Puromycinreaktion in programmierten Ribosomen geben. Die

Puromycinreaktivität der ribosomalen Initiationskomplexe mit $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ in der ribosomalen P-Stelle im Vergleich mit nicht programmierten Komplexen ist in der Abbildung 3.10 dargestellt.

Mit längerer Inkubationszeit steigt die Bildung von $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ für nicht-programmierte Ribosomen an, nach 20 Minuten ist der maximale Umsatz an $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}$

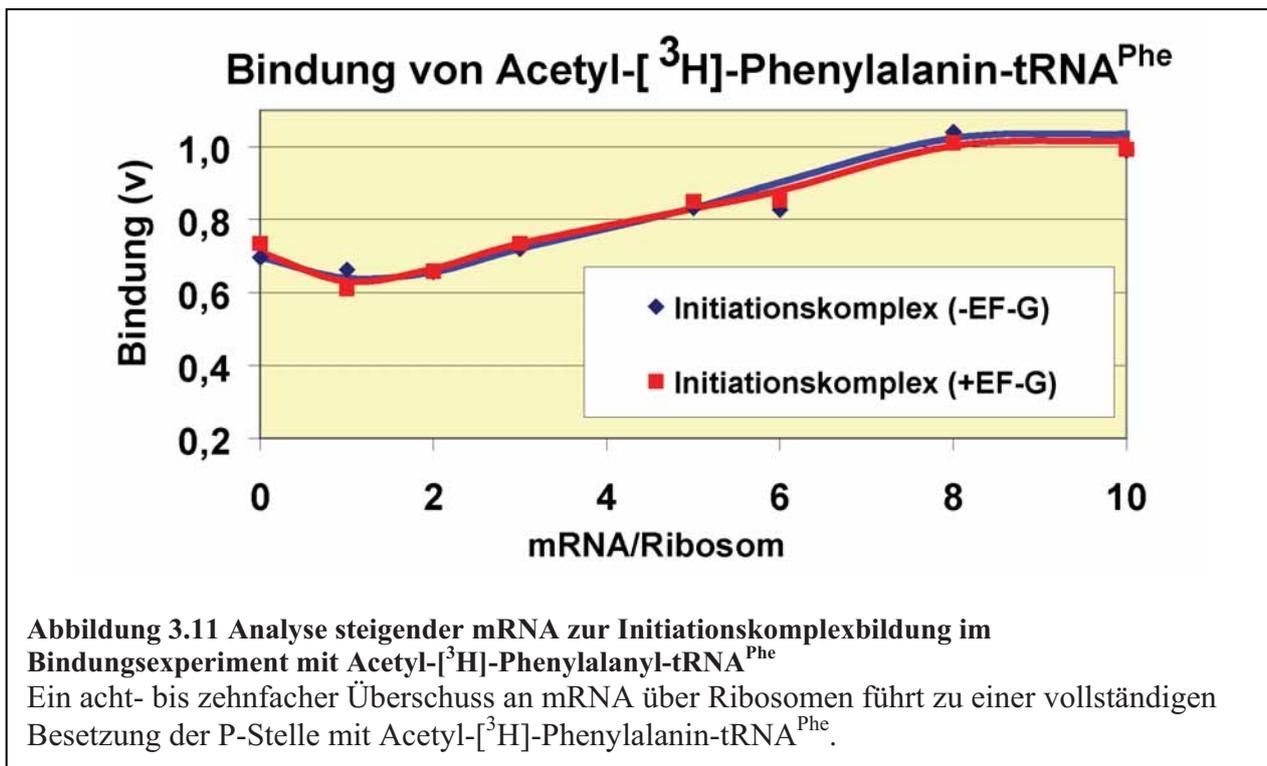


erreicht wird. Alle vorhandene $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ wurden nach 20 Minuten durch nicht-programmierte Ribosomen zu $f[{}^3\text{H}]\text{Met-Pm}$ umgesetzt. Für programmierte Ribosomen steigt der Umsatz anfänglich ebenfalls steil an. Die steile Anstiegsphase der Puromycinreaktion kann der Reaktion von gebundener Peptidyl-tRNA zugerechnet werden. Der folgende, langsame Anstieg repräsentiert den langsamen Austausch der deacyl-tRNA in den programmierten Ribosomen innerhalb der repetitiven Puromycinreaktion. Bei nicht programmierten Ribosomen, die die tRNA nicht durch Codon-Anticodon-Wechselwirkung binden, erfolgt der Austausch und Umsatz der Peptidyl-tRNA deutlich schneller als in programmierten Ribosomen. Nach zwei Minuten geht Umsetzung der von $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ bei programmierten Ribosomen in den Sättigungsbereich der Reaktion über. Nach fünf

Minuten werden 5 pmol $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ umgesetzt, dies entspricht der Menge an Ribosomen, die im Experiment eingesetzt wurden. Bei einer Besetzung von 84% bei programmierten Ribosomen ist nach 5 Minuten ein Verhältnis zwischen repetitiver Puromycinreaktion und der Reaktion von $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ aus programmierten Ribosomen erreicht, die eine repräsentative Beurteilung der Besetzung der P- Stelle erlaubt.

3.2.5.4 Test des zweiten Codons der MF-mRNA mit $\text{Ac}[{}^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$

Steigende MF mRNA Mengen wurden mit re-assoziierten 70S Ribosomen, 2,5-fachem Überschuss an Acetyl- $[{}^3\text{H}]\text{-Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ über Ribosomen inkubiert. Die Inkubationszeit im Programmierungsschritt (Prä-Inkubation) betrug 15 Minuten, anschließend erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten (Main-Inkubation). Im Translokationsschritt erfolgte die Zugabe von katalytischen Mengen EF-G zu einem Teil der ribosomalen Komplexe. Anschließend wurde die Bindung der $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ in Nitrozellulose-Filter-Test getestet. Die Auswertung der Bindung von $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ an mit MF-mRNA programmierte Initiationskomplexe wurde im Nitrocellulose-Filter-Bindungstest ermittelt und ist in Abbildung 3.11 dargestellt.



Bereits der achtfache Überschuss an mRNA pro Ribosomen zeigte eine maximale Bindung (100%) von 1 pmol $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ /1 pmol Ribosom bei konstanten 2,5-fachem Überschuss an tRNA pro Ribosomen. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den Komplexen,

die mit oder ohne EF-G inkubiert wurden. Auch bei Initiationskomplexen mit AcPhe-tRNA^{Phe} zeigt sich repetetive Puromycinreaktion.

Initiationskomplexe lassen sich mit fMet-tRNA^{Met}_f und dem Peptidyl-Analog AcPhe-tRNA^{Phe} herstellen, die Bindungswerte der tRNAs in die ribosomale P Stele und die Puromycinreaktivität sind vergleichbar gut.

3.2.5.5 Zusammenfassung der Optimierung des nicht-enzymatischen Watanabe Experiments

Die Optimierung des Watanabe Experiments erlaubt die Herstellung definierter ribosomale Komplexe zur Analyse der Initiation und des ribosomalen Elongationszyklus. Das Bindungsexperiment zeigte, dass die Herstellung von Initiationskomplexe mit bis zu hundertprozentiger Besetzung der P-Stelle erfolgen kann. Dafür sollte der Überschuss an mRNA mindestens achtfach über Ribosomen erfolgen. Die Prä-Inkubation wurde auf minimal 10 Minuten festgelegt. Die Haupt-Inkubation bleibt bei 30 Minuten. Die Zeit der Translokationsreaktion wurde im Standard Experiment auf 30 Minuten festgesetzt. Die Zeit der Puromycinreaktion zur repräsentativen Bestimmung der der Besetzung der P-Stelle wurde auf 5 Minuten reduziert. Sowohl fMet-tRNA^{Met}_f als auch AcPhe-tRNA^{Phe} sollten im 2,5 fachen Überschuss über Ribosomen zur Formation vom Initiationskomplexen eingesetzt werden.

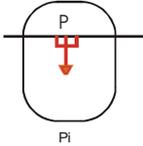
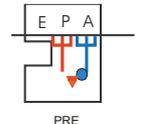
3.2.6 Optimierung des enzymatischen Watanabe Experiments

Im non-enzymatischen Watanabe Experiment erfolgte die Bindung der A-Stellen tRNA ohne die Hilfe des Elongationsfaktor Tu (EF-Tu). Der EF-Tu ist ein G Protein, dass in der GTP Form mit der Aminoacyl-tRNA (Aa-tRNA) einen ternären Komplex bildet (EF-Tu*GTP*Aa-tRNA). Der ternäre Komplex bindet in die ribosomale A-Stelle, nach erfolgter Dekodierung und Dissoziation von EF-Tu*GDP akkomomodiert die Aa-tRNA in die A-Stelle. Im enzymatischen Watanabe Experiment erfolgt der Einsatz der Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-Ts. EF-Ts ist der Nukleotidaustauschfaktor der die Umwandlung von EF-Tu*GDP zu EF-Tu*GTP beschleunigt. Der Einsatz von 1,5-fachem Überschuss an EF-Tu über Aa-tRNA und katalytischen Mengen (0,6-fach EF-Ts/ EF-Tu) an EF-Ts sollte die effiziente Bildung des ternären Komplexes gewährleisten.

3.2.6.1 Enzymatische Bindung des ternären Komplex und Translokation

Die Durchführung des enzymatischen Watanabe Experiments erfolgte mit 5 pmol 70S/Aliquot, dem 8-fachem molaren Überschuss an MF-mRNA (bezogen auf 70S) und dem 2,5-fachem molaren Überschuss an $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$ (siehe Kapitel 2.7.2). Im zweiten Inkubationsschritt (Haupt-Inkubation) erfolgte zur Bildung von PRE und POST Komplexen die Zugabe von 2,5-fachem Überschuss an tRNA (bzw. ternärem Komplex ($[{}^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}*\text{EF-Tu}*\text{GTP}$) zur Bindung an das zweite Codon der mRNA. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9 Enzymatische Bindung von $[{}^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}*\text{EF-Tu}*\text{GTP}$ an MF-mRNA programmierte Initiationskomplexe mit $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$

Erwarteter Bindungszustand	Verwendung von EF-G zur Translokation der tRNAs	Bindung (v) von $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$  bzw. $[{}^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$  pmol/pmole 70S Ribosom	Lokalisation der $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$  bzw. $[{}^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ 	
			P-Stelle	A-Stelle
 Pi Pi-Zustand	-	 0,99	100%	0%
	+	 0,99		
 PRE PRE-Zustand	-	 0,62  0,74	78%	22%
	+	 0,67  0,70	-	-

Es wurden für den Initiationskomplex eine vollständige und spezifische Besetzung der P-Stelle mit $f[{}^3\text{H}]\text{Met-tRNA}$ erhalten. Bei der enzymatischen Besetzung der A-Stelle durch den

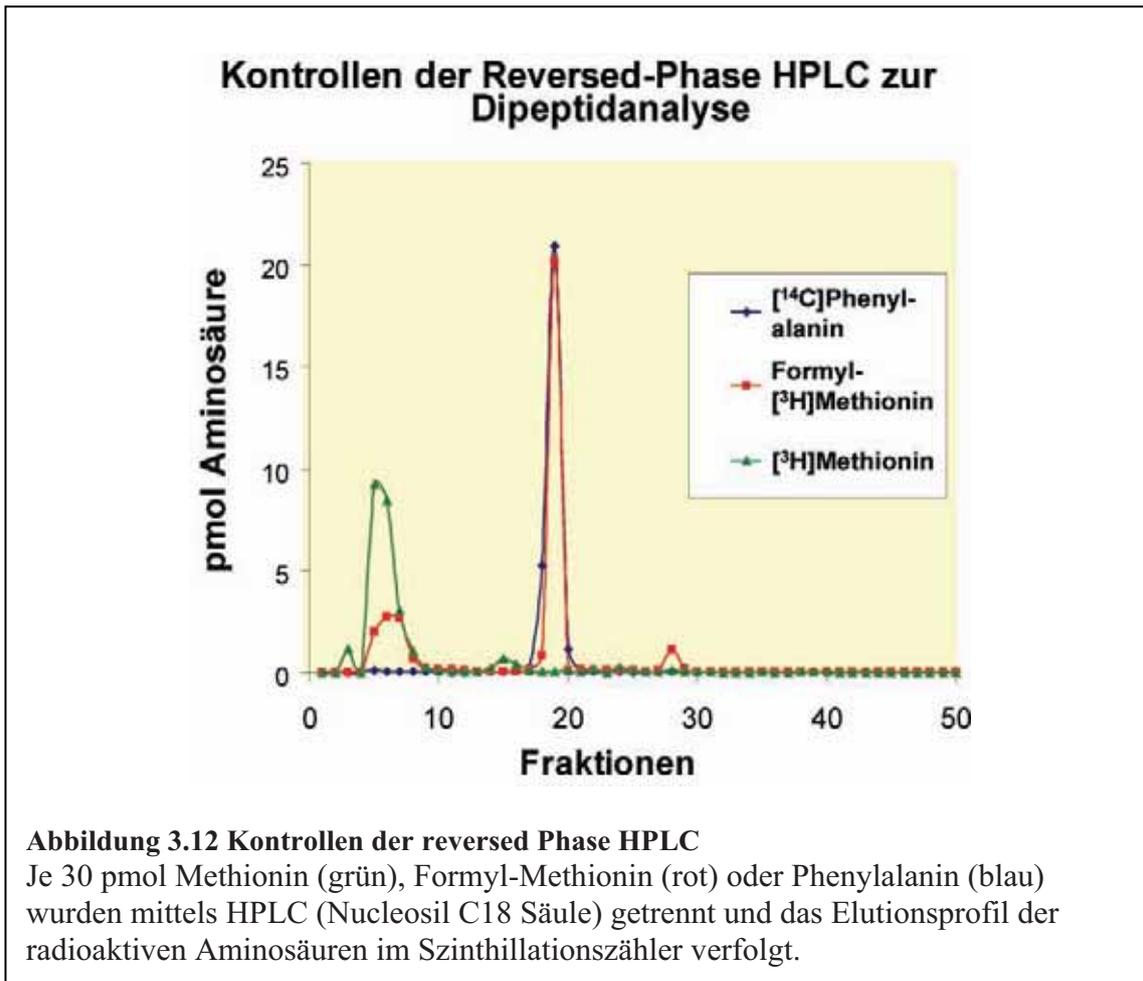
ternären Komplex aus Phe-tRNA^{Phe}*EF-Tu*GTP fällt der Bindungswert der P-Stellen tRNA auf 62 % ab und bleibt auch nach der Translokation durch EF-G zum posttranslokationalen Zustand (POST) auf dem selben Niveau (67%). Die Bindung der Phe-tRNA^{Phe} liegt mit 74 % im prätranslokationalen Zustand (PRE) und bei 70% im POST Zustand. Die Spezifität der Bindung der tRNAs sinkt von 100% im Initiationskomplex (P_i) auf 78% für die P-Stellen tRNA (f[³H]Met-tRNA_f^{Met}) bzw. 77% für die A-Stellen tRNA ([¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}) im PRE Komplex. Die Reaktivität des Puromycin gegenüber dem Dipeptid der Peptidyl-tRNA im POST Komplex lag nur bei 40%-50% des Bindungswertes der Phe-tRNA^{Phe}, dies spricht für eine unvollständige Translokationsreaktion und/oder eine mangelnde Akkomodation des ternären Komplex in die ribosomale A-Stelle. Die Aktivität des verwendeten Elongationsfaktors G (EF-G) konnte im Standard Watanabe mit Poly(U) (vgl. 3.2.1) mit 90% Translokation innerhalb von 10 Minuten nachgewiesen werden. Somit kann eine mangelnde Translokation durch zu geringe Aktivität des EF-G ausgeschlossen werden.

3.2.6.2 Analyse des Dipeptid im enzymatischen Watanabe Experiment

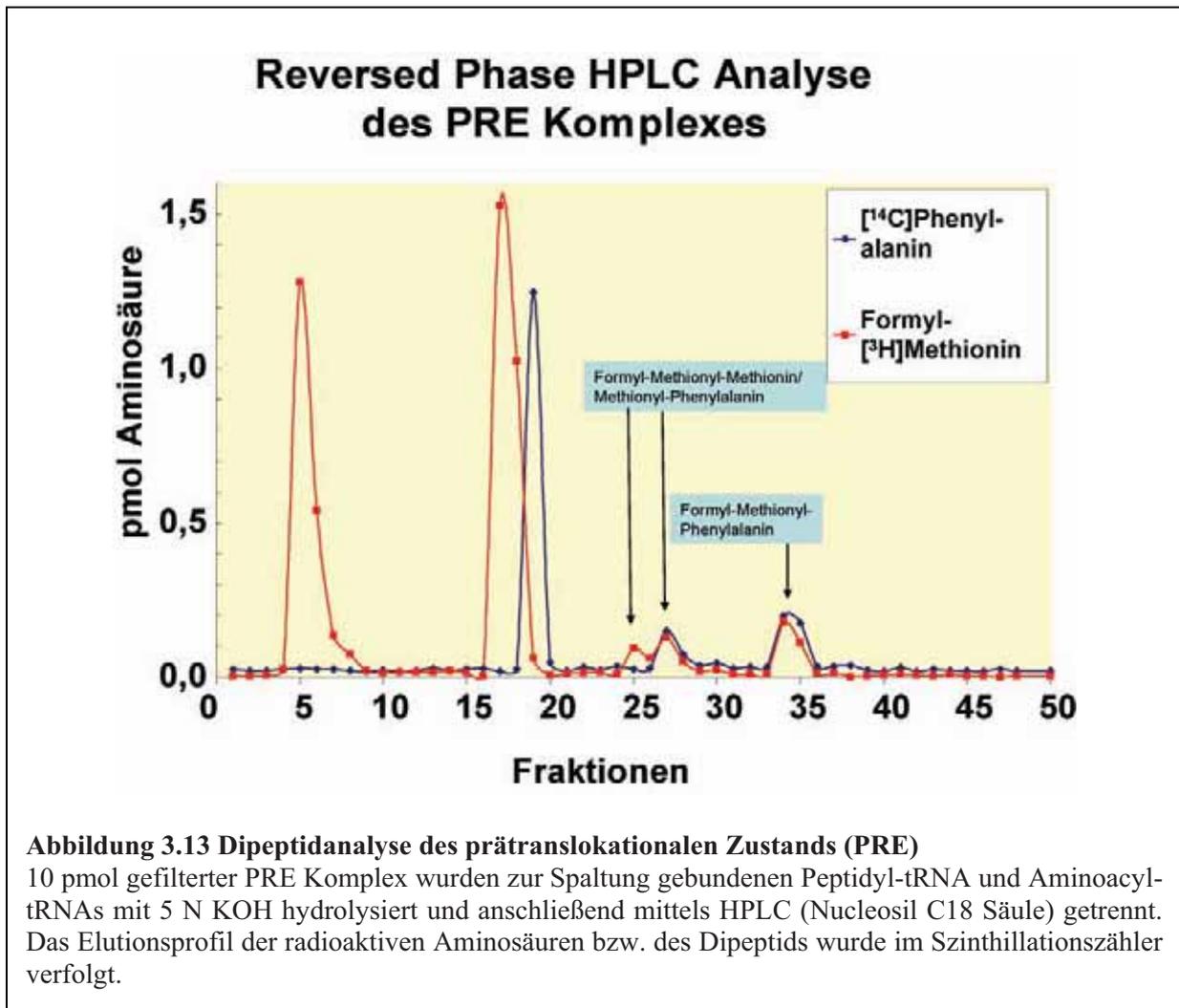
Die Analyse der Bildung des Dipeptides kann neben der Puromycinreaktion des POST Komplex auch durch Trennung des Dipeptides von den freien Aminosäuren durch reversed Phase HPLC erfolgen. Hierbei kann auf eine Translokationsreaktion verzichtet werden. Die Dipeptid-Analyse kann mit PRE Komplexen erfolgen, da nach der Bindung und Akkomodation des ternären Komplex die schnelle Peptidylübertragungsreaktion erfolgt. Für die Analyse des Dipeptids wurden die Elutionsfraktionen der radioaktiv markierten Aminosäuren bestimmt. Die Kontrollen der HPLC-Analyse zeigen, dass Phenylalanin und Formyl-Methionin in Fraktion 20 eluieren, sie können aber anhand der unterschiedlichen Radioaktivität unterschieden werden (Abbildung 3.12). Formyl-Methionin (rot) enthält einen nicht unerheblichen Anteil (ca. 30%) Methionin (grün). Das Auftreten des Methionins ist eine mögliche Folge der harschen Hydrolyse-Bedingungen zur Präparation von Formyl-Methionin aus der Formyl-Methionyl-tRNA_f^{Met}, vergleiche Kapitel 2.4.5.

In Fraktion 28 des Kontrollexperimentes ist ein weiteres Signal, das einem Dipeptid aus Formyl-Methionyl-Methionin zugeordnet werden könnte. Dieser unerwartete Peak zeigt nur einen sehr geringen Anteil und ist möglicherweise auch ein Nebenprodukt der basenkatalysierten Hydrolyse Reaktion der Probenvorbereitung.

Die HPLC-Analyse des PRE Komplex nach Filtration durch einen Nitrozellulose-Filter und Hydrolyse der filtergebundenen Aminoacyl- und Peptidyl-tRNAs ist in Abbildung 3.13 dargestellt.



Die Auswertung der Radioaktivität der Fraktionen der HPLC ergab in den Fraktionen 4-7 ein Tritium-Signal, dass im Vergleich mit der Kontrolle der Aminosäure Methionin zugeordnet werden kann. In den Fraktionen 17 und 18 folgt ein weiteres Tritium-Signal, dass dem Formyl-Methionin zugeordnet werden kann. In den Fraktionen 19 und 20 erscheint das [^{14}C]-Signal der Aminosäure Phenylalanin. Die Fraktionen 25 und 27 zeigen ein Dipeptide, Fraktion 25 zeigt ein reines Tritium-Signal während in Fraktion 27 äquimolare Signale Tritium und ^{14}C auftauchen. Das Signal in Fraktion 25 scheint dem Signal in der Kontrolle in Fraktion 28 zu entsprechen. Hierbei handelt es sich um ein Dipeptidsignal für Formyl-Methionyl-Methionin. Die Peaks in Fraktion 27 und in den Fraktionen 34/35 zeigen beide äquimolare Mengen an Tritium und ^{14}C markierten Aminosäuren. Sie entsprechen den Dipeptiden Methionyl-Phenylalanin (27) und Formyl-Methionyl-Phenylalanin (34/35). Die Quantifizierung der Peaks über die Peakflächen zeigte, dass 15% der gebundenen Tritium-markierten Aminosäure in den Fraktionen des Dipeptids zu finden sind. Die Verteilung des ^{14}C -markierten Phenylalanin zeigte, dass 40% des gebundenen Phenylalanins zum Dipeptid reagiert haben. Dieser Wert entspricht der Umsetzung des Dipeptids des POST Komplexes mit Puromycin im enzymatischen Watanabe Experiment.



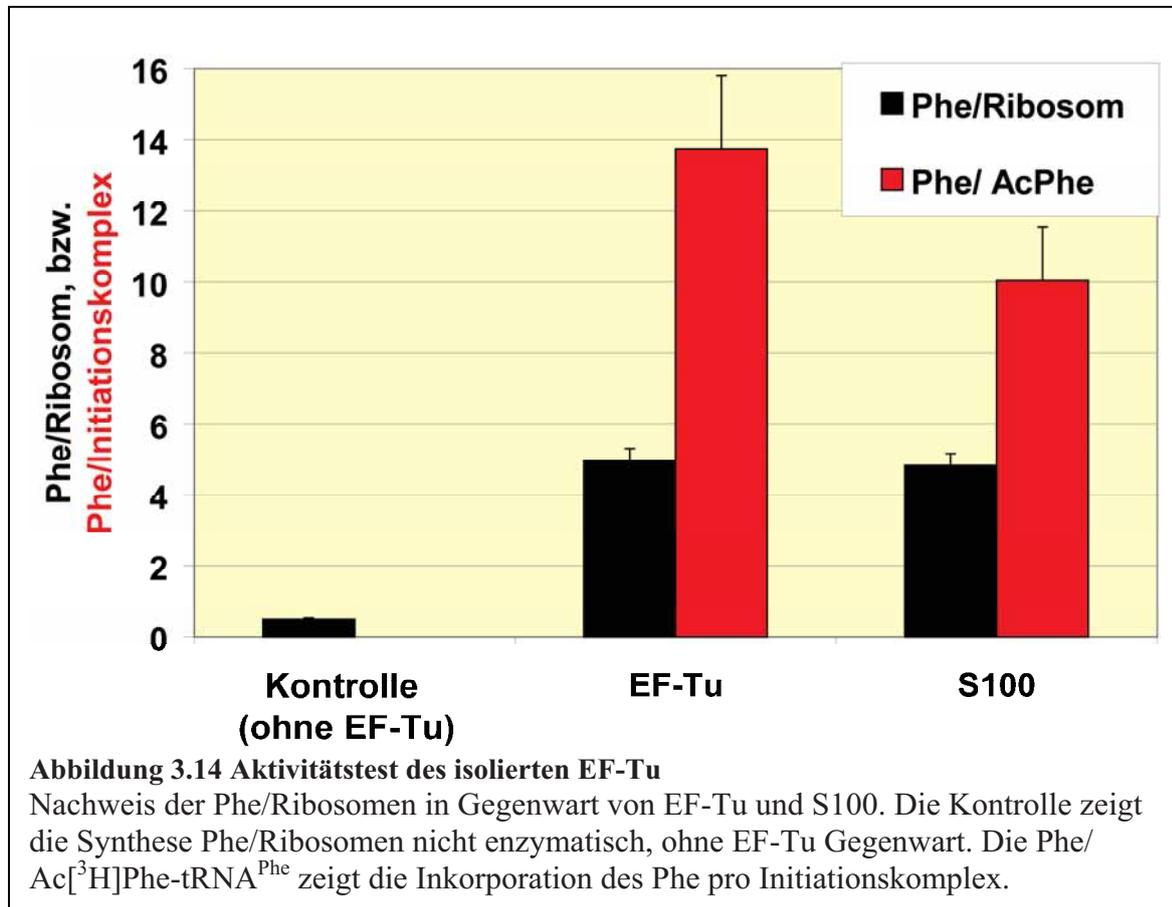
Um eine unvollständige Bildung des ternären Komplexes $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}} \cdot \text{EF-Tu} \cdot \text{GTP}$ aufgrund von Mangel an Guanosin triphosphat (GTP) zu vermeiden, wurde ein energieregenerierendes System aus Phosphoenolpyruvat (PEP), GTP, ATP und Pyruvat-Kinase (PK) mit erhöhtem Grundniveau von 2 mM GTP eingeführt.

Die Einführung des Energie-regenerierenden Systems brachte nur geringe Verbesserung der Puromycinreaktion, 52% des gebundenen Dipeptids reagierte mit Puromycin.

3.2.6.3 Aktivitätstest von EF-Tu

Der Nachweis der Aktivität des EF-Tu kann durch direkten Vergleich der Synthese von Poly(Phe) in Gegenwart von EF-Tu bzw. der S100 Fraktion (enzymatische Fraktion des Zellaufschlusses) erfolgen. 2,5 pmol Ribosomen wurden zur Bildung des Initiationskomplexes mit Poly(U) und N-Acetyl- $[^3\text{H}]\text{-Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ ($\text{Ac}[^3\text{H}]\text{-Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$) inkubiert. Anschließend erfolgte die Elongationsreaktion in Gegenwart eines 10-fachen Überschuss an $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ und EF-Tu bzw. S100. Die Synthese des Poly(Phe) wurde durch Präzipitation mit Trichloressigsäure und Messung der filtergebundenen Radioaktivität bestimmt, Kapitel . 2.7.5

Die Synthese von $5 (\pm 0.4)$ Phenylalanin/Ribosomen bzw. $13,8 (\pm 1,)$ Phenylalanin/ $\text{Ac}[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ in Gegenwart von EF-Tu ist vergleichbar der Synthese bei Verwendung des S100 Extrakts (Abbildung 3.14). Hiermit ist die Aktivität des isolierten EF-Tu nachgewiesen.



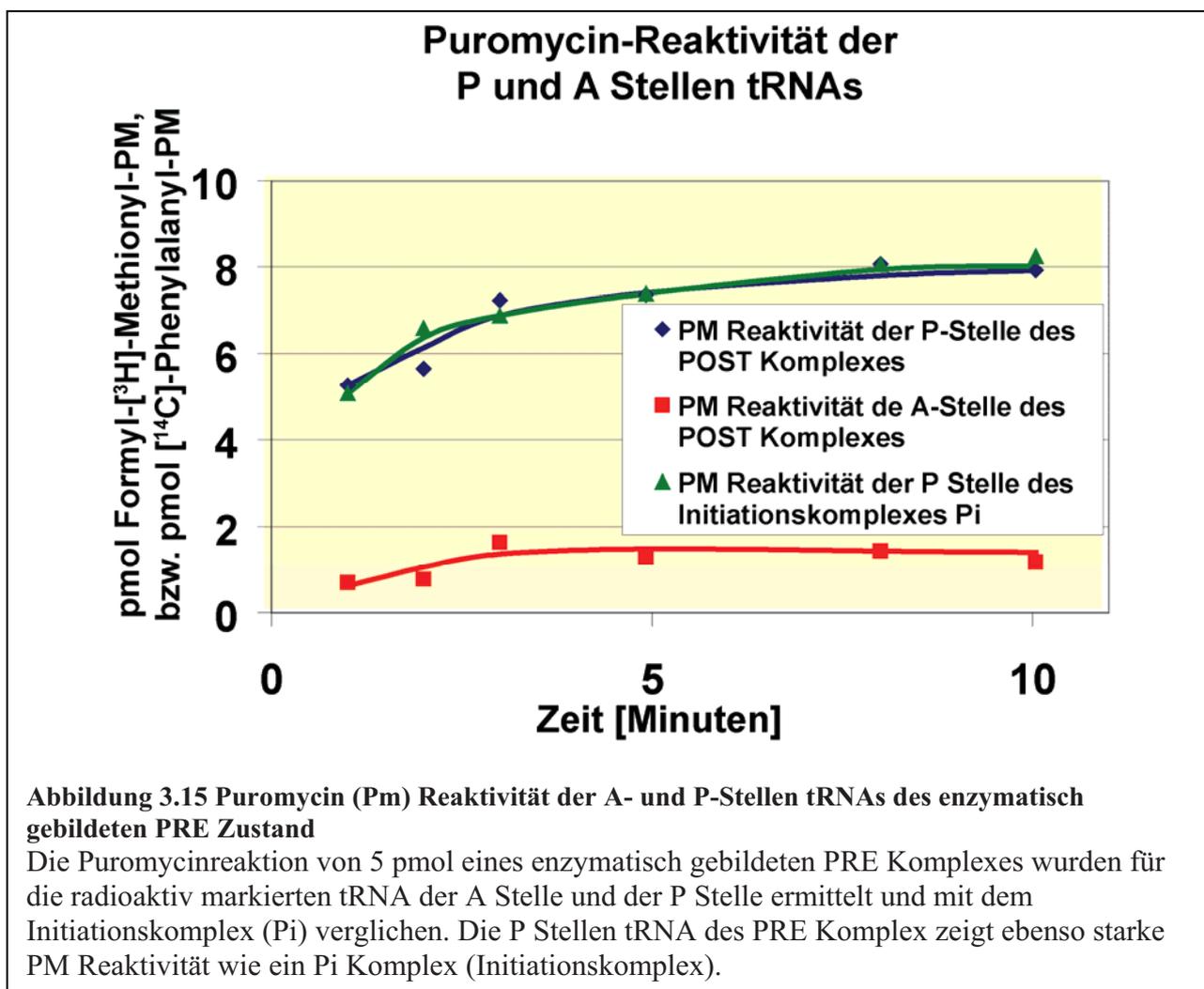
Die geringe Puromycinreaktivität und die geringe Dipeptidbildung im enzymatischen Watanabe kann nicht auf eine inaktive EF-Tu Präparation zurückgeführt werden. Der Unterschied von 5 Phenylalanin/Ribosomen zu 13,8 Phenylalanin/ $\text{Ac}[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ zeigt, dass nicht alle Ribosomen an der Elongationsreaktion teilgenommen haben. Dies entspricht dem Ergebnis der Puromycinreaktion des POST Komplexes im enzymatischen Watanabe Experiment und der 40%igen Umsetzung der A-Stellen tRNA zum Dipeptid (HPLC Analyse). Trotz der hohen Bindungswerte von über 60% für beide tRNAs muss also ein Anteil von ca. 10-40% Initiationskomplexe oder nicht programmierte Ribosomen an der Gesamtpopulation der Ribosomen angenommen werden.

3.2.6.4 Puromycinreaktion aus der A-Stelle

Die Puromycinreaktion wird zum Nachweis der Bindungsposition im nicht-enzymatischen Watanabe Experiment eingesetzt. Der Nachweis der Puromycinreaktivität erfolgt hier für die

einzigste radioaktiv markierte Aminosäure ausschließlich aus der P-Stelle. Die Puromycin (Pm) Reaktion aus der A-Stelle eines PRE Komplexes unter vergleichbaren Experimentalbedingungen zeigte eine Pm-Reaktivität, die um den Faktor 200-300 langsamer erfolgte, und eher einer so genannten spontanen Translokation von PRE nach POST zugeschrieben werden kann, als einer Reaktivität aus der der A-Stelle (Bergemann and Nierhaus, 1983). Cooperman und Kollegen finden eine Pm-Reaktivität die um den Faktor 3.000 langsamer ist und als unspezifische Hintergrund-Reaktivität angesehen wird (Pan et al., 2007). Green und Kollegen beschreiben eine A-Stellen Reaktivität, die auf der Bildung der Hybridzustände A/P und P/E beruhen und somit keine echte A-Stellen Reaktivität darstellen (Sharma et al., 2004). Die Bildung der so genannten Hybridpositionen ist ein Ereignis, das sehr stark von den verwendeten Pufferbedingungen abhängt. Für die Bildung des PRE und POST Zustand im Polyaminpuffersystem und im Polymixpuffersystem, als auch im so genannten "High-fidelity" Puffersystem (Konevega, 2007 #15088), dass eine geringe Modifikation unseres Polyaminpuffersystem darstellt, konnten Komplexe in der Kryo-EM rekonstruiert werden, die die tRNAs in den klassischen Bindungspositionen zeigen (Agrawal et al., 2000; Gao et al., 2005; Konevega et al., 2007). Bei Verwendung des so genannten konventionellen Puffersystem konnten Hybridpositionen nachgewiesen werden, ebenso im Polymixpuffersystem nach Verlust der E-Stellen tRNA (Agrawal et al., 2000; Gao et al., 2005). Dieses Auftreten der Hybridpositionen ist möglicherweise ein *in vitro* Artefakt, das aufgrund der pufferinduzierten Konformationsänderung des Ribosoms auftritt, und bisher nur bei Komplexen gezeigt wurde, die kurze Peptidyl-tRNA in der A Stelle tragen. Das Einführen der Peptidylgruppe der wachsenden Proteinkette in den ribosomalen Tunnel könnte möglicherweise die Bindeposition der Peptidyl-tRNA in der A-Stelle stabilisieren und die Bildung der Hybridposition verhindern. PRE Komplexe des nicht-enzymatischen Watanabe Experiments mit der deacyl-tRNA^{Met} in der P-Stelle und N-Acetyl-Phe-tRNA^{Phe} in der A-Stelle zeigten 18% der Puromycin Reaktion eines POST Komplexes. Möglicherweise erfolgt hier eine partielle Wanderung, die den Peptidylrest bereits in die P Stelle platziert und die Puromycinreaktion erlaubt. Fluoreszenz-markierte tRNAs und das Messen von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) erlaubte das Auftreten solcher Hybridzustände zeitlich zu verfolgen und zu quantifizieren (Munro et al., 2007; Pan et al., 2007).

Zur Analyse einer A-Stellen Puromycinreaktivität wurden im enzymatischen Watanabe Experiment PRE Komplexe, die ($f[^3\text{H}]\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$) in der P-Stelle tragen und den ternären Komplexes $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}*\text{EF-Tu*GTP}$ in die A-Stelle dirigieren, hergestellt. Die kinetische Analyse der Puromycinreaktivität des enzymatisch geformten PRE Komplexes bestätigte das Auftreten einer Reaktivität der A-Stellen tRNA (Abbildung 3.15). Das Phenylalanin der A-Stellen $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ zeigte Puromycinreaktivität. Bis zu 30% des gebundenen Phenylalanins (1,5 pmol/5pmol Ribosomen) wurden in der Puromycinreaktion umgesetzt. Ein Anteil, der etwas über der Häufigkeit des Auftretens der Hybridzustände in den FRET Experimente liegt (Munro et al., 2007). Gänzlich unerwartet erfolgte die Umsetzung der $f[^3\text{H}]\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$ aus der P-Stelle mit Puromycin (Abbildung 3.15).



Durch die Bindung der $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ ($v= 76\%$) in die A-Stelle und der Bildung des Dipeptids sollte die Reaktion aus der P-Stelle unterdrückt sein. Doch der PRE Komplex zeigt ebenso starke Reaktion aus der P-Stelle, wie ein Initiationskomplex mit der $f[^3\text{H}]\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$ in der

P Stelle. In beiden Fällen ist repetitive Puromycinreaktion nachweisbar. Eine mögliche Erklärung ist das Vorhandensein einer gemischten Ribosomenpopulation aus PRE Komplexen, Initiationskomplexen und nicht-programmierten Ribosomen. Die Interpretation, dass der PRE Komplex mit der Peptidyl-tRNA in der A-Stelle und deacyl-tRNA in der P-Stelle die Hybridzustände A/P und P/E eingenommen haben könnte, würde den Anteil an A Stellenreaktivität erklären, nicht aber die Reaktivität aus der P-Stelle und die repetitive Puromycin Reaktion.

3.3 Etablierung des toeprint Experiments

Die Analyse der Positionen der tRNAs, wie bereits oben beschrieben, erfolgt häufig durch Puromycinreaktion. Dadurch kann in erster Linie nur die Position des Akzeptorarms der Peptidyl-tRNA innerhalb der großen Untereinheit detektiert werden. Im Falle des Auftretens von Hybriden-Positionen der tRNA, wie im Hybridstellen Model beschrieben und immer häufiger in der Literatur diskutiert, könnte dadurch die Positionierung der tRNA nicht exakt beschrieben werden. Noller und Kollegen beschrieben im Jahre 1989 eine Methode der chemischen Detektion (*chemical probing*) der tRNAs innerhalb der Bindepositionen für beide Untereinheiten (Moazed and Noller, 1986; Moazed and Noller, 1989a). Obwohl mit dieser Methode beide Untereinheiten des Ribosomen auf das Vorhandensein der tRNAs geprüft werden, birgt diese Methode den Nachteil, dass bereits geringe Inhomogenität der ribosomalen Komplexe zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt. In chemischen Detektions-Experimenten werden auch Minoritäten, die durch kurzzeitige Konformationsänderung auftreten nachgewiesen. Der Nachweis der Konformationsänderung der großen Untereinheit während der Translokation durch das so genannte rRNA-Spaltungsexperiment durch Bleiacetat kann ebenfalls zur Bestimmung der tRNA Positionen herangezogen werden (Polacek et al., 2000; Qin et al., 2006). Aber auch hier ist der Nachweis auf die große Untereinheit beschränkt. Das toeprint Experiment hingegen beschreibt die Position der mRNA gebundenen tRNA innerhalb der kleinen Untereinheit des Ribosoms. Durch Anwendung aller oben beschriebenen Detektionsmethoden lassen sich verlässliche Nachweise der tRNA Positionen innerhalb des Ribosoms führen (Qin et al., 2006).

3.3.1 Position des Ribosoms auf der mRNA und mRNA

Sequenzierung

Die Position des Ribosoms auf der mRNA kann durch toeprints ermittelt werden. Das toeprint Experiment beruht auf der Technik von (Hartz et al., 1989). Es gibt zahlreiche Modifikationen des toeprint Experiments, bezüglich Puffer, Reverse Transkriptase und bezüglich der eingesetzten Verhältnisse an Ribosomen und mRNA*Primer Komplex. Im toeprint Experiment wird ein [³²P]-markiertes DNA-Oligonukleotid (Reverse Transcriptions-Primer), das komplementär zu einem 3' Bereich der verwendeten mRNA ist, eingesetzt. Der Primer wird an die mRNA angelagert und die Ribosomen mit diesem Hybrid aus Primer und mRNA programmiert. Die Positionierung des Ribosoms ergibt sich durch Zugabe einer oder mehrerer tRNAs entsprechend der Codon-Anticodon Wechselwirkung in der ribosomalen P-Stelle bzw. A- und E-Stelle (siehe stellenspezifische Bindung von tRNA an das Ribosomen (Watanabe-Experiment)). Im nächsten Schritt erfolgt die Verlängerung des [³²P]-markiertes DNA-Oligonukleotid mittels Reverse Transkriptase (Primerextension). Die Synthese des Oligonukleotids durch die Reverse Transkriptase stoppt, wenn das Enzyme gegen das Ribosomen stößt. Die Länge des synthetisierten Oligonukleotids (toeprint) kann mit der Nukleotidfolge der Sequenzierung der mRNA verglichen werden. Dadurch kann das letzte angehängte Nukleotid ermittelt werden. Die Position des letzten angehängten Nukleotids, das toeprint Signal, liegt +17 Nukleotiden in 3' Richtung von dem ersten Nukleotid des P-Stellen Codons (+1) entfernt, da das Ribosomen einen Teil der mRNA verdeckt. Die exakte Position ist abhängig von den verwendeten Pufferbedingungen und der Reverse Transkriptase (Hartz et al., 1988; Joseph and Noller, 1998; Moll et al., 2003).

Die Herstellung der ribosomalen Komplexe, die zur toeprint Analyse verwendet werden, erfolgt im nicht-enzymatischen Watanabe. Entsprechend dem Protokoll nach Hartz et al (Hartz et al., 1988) modifiziert durch Moll et al (Moll et al., 2003) erfolgte die Verwendung eines 30-fachen Überschuss an Ribosomen über mRNA*Primer Duplex. Je 180 pmol re-assoziierte 70S Ribosomen wurden mit 6 pmol mRNA*Primer Duplex und 4-fachen Überschuss an deacyl-tRNA^{Met}_f und 4-fachen Überschuss an AcPhe-tRNA^{Phe} zur Bildung von PRE und POST Komplexen (nach Translokation mit EF-G) eingesetzt.

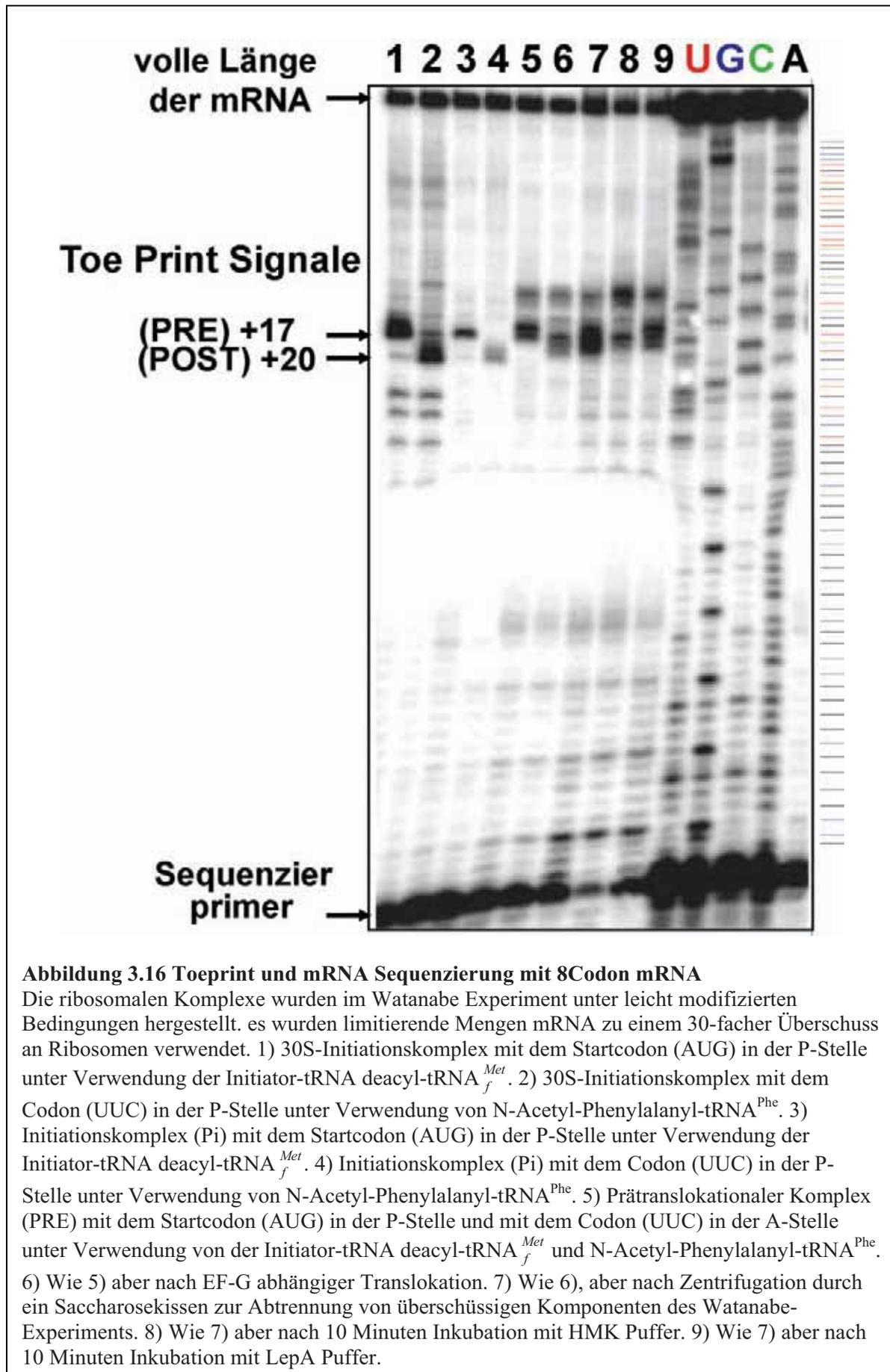


Abbildung 3.16 Toeprint und mRNA Sequenzierung mit 8Codon mRNA

Die ribosomalen Komplexe wurden im Watanabe Experiment unter leicht modifizierten Bedingungen hergestellt. es wurden limitierende Mengen mRNA zu einem 30-fachen Überschuss an Ribosomen verwendet. 1) 30S-Initiationskomplex mit dem Startcodon (AUG) in der P-Stelle unter Verwendung der Initiator-tRNA deacyl-tRNA^{Met}. 2) 30S-Initiationskomplex mit dem Codon (UUC) in der P-Stelle unter Verwendung von N-Acetyl-Phenylalanyl-tRNA^{Phe}. 3) Initiationskomplex (Pi) mit dem Startcodon (AUG) in der P-Stelle unter Verwendung der Initiator-tRNA deacyl-tRNA^{Met}. 4) Initiationskomplex (Pi) mit dem Codon (UUC) in der P-Stelle unter Verwendung von N-Acetyl-Phenylalanyl-tRNA^{Phe}. 5) Prätranslokationaler Komplex (PRE) mit dem Startcodon (AUG) in der P-Stelle und mit dem Codon (UUC) in der A-Stelle unter Verwendung von der Initiator-tRNA deacyl-tRNA^{Met} und N-Acetyl-Phenylalanyl-tRNA^{Phe}. 6) Wie 5) aber nach EF-G abhängiger Translokation. 7) Wie 6), aber nach Zentrifugation durch ein Saccharosekissen zur Abtrennung von überschüssigen Komponenten des Watanabe-Experiments. 8) Wie 7) aber nach 10 Minuten Inkubation mit HMK Puffer. 9) Wie 7) aber nach 10 Minuten Inkubation mit LepA Puffer.

Ein Teil der PRE und POST Komplexe (jeweils 120 pmol) wurde zur Abtrennung des überschüssigen Materials durch ein Saccharose- Kissen (10% Saccharose in Bindungspuffer) bei 78000 rpm TLA 100 Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 60µl Bindungspuffer aufgenommen. Für die Kontrollen der Initiationskomplexe wurden jeweils 4 pmol re-assoziierte 70S mit 0,133 pmol mRNA*Primer Duplex und 4 fachen Überschuss an deacyl-tRNA^{Met} oder 4-fachen Überschuss an AcPhe-tRNA^{Phe} für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Reverse Transkription zur Herstellung der toeprint Signale. Ein Aliquot der RT Reaktion (2 pmol 70S-Komplexe) wurde mit denaturierendem Probenpuffer versetzt und mittels denaturierender PAGE (Sequenziergel) getrennt. Der Nachweis der toeprints erfolgt durch Autoradiographie der getrockneten Sequenziergele auf Phosphorimagerdetektoren. Das Ergebnis der toeprint Reaktionen wurden mit der mRNA Sequenzierung (siehe Kapitel 2.4.7) verglichen (Abbildung 3.16).

3.3.1.1 Optimierung der Herstellung der Sequenziergele

Die Qualität der Sequenziergele konnte durch Verwendung von ultra reinen Komponenten, wie Polyacrylamid für Sequenzierungen (Fluka) und Harnstoff für Sequenzierungen (Fluka) und jeweils frisch hergestellter Pufferlösung (TBE) deutlich verbessert werden. Zur vollständigen Polymerisation sollten die Sequenziergele einen Tag vor dem Experiment

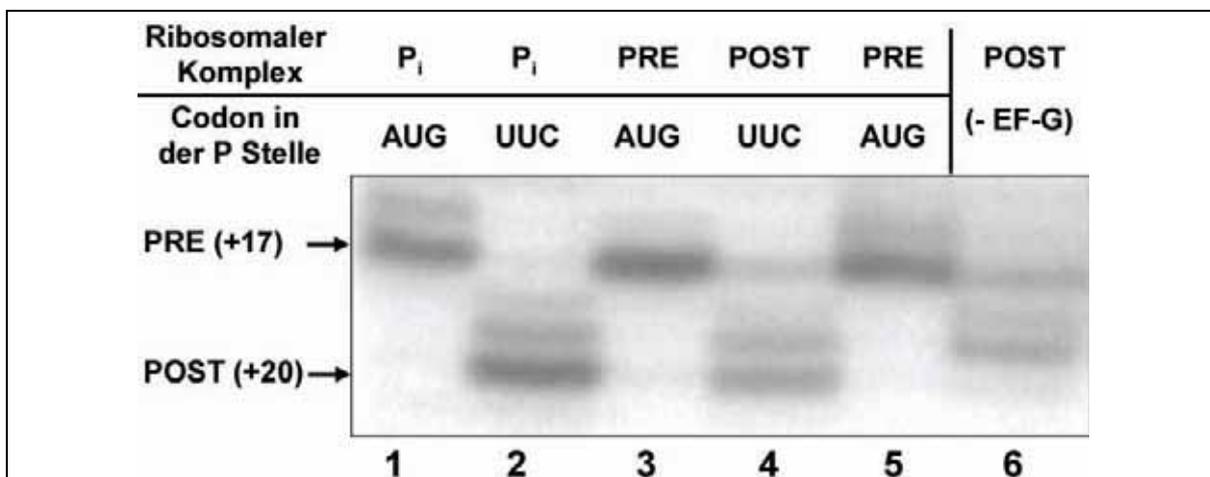


Abbildung 3.17 Toeprint Signale mit 8Codon mRNA

1) Initiationskomplex (Pi) mit dem Startcodon (AUG) in der P Stelle unter Verwendung der Initiator-tRNA deacyl- tRNA^{Met}. 2) Initiationskomplex (Pi) mit dem Codon (UUC) in der P Stelle unter Verwendung von N-Acetyl-Phenylalanyl-tRNA^{Phe}. 3) Prätranslokationaler Komplex (PRE) mit dem Startcodon (AUG) in der P Stelle und mit dem Codon (UUC) in der A Stelle unter Verwendung von der Initiator-tRNA deacyl- tRNA^{Met} und N-Acetyl-Phenylalanyl-tRNA^{Phe}. 4) Wie 3) aber nach EF-G abhängiger Translokation. 5) Wie 3), aber nach Zentrifugation durch ein Saccharose-Kissen. 6) POST wie 4), aber nach Zentrifugation durch ein Saccharose-Kissen.

hergestellt werden. Zusätzlich verbessert ein Vorlauf zur gleichmäßigen Durchwärmung des Gels, sowie die Auftrennung der toeprint Signale bei geringerer Stromstärke (bis maximal 18 Milliampère, besser 10-15 Milliampère) die Qualität der Bandenauflösung, siehe Abbildung 3.17.

3.3.1.2 Reinigung des Primer zur Reduktion der Hintergrundstrahlung

Durch die Reinigung des Primers durch Gelextraktion oder Gelfiltration kann die Hintergrundstrahlung des Gels reduziert werden. Hierbei zeigte sich, dass durch das Ausschneiden des Primers aus einem denaturierenden PAGE Gel geringfügige Verunreinigungen des Primers durch kürzere Oligonukleotide, die als Nebenprodukte der Synthese entstehen, entfernt werden. Die Gelfiltration

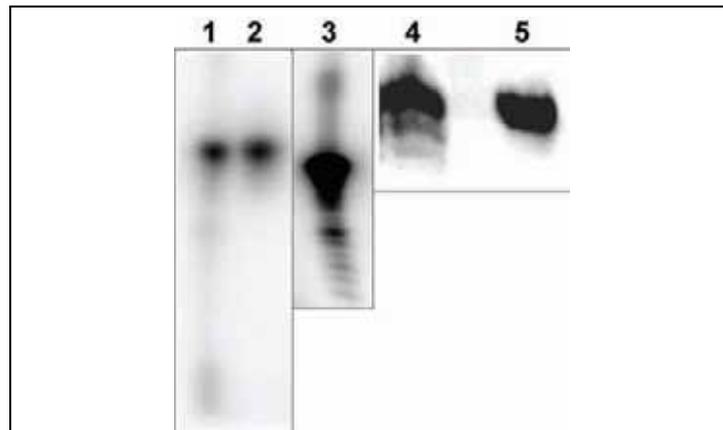


Abbildung 3.18 Reinigung des radioaktiv markierten Primers für toeprint Experimente

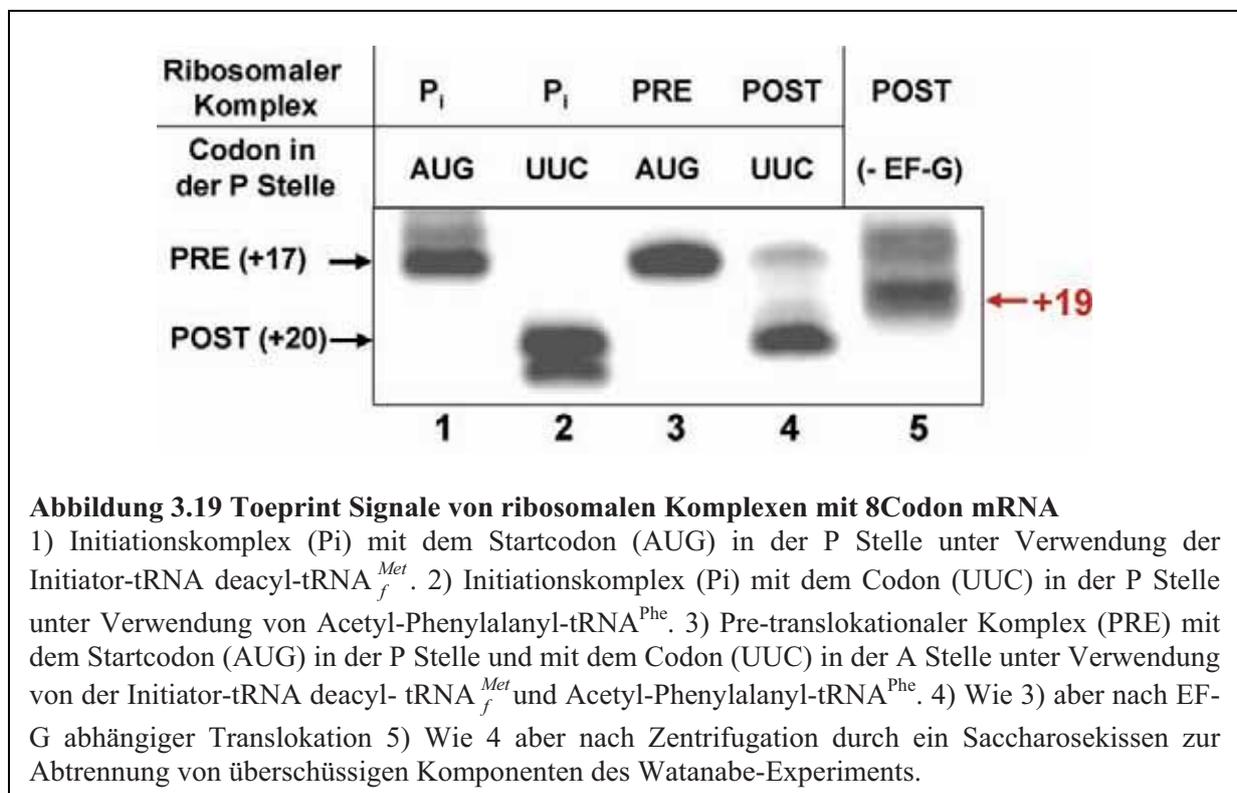
1) Primer nach Ethanolpräzipitation; 2) Primer nach Gelfiltration durch Sephadex G-10; 3) Primer nach Gelfiltration durch Sephadex G-10 im Sequenziergel mit Nukleotidauflösung; Vergleich zwischen Gelfiltration (4) und Extraktion des Primers aus PAGE Gel (5)

hingegen entfernt nur überschüssiges radioaktives ATP, das zur Markierung des Oligonukleotids eingesetzt wurde. Da die Effizienz der radioaktiven Markierung bei ca. 10% der eingesetzten Menge ATP liegt, dient die Gelfiltration in erster Linie dazu, die überschüssige Strahlung zu entfernen um das gesundheitliche Risiko zu reduzieren. Die Kombination aus Gelfiltration und Gelextraktion bieten den Vorteil des Entfernens der großen Menge überschüssigen Strahlung durch einen kurzen Zentrifugationsschritt und der Verbesserung der Primerqualität durch die mehrtägige Prozedur der Primerextraktion aus einem Polyacrylamidgel.

3.3.1.2 Optimierung der Herstellung der ribosomalen Komplexe

Die Verwendung eines 30-fachen Überschuss an Ribosomen pro mRNA*Primer Komplex bei 4-fachem Überschuss an tRNA über Ribosomen, Abbildungen 3.16, zeigt dass nicht alle mRNA an Ribosomen gebunden vorliegt. Das Auftreten der Signale einer reversen Transkription der vollen Länge der mRNA zeigt den erheblichen ungebundenen Teil der mRNA. Eine Erhöhung des Überschuss der mRNA über Ribosomen in Watanabe Experiment,

vergleiche 3.2.5.2, führte zu einer besseren Besetzung der tRNA Positionen im programmierten Ribosom. Durch die Verwendung eines 5-fachen Überschuss an mRNA*Primer Duplex über Ribosomen (in Anlehnung an das Protokoll des nicht optimierten Watanabe Experiments) sollte die Ausbeute an programmierten Ribosomen erhöht werden. Es zeigte sich, dass die Signalqualität des toeprints über dem Hintergrund deutlich verbessert werden konnte, siehe Abbildung 3.19. Für PRE und POST Komplexe (Spur 3 und 4) treten nun eindeutige Signale bei +17 (PRE), bzw. +20 (POST) auf. Trotz der deutlichen Signalverbesserung der toeprints durch den Überschuss an mRNA über Ribosomen und dadurch bedingt homogenere Komplexbildung, zeigten die POST Komplexe, die zur Entfernung des EF-G durch eine Saccharosekissen zentrifugiert wurden, eine Mischung aus PRE und leicht verschobenem POST Signal (+19).



3.3.1.4 Optimierung der Zentrifugationsbedingungen zur Herstellung gereinigter POST Komplexe (Depletion von EF-G).

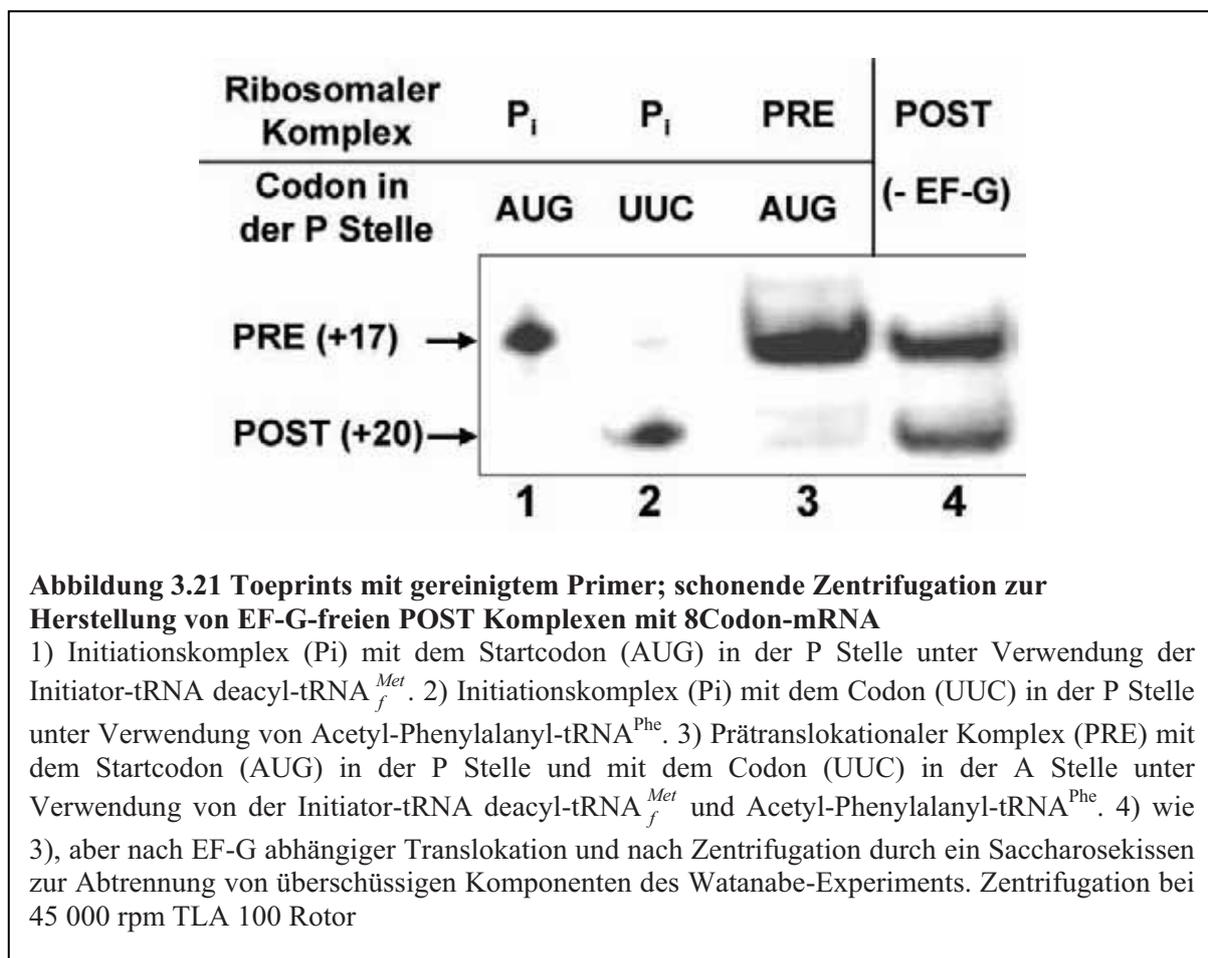
Die Entfernung des EF-G von POST Komplexen zur Analyse von Proteinen, Oligonukleotiden und Hemmstoffen (Antibiotika) ist Ziel der nächsten Optimierungsschritte. Verschiedene Zentrifugationsbedingungen wurden getestet, um überschüssige Komponenten (tRNAs, EF-G, GTP) des stellenspezifischen tRNA Bindungsexperiments abzutrennen. Die Zentrifugation erfolgte durch eine 10%ige Saccharose Lösung in Bindungspuffer. Durch die

hohe Gravitationskraft der Zentrifugation (78.000 rpm, 2 Stunden, TLA-100 Rotor) werden die ribosomalen Komplexe sedimentiert, während die übrigen Komponenten des nicht-enzymatischen Watanabe Experiments nur gering in die Saccharose-Lösung einwandern und im Überstand verbleiben. Der Überstand wird möglichst schnell entfernt, um eine Resuspendierung der ribosomalen Komplexe zu verhindern. Anschließend wird das Sediment der ribosomalen Komplexe in Bindungspuffer resuspendiert. Dabei wird ein Verlust bis zu 50% der ribosomalen Komplexe in Kauf genommen, um möglichst gereinigte Komplexe zu erhalten. Die Analyse der toeprints, Abbildung 3.20, zeigt deutlich, dass der POST Zustand sich durch die Zentrifugation verändert. Im Vergleich des toeprints vor der Zentrifugation des POST Komplexes (Spur 4, Abbildung 3.20) mit dem toeprint des POST Komplexes nach der Zentrifugation (Spur 6, Abbildung 3.20 und Spur 5 Abbildung 3.21) wird die Veränderung deutlich. Es erscheinen zwei toeprint Signale nach der Zentrifugation. Das obere Signal in Spur 6 entspricht dem Signal des PRE Zustand (Spur 3). Das zweite Signal entspricht eher dem POST Signal als dem PRE Signal, ist aber um 1 Nukleotide in 5' Richtung im Vergleich mit dem POST Komplex vor der Zentrifugation (Spur 4) verschoben. Durch die hohe Beschleunigung der ribosomalen Komplexe während der Zentrifugation könnten die Ribosomen möglicherweise eine tRNA verloren haben und den bevorzugten Initiationskomplex (P_i mit deacyl-tRNA^{Met} eingenommen haben, das toeprint Signal dieses P_i Komplexes entspricht dem des PRE toeprint Signals. Eine Dissoziation des 70S Ribosoms in die Untereinheiten durch zu harsche Zentrifugationsbedingungen wurde von (Baierlein and Infante, 1974) beschrieben. Der Verlust einer tRNA konnte im Kontrollexperiment mit zwei radioaktiv markierten tRNAs zur Bildung des POST Komplexes und Zentrifugation ausgeschlossen werden. Beide tRNAs zeigten die gleichen Bindungswerte vor und nach der Zentrifugation. Die Puromycinreaktion zeigte eine Abnahme der Reaktivität um 50% und bestätigt das Verschieben des Verhältnisses POST zu PRE durch die Zentrifugation.

Eine weitere Erklärung für das Auftreten der beiden toeprint Signale könnte eine druckinduzierte Konformationsänderung von POST zu PRE sein. Eine vollständige Änderung (PRE Signal) bzw. einer partiellen Änderung (POST ähnlich) der ribosomalen Konformation erklärten die beiden toeprint Signale. Ein Verlust ribosomaler Proteine könnte eine weitere Erklärung für das Auftreten beider Signale sein. Um eine druckinduzierte Konformationsänderung und den Verlust von ribosomalen Proteinen zu vermeiden wurde eine schonende Zentrifugation eingesetzt.

3.3.1.5 Schonende Zentrifugation zur Entfernung von EF-G aus POST Komplexen

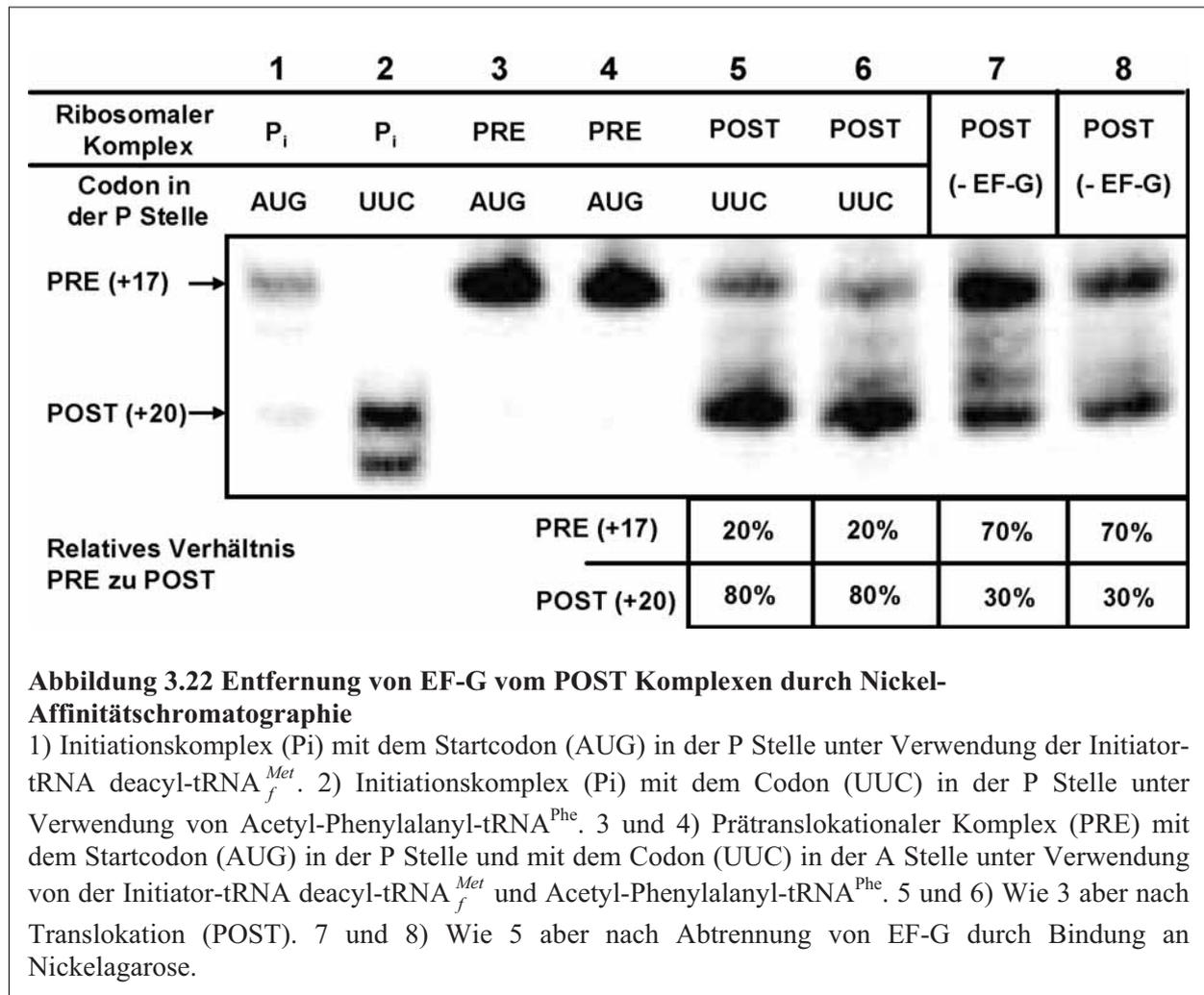
Durch die veränderten Zentrifugationsbedingungen können stabilere ribosomale Komplexe erhalten werden. Der PRE Zustand nach der Zentrifugation zeigt das Signal des PRE Zustands vor der Zentrifugation. Der POST Zustand zeigt, wie im vorherigen Experiment, zwei Signale, das obere Signal entspricht dem Signal im PRE Zustand, das untere Signal ist in diesem Fall ein klares POST Signal, welches drei Nukleotide in 3' Richtung (bezogen auf das PRE Signal) der mRNA verschoben ist. Das Verhältnis der Signale im zentrifugierten POST Komplex entsprechen 53 % PRE und 47 % POST, Abbildung 3.21.



3.3.1.6 Entfernung von EF-G durch Nickelagarose Affinitätschromatographie

Eine weitere schonende Entfernung des EF-G von POST Komplexen, die im Watanabe Experiment hergestellt wurden, beruht auf der Bindung des His₆ markierten EF-G an Nickel-Agarose (NiNTA, QIAGEN). Bei dieser Methode erfolgt die selektive Entfernung des EF-G, hingegen verbleiben die zugegebenen Überschüsse an mRNA und tRNAs mit dem POST Komplex im Eluat. Die Analyse der Komplexe im toeprint Experiment zeigte, dass wie bei

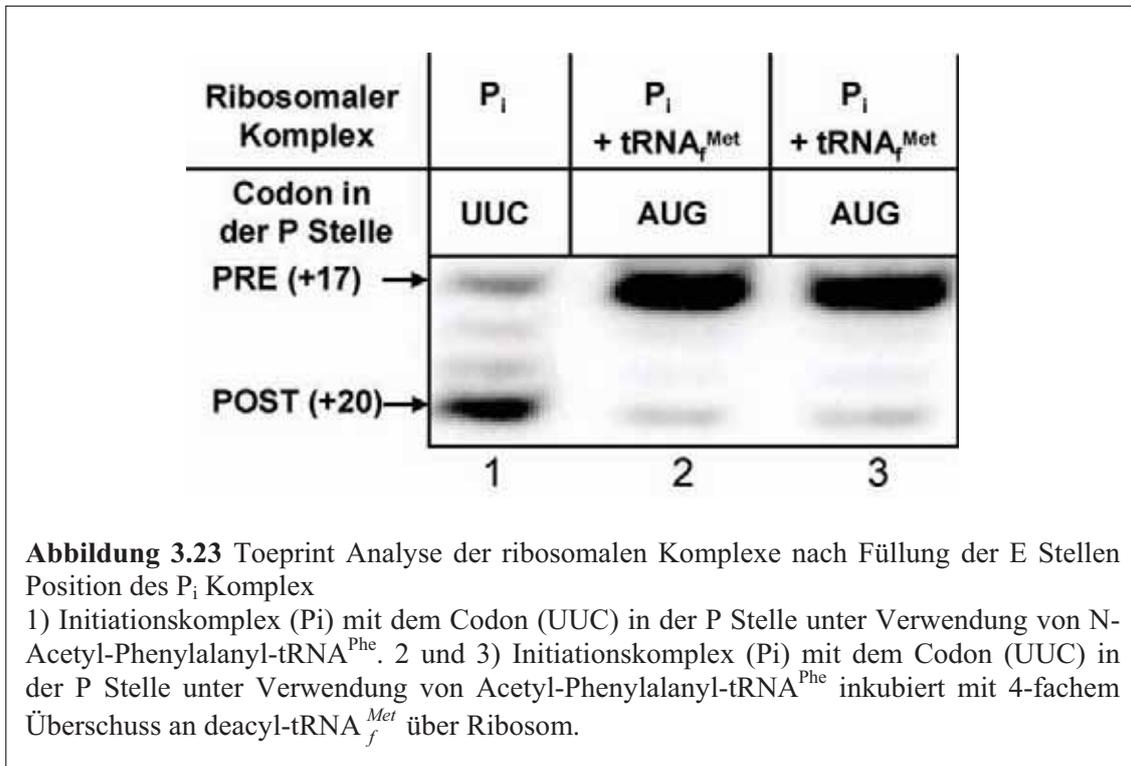
der Methode der Entfernung des EF-G durch Zentrifugation, eine Mischung aus POST und PRE nach der Entfernung von EF-G nachgewiesen werden kann (Abbildung 3.22). Die Quantifizierung der relativen Mengen an PRE und POST Zustand ergab, dass nach der Entfernung von EF-G der PRE Zustand mit 70% gegenüber dem POST Zustand mit 30% dominiert.



3.3.1.7 Herstellung von EF-G freien POST Zuständen durch Füllung der E-Stelle von Initiationskomplexen mittels tRNA Bindung

Die Herstellung des Initiationskomplex (Pi) im Watanabe Experiment erlaubt die vollständige Besetzung der P-Stelle mit dem Peptidyl-tRNA Analogon Ac[³H]Phe-tRNA^{Phe}, vergleiche Tabelle 3.11. Durch Zugabe eines vierfachen Überschuss an E-Stellen spezifischer deacyl-tRNA zum P_i Komplex soll die Besetzung der E-Stelle erfolgen. Der Nachweis der Komplexbildung erfolgte durch toeprint Analyse, siehe Abbildung 3.23.

Durch Füllung der E-Stelle des P_i Komplex erfolgt eine Rücktranslokation der Acetyl- $[^3\text{H}]$ -Phe-tRNA^{Phe} von der P-Stelle in die A-Stelle. Es zeigt sich ein toeprint Signal für einen PRE Komplex. Das Experiment konnte nicht zur Herstellung EF-G freier ribosomaler POST Komplexe verwendet werden.



3.4 Anwendung der *in vitro* Systeme

3.4.1 Herstellen von ribosomalen Komplexen, die den

Regulationsfaktor RelA tragen

Die Regulation der Wachstumskontrolle ist in *E. coli* ein entscheidender Mechanismus der sowohl mit dem Energiehaushalt als auch mit der Verfügbarkeit von Nährstoffen (Bausteinen zur Biosynthese) verknüpft ist. In schnell wachsenden *E. coli* Zellen kann die Trockenmasse der Zellen bis zu 60% aus Komponenten der Proteinbiosynthese (Ribosomen, tRNA, Aa-tRNA-Synthetasen Initiationsfaktoren und Elongationsfaktoren) bestehen. Bis zu 60% der zellulär verfügbaren Energie wird für die Synthese und den Aufbau der Ribosomen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die Quelle und die Mechanismen der Regulation der Wachstumsraten in *E. coli* sind noch nicht aufgeklärt. Die Konzentrationen der

energiereichen Verbindungen ATP und GTP, sowie das jeweils erste Nukleotid der mRNA Synthese sind Kandidaten der Wachstumskontrolle (Gourse et al., 1996). Ein weitere Faktor der in die Regulation der RNA Synthese involviert ist, ist der Stringent Faktor ((p)ppGpp) der von RelA aus ATP und GTP bzw. GDP gebildet wird.

Der Regulationsfaktor RelA aus *E. coli* (GTP pyrophosphokinase, EC 2.7.6.5) ist ein Protein mit 744 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 83,875 kDa (Swiss-Prot P11585, (Metzger et al., 1988) das unter Aminosäuremangelbedingungen aktiviert wird.

Die Aktivierung des RelA erfolgt nicht über die Konzentration der Aminosäuren, sondern über die Detektion von unbeladenen (deacyl-) tRNAs in der ribosomalen A-Stelle, vergleiche Abbildung 3.24.

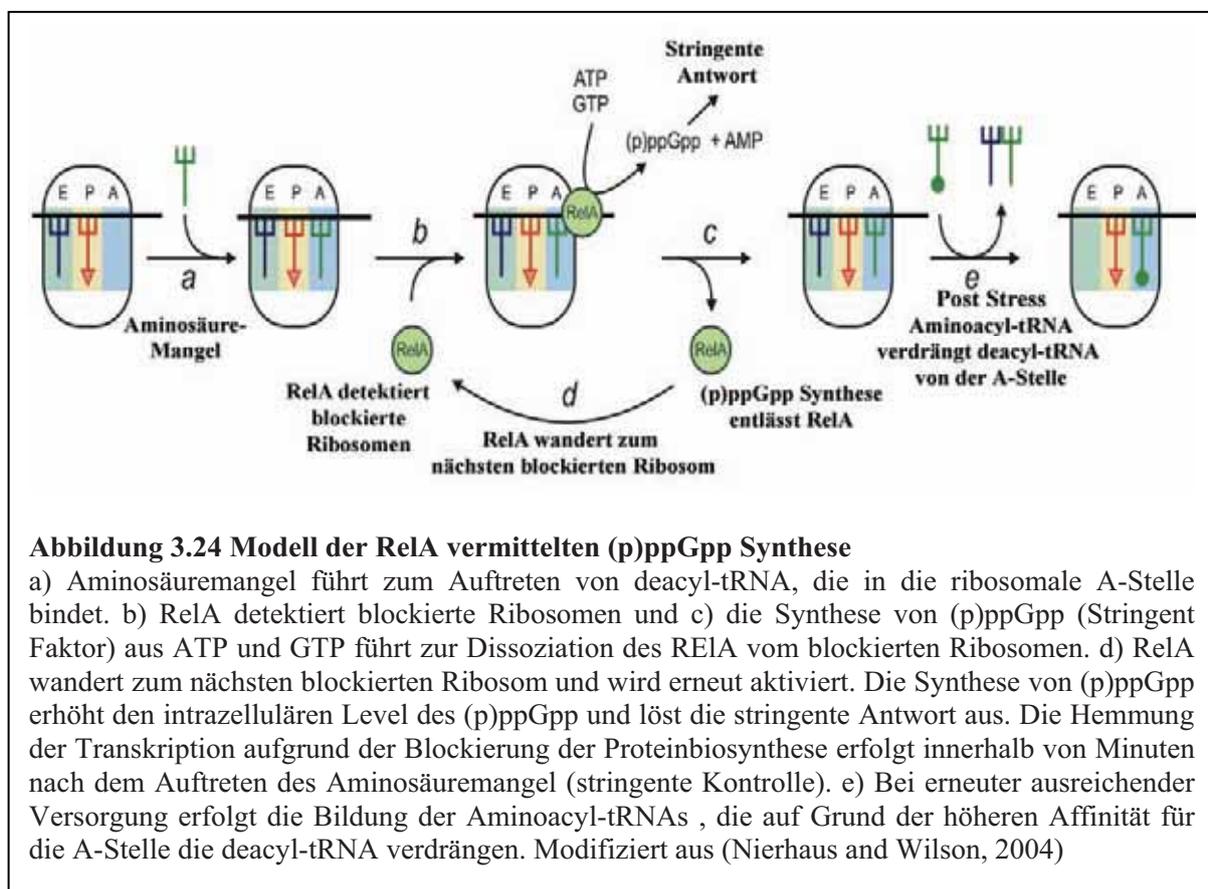


Abbildung 3.24 Modell der RelA vermittelten (p)ppGpp Synthese

a) Aminosäuremangel führt zum Auftreten von deacyl-tRNA, die in die ribosomale A-Stelle bindet. b) RelA detektiert blockierte Ribosomen und c) die Synthese von (p)ppGpp (Stringent Faktor) aus ATP und GTP führt zur Dissoziation des RelA vom blockierten Ribosomen. d) RelA wandert zum nächsten blockierten Ribosom und wird erneut aktiviert. Die Synthese von (p)ppGpp erhöht den intrazellulären Level des (p)ppGpp und löst die stringente Antwort aus. Die Hemmung der Transkription aufgrund der Blockierung der Proteinbiosynthese erfolgt innerhalb von Minuten nach dem Auftreten des Aminosäuremangel (stringente Kontrolle). e) Bei erneuter ausreichender Versorgung erfolgt die Bildung der Aminoacyl-tRNAs, die auf Grund der höheren Affinität für die A-Stelle die deacyl-tRNA verdrängen. Modifiziert aus (Nierhaus and Wilson, 2004)

Die Bindung von RelA an das 70S Ribosom (Christiansen and Nierhaus, 1976), sowie an die ribosomalen Untereinheiten (Christiansen and Nierhaus, 1976; Wendrich et al., 2002) konnte nachgewiesen werden. Zur Analyse der RelA-Ribosom-Interaktion sollen möglichst homogene ribosomale Komplexe die RelA tragen präpariert werden. Die Analyse der Interaktion soll in Kooperation mit Prof. Dr. Christan Spahn, Institut für Biomathematik Charité Berlin, durch kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen der Komplexe erfolgen.

3.4.1.1 Analyse der RelA Präparationen

Die Proteine RelA und RelA-His₆ (His₆ markiertes RelA) wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Glaser, Department of Cellular Biochemistry, Hadassah Medical School, Hebrew University, Jerusalem, Israel, zur Verfügung gestellt wurde. Die Konzentration der Proteinpräparationen wurde über die Absorption bei 280 nm (A_{280}) zu 1,71 mg/ml (20 pmol/ μ l) für RelA und 0,93mg/ml (11 pmol/ μ l) für RelA-His₆ bestimmt. Die Analyse der Reinheit der Proteine zeigte keine detektierbare Verunreinigung im Coomassie gefärbten SDS-PAGE Gel, siehe Abbildungen 3.25 und 3.27. Allerdings zeigte sich, dass höhere Konzentrationen der RelA Präparationen zu Aggregation und Präzipitation neigen. Insbesondere das RelA-His₆ zeigt nur geringe Löslichkeit und kann nicht für Bindungsexperiment eingesetzt werden, in den ein erheblicher Überschuss von Protein über Ribosom notwendig ist. Die geringe Löslichkeit von RelA wurde auch von anderen Gruppen beschrieben (Block and Haseltine, 1975; Cochran and Byrne, 1974; Pedersen and Kjeldgaard, 1977). Der Vergleich der Bandenintensität des RelA mit dem Protein L2 der großen ribosomalen Untereinheit zeigte, dass äquivalente Mengen RelA und L2 sich unterschiedlich stark anfärben. Der Unterschied in der Anfärbbarkeit der RelA und L2 Banden zeigt im Bereich von 5 pmol bis 20 pmol einen konstanten Faktor von vierfach stärkere Intensität der L2 Bande gegenüber der RelA Bande, siehe Abbildung 3.25. Der Unterschied der Bandenintensitäten zwischen RelA-His₆ und L2 zeigt einen Faktor von 1,5-fach stärkerer Intensität der L2 Bande bei gleicher Konzentration. Der Vergleich der Konzentration von RelA-His₆ und EF-G-His₆ durch Westernblot zeigte ebenfalls einen Unterschied zwischen gemessener Proteinmenge und Signalstärke der beiden verwendeten Proteine. Steigende Mengen von EF-G-His₆ wurden mit 30 pmol bzw. 40 pmol RelA-His₆ verglichen. Weiterhin wurden äquimolare Mengen RelA-His₆ und EF-G-His₆ verglichen. Die Auswertung der Westernblot Signale ergab einen Unterschied von Faktor fünf in der Stärke der Signale bei gleicher Konzentration, siehe Abbildung 3.26A. Der Unterschied der Bandenintensität zwischen RelA-His₆ und EF-G-His₆ bestätigte sich in der Silberfärbung eines SDS-PAGE Gels, Abbildung 3.26B.

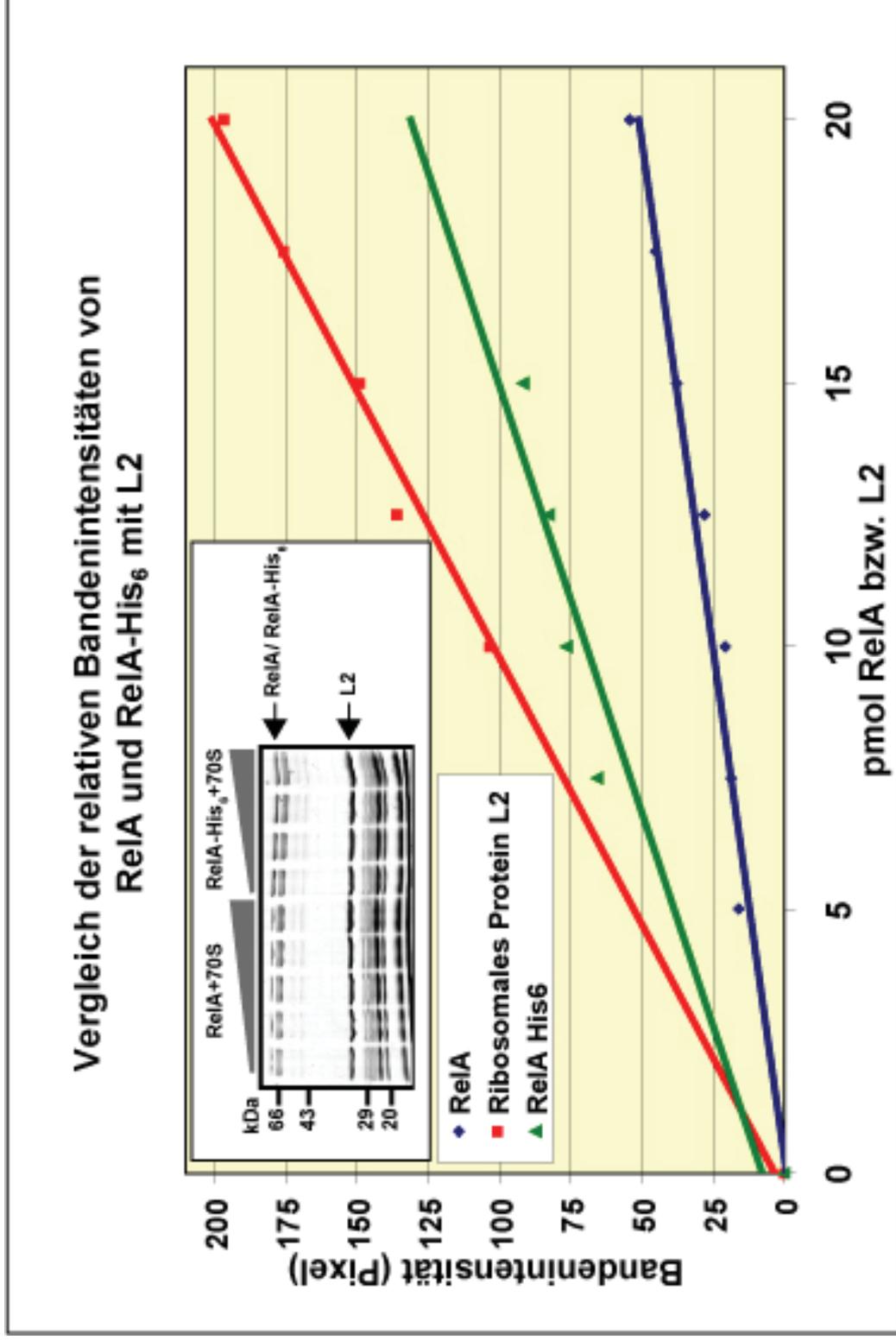


Abbildung 3.25 Konzentrationsvergleich von ReIA und ReIAHis₆ mit L2 und Qualitätskontrolle der Proteinpräparation
 Die Bandenintensität der Proteine L2 (rot) und ReIA (blau), sowie REIA-His₆ (grün) der Coomassie-gefärbten SDS PAGE wurde mit ImageQuant[®] ermittelt und gegen die Konzentration der eingesetzten Proteinmenge aufgetragen.
 Im eingefügten Kasten ist die SDS PAGE steigender Mischungen von ReIA bzw. REIA-His₆ mit re-assoziierten Ribosomen abgebildet.

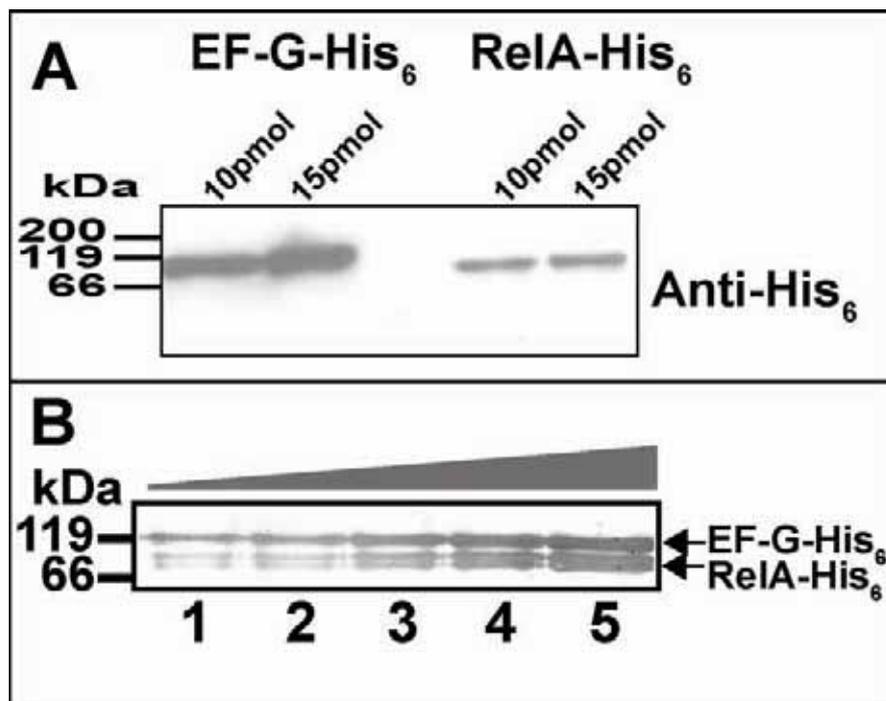


Abbildung 3.26 A) Western blot Analyse zur Bestimmung der Konzentration des RelA-His₆ im Vergleich mit EF-G-His₆; B) Silberfärbung einer SDS-PAGE; Äquimolare Mischung von RelA-His₆ und EF-G-His₆: 1) 3 pmol; 2) 5 pmol; 3) 7,5 pmol; 4) 10 pmol; 5) 15 pmol.

3.4.1.2 Herstellung der ribosomalen Komplexe, die den Regulationsfaktor RelA tragen.

Aufgrund der Unsicherheit der Proteinkonzentration des RelA wurden steigende Mengen an RelA über Ribosom (ein bis zehnfach über 70S) zur Bindung eingesetzt. Überschüssiges Protein wurde durch Zentrifugation durch ein Saccharose Kissen (10% Saccharose in Bindungspuffer) abgetrennt und das Verhältnis zwischen gebundenen RelA und dem ribosomalen Protein L2 aus der SDS PAGE ermittelt, siehe Abbildung 3.25. Bei zehnfachem Überschuss an RelA über Ribosomen zeigte sich ausreichend starke Bindung (3 RelA/Ribosomen). Trotz Unsicherheit der Konzentration der RelA Proteinpräparation kann von einer Bindung von mindestens 75% ausgegangen werden. Die RelA-Ribosomen-Komplexe des Experiments mit zehnfachem Überschuss an RelA wurden zur kryoelektronenmikroskopischen Analyse verwendet.

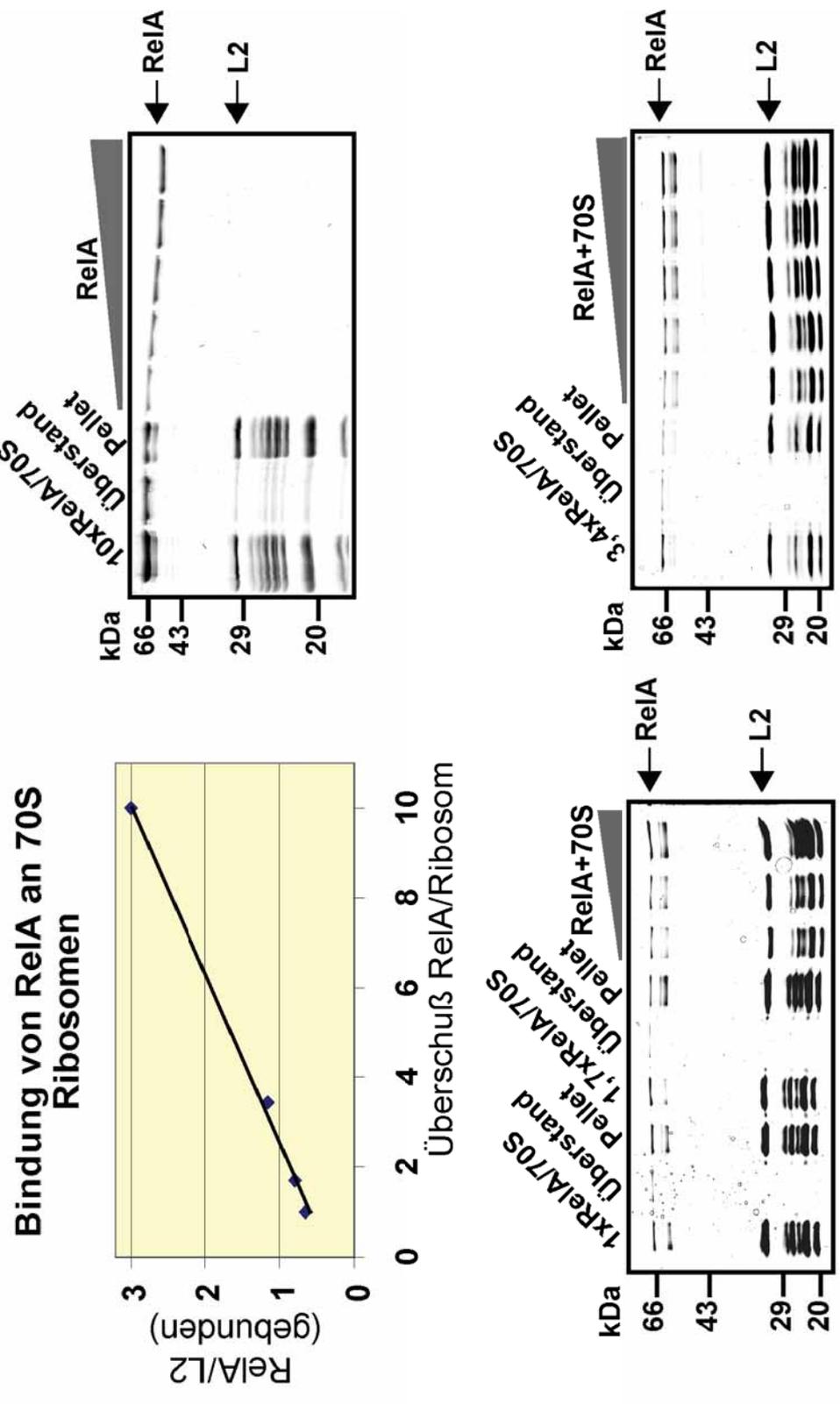


Abbildung 3.27 Bindung von RelA an 70S Ribosomen
 Die Bindung des RelA an 70S Ribosomen zeigt bis zum 10fachen Überschuss eine lineare Abhängigkeit. Die Bestimmung der Bindung des RelA an 70S erfolgte nach Zentrifugation durch ein Saccharose-Kissen e aus der SDS PAGE durch Vergleich der Bandenintensität des RelA mit dem ribosomalen Protein L2.

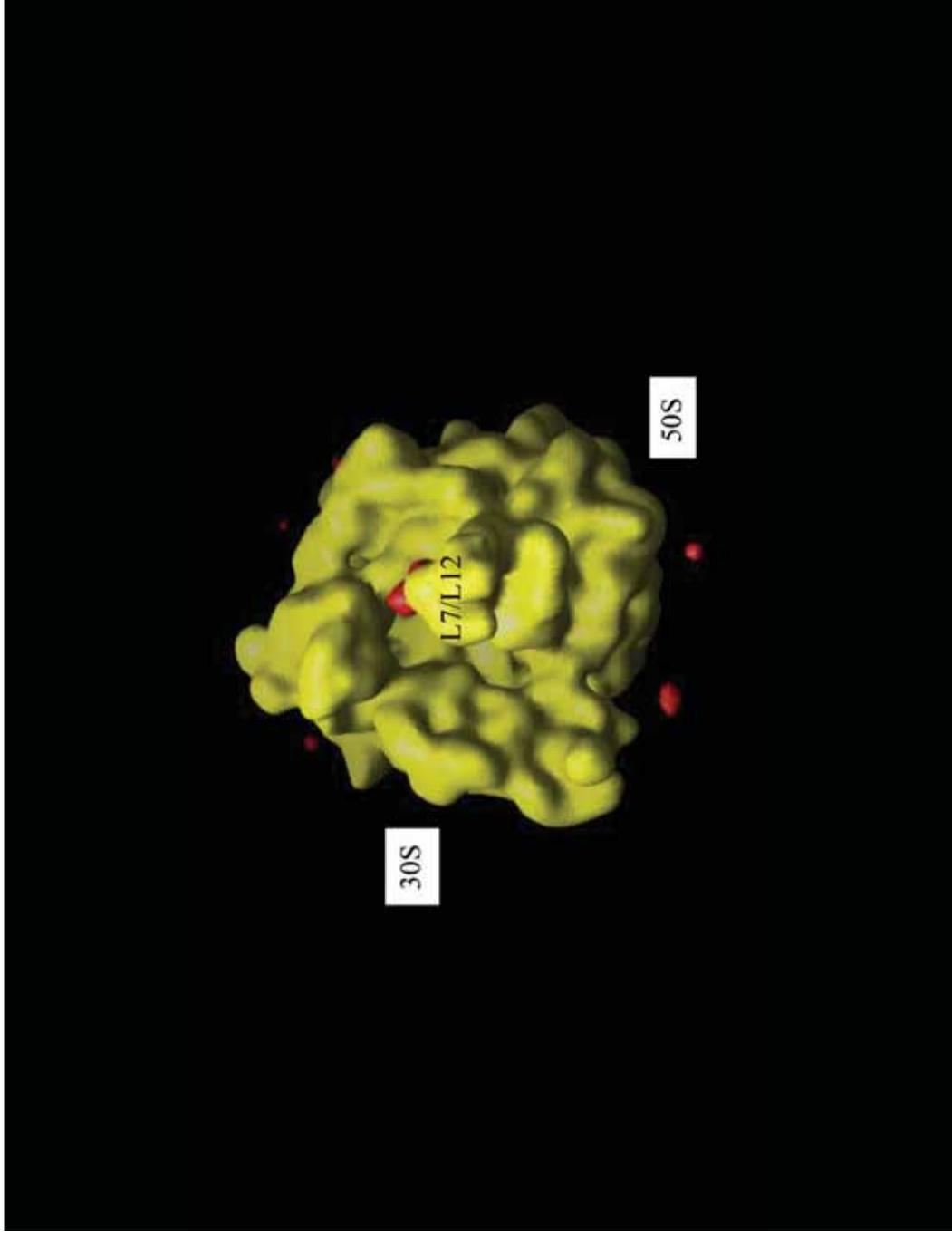


Abbildung 3.28 Kryoelektronenmikroskopische Rekonstruktion von 70S Ribosomen die den Regulationsfaktor RelA tragen. Das 70S Ribosom in der Ansicht auf den ribosomalen Stiel (L7/L12) ist in gelb dargestellt. Die kleine Untereinheit liegt auf der linken Seite, die große Untereinheit auf der rechten Seite. Der Blick ist frei auf die A-Stelle des Ribosom. Die zusätzliche Elektronendichte gegenüber einen leeren Ribosom ist in rot dargestellt. Ein roter Bereich hinter dem L7/L12 Stiel zeigt eine mögliche Bindestelle des RelA im Ribosomen. Die kryoelektronen-mikroskopische Aufnahme und 3D Rekonstruktion ist in Zusammenarbeit mit Dr. Giesebrecht, AG Prof. Dr. Christian Spahn, Charité, entstanden.

3.4.1.3 Kryoelektronenmikroskopische Analyse von RelA-Ribosomen-Komplexen

Die Analyse der ribosomalen Komplexe mit zehnfachem Überschuss an RelA ergab eine dreidimensionale Rekonstruktion mit einer Auflösung von ca. 30 Å. Zusätzlich zur Struktur des 70S Ribosoms zeigte sich in der Nähe des GTPase aktivierenden Zentrums eine zusätzliche Elektronendichte, die dem Protein RelA zugerechnet werden kann. Die zusätzliche Elektronendichte ist nicht ausreichend, um das vollständige Protein zu modellieren (Abbildung 3.28).

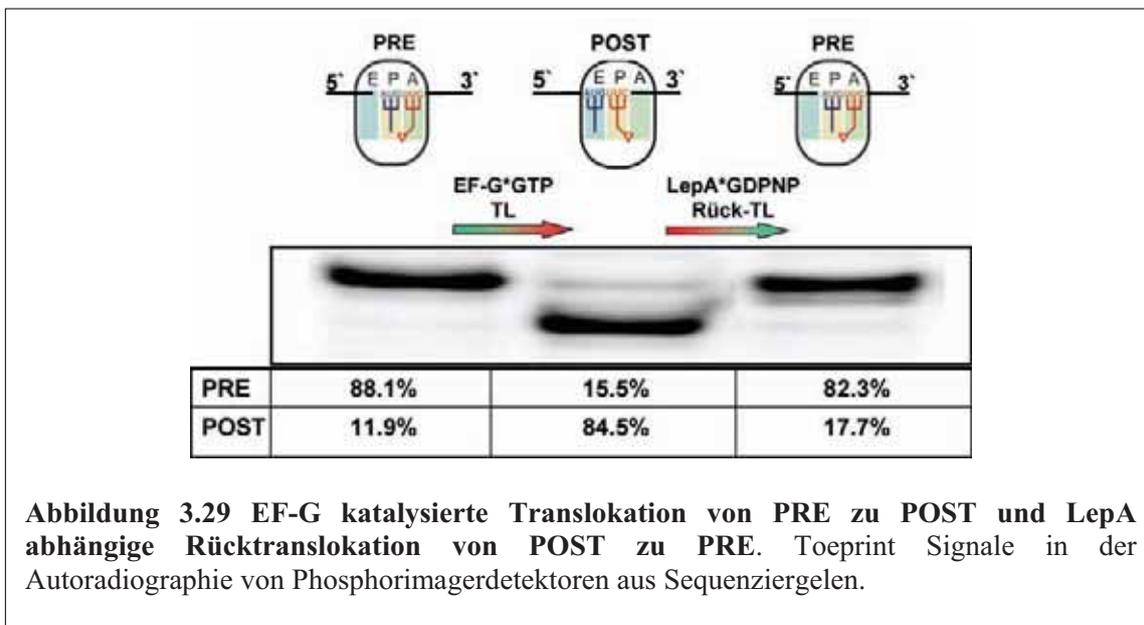
3.4.2 *In vitro* Analyse der LepA Funktion

Die Gruppe von Mankin lieferte den Hinweis, dass die universell in Bakterien konservierte GTPase LepA mit Ribosomen assoziiert sei (Colca et al., 2003). Zur Analyse von Proteinen, die auf die Translation wirken, erfolgt als Standard-Experiment die Analyse im Watanabe Experiment. Pi, PRE und POST Komplexe wurden vor und nach der Inkubation mit LepA analysiert. Die Analyse der Puromycinreaktion der drei funktionellen Zustände des Ribosoms, Pi, PRE und POST in Gegenwart und Abwesenheit von LepA lieferte den ersten Hinweis auf eine mögliche LepA- katalysierte Rücktranslokation des Ribosoms von POST nach PRE (Qin et al., 2006).

Der Verlust der Puromycin Reaktivität des POST Komplexes nach der Inkubation mit LepA legte den Verdacht nahe, dass LepA einen POST Komplex in einen PRE Komplex zurück verwandelt. Eine Dissoziation des POST Komplexes und Neuformierung eines PRE Komplexes konnte durch „Chasing“ Experimente ausgeschlossen werden. Da die Puromycin Reaktion nur die Position der tRNAs innerhalb der großen Untereinheit detektiert, sollte die Analyse der tRNA Positionen innerhalb der kleinen Untereinheit durch toeprint Analyse erfolgen.

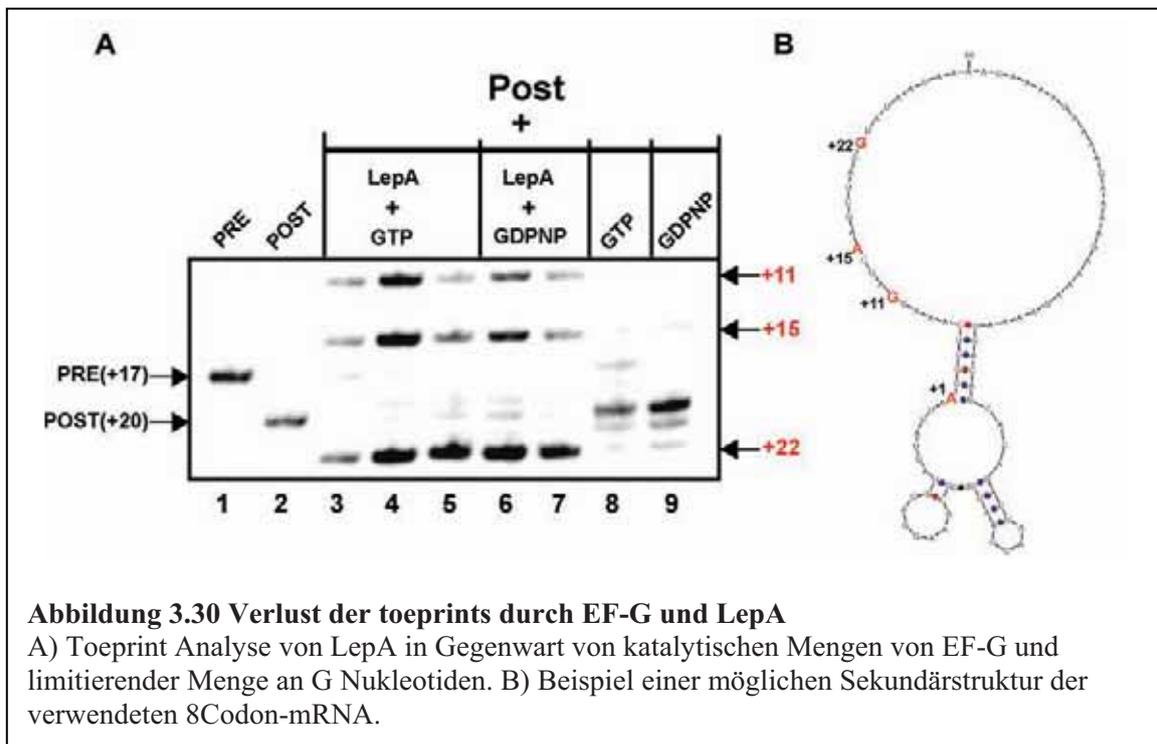
3.4.2.1 Toeprint Analyse der Rücktranslokation von POST nach PRE durch LepA

Im toeprint Experiment wird die Position des Ribosoms auf der mRNA detektiert und somit die Codon abhängige Position der tRNAs (siehe 3.3.2). Eine Bewegung in die 3' Richtung (Translokation) um ein Codon ergibt hierbei ein drei Nukleotide kürzeres toeprint Signal. Eine LepA- abhängige Rücktranslokation innerhalb der kleinen Untereinheit von einem POST zu einem PRE Zustand verlängert das toeprint Signal um drei Nukleotide, (Abbildung 3.29).



Die durch EF-G erfolgte Translokation des PRE in den POST Zustand kann durch LepA fast vollständig revertiert werden. Das Auftreten des PRE Signals zu 82% zeigt deutlich die Rücktranslokation um 3 Nukleotide durch LepA. Die Detektion der radioaktiven toeprint Signale erfolgt durch Autoradiographie von Phosphorimagerdetektoren aus Sequenziergelen.

Der Einsatz des nichtspaltbaren GTP-Analogon GDPNP in der Konzentration von 2 mM war notwendig, um dem fünffachen Überschuss an LepA über Ribosomen eine detektierbare Rücktranslokation gegenüber der katalytischen Menge an EF-G (0,6-fach per Ribosomen) zu ermöglichen. Der Einsatz von 100 μ M GDPNP bzw. von GTP in Gegenwart von EF-G und LepA führte zu einem Verlust der spezifischen toeprint Signale für PRE (+17) und POST (+20), siehe Abbildung 3.30A. Eine Beeinflussung des toeprint Signals durch Zugabe von 100 μ M GTP oder GDPNP in Abwesenheit von LepA erfolgte nicht. Die neu aufgetretenen toeprint Signale (+11, +15 und +22) können nicht durch alternative Bindung der tRNAs erklärt werden. Möglicherweise entstehen diese Signale durch Stabilisierung von Sekundärstrukturen der mRNA. Eine mögliche Sekundärstruktur, die den (+11) toeprint erklären könnte, ist in Abbildung 3.30B dargestellt. Die geringe Menge an 100 μ M GDPNP verändert den POST Komplex in diesem Experiment nicht, auch GTP zeigt keinen Einfluss auf das toeprint Signal des POST Komplexes.



Kotrollexperimente mit nichtspaltbaren GTP Analoga (GDPNP, GTP γ S und GDPCP) in den finalen Konzentration von 2 mM zeigten eine Tendenz der Rücktranslokation von POST nach PRE, (Abbildung 3.31 A und B). Im Vergleich der Stärke der Rücktranslokation durch LepA*GDPNP mit GDPNP allein ist eine erheblich stärkere Rücktranslokation durch LepA*GDPNP zu erkennen, Abbildung 3.31 A. Dieses Ergebnis konnte durch die Analyse der Puromycin Reaktivität der inkubierten POST Zustände bestätigt werden 3.31 C.

Die Analyse der Rücktranslokation im toeprint Experiment durch LepA*GTP γ S zeigt keinen Unterschied zu der Rücktranslokation mit GTP γ S allein, aber eine schwächere Rücktranslokation als mit LepA*GDPNP innerhalb der kleinen Untereinheit.

Die Analyse der Position der AcPhe-tRNA^{Phe} im ribosomalen Komplex durch Reaktion mit Puromycin bestätigte die im toeprint Signal erhaltene Position des Ribosoms nach Inkubation mit nichtspaltbaren GTP Analoga, allerdings mit der Ausnahme der Inkubation mit GTP γ S. Durch die Inkubation mit GTP γ S allein entsteht eine so genannte Hybridposition (A/P), in der sich die Peptidyl-tRNA in der kleinen Untereinheit in der A-Stelle befindet (toeprint) und in der großen Untereinheit weiterhin in der P-Stelle verbleibt und Puromycinreaktivität zeigt, siehe Abbildung 3.31 C und D.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in Gegenwart von LepA und GTP γ S eine vollständige Rücktranslokation innerhalb beider Untereinheiten.

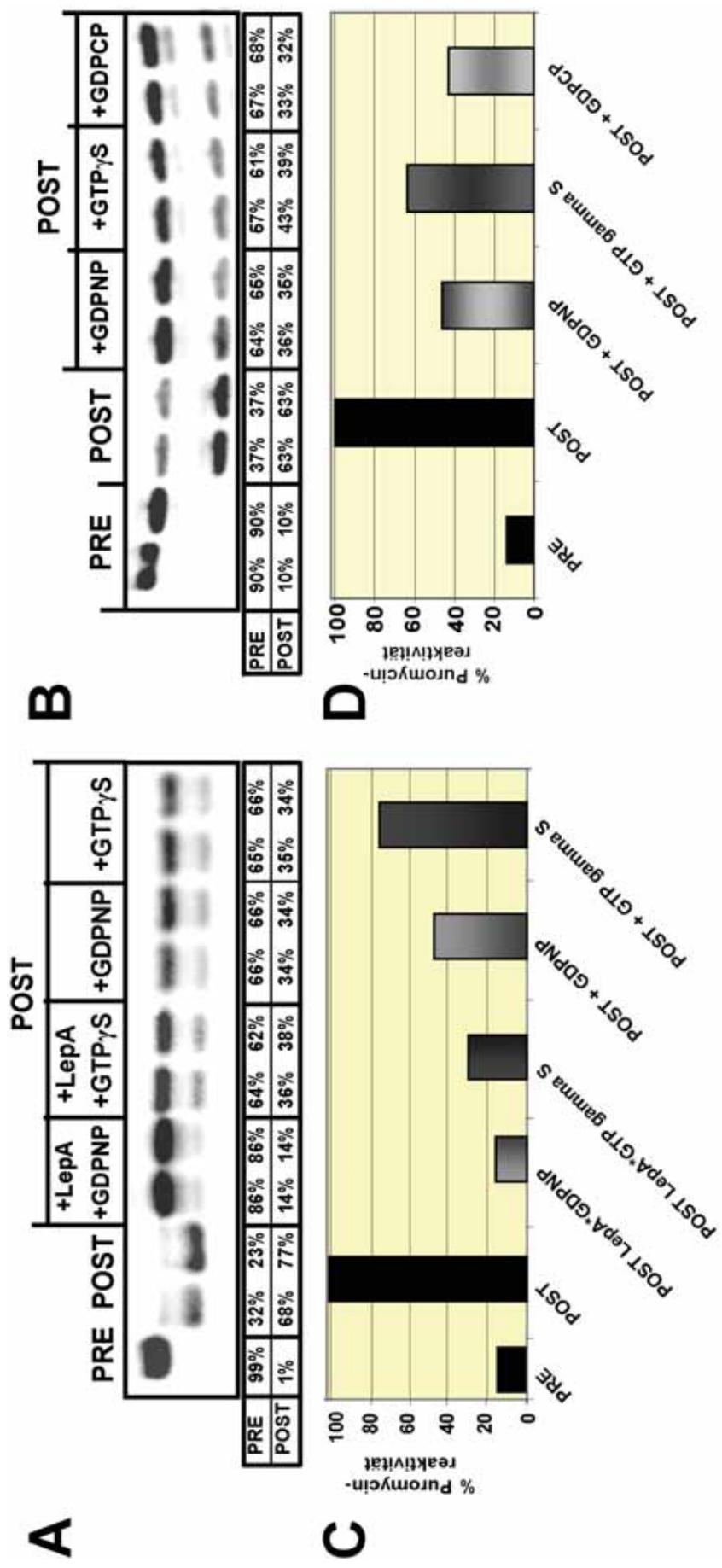
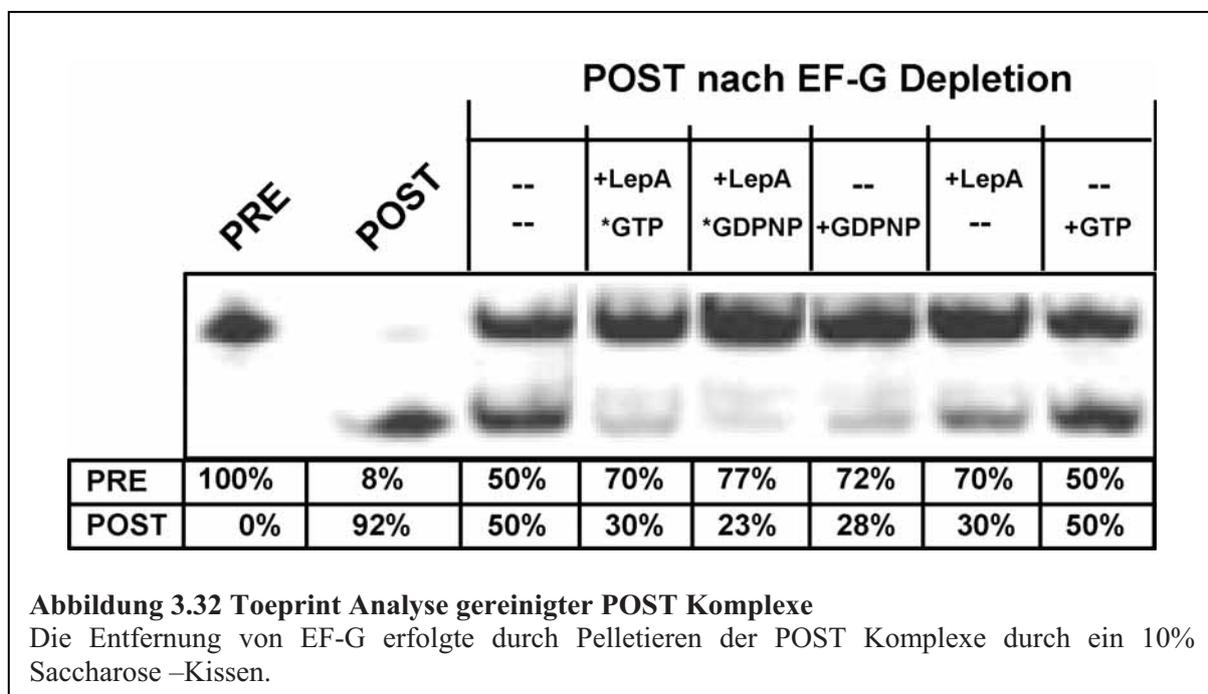


Abbildung 3.31 Einfluss von nichtspaltbaren GTP Analoga auf POST Komplexe

A) Toeprint Analyse: Einfluss von GDPNP, GTP γ S und GDPCP auf POST Komplexe; B) Vergleich der Rücktranslokation durch LepA und GTP Analoga; C und D) Puromycin Reaktivität zu A und B.

3.4.2.2 EF-G Entfernung zur Analyse der LepA abhängigen Rücktranslokation

Zur Herstellung der POST Komplexe erfolgte die Zugabe von katalytischen Mengen von EF-G zu PRE Komplexen. Bei einer Zugabe von 0,6-fach EF-G über Ribosomen und einer Besetzung der spezifischen tRNA Bindepositionen im Watanabe Experiment von unter 60% mit der verwendeten 8Codon-mRNA (vergleiche 3.1.7) kann ein Einfluss von EF-G in der Gegenwart von nichtspaltbaren GTP Analoga nicht ausgeschlossen werden. Eine Induktion der Rücktranslokation durch EF-G*GDPNP soll durch Entfernung des EF-G ausgeschlossen werden. Zur Analyse von EF-G freien POST Zuständen wurden die POST Zustände zur Abtrennung des EF-G durch ein 10%iges Saccharose Kissen bei 48000 rpm (TLA100.3 Rotor) zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Komplexe zeigen im toeprint Experiment eine Mischung aus PRE und POST Zustand mit einem Anteil von jeweils 50% PRE und POST. Dennoch konnten diese Komplexe zum Nachweis der LepA*GTP spezifischen Rücktranslokation genutzt werden. Die Komplexe weisen nach der Inkubation mit LepA*GTP einen Anteil von 86% PRE Zustand auf, eine ebenso starke Rücktranslokation wie durch LepA*GDPNP. Die Kontrollreaktion, in der nur GTP zu den POST Komplexen zugegeben wurde, verblieb unverändert zur Reaktion des POST Komplexes nach der Zentrifugation, siehe Abbildung 3.32.

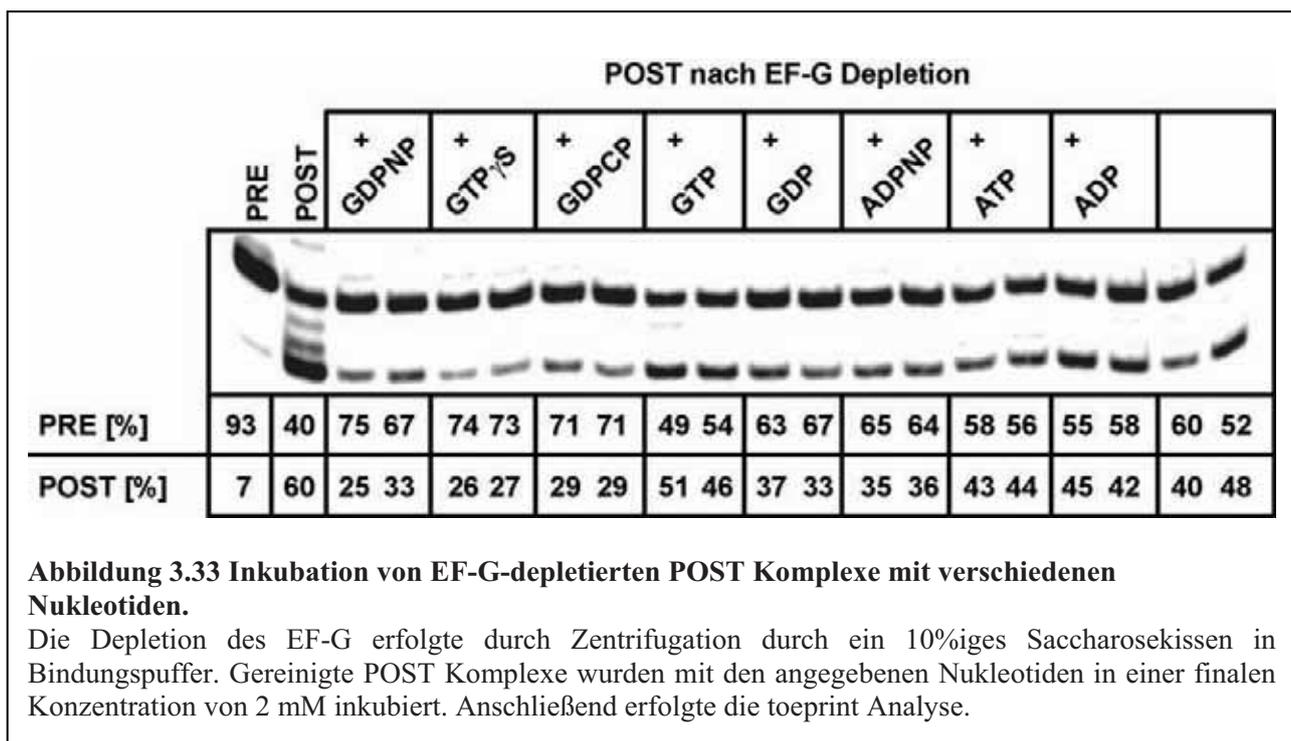


Bei Zugabe von LepA ohne Nukleotide erfolgte eine intermediäre Umwandlung der POST Komplexe. Es zeigte sich ein Anteil von 76% PRE nach der Inkubation mit LepA. Ein Einfluss von EF-G auf die Rücktranslokation konnte ausgeschlossen werden. LepA bewirkt

unabhängig von GTP eine Rücktranslokation von POST zu PRE, das Ausmaß der Rücktranslokation in Gegenwart von LepA*GTP weist darauf hin, dass GTP die LepA abhängige Rücktranslokation stimuliert, ein möglicher Hinweis auf die Bedeutung der GTP Spaltung für ein Recycling des G Proteins und somit einer Stimulierung der Rücktranslokation.

3.4.3 LepA unabhängige Rücktranslokation

Das unerwartete Ergebnis der Rücktranslokation von POST Komplexen zu PRE Komplexen in Gegenwart und Abwesenheit von EF-G durch nicht-spaltbare GTP Analoga tritt auch im bedingten Maße für das nicht-spaltbare ATP Analogon (ADPNP) und GDP auf, siehe Abbildung 3.33. GTP, ATP und ADP zeigen keine Veränderung der Mischung aus PRE und POST Komplexen im Experiment mit EF-G depletierten POST Zuständen. Die Stabilisierung des PRE Zustandes gegenüber dem POST Zustand scheint eine intrinsische Funktion des Ribosomen zu sein. Obwohl die Entfernung des EF-G durch Zentrifugation nicht vollständig erfolgt, es können in der SDS PAGE noch Spuren von EF-G in den zentrifugierten POST Komplexen nachgewiesen werden, kann ein Einfluss von EF-G ausgeschlossen werden. Die Menge des detektierten EF-G lag unter 5% der Stärke der Kontrollbande des ribosomalen Protein L2 (Daten nicht gezeigt). Eine bevorzugte Bildung des PRE Komplex konnte auch durch Entfernung von EF-G durch Affinitätsreinigung über Nickelagarose erreicht werden



(Kapitel 3.3.1.6). Auch die Füllung der ribosomalen E-Stelle durch cognate deacyl-tRNA führte zur vollständigen Ausbildung des PRE Zustandes und nicht wie erwartet zu einem POST Komplex (Kapitel 3.3.1.7).

3.4.4 EF-G abhängige Translokation

Eine Translokation von PRE zu POST durch EF-G*GDPNP erfolgte innerhalb von 60 Minuten zu 80%, siehe Abbildung 3.34. Die Zugabe von EF-G ohne Zugabe von Nukleotiden ergab eine fast vollständige Translokation. 92%, bzw. 88% Translokation sind nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C nachweisbar. Im Kontrollexperiment ohne EF-G tritt nur der PRE Komplex auf, GDPNP allein führt zu keiner Translokation. Die Analyse der Puromycin Reaktivität zeigte, neben der Translokation innerhalb der kleinen Untereinheit (toeprint), ein differenziertes Ergebnis innerhalb der großen Untereinheit. PRE Komplexe die mit EF-G*GDPNP inkubiert wurde zeigen in beiden Untereinheiten eine Translokation der tRNAs zu 80%. PRE Komplexe, die mit EF-G ohne Nukleotide inkubiert wurden, zeigen im toeprint eine fast vollständige Translokation innerhalb der kleinen Untereinheit, aber keine Puromycin Reaktion; und somit keine Translokation innerhalb der großen Untereinheit. Hier wird eine noch nicht beobachtete Hybrid Position P/A; Peptidyl-tRNA in der kleinen Untereinheit in der P-Stelle und in der großen Untereinheit in der A-Stelle, nachgewiesen.

Ob die Translokation von der Spaltung der energiereichen Verbindung GTP abhängig, oder ob EF-G in der GTP Konformation (EF-G*GDPNP) einen PRE Komplex stabilisiert und dadurch eine Rücktranslokation, bzw. keine Translokation herbeiführt, sollte im folgenden Experiment analysiert werden. Das GDPNP von Sigma (G0635; G8634) ist in einer 75-85%igen Reinheit erhältlich. Die HPLC Analyse des GDPNP zeigte neben dem Hauptsignal noch weitere Peaks für Verbindungen, die bei 260nm absorbieren. Da ein erheblicher Anteil an GTP in der Präparation von GDPNP nicht ausgeschlossen werden kann, sollte eine Reinigung des GDPNP erfolgen. Verunreinigungen von G-Nukleotidverbindungen wurden auch von anderen Gruppen beschrieben, z.B. ist für GDP ein Anteil von bis zu 2% GTP beschrieben (Zavialov et al., 2005). Die Reinigung des GDPNP zur Abtrennung der Nebenpeaks erfolgte durch HPLC und anschließender Gelfiltration zum Entsalzen, siehe Material und Methoden, Kapitel 2.6.10.1.

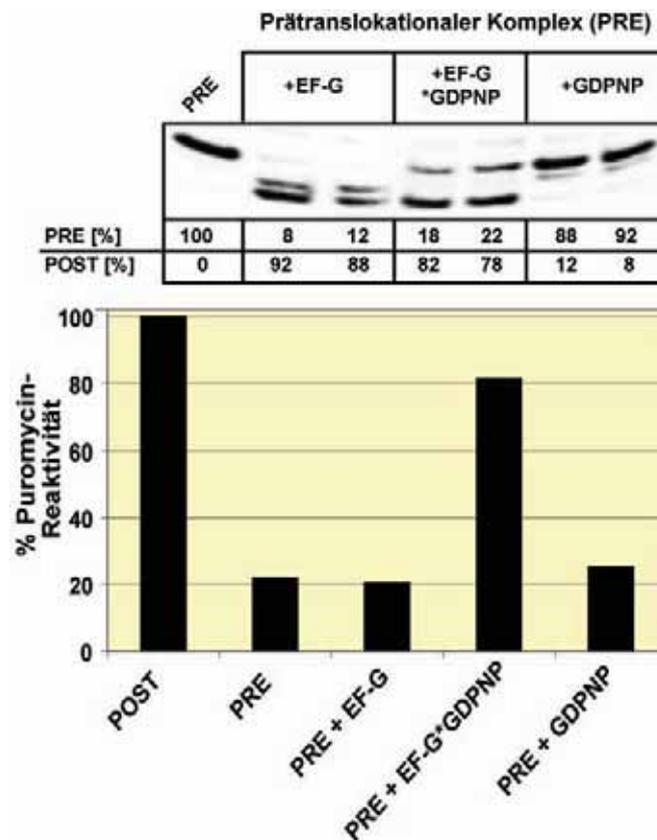
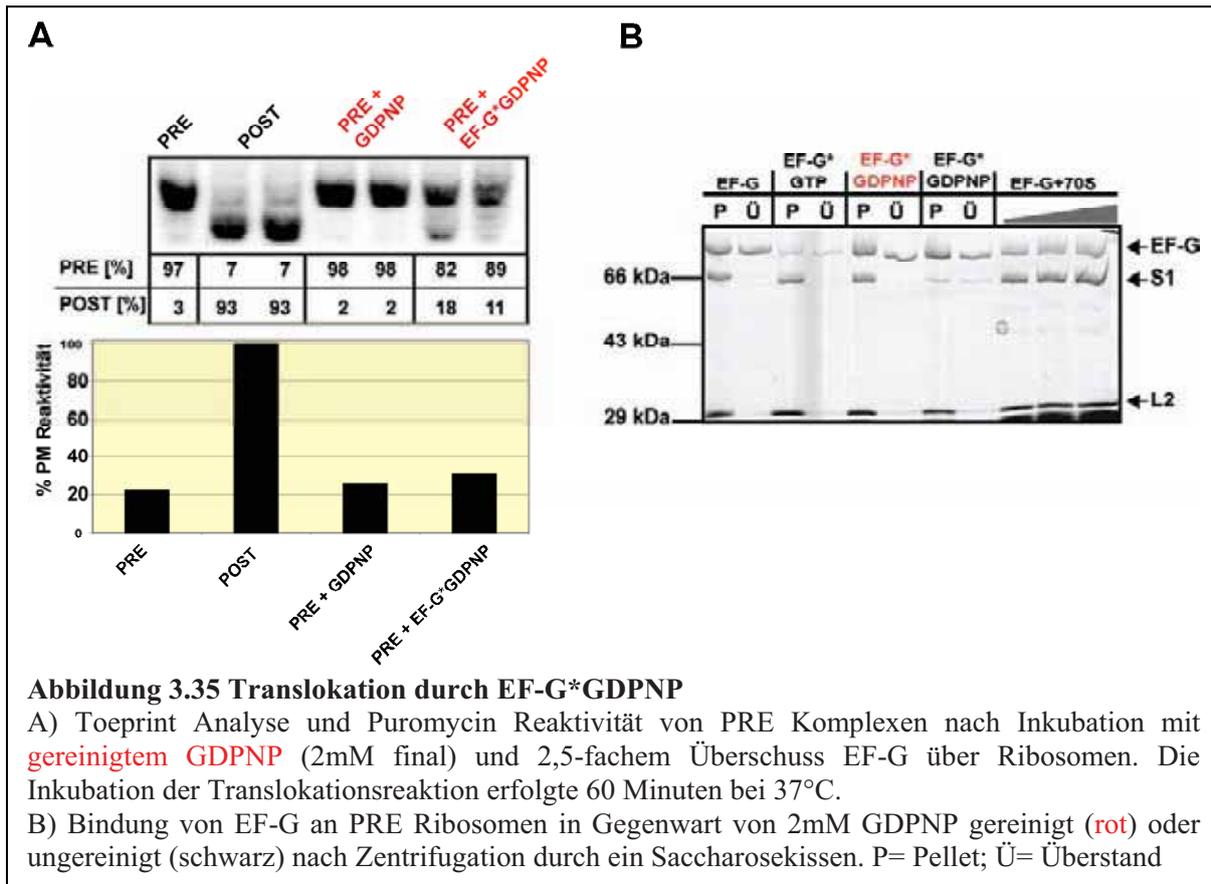


Abbildung 3.34 Translokation durch EF-G*GDPNP

Toeprint Analyse und Puromycin Reaktivität von PRE Komplexen nach Inkubation mit **ungereinigtem** GDPNP (2 mM final) und 2,5-fachem Überschuss EF-G über Ribosomen. Die Inkubation der Translokationsreaktion erfolgte 60 Minuten bei 37°C.

Translokationsexperimente zum Vergleich des gereinigten mit dem ungereinigten GDPNP (Abbildung 3.34) wurden durchgeführt. Die Translokation von PRE nach POST erfolgte durch EF-G innerhalb von 60 Minuten nur zu 11%- 18% bei Verwendung des gereinigten GDPNP, im Gegensatz zu einer Translokation von 80% bei Verwendung des ungereinigten GDPNP, Abbildung 3.35. Eine nahezu vollständige Translokation von bis zu 93% wird mit EF-G*GTP erreicht. Innerhalb der großen Untereinheit verbleibt die Peptidyl-tRNA unverändert in der A-Stelle, es ist nur eine geringe Steigerung der Puromycinreaktivität gegenüber einem unbehandelten PRE Komplex nachzuweisen.



Um einen Verlust des GDPNP durch die Prozedur der HPLC Reinigung und Entsalzung auszuschließen, erfolgten Bindungsexperimente von EF-G an PRE Komplexe in Gegenwart von gereinigten und ungereinigten GDPNP, Abbildung 3.35B.

Die Bindung des EF-G in Gegenwart von gereinigtem und ungereinigtem GDPNP an PRE Komplexe zeigt keinen Unterschied. In beiden Fällen können 1 EF-G per Ribosom nach der Zentrifugation durch ein 10%iges Saccharosekissen nachgewiesen werden. In Gegenwart von GTP ist die Bindung des EF-G vermindert, nur 0,32 EF-G/70S. Unerwarteter Weise zeigt auch das Nukleotid freie EF-G mit 0,75 EF-G/70S starke Bindung an den PRE Komplex. Dadurch konnte keine abschließende Aussage über die Nutzbarkeit des gereinigten GDPNPs gemacht werden, bestätigt aber zumindest die partielle Translokation durch die Bindung des Nukleotid freien EF-G an PRE Komplexe, Abbildung 3.35 B.

Zur weiteren Klärung der Nutzbarkeit des GDPNP sollte das gereinigte und entsalzte GDPNP durch Elektronen-Spray-Ionisierungs-Massenspektroskopie (ESI-MS) analysiert werden. In der massenspektroskopischen Analyse zeigte sich ein winziges Signal bei 564,9 m/z im Negativ-Modus, das dem $(\text{Na})_2\text{GDPNP}^-$ entspricht. Zwei weitere, dominierende Signale zeigten sich bei 463,0 m/z und 441,0 m/z. Diese Signale könnten einer Verbindung entsprechen, die einem Bruchstück des GDPNP zugeordnet werden könnte. Eine weitere

Möglichkeit ist, dass es sich bei diesen detektierten Massen um das Edukt der GDPNP Synthese, Guanosin-di-phospho-amitid (GDPN) handelt, Abbildung 3.36.

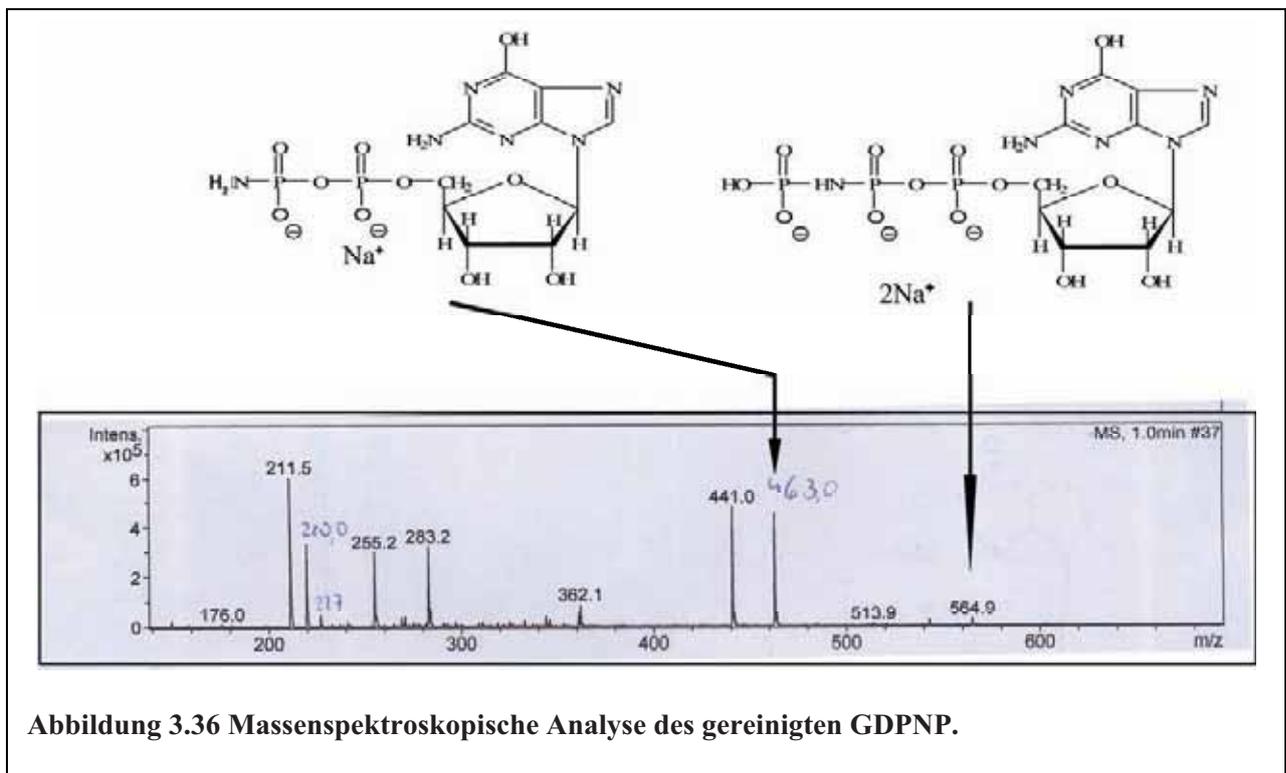


Abbildung 3.36 Massenspektroskopische Analyse des gereinigten GDPNP.

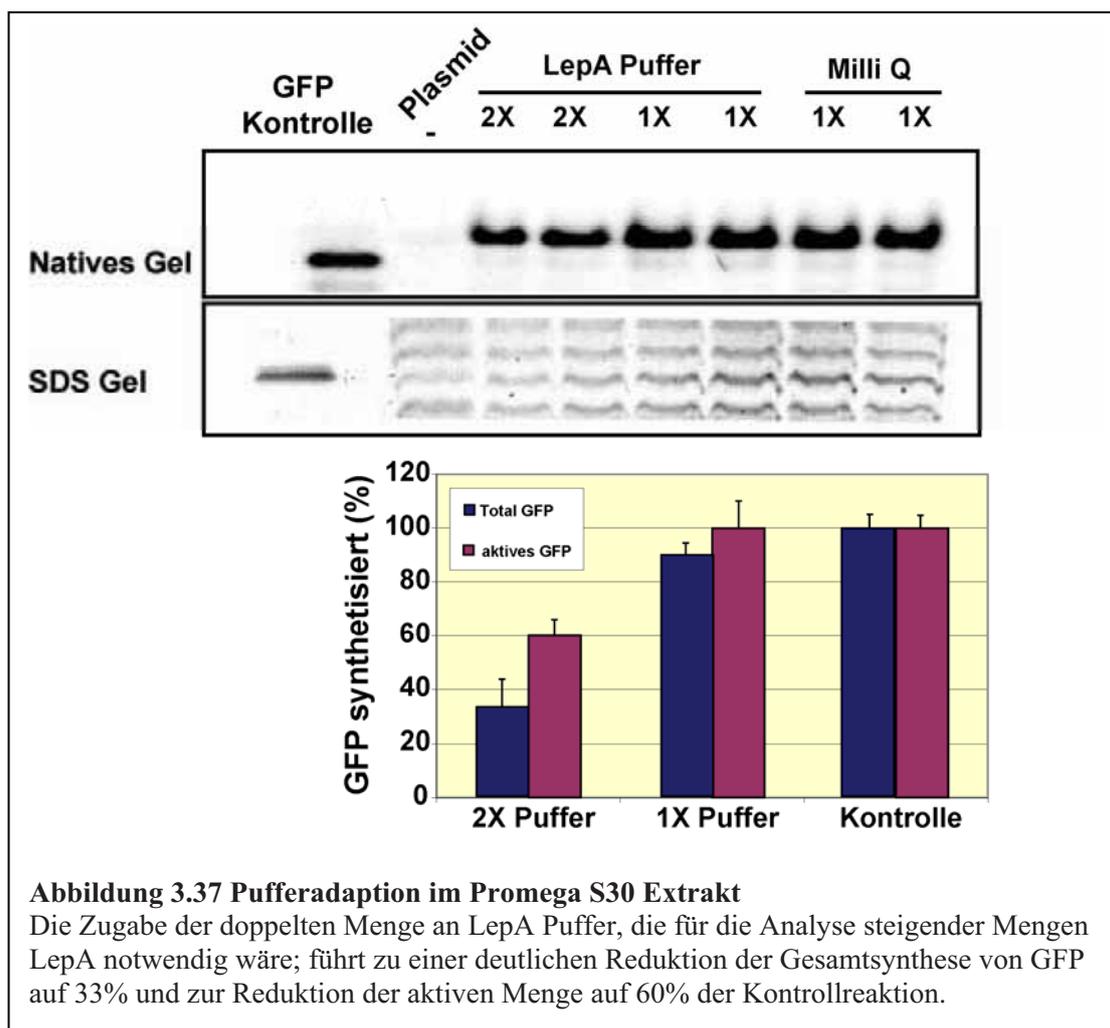
3.4.5 Bedeutung der LepA abhängigen Rücktranslokation für die Proteinsynthese

Im gekoppelten Transkriptions-/ Translations-System von Roche (RTS System) können große Mengen des Reporterproteins GFP synthetisiert werden, es sind Proteinmengen von 4mg/ml GFP synthetisierbar (Dinos et al., 2004). Allerdings ist die aktive Fraktion des Proteins unter Standard Konditionen (30°C) unbefriedigt gering, nur ca. 50% des synthetisierten Proteins ist aktiv (Dinos et al., 2004). Trotz der geringen aktiven Fraktion bietet das gekoppelte Transkriptions-/Translations-System gute Voraussetzungen zur Analyse von Hemmstoffen der Proteinsynthese oder wie hier zur Analyse von LepA, da sowohl positive als auch negative Effekte detektiert werden können.

Die Analyse des synthetisierten GFP erfolgt auf zwei getrennten Wegen: Die Gesamtmenge des synthetisierten Proteins kann in der SDS PAGE durch Vergleich der GFP Bande mit einer Standardmenge an gereinigtem GFP ermittelt werden. Die Detektion der aktiven Menge des GFP erfolgt über die intrinsische Fluoreszenz des GFP aus einem nativen PAGE Gel. Das Verhältnis der aktiven Menge zu der Gesamtmenge an GFP ergibt die aktive Fraktion.

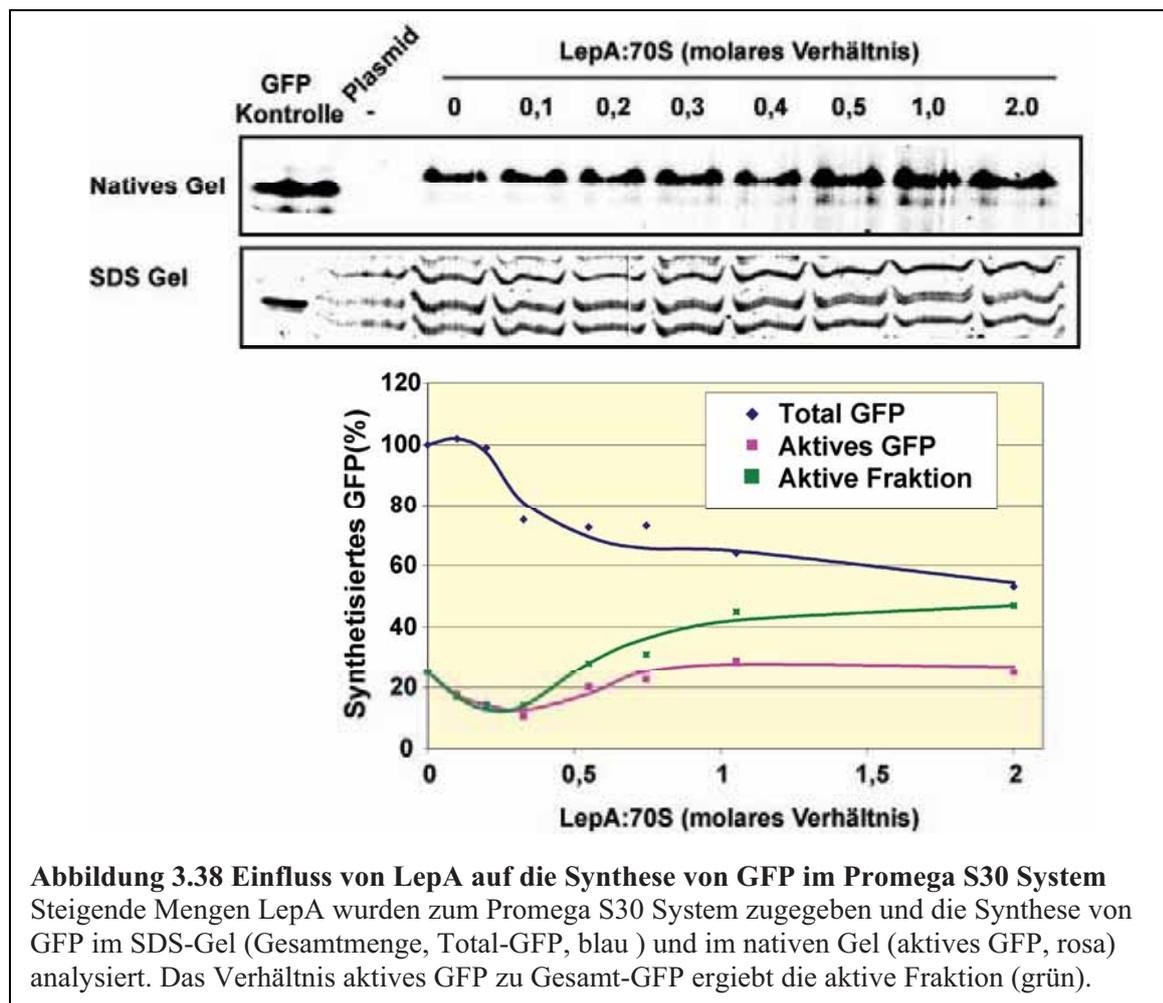
3.4.5.1 Einfluss von LepA auf die GFP Synthese im gekoppelten Transkriptions- / Translations- System von Promega (Promega, S30 Extrakt)

Das gekoppelte *in vitro* Transkriptions- / Translations-System von Promega beruht ebenfalls, wie das RTS System von Roche, auf dem so genannten S30 Extrakt (zytosolische Fraktion) aus *E. coli*. Durch Zugabe einer Aminosäuremischung und dem Plasmid erfolgt die Transkription und Translation des Plasmid-codierten Gens. Das oben verwendete Plasmid für die *in vitro* Expression von GFP unter dem T7 Promotor ist auch im Promega System einsetzbar. Da der 10 µl Ansatz des S30 Systems kaum Platz für das Pufferfenster aufwies, sollte eine Volumenerweiterung des 10 µl Ansatzes getestet werden. Die Zugabe von einfacher und doppelter Menge LepA Puffer wurde gegenüber der Kontrolle mit Wasser (MilliQ) getestet. Die Puffererweiterung wäre notwendig, um ansteigende Mengen LepA zu zugeben und somit den Einfluss auf die GFP Synthese zu untersuchen. Die Analyse der aktiven Menge GFP zeigte, dass durch Zugabe der doppelten Puffermenge die Aktivität des synthetisierten GFP auf 60% der Kontrolle absinkt (Abbildung 3.37). Die Auswertung der



Gesamtmenge an GFP erwies sich als schwierig, da das synthetisierte GFP mit einer Bande des S30 Extrakts überlagert. Trotzdem zeigte sich hier, dass die Zugabe der doppelten Puffermenge zu einer Reduktion auf 33% der GFP Menge der Kontrolle führt. Die Zugabe der einfachen Puffermenge zeigt keinen Einfluss auf die GFP Synthese, aktive Menge und Gesamtmenge an GFP entsprechen der Kontrolle.

Zur Analyse ansteigender LepA Mengen erfolgte die Verwendung von 25 μ l Promega S30 Ansätzen. Dadurch, und durch Verwendung von konzentrierterer Plasmidlösung, konnte das Pufferfenster für die Zugabe von LepA bis zu einem zweifachen molaren Überschuss über Ribosomen erweitert werden. Die Gesamtmenge der GFP Synthese wurde in der SDS PAGE ermittelt, die Bestimmung der aktiven Menge erfolgte aus der Fluoreszenz des GFP im nativen Gel. Ab einer Zugabe von 0,3-fach LepA kommt es zu einer Reduktion der Gesamtsynthese von GFP im Promega S30 System, gleichzeitig ist aber ein stetiger Anstieg der aktivem GFP Menge zu detektieren (Abbildung 3.38). Die aktive Fraktion (grün) steigt bis auf 50% an, immerhin eine Verdopplung der aktiven Fraktion. 100% aktives Protein konnte im Promega S30 Extrakt nicht detektiert werden.



3.4.5.3 Vergleich der GFP Synthese in Promega S30 und in Roche RTS 100

Ein direkter Vergleich der GFP Synthese in den beiden *in vitro* Transkriptions-/ Translations-Systeme zeigte, dass die Gesamtsynthese des GFP im Promega S30 System auf 16% der GFP Synthese im RTS System reduziert ist. Im RTS System sind 50% des synthetisierten GFP aktiv. Im Promega System zeigen sich nur 30% des GFP aktiv (Abbildung 3.39).

Die Zugabe von LepA zum RTS System führt zu einer Reduktion der Gesamtmenge bei

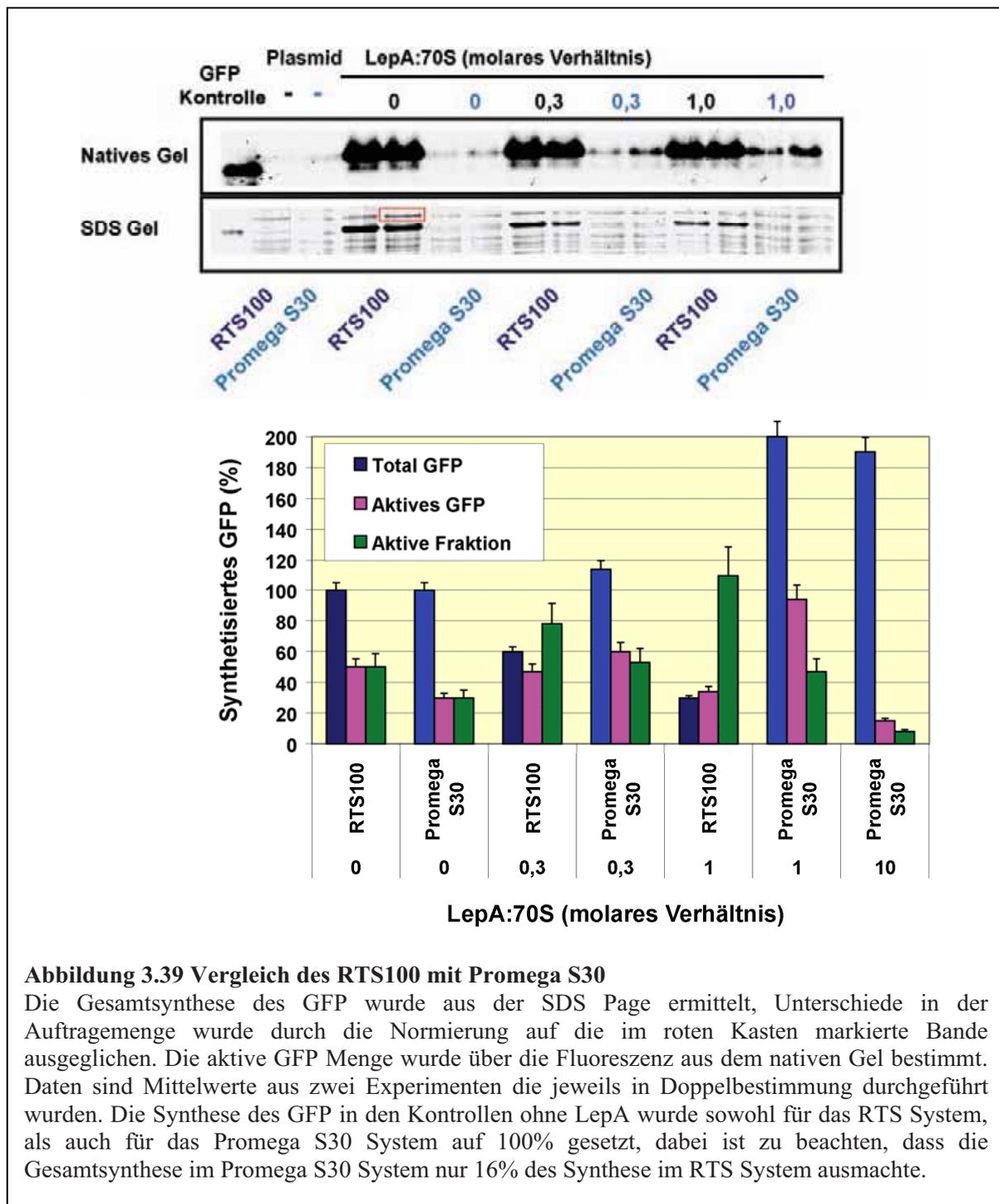


Abbildung 3.39 Vergleich des RTS100 mit Promega S30

Die Gesamtsynthese des GFP wurde aus der SDS Page ermittelt, Unterschiede in der Auftragemenge wurde durch die Normierung auf die im roten Kasten markierte Bande ausgeglichen. Die aktive GFP Menge wurde über die Fluoreszenz aus dem nativen Gel bestimmt. Daten sind Mittelwerte aus zwei Experimenten die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Die Synthese des GFP in den Kontrollen ohne LepA wurde sowohl für das RTS System, als auch für das Promega S30 System auf 100% gesetzt, dabei ist zu beachten, dass die Gesamtsynthese im Promega S30 System nur 16% des Synthese im RTS System ausmachte.

gleichzeitiger Steigerung der aktiven Fraktion des GFP. Bei Zugabe von 0,3fach LepA pro 70S werden schon 80% aktives GFP erhalten, 100% aktives GFP werden bei stöchiometrischer LepA Zugabe erreicht.

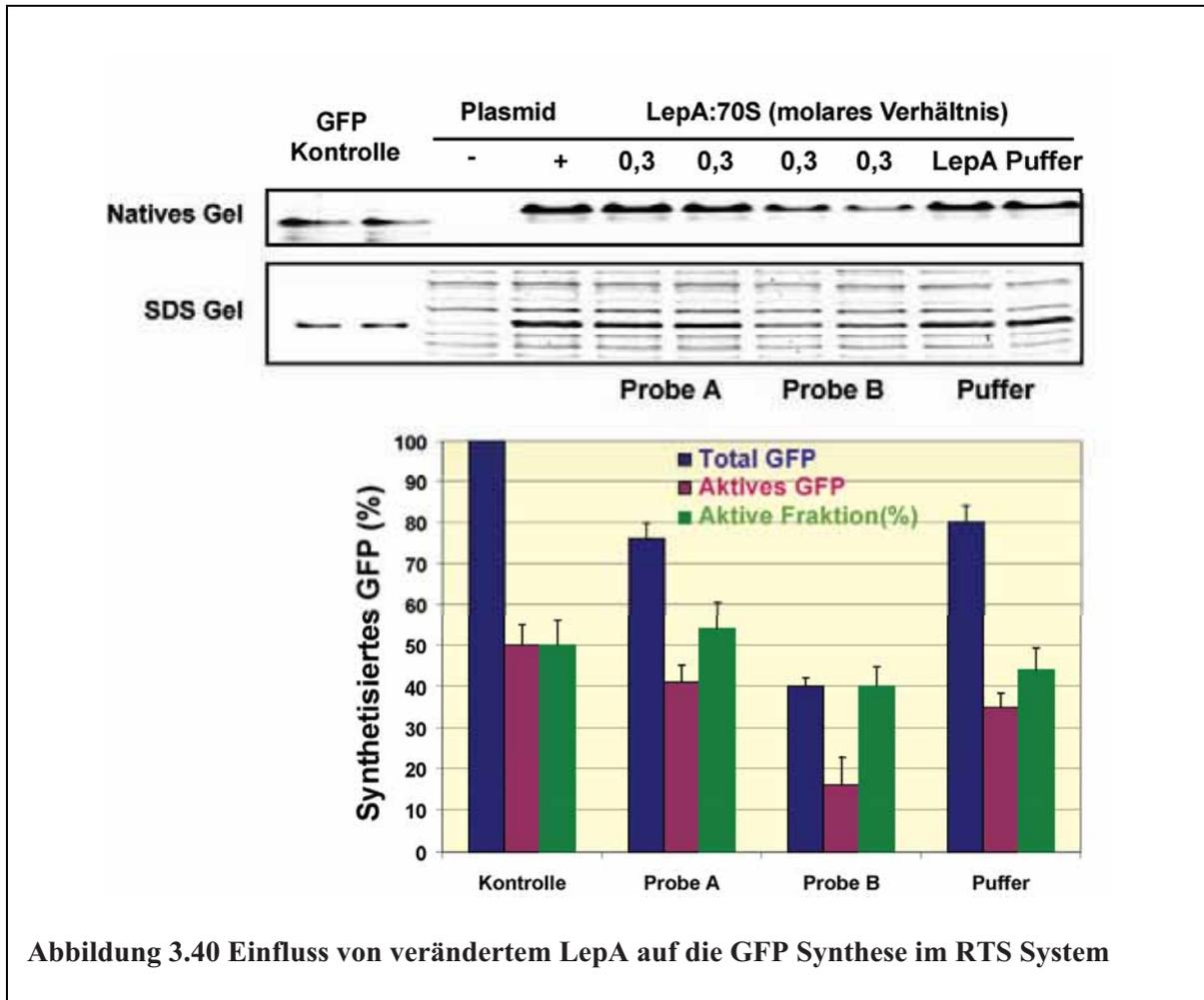
Hingegen zeigt sich im Promega S30 System, dass die Zugabe von LepA zu einer deutlichen Steigerung der Gesamtsynthese von GFP führt. Bei Zugabe von stöchiometrischen Mengen von LepA zum Promega System wird die Gesamtsynthese auf 200% der Kontrolle ohne LepA Zugabe (bzw. 32% der RTS Kontrolle ohne LepA Zugabe) erhöht. Die Synthese von aktiven GFP wird ebenfalls gesteigert. Es wird eine aktive Fraktion von 50% erreicht. Bei Zugabe eines 10-fachen Überschuss an LepA über Ribosom erfolgt die Gesamt GFP Synthese unverändert, aber es können nur noch 8% aktives GFP detektiert werden. Die Analyse des Bereichs zwischen stöchiometrischer LepA Zugabe und zehnfachem Überschuss von LepA über Ribosom konnte aufgrund nur noch geringer Mengen der LepA Präparation nicht mehr durchgeführt werden.

3.4.5.4 Überexpression von LepA in *E. coli*

Die Überexpression von LepA in *E. coli* ist toxisch für die Zellen (Qin et al., 2006). Nach Induktion der Expression kehren die Zellen schnell in die stationäre Wachstumsphase ein. Optische Dichten von größer als 0,6 A_{560} können nicht erreicht werden (Qin et al., 2006) Karim und Pech, unpubliziert). Die Toxizität der Überexpression des LepA fördert Mutationen, die inaktives LepA bzw. einen inaktiven Promotor enthalten. Mutationen im Promotor, die zum Ausbleiben der Proteinsynthese und Mutationen in der Aminosäuresequenz, insbesondere in der G Domäne (Domäne I) konnten durch Sequenzanalyse der Plasmide nach Induktion der Expression gefunden werden (Karim, persönliche Mitteilung). Im Falle der Inaktivierung des Promotors konnte keine Expression von LepA nachgewiesen werden. Der Hinweis auf die Veränderung der codierenden Sequenz im LepA Plasmid wurde durch das Ausbleiben des erwarteten Effekts von isoliertem LepA auf die GFP Synthese im RTS System (Abbildung 3.40), bzw. am Ausbleiben der Rücktranslokation im toeprint Experiment erhalten (Daten nicht gezeigt).

Die erste Präparation des LepA Proteins (Probe A) zeigte keine Veränderung der Gesamtsynthese und keine Verbesserung der aktiven Fraktion, die bei Zugabe der katalytischen Menge von 0,3-fach LepA über Ribosomen erwartet wurde. Die zweite Präparation des LepA Proteins (Probe B) hemmte die Gesamtsynthese auf 40% der Kontrolle, aber die Menge an aktiven GFP wurde unerwarteter Weise ebenfalls reduziert. Die aktive Fraktion des in Gegenwart von Probe B synthetisierten GFP lag nur bei 40%. Leider konnte

den verwendeten Proteinen der Probe A und B noch keine Veränderung der Aminosäuresequenz zugeordnet werden. Eine Analyse der aufgetretenen Mutationen könnte Aufschluss über die molekularen Mechanismen der Aktivierung bzw. der Inaktivierung des LepA liefern.



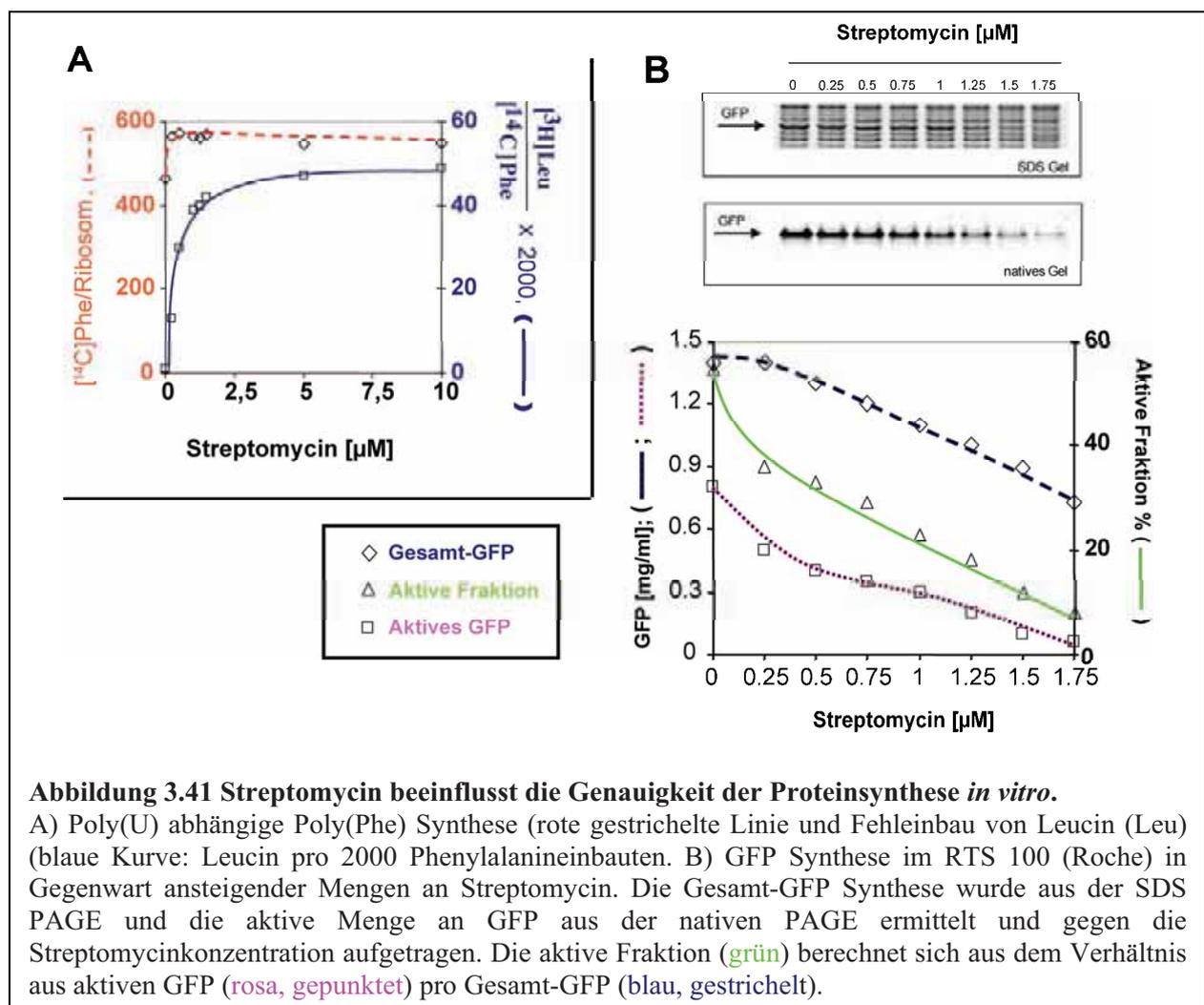
3.4.6 Auswirkungen von Aminoglykosid-Antibiotika auf die Proteinsynthese

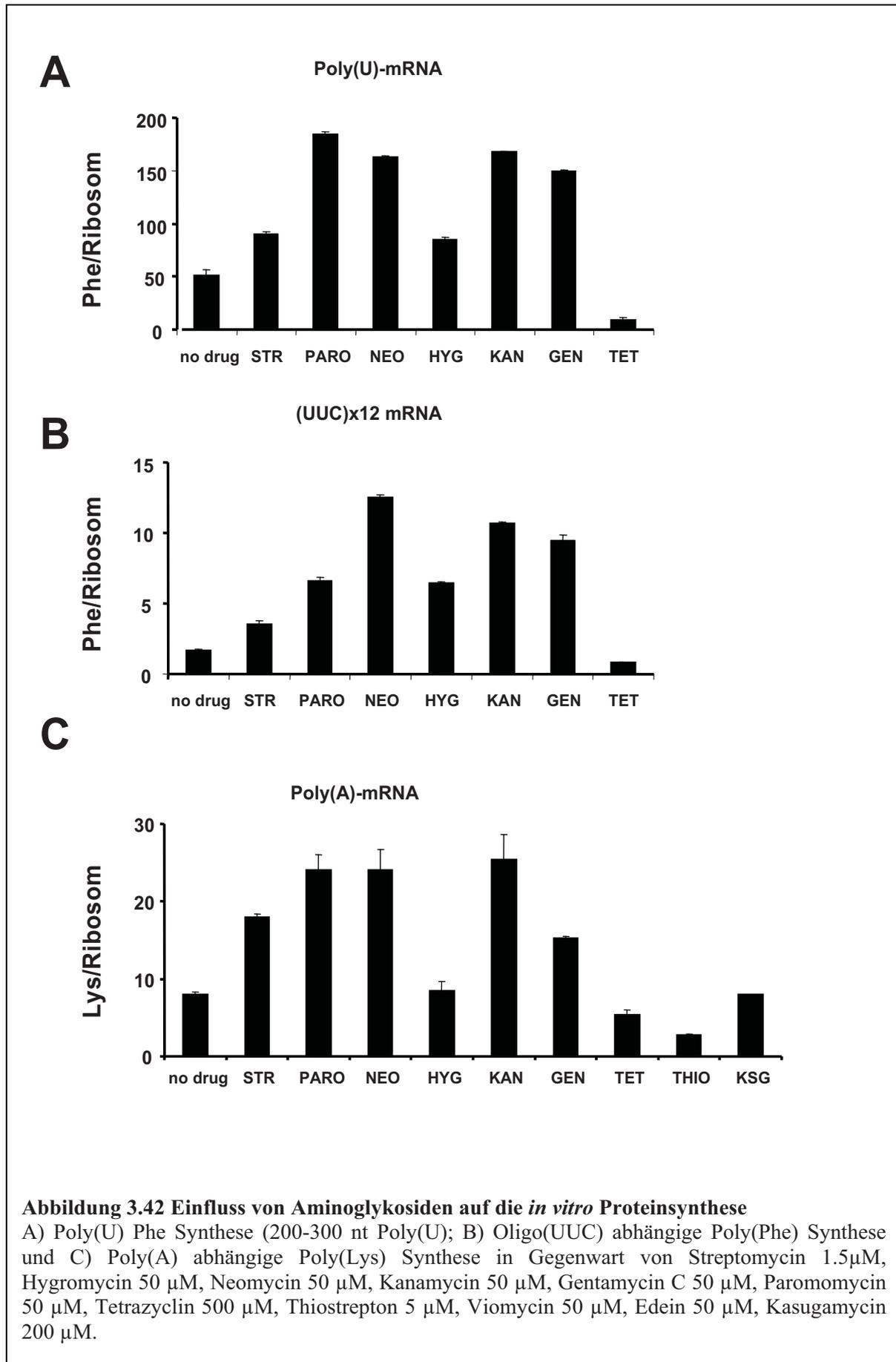
Aminoglykosid-Antibiotika sind bekannt für ihre Fehler induzierende Wirkung auf die Proteinbiosynthese. Dieser Effekt konnte aber nicht mit der bakteriziden Wirkung dieser Antibiotika verknüpft werden, da auch Mutationen in den ribosomalen Proteinen S4 und S5, so genannte *ram* Stämme (*ribosome ambiguity mutant*) diese hohe Fehlerrate zeigen, aber nicht letal sind (Zimmermann et al., 1971). Die Zugabe von 1,3 μ M Streptomycin führte *in vitro* in

der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese zu einer Erhöhung der Fehleinbauten des Leucin um den Faktor 30, Abbildung 3.5, Kapitel 3.1.4.

3.4.6.1 Effekte der Aminoglykoside auf die *in vitro* Proteinsynthese

Der Vergleich der Effekte der Aminoglykoside in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese mit dem gekoppelten Transkriptions-/ Translations-System (RTS100, Roche)), beispielhaft für Streptomycin, zeigte den Einfluss des Streptomycin auf die Genauigkeit der *in vitro* Proteinsynthese, Abbildung 3.41. Bereits Konzentrationen von 0,5 μM Streptomycin führten zu einer Steigerung des Fehlers um den Faktor 15. Neben dem Einfluss auf die Genauigkeit der Proteinsynthese erhöht die Zugabe des Streptomycins die Synthese des Poly(Phe), eine Steigerung um 25% konnte bei 0,5 μM Streptomycin erzielt werden. Hingegen ist im gekoppelten System mit der natürlichen mRNA für GFP keine Steigerung der Synthese zu beobachten. Hier zeigt sich dosisabhängig der Rückgang der Gesamtsynthese, aber auch der Einfluss auf die Genauigkeit. Die aktive Fraktion (das Verhältnis aus aktiven GFP zu Gesamt-GFP) nimmt mit steigender Konzentration an Streptomycin ab.





3.4.6.2 Steigerung der Proteinsynthese durch Aminoglykoside

Die oben beschriebene Steigerung der Poly(Phe) Synthese durch Streptomycin kann ebenfalls für die Aminoglykoside Paromomycin, Neomycin, Hygromycin B, Kanamycin und Gentamycin nachgewiesen werden, Abbildung 3.42 A. Die Steigerung durch Hygromycin B entspricht mit 25% der Steigerung durch Streptomycin. Die anderen Aminoglykoside zeigen wesentlich deutlichere Steigerungen der Poly(Phe) Synthese, die im Bereich von 300%-400% der Kontrolle ohne Zugabe von Aminoglykosiden liegen. Das Antibiotikum Tetrazyclin zeigt, wie erwartet, eine deutliche Reduktion der Poly(Phe) Synthese.

Ein vergleichbarer Effekt konnte mit der kurzen mRNA (UUC₁₂), die für 12 Phenylalanine codiert, im modifizierten Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Experiment (Kapitel 2.7.5) erzielt werden, Abbildung 3.42 B.

In der Poly(A) abhängigen Poly Lysin (Poly(Lys)) Synthese zeigt sich ebenfalls eine Steigerung der Synthese durch Aminoglykoside. Einzige Ausnahme bildet das Antibiotikum Hygromycin B (Abbildung 3.42 C).

3.4.6.3 Antibiotika-induzierte Rücktranslokation von POST nach PRE

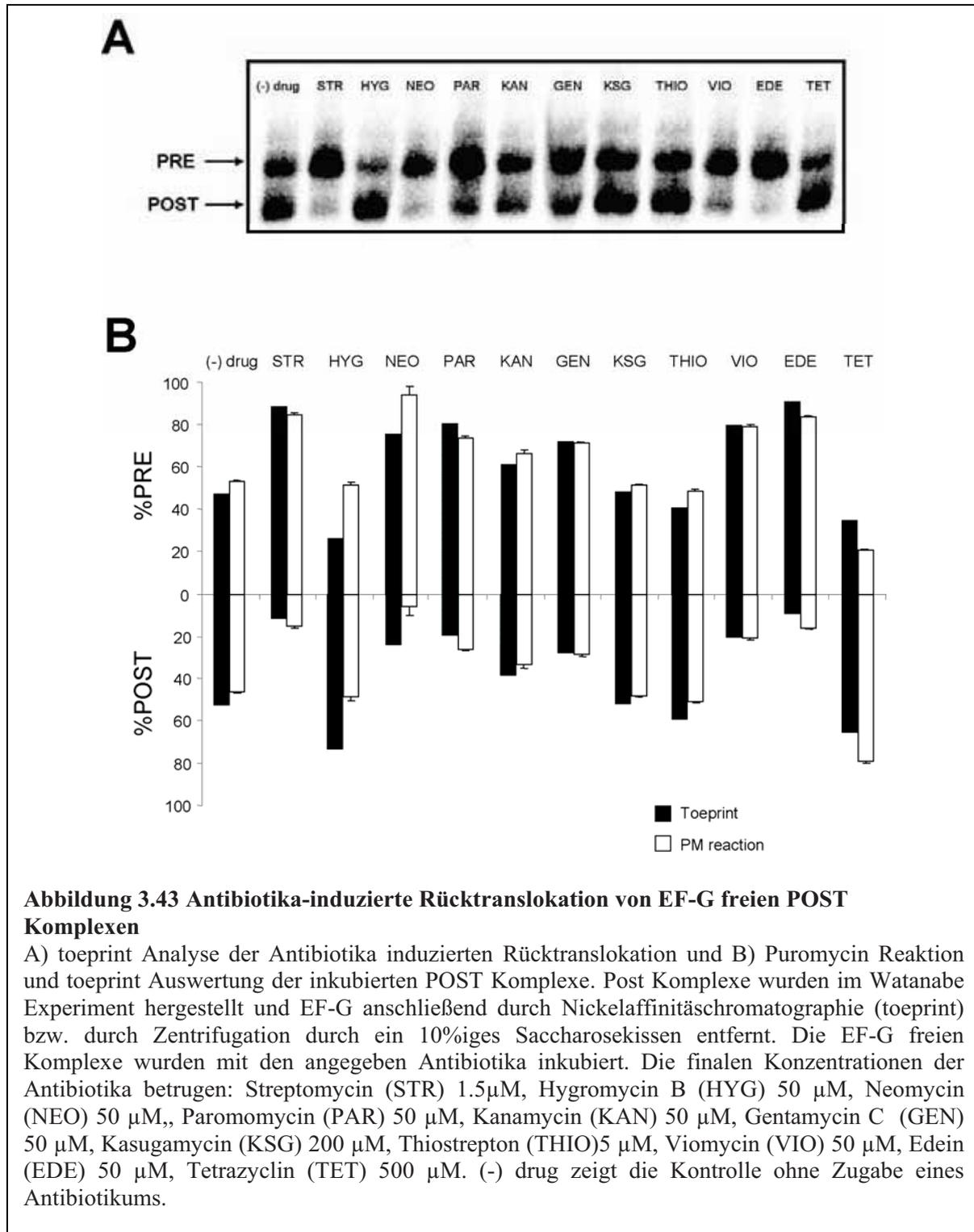
Fredrick und Kollegen beschrieben kürzlich, dass einige Aminoglykoside eine Rücktranslokation des POST Zustandes zum PRE Zustand begünstigen. Dieser Effekt erklärt möglicherweise eine Stabilisierung des PRE Zustandes *in vivo* und könnte zu einer gesteigerten Fehlerrate in der Proteinsynthese führen und eine Blockade der Translokation von PRE nach POST durch Aminoglykoside könnte den bakteriziden Effekt erklären.

Der Befund der Rücktranslokation durch Aminoglykoside von Fredrick und Kollegen veranlasste uns zur Analyse weiterer Aminoglykoside und einiger Antibiotika als Kontrollen. POST Komplexe wurden im Watanabe Experiment hergestellt und EF-G durch Nickelaffinitätschromatographie entfernt, siehe Kapitel 2.6.11.2.

Anschließend erfolgte die Inkubation der EF-G freien POST Komplexe mit den ausgewählten Aminoglykosiden und den Antibiotika-Kontrollen. Der Nachweis einer möglichen Rücktranslokation erfolgte durch toeprint Analyse und Puromycinreaktion, Abbildung 3.43

Außer für Hygromycin B konnte für die Aminoglykoside (Streptomycin; Neomycin, Paromomycin; Kanamycin und Gentamycin) eine partielle Rücktranslokation von POST nach PRE gezeigt werden. Hierbei stimmen die Ergebnisse der beiden Methoden zur tRNA Lokalisation (toeprint und Puromycin Reaktion) im Wesentlichen überein. Die Antibiotika Viomycin und Edein, die nicht in die Gruppe der Aminoglykoside gehören, bewirken

ebenfalls eine Rücktranslokation. Tetracyclin, ein klassischer A-Stellen Hemmer, führt zu einer Stabilisierung des POST Komplexes und induziert eine geringe Translokation von PRE zu POST.



3.5 Termination und Ribosomrecycling

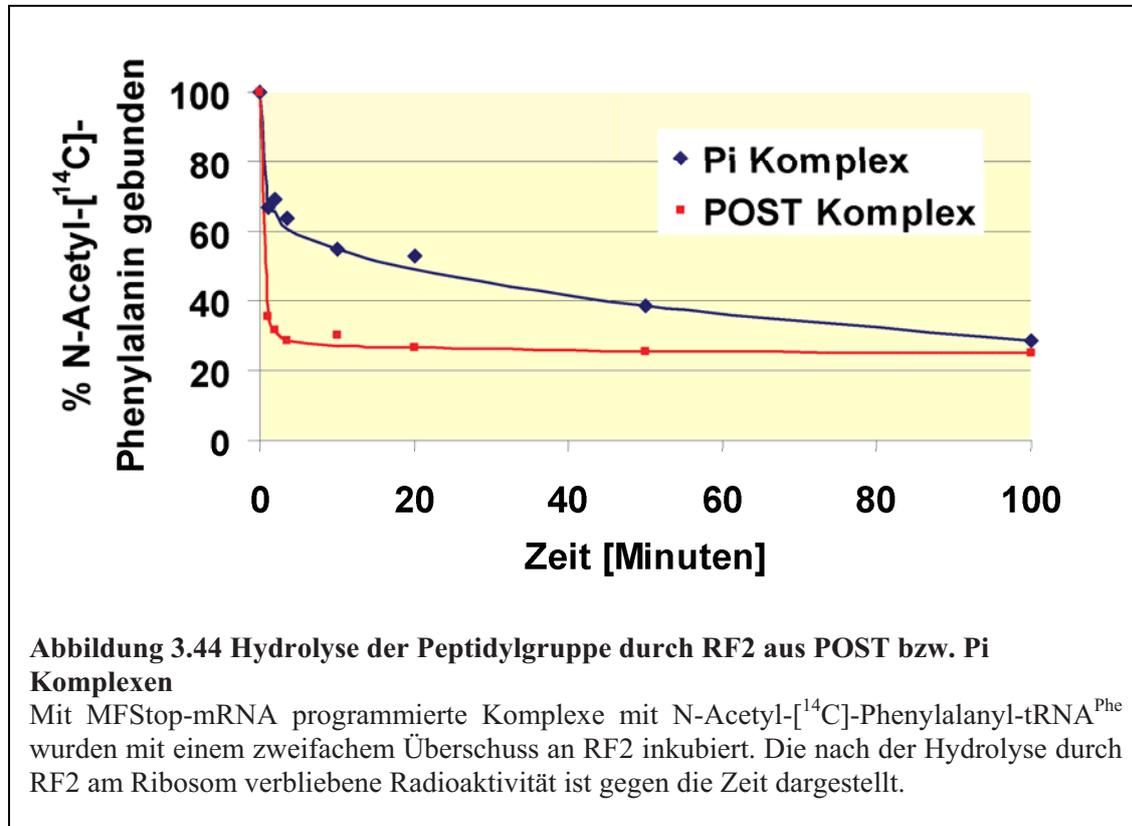
Die Terminationsphase der Proteinbiosynthese wird eingeleitet, wenn die letzte Aminosäure an die wachsende Peptidkette angeknüpft ist und das Stoppcodon in der ribosomalen A Stelle erscheint. Dieser so genannte Prä-Terminationskomplex ist das Ziel der Klasse I Terminationsfaktoren, die auch als Dekodierungs-Terminationsfaktoren bezeichnet werden. Der Klasse I Terminationsfaktor bindet am Ribosom in der A Stelle und erkennt das Stoppcodon. Durch eine Konformationsänderung passt sich das Protein in die A-Stelle ein und führt zur hydrolytischen Spaltung der Peptidyl-tRNA. Die Klasse I Terminationsfaktoren werden durch den Klasse II Terminationsfaktor RF3 unterstützt. Das G Protein RF3 führt zur Dissoziation der Klasse I Terminationsfaktoren nach erfolgter Peptidhydrolyse. Anschließend löst sich RF3 nach erfolgter GTP Hydrolyse vom Ribosomen ab. Dabei entsteht der Post Terminationskomplex, der in die Phase des Ribosomrecycling übergeht. Am Ribosomrecycling sind der Elongationsfaktor G (EF-G), der Ribosomrecycling Faktor (RRF) und der Initiationsfaktor 3 (IF3) beteiligt.

3.5.1 Test der Aktivität von isoliertem RF2

Die Aktivität von Klasse I Terminationsfaktoren (RF1 und RF2) kann anhand des Freisetzens des Peptidrestes von Model-Präterminationskomplexen getestet werden. Dafür wurden Ribosomen mit MFStop-mRNA programmiert und Pi, und POST Komplexe im Watanabe Experiment hergestellt. Diese Komplexe tragen ein Peptidyl-tRNA Analogon (N-Acetyl-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}) in der ribosomalen P-Stelle und im Falle des POST Komplexes eine deacyl-tRNA (deacyl-tRNA^{Met}) in der ribosomalen E-Stelle. Die ribosomale A-Stelle ist frei von tRNA und zeigt ein Stoppcodon UAA, welches von beiden Klasse I Terminationsfaktoren erkannt werden kann. Das Freisetzen der Peptidylgruppe kann im Nitrozellulose Filterbindungsexperiment (siehe Watanabe) durch Abnahme der gebundenen Radioaktivität der Peptidylgruppe verfolgt werden (Abbildung 3.44). Das isolierte RF2 wurde freundlicherweise von D. N. Wilson zur Verfügung gestellt.

Ein zweifacher Überschuss an RF2 über Ribosom führt zu einer schnellen Hydrolyse der Peptidyl-tRNA. 70% der gebundenen Peptidylgruppe werden innerhalb der ersten fünf Minuten aus dem POST Komplex freigesetzt. Für den Pi Komplex erfolgt die Hydrolyse der Peptidylgruppe zweiphasig, in der schnellen Anfangsphase innerhalb der ersten fünf Minuten werden 40% der Peptidylgruppe freigesetzt. In der folgenden langsamen Phase erfolgt das

Freisetzen von 30% der gebundenen Radioaktivität. Jeweils weitere 30% verbleiben in dem POST, bzw. Pi gebunden.



3.5.2 RF3 stimuliert die Peptidhydrolyse durch katalytischen Mengen an RF2

Ehrenberg und Kollegen beschrieben, dass der Klasse II Terminationsfaktor RF3 die Hydrolyse-Reaktion durch die Klasse I Terminationsfaktoren stimuliert, indem der Klasse I Terminationsfaktor recycelt wird (Zavialov et al., 2001; Zavialov et al., 2002). Zur Analyse der Stimulation der Hydrolyse von Klasse I Terminationsfaktoren durch RF3 überexprimierten und isolierten wir RF3 aus *E. coli*. Das His₆ markierte RF3 wurde über Nickelagarose gereinigt und in Bindungspuffer dialysiert. Die Aktivität des His₆ markierten Proteins konnte *in vivo* durch Komplementation eines Temperatur sensitivem RF3 Stammes nachgewiesen werden (Vesper, 2003). Um Recycling-Konditionen des Klasse I Terminationsfaktors zu simulieren, erfolgte die Inkubation von Prä-Terminationskomplexen mit einer katalytischen Menge (0,1-fach) RF2 pro Ribosom. Ansteigende RF3 Mengen führten zu einer Stimulation der Hydrolyse Reaktion durch die katalytische Menge des Klasse

I Terminationsfaktors RF2 (Abbildung 3.45). Bei stöchiometrischen Mengen an RF3 pro Ribosom wird das Maximum der Stimulation der Hydrolyse durch 0,1-fach RF2 über Ribosomen erreicht.

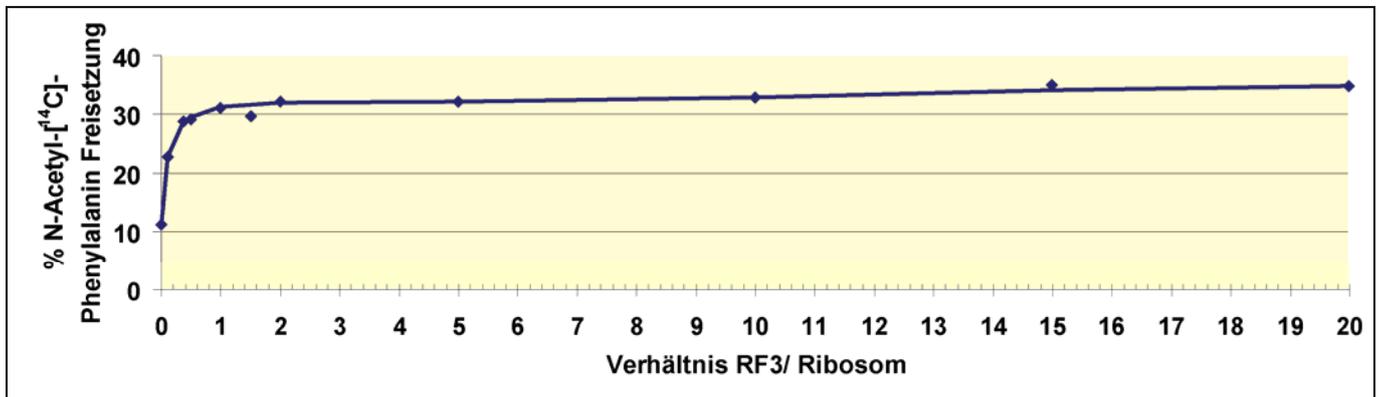


Abbildung 3.45 RF3 stimuliert die Peptidhydrolyse aus Prä-Terminationskomplexen durch katalytischen Mengen RF2.

Der prozentuale Anteil des freigesetzte N-Acetyl-[¹⁴C]Phenylalanin pro Ribosomen bei ansteigende Mengen des RF3 und konstantem RF2 (0,1 RF2/70S) erreicht bei stöchiometrischer Menge an RF3 pro Ribosomen das Maximum der RF2 abhängigen Hydrolyse der Peptidylgruppe.

3.5.3 RF2 setzt die E-Stellen tRNA aus Terminationskomplexen frei

Die Bedeutung der stabilen Bindung einer deacyl-tRNA über Codon-Anticodon-Wechselwirkung liegt im Erhalt des Leserasters (Márquez, 2002, sowie in der Reduktion der Fehlerhäufigkeit und im Ausschluss von nicht-verwandten Aminoacyl-tRNAs an der Teilnahme des Selektionsprozesses in der ribosomalen A-Stelle (zur Diskussion siehe {Nierhaus, 2006 #14796; Nierhaus, 2006a})).

Das Vorhandensein der E-Stellen tRNA stimuliert die Hydrolyseaktivität der Klasse I Terminationsfaktoren, siehe Abbildung 3.48. Aus POST Komplexen erfolgt das Freisetzen der Peptidylgruppe schneller als aus P_i Komplexen. Da der zuletzt gebildete POST Komplex der Proteinsynthese den so genannten Prä-Terminationskomplex ergibt, muss vom Vorhandensein der deacyl-tRNA ausgegangen werden. Die bisherigen Analysen der Termination erfolgten unter Pufferbedingungen, die keine stabile E-Stellenbindung zeigen (Zavialov et al., 2002). In Experimenten unter konventionellen (Polyamin freien) Puffern verlieren die Ribosomen die tRNA während der Prozedur des Nachweises (Filterbindung oder auch schnelle Kinetiken)(Semenkov et al., 1996)

Die Analyse der Bindung der E-Stellen tRNA im Prozess der Peptidyl-tRNA Hydrolyse durch RF2 zeigte, dass das Freisetzen der E-Stellen tRNA dem Verlauf der Hydrolyse der

Peptidylgruppe folgt, Abbildung 3.46. MFStop-mRNA programmierte POST Komplexe, die $\text{Ac}^{[14\text{C}]}\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ in der P-Stelle und $\text{deacyl-}^{[32\text{P}]}\text{-tRNA}^{\text{Met}}$ in der E-Stelle tragen wurde im Watanabe Experiment hergestellt. Diese Komplexe tragen ein Stopp-Codon im Dekodierungszentrum der A-Stelle und können als Modell-Prä-Terminationskomplexe dienen. Die Analyse der gebundenen tRNAs (tRNA/Ribosom) vor der Inkubation mit RF2 ergab für $\text{Ac}^{[14\text{C}]}\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ $v=0,42$ und für $\text{deacyl-}^{[32\text{P}]}\text{-tRNA}^{\text{Met}}$ $v=0,88$. Die Abnahme der Bindung der E-Stellen tRNA ($\text{deacyl-}^{[32\text{P}]}\text{-tRNA}^{\text{Met}}$) ist gegen über der Hydrolyse des Peptids ($\text{Ac}^{[14\text{C}]}\text{Phe}$) etwas verzögert, möglicherweise erfolgt das Freisetzen nicht primär durch RF2, sondern durch Destabilisierung des Terminationskomplexes nach der Hydrolyse-Reaktion. Obwohl in der Präparation der POST Komplexe die Bindung der E-Stellen tRNA mit $v=0,88$ (tRNA/Ribosom) höher als der gebundenen Anteil an $\text{Ac}^{[14\text{C}]}\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ $v=0,42$ (tRNA/Ribosom) liegt, zeigt sich eine äquimolare Menge an freigesetzter E-Stellen tRNA (0,33 tRNA/Ribosom) zur Menge an freigesetztem $\text{Ac}^{[14\text{C}]}\text{Phe}$ (0,32 tRNA/Ribosom).

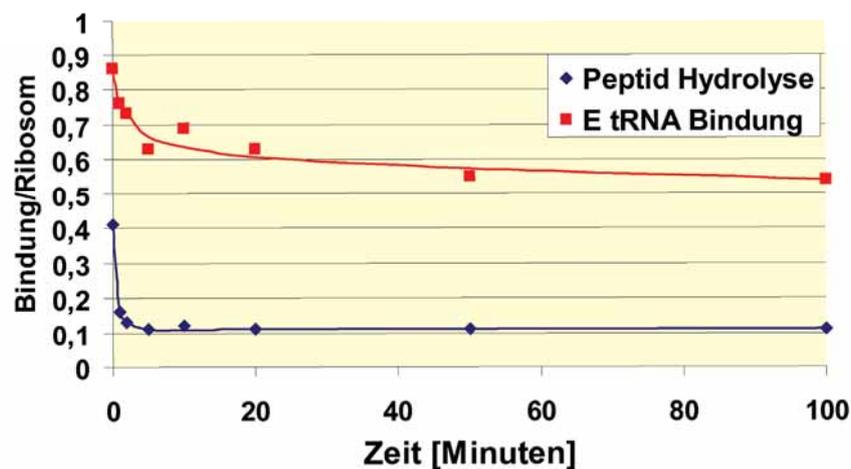


Abbildung 3.46 RF2 führt zur Freisetzung der E-Stellen tRNA aus Terminationskomplexen POST Komplexe mit $\text{Ac}^{[14\text{C}]}\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ $v=0,42$ und $\text{deacyl-}^{[32\text{P}]}\text{-tRNA}^{\text{Met}}$ $v=0,88$. Die Abnahme der Bindung der E-Stellen tRNA ($\text{deacyl-}^{[32\text{P}]}\text{-tRNA}^{\text{Met}}$) (rot) erfolgt nach der Hydrolyse des Peptidrests $\text{Ac}^{[14\text{C}]}\text{Phe}$. Äquimolare Menge der E-Stellen tRNA (0,33 tRNA/Ribosom) des Peptids $\text{Ac}^{[14\text{C}]}\text{Phe}$ (0,32 tRNA/Ribosom) werden freigesetzt.

3.6 Ribosomrecycling

Die Prozesse des Ribosomrecycling werden in der Literatur kontrovers diskutiert (Hirokawa et al., 2005; Vesper and Wilson, 2006) Kaji und Kollege beschrieben, dass die Entlassung der tRNAs des Post-Terminationskomplexes durch EF-G und den Ribosomrecycling Faktor (RRF) erfolgen und dies der Entlassung der mRNA vorangeht (Hirokawa et al., 2002) Dieser Befund steht im Widerspruch zum oben beschriebenen Freisetzen der E-Stellen tRNA durch den Terminationsfaktor RF2. Zur Analyse der Prozesse des Ribosom Recyclin wurde der Ribosomrecycling Faktor (RRF) isoliert. Das Plasmid zur Isolierung eines His₆- markierten RRF wurde freundlicherweise von Dr .T. Ueda zur Verfügung gestellt. Isoliertes unmarkiertes RRF zu Vergleichszwecken wurde von Dr. A Kaji bereitgestellt. Die Isolierung des His₆- markierten RRF erfolgte über Nickelagarose.

3.6.1 Test der Aktivität von isoliertem Ribosomrecycling Faktor

(RRF)

Der Test der Aktivität des isolierten Ribosomrecycling Faktors (RRF) kann im so genannten „Polysomen break-down“ Experiment erfolgen (Hirashima 1972). In diesem Experiment werden Polysomen, die sich überwiegend im POST Zustand befinden, mit Puromycin zur Entfernung der Peptidylgruppe inkubiert. Dabei entsteht der so genannte Model-Post-Terminationskomplex. Dieser Model-Post-Terminationskomplex trägt eine mRNA und eine deacyl-tRNA in P- und E-Stelle, aber im Gegensatz zum authentischen Post-Terminationskomplex kein Stopcodon in der ribosomalen A-Stelle (Hirashima and Kaji, 1972a; Hirokawa et al., 2002). Hirashima et al. zeigten, dass eine Umwandlung von Polysomen zu Monosomen und ribosomale Untereinheiten durch Inkubation mit RRF, EF-G und GTP erfolgt (Polysom-break-down) (Hirashima and Kaji, 1972a)

3.6.1.1 Polysomen break-down Assay unter konventionellen Pufferbedingungen

Das von Hirashima et al. beschriebene Protokoll zur Isolierung von Polysomen beschreibt ein polyaminfreies Puffersystem mit 8,2 mM Magnesium (Hirashima and Kaji, 1972a). Die Isolierung der Polysomen erfolgte unter diesen Pufferbedingungen aus *E. coli* MRE600 Zellen nach Zugabe von Tetrazyclin. Anschließend wurden die Polysomen über eine Gelfiltration fraktioniert. Dabei werden das gebundene Tetrazyclin und die Elongationsfaktoren von den Polysomen getrennt.

Durch Inkubation mit EF-G und RRF in Gegenwart von Puromycin erfolgt die Umwandlung der Polysomen in Monosomen (70S Ribosomen), der so genannte „Polysomen break-down“ (Abbildung 3.47). Die Analyse der Polysomenprofile erfolgt in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (10%-40% Saccharose in Bindungspuffer)

Die Aktivität des RRF kann an der Zunahme des 70S Peaks (rot) und der Abnahme der Polysomen (Tetra- Tri- und Disomen, in blau) erkannt werden. In Abwesenheit von EF-G kann keine Umsetzung von Polysomen beobachtet werden. Auch EF-G allein verändert das Polysomenprofil nicht. Die gemessene Absorption bei 260 nm zeigte, dass eine Verteilung der 70S Ribosomen und der Polysomen in der Kontrolle bei 51% 70S zu 49% Polysomen vorliegt. Durch Einwirkung von RRF und EF-G verschiebt sich die Verteilung auf 82% 70S Monosomen (rot), ein klares Zeichen für die Umwandlung der Polysomen (blau). In der EF-G Kontrolle und in der RRF Kontrolle zeigt sich nur eine geringfügiges Verschieben der

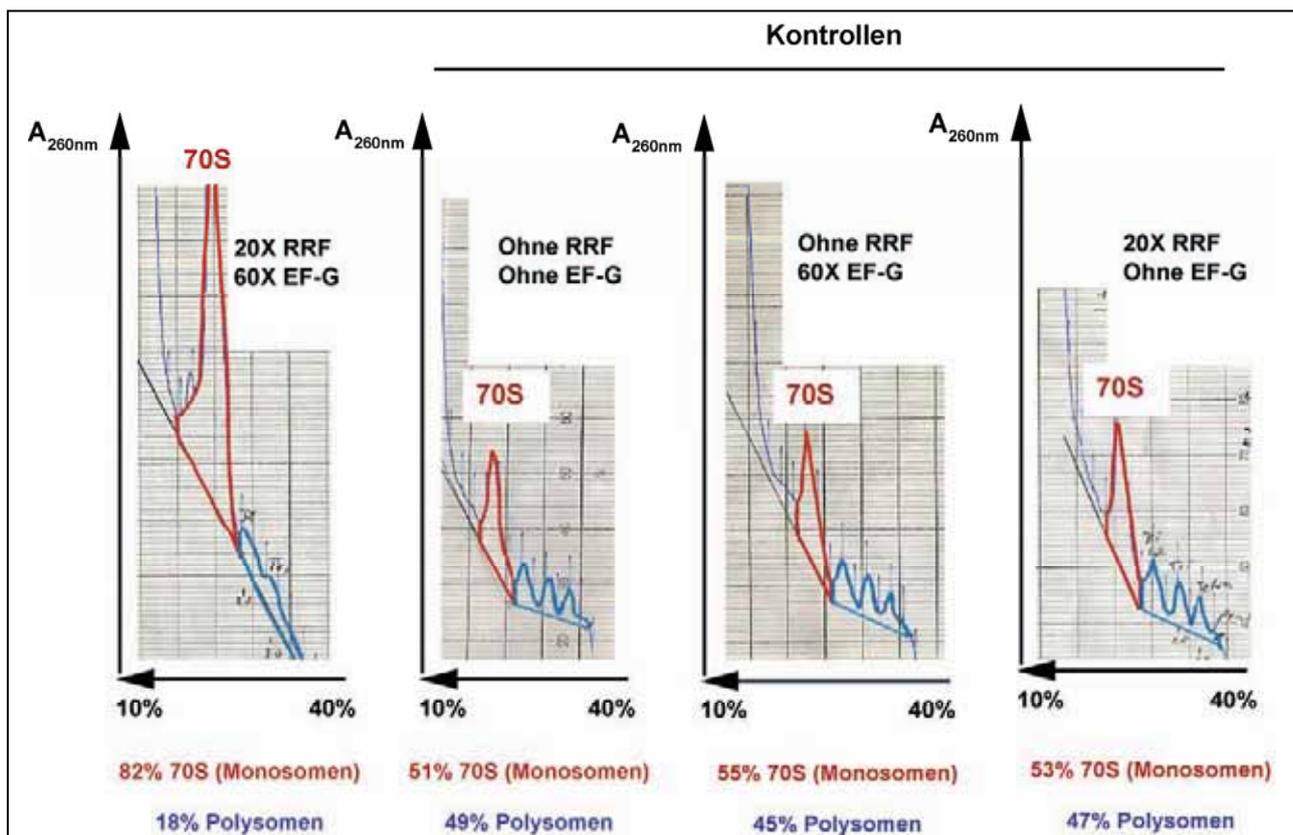


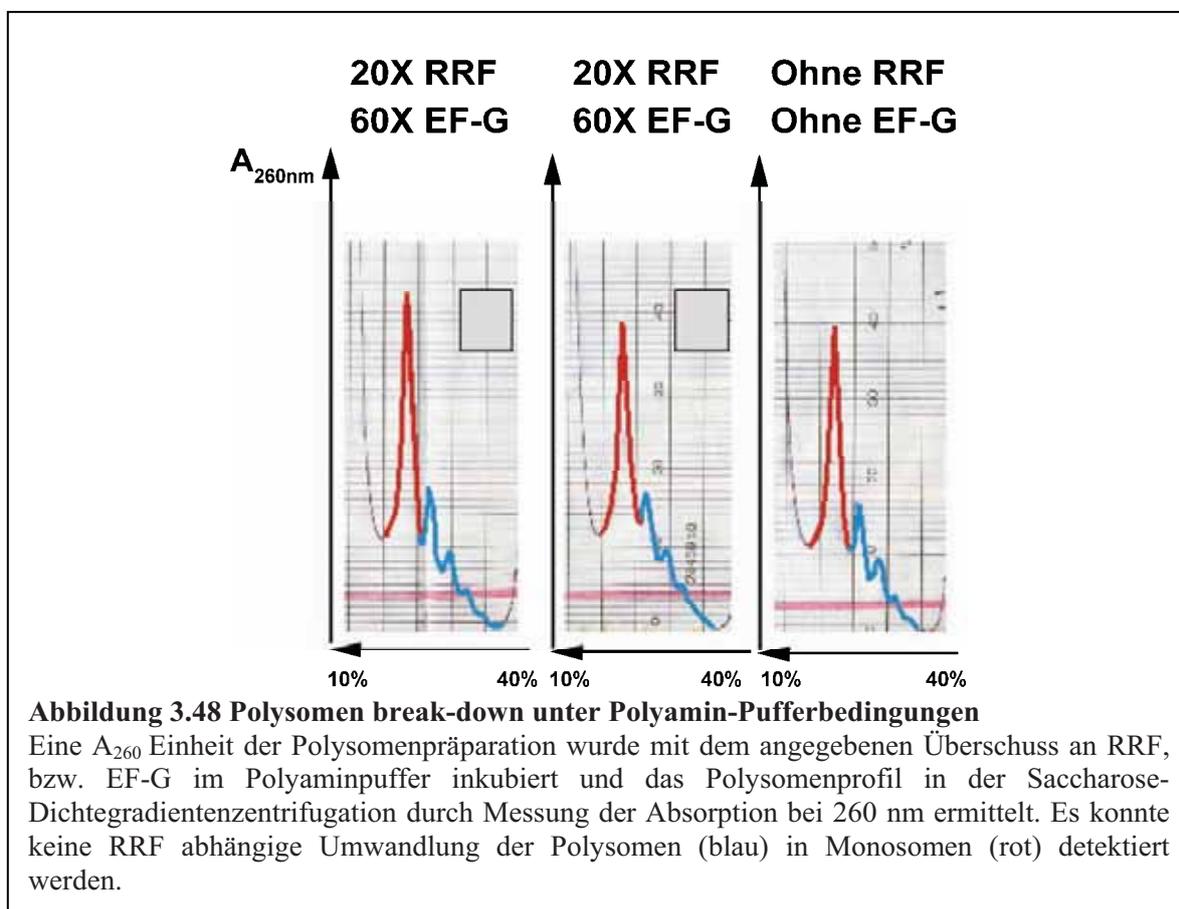
Abbildung 3.47 Polysomen break-down unter konventionellen Pufferbedingungen

Eine A_{260} Einheit der Polysomenpräparation wurde mit dem angegebenen Überschuss an RRF, bzw. EF-G im konventionellen Puffer inkubiert und das Polysomenprofil in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Es konnte eine RRF und EF-G abhängige Umwandlung der Polysomen (blau) in Monosomen (rot) detektiert werden.

Verteilung von Polysomen und Monosomen, der Anteil der Monosomen lag bei 55% bzw. 53%. Die Aktivität des markierten RRF unterschied sich nicht von der Aktivität des unmarkierten RRF im „Polysomen break-down“ Experiment (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren Experimente wurde das His₆ markierte RRF benutzt.

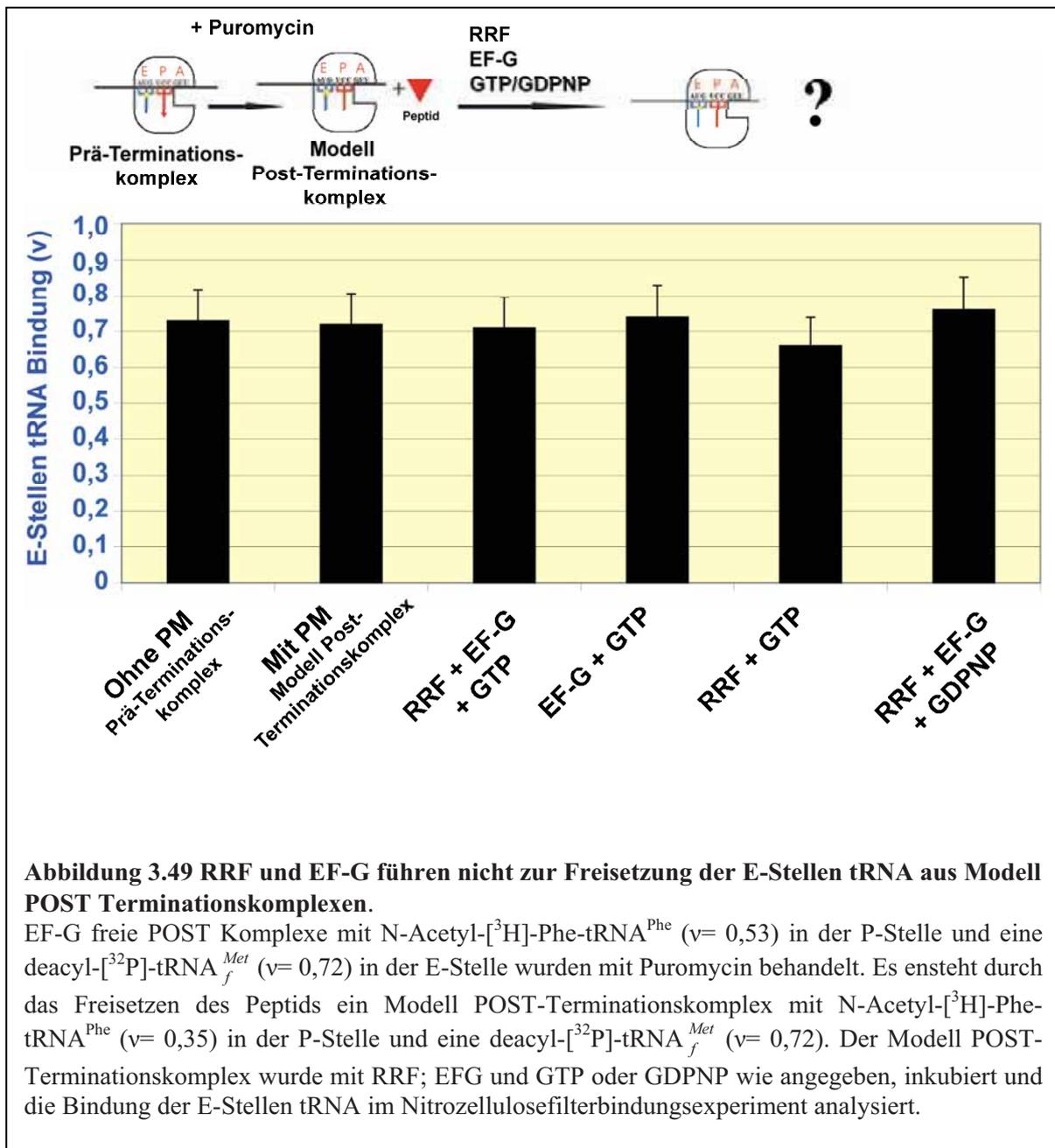
3.6.1.2 Polysomen break-down Assay im Polyamin-Puffer

Die für die Poly(U) abhängige Poly(Phe) Synthese und das Watanabe Experiment optimierten Bedingungen sollten auch zur Analyse des Ribosomrecycling eingesetzt werden. Polysomen wurden nach Inkubation mit Tetrazyclin aus *E. coli* MRE600 Zellen unter folgenden Pufferbedingungen isoliert: Bindungspuffer (H₂₀K₁₅₀M_{4,5}SH₄Spd₂Spm_{0,05}). Anschließend wurden die Polysomen über eine Gelfiltration fraktioniert. Durch die Gelfiltration werden das gebundene Tetrazyclin und die Elongationsfaktoren von den Polysomen getrennt. Im Gegensatz zum Experiment unter konventionellen Pufferbedingungen zeigt sich kein Polysomen break-down im Polyaminpuffersystem (Abbildung 3.48). Die Verteilung der Polysomen zu den 70S Monosomen bleibt nach Inkubation mit RRF und EF-G unverändert zur Kontrolle ohne Zugabe von RRF und EF-G.



3.6.2 Wirkung von RRF und EF-G auf Modell Post-Terminationskomplexe

Die oben beschriebenen Polysomen break-down Experimente zeigten, dass RRF und EF-G nur im konventionellen Puffersystem eine Umwandlung der Polysomen zu Monosomen erzielen. Im Polyaminpuffersystem, das eine stabile Bindung der E-Stellen tRNA ermöglicht, erfolgte keine Umwandlung der Polysomen zu Monosomen. Da es sich in dieser Analyse der Aktivität von RRF um ein artifizielles System handelt und translatierende Polysomen kein Stoppcodon in der ribosomalen A-Stelle tragen, muss hier eine Freisetzen der Peptidylgruppe (des naszierenden Proteins) durch Puromycin erfolgen. Kaji und Kollegen beschrieben eine Entlassung der E-Stellen tRNA durch RRF und EF-G, die im Widerspruch zu der oben gezeigten Freisetzung der E-Stellen tRNA durch RF1/2 steht (Kiel et al., 2003) (Hirokawa et al., 2002). Dieser Widerspruch sollte im folgenden Experiment für einen Terminationskomplex unter Polyaminpuffer Bedingungen geprüft werden. Hierfür wurde POST Komplexe im Watanabe Experiment hergestellt, sie tragen eine N-Acetyl-[³H]-Phe-tRNA^{Phe} in der P-Stelle und eine deacyl-[³²P]-tRNA^{Met} in der E-Stelle. Diese Komplexe wurden zum Entfernen von EF-G durch ein Saccharosekissen zentrifugiert. Nach dem Entfernen der Peptidylgruppe der P-Stellen tRNA durch Puromycin, der Herstellung des Modell Post-Terminationskomplex, erfolgte die Inkubation mit RRF und EF-G. Die Bindung der E Stellen tRNA wurde im Nitrozellulose Filtertest verfolgt. Es zeigte sich kein Verlust der E-Stellen tRNA durch die Einwirkung von EF-G und RRF (Abbildung 3.49). Somit kann ein Freisetzen der E-Stellen tRNA im Zuge des Ribosomrecycling ausgeschlossen werden. Da oben gezeigt wurde, dass die E-tRNA durch die Wirkung des RF1/2-Faktors freigesetzt wird (was im Einklang mit dem allosterischen Drei-Stellen Modell steht), soll während meiner Postdoc Zeit der Effekt von RRF und EF-G auf die Dissoziation des P_i Zustandes untersucht werden. Weiterhin bietet der oben beschriebene POST Komplex mit zwei deacyl-tRNA in P- und E-Stelle ein gutes Modell um die RRF Bindung in die ribosomale A-Stelle zu untersuchen.

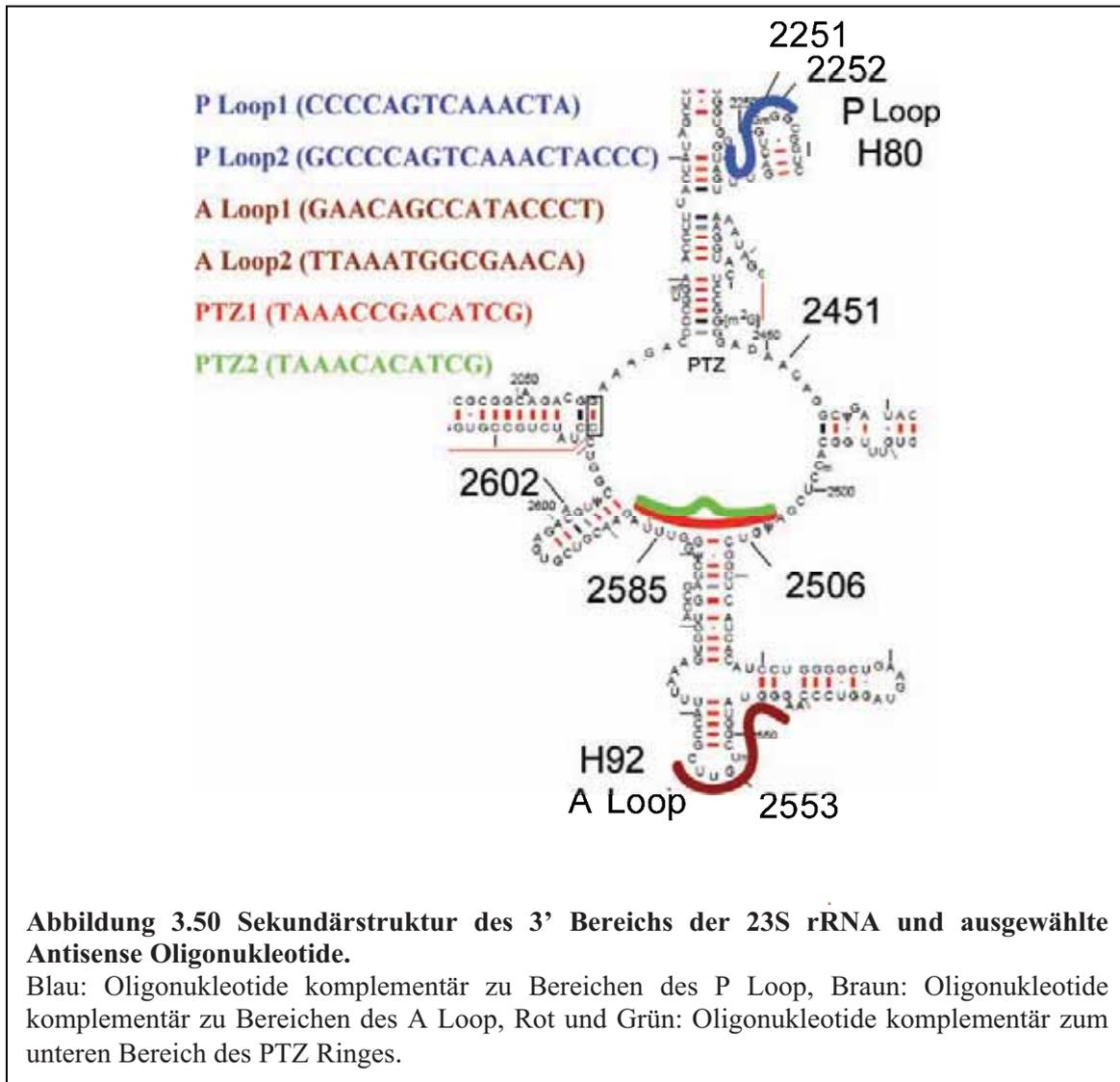


Anhang

3.7 Analyse von Antisense Oligonukleotiden des Peptidyltransferase Zentrums

Bogdanov und Kollegen führten die Verwendung von Antisense DNA-Oligonukleotiden gegen exponierte rRNA Bereiche als Technik zur Untersuchung der Struktur und Funktion ein (Mankin et al., 1981). Hill und Kollegen führten eine umfangreiche Analyse der Effekte von Oligo-DNA auf funktionelle Bereiche des Ribosoms durch (Hill et al., 1990; Hill et al., 1988; Hill et al., 1985; Hill and Tassanakajohn, 1987). Die spezifische Hemmung der mRNA Bindung (Oligos gegen die Basen 518-525 und 1534-1541) gaben Aufschluss über die mRNA Bindestelle des Ribosoms. Oligos gegen die Basen 2497-2505 des Peptidyltransferase Zentrum zeigten Hemmung der tRNA Bindung. Dieser viel versprechende Ansatz der Hemmung der Proteinsynthese durch Antisense-Oligonukleotide ließ die Idee entstehen DNA Oligos zu entwerfen, die spezifisch gegen den A- und P- Loop des Peptidyltransferase Zentrums (PTZ), sowie gegen den unteren Bereich des PTZ Ringes gerichtet sind. Die Antisense Oligonukleotide gegen die P- und A- Schleife (Loop) der 23S rRNA wurden auf Grund der Sekundärstrukturvorhersage der 23S rRNA ausgewählt, Abbildung 3.50.

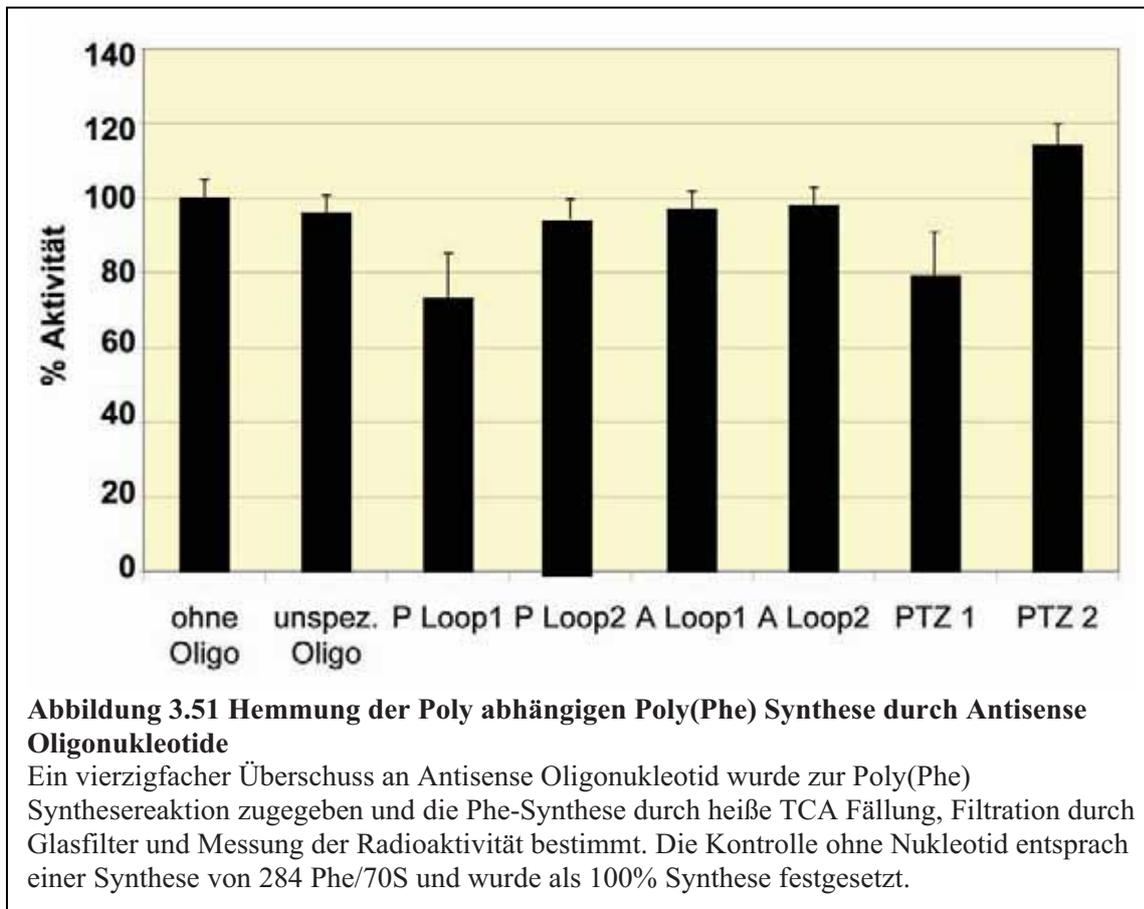
Anti P Loop1 (CCCCAGTCAA ACTA) und Anti P Loop2 (GCCCCAGTCAA ACTACCC) sind komplementär zu den Nukleotiden (U2240-G2252) bzw. (U2237-C2253). Sie decken den Bereich der 23S rRNA ab, der mit der P-Stellen tRNA wechselwirkt. Antisense Oligo A Loop1 (GAACAGCCATACCCT) und A Loop2 (TTAAATGGCGAACA) sind komplementär zu den Bereichen (A2542-C2556) und (A2541-U2554). Die Oligonukleotide gegen den unteren Bereich des PTZ Ring PTZ1 (TAAACCGACATCG) und PTZ2 (TAAACACATCG) sind komplementär zum Bereich (G2582-A2587) und (C2501-C2507) bzw. (C2501-U2506).



3.7.1 Hemmung der Poly(Phe) Synthese durch Antisense

Oligonukleotide gegen rRNA

Der Einsatz der Antisense Oligonukleotide als Inhibitoren der Proteinsynthese erfolgte in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese. Jeweils ein vierzigfacher Überschuss der Oligonukleotide wurde in der Programmierungssinkubation der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese zugegeben und die Poly(Phe) Synthese nach neunzig Minuten ermittelt. Die Synthese von 282 Phenylalanin/Ribosom der Kontrolle ohne Zugabe von Oligonukleotiden wurde 100% gesetzt und der Einfluss der Antisense-Oligonukleotide prozentual dargestellt (Abbildung 3.51)



Eine geringfügige Hemmung der Poly(Phe) Synthese auf 67 (± 11) % für Anti P Loop Oligo1 und auf 89 (± 13) % für PTZ 1 konnte gegenüber der Kontrolle beobachtet werden.

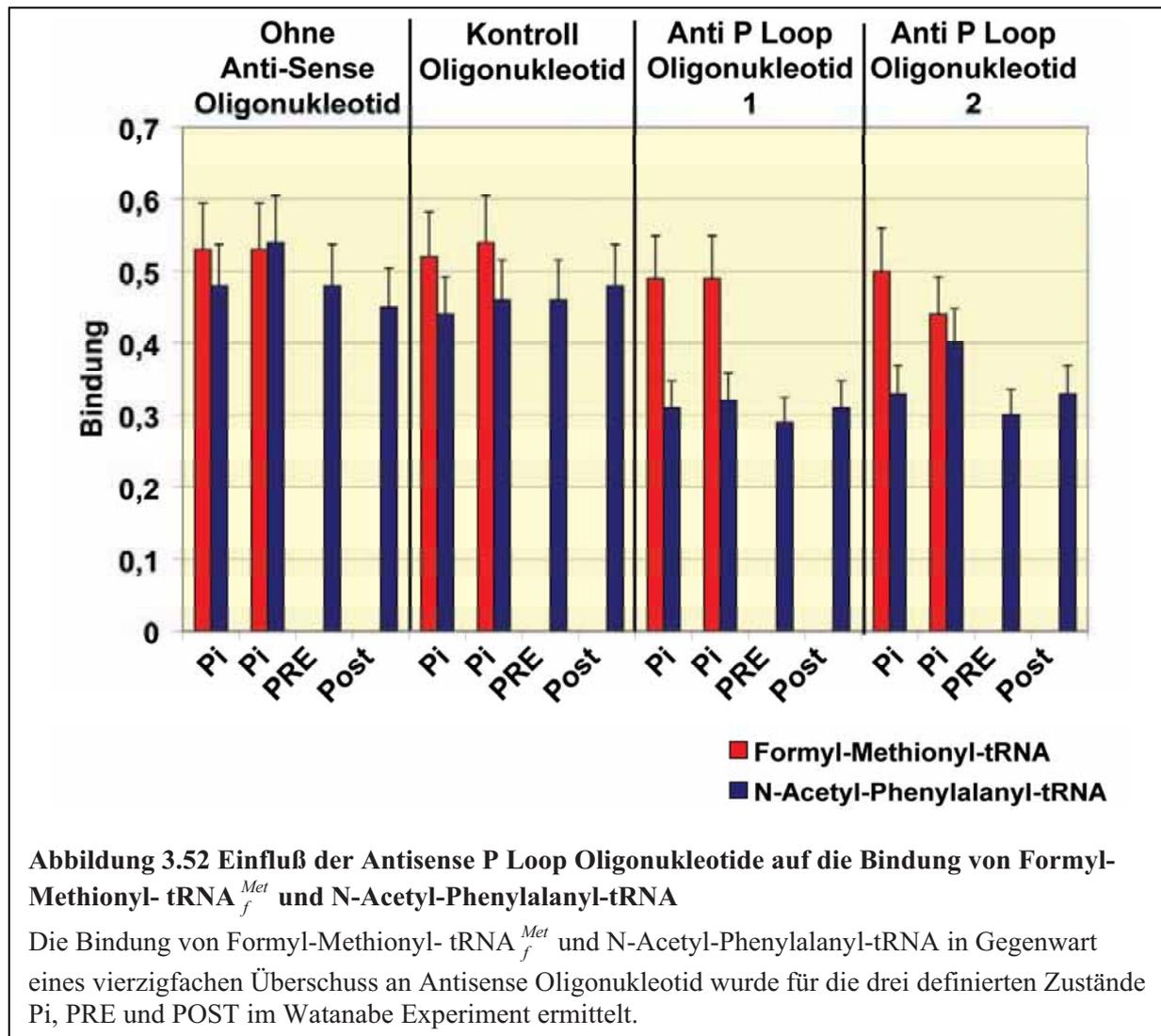
3.7.2 Bindung von Peptidyl-tRNA in Gegenwart von Antisense

Oligonukleotiden des P Loop

Der Einfluss der Antisense P Loop Oligonukleotide auf die Bindung der P-Stellen tRNA in Pi und POST, sowie der A-Stellen Bindung im PRE Komplex wurden im Watanabe Experiment untersucht (Abbildung 3.52).

In Gegenwart eines vierzigfachen Überschuss an Antisense Oligonukleotid, bzw. eines Kontroll-Oligonukleotids, das keine komplementären Bereiche zur 23S rRNA trägt, wurden Ribosomen programmiert und die Bindung eines 1,5-fachen Überschuss an Peptidyl-tRNA im Filterbindungsexperiment geprüft. Das Kontroll-Oligonukleotid zeigte im Rahmen der Genauigkeit des Experiments keine Abweichung der Bindung von Formyl-Methionyl-tRNA^{Met} oder N-Acetyl-Phe-tRNA^{Phe} in Initiationskomplexen (Pi), PRE oder POST. In Gegenwart der Antisense Oligonukleotide ist eine Reduktion der Bindung von N-Acetyl-Phe-

tRNA^{Phe} in Pi, PRE und POST auf ca. 70% zu beobachten. Die Bindung von Formyl-Methionyl-tRNA^{Met} im Pi Komplex bleibt unverändert. Ein Einfluss der Antisense P Loop Oligonotide auf die Bindung von tRNAs in A- und P- Stelle ist nicht signifikant.



Die Bindung von [³²P]-markierten Antisense P Loop Oligonukleotiden konnte nicht im Filterbindungstest ermittelt werden, da mit steigender Zugabe von Oligonukleotid ein linearer Anstieg der Hintergrundstrahlung in der Kontrolle ohne Ribosomen zu detektieren war. Eine signifikante Strahlung über dem Hintergrund für gebundene Oligonukleotide war nicht detektierbar. Eine Co-Fraktionierung der radioaktiven Oligonukleotide mit 70S Ribosomen im Saccharose-Dichtegradienten konnte ebenfalls nicht bestimmt werden. Somit ist der nur geringe Effekt der Antisense Oligonukleotide auf die geringe Bindung der Antisense-Oligonukleotide an die rRNA zurückzuführen. Aufgrund der nur geringen Effekte der Antisense Oligonukleotide wurde dieses Projekt nicht weiter verfolgt.