

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei grundlegende *in vitro* Systeme zur Analyse der Proteinsynthese bezüglich der Effizienz und der Genauigkeit (Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese), bzw. der Homogenität der Komplexe (Watanabe Experiment) verbessert. Eine weitere Methode zur Bestimmung der tRNA Position, die toeprint Methode, wurde unter *in vivo* nahen Pufferbedingungen etabliert. Ein toeprint Experiment erlaubt in Kombination mit der Puromycinreaktion die Bestimmung der Codone und damit die tRNA Position innerhalb der kleinen (toeprint) und der großen Untereinheit (Puromycinreaktion), zusammen erlauben beide Methoden die Analyse einer neuen, in unserem Labor entdeckten ribosomalen Funktion, nämlich die so genannte Rücktranslokation. Diese Systeme wurden erfolgreich angewendet, eine Rücktranslokations-Aktivität einiger Antibiotika, vor allem Aminoglykoside, festzustellen, sowie den Einfluss von Antisense-Oligonukleotide gegen das Peptidyltransferase Zentrum zu untersuchen. Für die Analyse der Funktion des EF4 (LepA) wurden zusätzlich zwei gekoppelte *in vitro* Transkriptions-/Translationssysteme eingesetzt. Pilotexperimente zur Analyse der Mechanismen der Termination und des Ribosomenrecycling wurden durchgeführt und warfen Licht auf eine wesentliche Fragestellung zur Klärung der Kontroversen innerhalb des Prozesses des Ribosomenrecycling: Zu welchem Zeitpunkt verlassen die tRNAs das Ribosomen im Verlauf der Termination und des Ribosomrecyclings?

4.1 Puffersysteme und *in vivo* Bedingungen

Die Proteinbiosynthese in *E. coli* schreitet mit einer Rate von 10-20 Peptidbindungen pro Sekunde und einer Fehlerrate von ungefähr einem Fehleinbau pro 3.000 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(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 per Ribosom (in den besseren Systemen) oder weniger erreicht werden. Die anfänglichen Probleme der *in vitro* Systeme bestanden im Wesentlichen in den verwendeten ungünstigen Pufferbedingungen und der

geringen Aktivität der isolierten Ribosomen (Gavrilova et al., 1976; Gavrilova et al., 1981; Jelenc, 1980; Wagner et al., 1982).

Eine Verbesserung der Systeme erfolgte durch die Optimierungen der Pufferbedingungen und der Einführung des so genannten Polymix Puffersystems gegenüber den konventionellen Puffersystemen. In diesem System konnte über wenige Sekunden eine *in vivo* nahe Rate von 8 Aminosäuren pro Sekunde und eine Fehlerrate von einem Fehleinbau pro 3.000 Aminosäuren erzielt werden (Jelenc, 1980; Wagner et al., 1982). Ein deutlicher Nachteil des Polymix Systems ist die Tatsache, dass es nicht kompatibel mit Methoden ist, die NH_4^+ Ionen enthalten, da Präzipitation von MgNH_4PO_4 (Sargdeckelkristalle) Ribosomen inaktivieren.

Die Analyse der *in vivo* Konzentrationen der Ionen des Zytoplasmas von *E. coli* und *Salmonella spez.* (Neidhardt, 1987; Tabor and Tabor, 1985) wurden zum Aufbau eines verbesserten *in vitro* Systems herangezogen, Tabelle 4.1. (Bartetzko and Nierhaus, 1988)

Abbildung 4.1 Vergleich der Pufferbedingen für *in vitro* Systeme mit den zellulären Konzentrationen einiger Ionen in *E. coli*, basierend auf (Neidhardt, 1987). ^{A)} Zugabe von Putrescin, Cadaverin und Agmantin beeinflussten die Proteinsynthese *in vitro* nicht (Nierhaus et al., 2000).

	Konventionelle Puffer	Polyamin Puffer	Polymix Puffer	“High fidelity” Puffer	<i>in vivo</i>
TRIS-HCl, pH 7,4-7,5	10mM			50 mM	
HEPES-KOH, 7.,5 @ 4°C		20 mM			
Potassium Phosphat, pH 7,5			5 mM		
MgSO ₄ / MgCl ₂	8,2 – 20 mM				~4 mM
Mg(Acetate) ₂		4,5 mM	5 mM		
MgCl ₂				5,5-7 mM	
NH ₄ -Acetat /K-Acetat		150 mM			~150 mM
NH ₄ Cl	50 – 150 mM		5 mM	70 mM	
KCl			95 mM	30 mM	
CaCl			0,5 mM		
Spermidin		2 mM	1 mM	0,6 mM	1-4 mM
Spermin		0.05 mM		0,4 mM	0,03 mM
Putrescin			8 mM		20 mM ^{A)}
(Dithiotreitol) DTT			1 mM	2 mM	
β-Mercaptoethanol	6 mM	4 mM			

präsentierten ein einfacheres Ammonium/ Polyaminsystem mit geringer Magnesiumionenkonzentration zur Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese, dass über längere Zeit (über 2 Stunden) *in vivo*-nahe Fehlergenauigkeit zeigte. Aber der entscheidende Vorteil in diesem System (im weiteren als Polyaminsystem bezeichnet) ist, dass bis zu 50% der isolierten Ribosomen aktiv sind, während vergleichbare Ribosomenpräparationen unter Polymixbedingungen nur zu 10% aktiv waren (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 Energieregenerationssystem. Ein weiterer Vorteil des Polyaminsystems, der die Analyse der E-Stellen Merkmale erheblich erleichterte, ist die stabile Bindung der E-Stellen tRNA im posttranslokationalen Komplex (POST). Eine stabile Bindung der E-Stellen tRNA konnte auch in nativen Polysomen nachgewiesen werden und ist ein entscheidendes Merkmal der Ribosomen zur Erhaltung des Leserasters und der Genauigkeit der Aminoacyl-tRNA Selektion in der A-Stelle (Marquez et al., 2004; Remme et al., 1989; Rheinberger et al., 1981). Im Gegensatz dazu zeigt das Polymix Puffersystem einen spontanen Verlust der E-Stellen tRNA innerhalb weniger Minuten (Semenkov et al., 1996). Das von Bartetzko et al. beschriebene Polyaminpuffer System diente als Basis der hier berichteten Optimierung der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese.

4.2 Poly(U) abhängige Poly(Phe) Synthese

Die Proteinbiosynthese, ebenso wie das *in vitro* System der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese, ist abhängig von der Verfügbarkeit der energiereichen Verbindungen ATP und GTP und deren Regeneration. Die energiereichen Verbindungen Phosphoenolpyruvat (PEP) und Kreatinphosphat können durch die entsprechenden Enzyme Pyruvatkinase und Kreatinkinase zur Regeneration von GTP eingesetzt werden. Acetylphosphat (Ac-P) ist eine weitere energiereiche Verbindung, die bei neutralem pH-Wert gut wasserlöslich ist und zu dem deutlich preiswerter ist als PEP. Die Verwendung von Ac-P, wie von Spirin und Mitarbeitern vorgeschlagen (Ryabova et al., 1995), bietet den weiteren Vorteil, dass das regenerierende Enzym, die Acetatkinase, nicht zum Translationssystem zugegeben werden muss. Die Acetatkinase ist Bestandteil der enzymatischen Fraktion des Zellextrakts (S100 Fraktion), die in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese verwendet wird.

Ac-P von zwei verschiedenen Anbietern wurde getestet und beide Ac-P Präparationen zeigten vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 3.1 Seite 97). Das Ac-P der Firma Roche stand in

größere Menge zur Verfügung und wurde in der weiteren Optimierung des Energieregenerationssystems eingesetzt.

Die Optimierung des Energieregenerationssystems der Poly(Phe) Synthese erfolgte auf der Basis des Polyaminsystems für Kombinationen der Konzentrationen von 0 bis 4 mM jeder der energiereichen Komponenten (ATP, GTP, Ac-P, Tabelle 3.1; Seite 97). Die Synthese von Poly(Phe) in Gegenwart jeweils 2 mM jeder der drei Komponenten (Acetylphosphat, ATP und GTP) wurde willkürlich auf 100% gesetzt. Es zeigten sich zwei Bereiche höhere Aktivität: a) Bei jeweils 3 mM ATP und GTP ohne Ac-P, und b) bei Verwendung von 1mM GTP und 4 mM Ac-P. Im zweiten Bereich stieg die Poly(Phe) Synthese auf über 140% des Vergleichsansatzes über den untersuchten Bereich von 1 bis 3 mM ATP. Die Feineinstellung der Experimentierbedingungen erfolgte für den letzt genannten Bereich bei einer Magnesiumionen Konzentration von 4.5 mM. Die Auswahl von 1,5 mM GTP; 3mM ATP und 5 mM Ac-P zeigten reproduzierbar: Poly(Phe) Synthesen zwischen 150 und 300 Phe/Ribosom innerhalb einer Stunde bei hinreichend langen (nicht fraktioniertem) Poly(U), bzw. 800-1000 Phe/Ribosom bei fraktioniertem Poly(U) (Ketten mit ca.1400 – 1500 nt) innerhalb von zwei Stunden für das optimierte Polyaminpuffersystem (HEPES 20 mM, pH 7,4 bei 0°C; Magnesiumacetat 4,5 mM; Ammoniumacetat 150 mM, β -Mercaptoethanol 4 mM; Spermidin 2 mM, Spermin 0,05 mM). Die Anzahl der eingebauten Phe pro Ribosom (800-1000) überstieg damit deutlich die pro mRNA kodierte Phe-Anzahl ($1500/3 = 500$ Phe), ein Befund der auf ein Ribosomenrecycling im Poly(U) System hinwies (siehe unten, Kapitel 4.4).

4.3 Analyse der Genauigkeit der *in vitro* Proteinsynthese,

Definitionen von nah- und nicht-cognaten tRNAs

Eine Modifikation der oben beschriebenen optimierten Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese erlaubt die Analyse der Fehlerhäufigkeit der *in vitro* Proteinsynthese. Die Optimierung der Magnesium Konzentration des Polyaminsystems ergab bei Verwendung von Konzentrationen von 4 mM bis 4,5 mM Magnesiumacetat eine maximale Poly(Phe) Synthese von 845 (± 51) Phe/Ribosom bei einer Genauigkeit von einem Fehler (Leu-Einbau) in 3.000 Aminosäureverknüpfungen, siehe Abbildung 3.4 (Seite 102). Diese Genauigkeit entspricht ungefähr der *in vivo* gemessenen Genauigkeit von etwa einem Fehler in 3.000 Aminosäureverknüpfungen (Bouadloun et al., 1983). Unter diesen optimierten Bedingungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Witold Szaflarski die Analyse der Fehleinbauten von Leucin,

Isoleucin, Valin, Serin, Lysin und Glutaminsäure (Szaflarski und Vesper et al.; Publikation in Vorbereitung). Leucin ist die Aminosäure, die bei dem Codon UUU am leichtesten falsch eingebaut wird, da einige Leucin Codone sich nur in der Wobble Position unterscheiden (UUA/UUG). Nach einer gemeinhin angewandten Definition können die Codone UUA und UUG, aber auch CUU als nah-verwandte (near-cognate) Codone angesehen werden, da sie sich nur in einer Position des Codons unterscheiden. Eine weitere Klasse der Codone, solche die sich in mehr als einer Position unterscheiden, werden danach als nicht-verwandte (non-cognate) Codone bezeichnet. Dies ist die einfachste Betrachtungsweise zur Unterscheidung der Codone, verstellt aber den Blick auf einen wichtigen Unterschied der nah- und nicht-cognaten tRNAs. Weijland et al. präsentierten 1993 eine Technik zur hintergrundfreien Messung des NTP Verbrauchs pro inkorporierter Aminoacyl-tRNA (Weijland and Parmeggiani, 1993). Ein bis zwei Spaltungen energiereicher Nukleotide pro Aminosäureeinbau wurden durchschnittlich für cognate Aa-tRNA ermittelt. Fünf bis sieben Spaltungen waren notwendig, wenn die nah-cognate Leucyl-tRNA^{Leu} eingebaut wurde. Für die nicht-cognaten Aa-tRNAs konnte kein Verbrauch der energiereichen Verbindung gemessen werden. Nach dieser funktionellen Definition der Kategorien „nah- und nicht-cognaten tRNAs“ werden Aa-tRNAs, deren Anticodon (und damit auch ihre zugehörigen Codone) sich in der mittleren Position unterscheiden, nicht verlesen und sind demnach nicht-cognat, obwohl sich ihre Codone nur in einer Position unterscheiden. Dieser Befund konnte durch die Analyse des Mechanismus des Dekodierens der Aa-tRNA durch Ramakrishnan und Kollegen erklärt werden: sie fanden, dass die Prüfung der Codon-Anticodon Wechselwirkung auf einer korrekten Watson-Crick Geometrie beruht (Ogle et al., 2003), und dass die Prüfung der mittleren Position stringenter ist als die erste und dritte Position des Codons (Kapitel 1. Abbildung 1.4, Seite 18). Somit sollten, wie bereits 1990 von Nierhaus vorgeschlagen, die Einteilung in cognate, nah-(near-)cognat und nicht-(non)cognate, nicht nur nach der chemischen Art der betrachteten Codon-Anticodon-Wechselwirkung erfolgen, sondern nach der Wahrscheinlichkeit der Inkorporation der Aa-tRNA (Nierhaus, 1990).

Der erhöhte Verbrauch an Nukleotiden für das nahverwandte Leucin spiegelt möglicherweise das so genannte kinetische Korrekturlesen wieder, das zur Fehlergenauigkeit der Proteinsynthese beitragen könnte (Ninio, 1986). Bei Verwendung der gesamten Mischung der zellulären tRNA aus *E. coli*, tRNA^{bulk} in der Poly(Phe) ist bei der Betrachtung der Fehlerhäufigkeit auch die Häufigkeit der tRNAs im zellulären Pool zu beachten. Die relative Häufigkeit einer tRNA Spezies in der Zelle (Tabelle 4.2) beeinflusst ebenfalls die Größe des Fehleinbaus.

Tabelle 4.2 Der zelluläre Pool der *E. coli* tRNAs

Für die Iso-Akzeptoren der tRNAs sind das Anticodon und die lesbaren Codone angegeben. Die Anzahl der tRNA Spezies und der Anteil an der Gesamt tRNA der Zelle sind in Spalte 4 und 5 angegeben. Nach (Dong et al., 1996). Die roten Balken zeigen die tRNAs an, die für die Analyse der Fehleinbauten von Interesse sind.

tRNA	Anticodon (5'-3')	Codon recognition (5'-3')	Spot number on 2D gel	No. of molecules per cell	Fraction of tRNA out of total tRNA (%)
Ala1B	UGC	GCU, GCA, GCG	46	3250(±223)	5.04
Ala2	GGC	GCC	28, 29	617(±64)	0.95
Arg2	ACG	CGU, CGC, CGA	21, 22	4752(±440)	7.37
Arg3	CCG	CGG	37	639(±63)	0.99
Arg4	UCU	AGA	17	867(±160)	1.34
Arg5	CCU	AGG	16	420(±69)	0.65
Asn	GUU	AAC, AAU	42	1193(±127)	1.85
Asp1	GUC	GAC, GAU	12	2396(±346)	3.72
Cys	GCA	UGC, UGU	25	1587(±126)	2.46
Gln1	UUG	CAA	31	764(±66)	1.18
Gln2	CUG	CAG	32	881(±94)	1.36
Glu2	UUC	GAA, GAG	47	4717(±411)	7.32
Gly1*	CCC	GGG	24		
Gly2	UCC	GGA, GGG	24	2137(±320)	3.31
Gly3	GCC	GGC, GGU	34, 35	4359(±378)	6.76
His	GUG	CAC, CAU	26	639(±95)	0.99
Ile1	GAU	AUC, AUU	13	3474(±94)	5.39
Ile2*	CAU	AUA	13		
Leu1	CAG	CUG	7	4470(±346)	6.94
Leu2	GAG	CUC, CUU	5	943(±97)	1.46
Leu3	UAG	CUA, CUG	23	666(±94)	1.03
Leu4	CAA	UUG	10, 11	1913(±190)	2.97
Leu5	UAA	UUA, UUG	2	1031(±117)	1.60
Lys	UUU	AAA, AAG	44	1924(±185)	2.97
Met f1	CAU	AUG	38	1211(±191)	1.88
Met f2	CAU	AUG	40	715(±107)	1.11
Met m	CAU	AUG	41	706(±96)	1.09
Phe	GAA	UUC, UUU	33	1037(±162)	1.60
Pro1	CGG	CCG	43	900(±150)	1.38
Pro2	GGG	CCC, CCU	27	720(±125)	1.11
Pro3	UGG	CCA, CCU, CCG	45	581(±95)	0.90
Sec	UCA	UGA	15	219(±73)	0.34
Ser1	UGA	UCA, UCU, UCG	4	1296(±94)	2.01
Ser2	CGA	UCG	3	344(±62)	0.53
Ser3	GCU	AGC, AGU	1	1408(±126)	2.18
Ser5	GGG	UCC, UCU	9	764(±127)	1.18
Thr1	GGU	ACC, ACU	14	104(±34)	0.16
Thr2	CGU	ACG	18	541(±94)	0.84
Thr3	GGU	ACC, ACU	19	1095(±62)	1.70
Thr4	UGU	ACA, ACU, ACG	8	916(±64)	1.42
Trp	CCA	UGG	39	943(±162)	1.46
Tyr1	GUA	UAC, UAU	49	769(±95)	1.19
Tyr2	GUA	UAC, UAU	48	1261(±126)	1.95
Val1	UAG	GUA, GUG, GUU	36	3840(±218)	5.96
Val2A	GAC	GUC, GUU	30	630(±98)	0.97
Val2B	GAC	GUC, GUU	20	635(±95)	0.98
4.5 S RNA			6	416(±63)	0.64

Da das optimierte Poly(Phe) System so genau ist, haben wir zwei Bedingungen eingeführt, die den Fehler um mehr als eine Größenordnung erhöhen. Damit waren wir in der Lage festzustellen, welche Fehler bei der Dekodierung gemacht werden können. Die Analyse der Fehleinbauten durch Zugabe von 1,3 μ M Streptomycin bzw. durch Erhöhung der Magnesiumkonzentration bestätigte die Theorie, das *in vivo* nicht-verwandte Aa-tRNAs niemals und nah-verwandte Aa-tRNAs nur bei Abweichung in der wobble Position (häufig) oder bei Abweichung in der ersten Position (mäßig) eingebaut werden. Aa-tRNAs die sich in der mittleren Position der Codon-Anticodon Wechselwirkung unterscheiden, wie bei Serin, werden ebenfalls nicht eingebaut und sollten als nicht cognate tRNAs bezeichnet werden. Selbst ein Verlesen der ersten Codonposition findet in einigen Fällen nicht statt, wie die

Ergebnisse mit Valin zeigen. Ein C-U Basenpaarung an der ersten Position des Codons ist energetisch so unvorteilhaft, dass Valin niemals falsch in die Poly(Phe) Kette eingebaut wird und somit als nicht-cognate Aa-tRNA betrachtet werden sollte. Die von uns gefundene

Tabellen 4.3 A und B; A)Table 1: Wobble Basenpaarungen und B)Table 2: Dekodierungsregeln nach (Lim and Curran, 2001)

TABLE 1. Wobble rules for unmodified and modified residues in the first anticodon position.

Nucleoside on the anticodon	Nucleoside recognized on the codon
U	A, G, U, C
C	G
A	A < G < C < U (A and G poorly)
G	U, C
I	U, C, A (A poorly)
S ² U	A, G (G poorly)
Se ² U	A, G
Um	A, G (G less well than A)
xm ⁵ U	A, G
xo ⁵ U	A, G, U
k ² C (lysidine)	A

"Poorly" means that recognition efficiency is several percent. "Less well" means that recognition efficiency is several times lower. A < G < C < U is a rank of recognition efficiency of all the four standard bases.

TABLE 2. Rules for codon misreading.

Rule 1. Misreading errors should occur at only one of the three codon positions.

Rule 2. Misreading errors at the first and second codon positions:

Nucleoside on the anticodon second or third position	Nucleoside misread on the codon
U	G
C	A
A	C
G	U

Rule 3. Misreading errors at the third codon position:

Nucleoside on the anticodon first position	Nucleoside misread on the codon
C	A, U
G	A, G
I	G
S ² U	U, C
Se ² U	U, C
Um	U, C
xm ⁵ U	U, C
xo ⁵ U	C
k ² C (lysidine)	U

Restriktion des Fehleinbaus auf die wobble und die erste Position des Codons steht in guter Übereinstimmung mit den Fehleinbau-Regeln für diese Positionen, die von Lim & Curran vorhergesagt wurden (Lim and Curran, 2001). Sie beschreiben, dass eine C-U Basenpaarung zwar in der wobble Position stabilisiert werden kann, aber nicht in der ersten Codon Position (Tabellen 4.3 A und B).

Die Analyse der Fehleinbauten in der Poly(Phe) Synthese zeigte deutlich, dass eine Definition der Codon-Anticodon-Wechselwirkung in nah-verwandt und nicht-verwandt sinnvoll über die Häufigkeit des Fehleinbaus der tRNAs erfolgen sollte. Eine Einteilung, wie von Rodnina und Kollegen (Rodnina et al., 2002) vorgeschlagen, die nur die Anzahl der Fehlpaarungen von Codon-Anticodon berücksichtigt, erscheint nicht sinnvoll. Die Fehlpaarungsregeln von Lim & Curran hingegen basieren auf der Theorie, dass bei der Selektion der Codon-Anticodon-Paarung a) die mRNA eine A-Form annehmen muss, b) eine Fehlpaarungsenergie von ≥ 20 kJ/mol

zwischen der cognaten und nah-cognaten Paarung vorliegt (berechnet aus der *in vivo* Fehlerhäufigkeit) und c) eine Rate des Elongationszyklus von 8/s erreicht wird. Daraus resultiert, dass für die Auswahl der nah-cognaten Codon-Anticodon-Paarung nur der Verlust einer nicht-kompensierten Wasserstoffbrücken-Bindung erlaubt ist, die jedoch nicht

notwendigerweise im Codon-Anticodon-Paar zu finden ist, sondern eher in der Wechselwirkung zwischen Dekodierungszentrum und Codon-Anticodon-Paar. Obwohl in diesem Modell die selben Fehlpaarungsregeln für die erste und zweite Position des Codons gelten, ist in diesem Modell der Fehlpaarung nicht die Sequenz des Codons, bzw. des Anticodons *per se* das Auswahlkriterium für die Aa-tRNA, sondern das Zusammenspiel aus Dekodierungszentrum und Codon-Anticodon-Wechselwirkung, wie auch kürzlich durch Ramakrishnan und Kollegen gezeigt (Ogle et al., 2003).

Unter *in vivo* nahen Pufferbedingungen, wie dem Polyaminsystem, indem die E-Stellen tRNA stabil über Codon-Anticodon-Wechselwirkung am Ribosom gebunden bleibt, trägt die reziproke Kopplung zwischen E- und A-Stelle entscheidend zu der Genauigkeit der Proteinsynthese bei (Dinos et al., 2005). Diese reziproke Kopplung schafft eine A-Stelle mit reduzierter Affinität für tRNA im Dekodierungsmodus (vergleiche α - ε Model der Elongation, ((Dabrowski et al., 1995; Dabrowski et al., 1998; Rheinberger et al., 1990) ; Kapitel 1, Seite 28), die nicht verwandte tRNAs von der Dekodierung ausschließt (Nierhaus, 1990). Die Selektion der Aa-tRNA beschränkt sich somit auf eine korrekte (cognate) und zwei bis vier nahverwandte (nah-cognate) aus dem Pool von 42 zellulären tRNAs.

4.4 Recycling der Ribosomen in der Poly(Phe) Synthese

Die Analyse des S100 Extrakts nach Entfernung der zellulären RNA ergab, dass der S100 Extrakt frei von Klasse I Terminationsfaktoren ist (Márquez, 2002) und keine tmRNA enthält, da alle RNA mittels DEAE-Behandlung aus der S100 Präparation entfernt wird (Rheinberger et al., 1988) und die Aminosäure Alanin zur Beladung möglicher tmRNA Reste nicht im poly(U) System enthalten ist. Ein Recycling der Ribosomen in der Poly(Phe) Synthese konnte zweifelsfrei für kurze Poly(U) Fragmente (50nt) aber auch für lange Ketten (1400nt) nachgewiesen werden, da die Anzahl der eingebauten Phe-Reste pro Ribosom die Anzahl der UUU Codone in einem Leseraster deutlich übersteigt. Die Recyclingzeit wurde auf ungefähr 300 Millisekunden bestimmt, Kapitel 3.1.3, Seite 100. Dies zeigt, dass ein Recycling von stecken gebliebenen Ribosomen ohne tmRNA in *E. coli* möglich ist, und erklärt, warum die chromosomale Entfernung des tmRNA Genes in *E. coli* (tmRNA *knock-out*) keinen Phänotyp zeigt. Hingegen ist in *Bacillus subtilis* die tmRNA essentiell.

4.5 Optimierung der Microreaktionen in einem Elongationszyklus (Watanabe)

Die Umstellung der Magnesiumkonzentration im Polyaminpuffersystem von 6 mM zu 4,5 mM in der Poly(Phe) Synthese ermöglichte eine Fehlerrate, die der *in vivo* Fehlerrate entspricht. Gleichzeitig erfolgt unter diesen Bedingungen maximale Poly(Phe) Synthese. Diese kann durch das Energieregenerationssystem über zwei Stunden aufrecht gehalten werden. Die Umstellung der Magnesiumkonzentration im Watanabe Experiment von 6 mM zu 4,5 mM erbrachte eine Verbesserung der Homogenität der hergestellten ribosomalen Komplexe für die Kryo-EM und ermöglichten die Rekonstruktion vom 70S Komplex mit einer Auflösung von bis zu 7 Å (Spahn, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit erfolgte die Optimierung des Watanabe Experiments bezüglich der mRNA Menge im 4,5 mM Magnesium/ Polyaminsystem. Ein acht bis zehnfacher Überschuss an mRNA über Ribosomen bei 2,5-fachem Überschuss an tRNA über Ribosom führte zu einer vollständigen Besetzung der P Stelle. Trotz der vollständigen Besetzung der P-Stelle zeigte sich ein Anteil an nicht-programmierten Ribosomen (Ribosomen, die keine mRNA tragen). Die Puromycinreaktion als Indikator der Besetzung der P-Stelle zeigte eine überschießende Reaktion der Peptidyl-tRNA mit Puromycin, die so genannte repetitiven Puromycinreaktion. Dieser Befund lässt sich nur durch das Vorhandensein von nicht mit mRNA programmierter Ribosomen erklären, die nach der Reaktion der P-Stellen tRNA mit Puromycin die entstandene deacyl-tRNA verlieren und durch erneute Bindung einer Peptidyl-tRNA nochmals an einer Puromycinreaktion teilnehmen können. Die ermittelten Bindungswerte der PRE und POST Komplexe bei denen die Bindung mit zwei radioaktiv markierten tRNAs untersucht wurden, zeigten Besetzungen der A und P Stelle mit tRNAs bis zu jeweils 70%. Die Analyse der Komplexe im toeprint Experiment bestätigt, dass die gebildeten programmierten Ribosomen homogenen PRE bzw. POST Komplexen entsprechen. In diesem Experiment können allerdings keine nicht-programmierten Ribosomen nachgewiesen werden. Das Herabsetzen der Inkubationszeit mit Puromycin auf fünf Minuten unterdrückt die repetitive Puromycinreaktion weitestgehend. Die Verknüpfung von Puromycinreaktion und toeprint Experiment zur Bestimmung der Bindungszustände erweitert die Nachweiskraft der *in vitro* Experimente. Durch Puromycinreaktion ist die Bestimmung der tRNA Position innerhalb der großen Untereinheit möglich. Das toeprint Experiment ermittelt nicht nur die Position der tRNA, sondern auch der

mRNA innerhalb der kleinen Untereinheit. Die Optimierung der experimentellen Bedingungen des Watanabe Experiments sind in der folgenden Tabelle 4.4 zusammengestellt.

Tabelle 4.4 Watanabe Optimierung zur Herstellung homogener ribosomaler Komplexe

Optimierungsschritt	Bedingungen vorher	Bedingungen nach der Optimierung
mRNA/ 70S	6-fach	8-10 fach
Pre-Inkubationzeit	15Minuten	≥10 Minuten
tRNA/ 70S	1,5-2 fach	2,5 fach
Hauptinkubation	30 Minuten	unverändert
Translokation	10 Minuten	10-30 Minuten
Puromycinreaktion	15 Minuten	10 Minuten

4.6 Translokation und Rücktranslokation des Ribosoms

Die Translokationsreaktion ist eine der bemerkenswertesten Ereignisse der Proteinsynthese. Zwei 25 kDa große tRNAs und die mRNA müssen präzise um ein Codon (ca. 10 Å) durch das Ribosomen bewegt werden. Die Bewegung des tRNA₂*mRNA Komplex wird durch den Elongationsfaktor G und GTP Hydrolyse katalysiert. Die Bindung des EF-G in der GTP Form (EF-G*GDPNP) an den PRE Komplex führt zu einer strukturellen Änderung des Ribosoms (Frank and Agrawal, 2000). In dieser so genannte Ratschenbewegung (*ratchet movement*) bewegt sich die kleine Untereinheit relativ zur großen Untereinheit und innerhalb der großen Untereinheit erfolgen ebenfalls Konformationsänderungen (Agrawal et al., 1999a; Frank and Agrawal, 2001; Frank et al., 1999; Frank and Agrawal, 2000). Diese Strukturänderungen werden als das Entriegeln (*unlocking*) der mRNA innerhalb des Ribosoms verstanden (Spirin, 1987). Die Ratschenbewegung des Ribosom scheint mit der Bewegung der A-Stellen in die Hybridposition A/P einherzugehen (Seo et al., 2006; Zavialov et al., 2005) und setzt die Bewegung der P-Stellen tRNA in die P/E Hybridposition voraus. Eine Bewegung der P-Stellen tRNA in diese Position ohne eine Bewegung der A-Stellen tRNA konnte kürzlich von Cooperman und Kollegen gezeigt werden (Pan et al., 2007). Obwohl es sich bei den beschriebenen Hybridpositionen höchstwahrscheinlich um transiente Übergänge der Translokation handelt (Munro et al., 2007), konnten diese sowohl in der Kryo-EM als auch in Schutzexperimenten unter konventionellen Pufferbedingungen gezeigt werden. Unter Polyaminpufferbedingungen und dem so genannten „*high fidelity*“ Puffer konnten in der Kryo-EM nur definierte klassische tRNA Bindungsstellen detektiert werden (Agrawal et al.,

2000) (Agrawal et al., 1999b) (Konevega et al., 2007). Die Bedeutung der GTP Hydrolyse für die Translokation wurde kontrovers beschrieben, neben dem Modell des Motorproteins (Rodnina et al., 1997) in dem EF-G die Energie der Hydrolyse für die Translokation einsetzt, beschreibt dieselbe Gruppe in dieser Publikation, dass die Hydrolyse nicht für die Translation notwendig ist, da EF-G*GDPNP ebenfalls zu einer Translokation führt, wenn auch mit einer 50-fach geringeren Rate. In einer kürzlich erschienenen Publikation bestätigen Wintermeyer & Rodnina nun ein Modell in dem Konformationsänderungen des EF-G die Translokation bewirken (Savelsbergh et al., 2003; Wilden et al., 2006). Dieses Modell wurde bereits auf der Basis von Kryo-EM Daten von anderen Gruppen beschrieben: Die Hydrolyse des GTP durch EF-G führt zu einer Veränderung innerhalb des EF-G und dadurch wird die Domäne IV des EF-G in die A-Stelle der kleinen Untereinheit einpasst (Stark et al., 2000; Valle et al., 2003). In der Folge der Einpassung der Domäne IV in die 30S A-Stelle werden die tRNAs und die mRNA um ein Codon verschoben und die Translokation vollendet. Das Verlassen des anorganischen Phosphats führt zu einer weiteren Konformationsänderung innerhalb des EF-G und bewirkt die Dissoziation des EF-G vom Ribosom. Damit erfolgt eine Verriegelung (*locking*) der mRNA des Ribosoms im POST Zustand. Die tRNAs befinden sich nun erneut in den klassischen Bindestellen P und E. Die Bezeichnung „locking“ und „unlocking“ wird auch für die Zustände des PRE Ribosoms bezüglich der EF-G Bindung benutzt (Valle et al., 2003). Hier wird, obwohl keine Konformationsunterschiede in der Kryo-EM Rekonstruktion erkennbar sind, das „locking“ als der Zustand vor der Peptidyltransferreaktion (PT-Reaktion) und das „unlocking“ für den Zustand nach der PT-Reaktion bezeichnet. Das Signal für das „unlocking“ ist das Entstehen der deacyl-tRNA in der P-Stelle durch die PT-Reaktion. Dieser Zustand ist dann „offen“ für die EF-G Bindung, (Valle et al., 2003; Zavialov and Ehrenberg, 2003). Die beiden G- Proteine EF-Tu und EF-G machen die Proteinsynthese gerichtet: Die mRNA wird von 5' nach 3' gelesen, um sukzessive die Aminosäuren zum Protein zu verknüpfen. Die Hydrolyse des GTPs durch EF-G (PRE zu POST), bzw. EF-Tu (POST zu PRE) macht die Translokationsreaktion irreversibel. Der Wechsel zwischen PRE und POST erfolgt nur durch gleichzeitiges Verschieben der mRNA um ein Codon in 3' Richtung. Die Besetzung des neu eingewanderten A-Stellen Codons wird durch EF-Tu vermittelt. Die Analyse des als Elongationsfaktor 4 (EF 4) bezeichneten LepA durchbrach dieses Paradigma. Zum ersten Mal konnte zweifelsfrei eine LepA vermittelte Rücktranslokation des POST zum PRE Zustand und eine Bewegung des Ribosoms auf der mRNA von 3' in 5' gezeigt werden, Abbildung 3.32, Seite 150.

4.6.1 Translokation durch EF-G

Für die Translokation des PRE zum POST Zustand wurde für die Reaktion mit EF-G und nichtspaltbaren GTP-Analoga, wie GDPNP und GDPCP eine Translokationsrate beschrieben, die 50-fach langsamer als die GTP katalysierte Reaktion erfolgt (Rodnina et al., 1997). Andere Autoren beschreiben, dass EF-G*GDPNP den PRE Zustand im Hybrid Zustand mit tRNAs in A/P und P/E bindet (Frank and Agrawal, 2000; Wilson and Noller, 1998; Zavialov and Ehrenberg, 2003; Zavialov et al., 2005). Für EF-G ohne Nukleotid konnte die Translokationsreaktion nicht über das Maß der so genannten spontanen Translokation beschleunigt werden (Bergemann and Nierhaus, 1983; Rodnina et al., 1997). Im Gegensatz zu diesem Ergebnisse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass EF-G ohne Nukleotid eine nahezu vollständige Translokation zeigt. Diese Translokation beruht nicht auf einer spontanen Translokation, da der PRE Zustand sich innerhalb der gleichen Inkubationszeit ohne Zugabe von EF-G nicht verändert, Abbildung 3.32, Seite 150. Ebenso wenig verändert sich das toeprint Signal in der Kontrolle in der nur das nichtspaltbare GTP Analog GDPNP zum PRE Komplex zugegeben wurde. Eine ca. 80%ige Translokation erfolgte durch EF-G*GDPNP, wenn das ungereinigte GDPNP benutzt wird. Da die Reinheit des GDPNP nur ca. 75 - 85% beträgt und eine GTP Kontaminationen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde das GDPNP über HPLC und Gelfiltration gereinigt. Die Analyse der Translokationsreaktion zeigte, dass EF-G in Gegenwart des gereinigten GDPNP keine Translokation katalysieren kann. Dies könnte bedeuten, dass EF-G in der GTP Form, den PRE Komplex stabilisiert. Dieser Befund könnte die Rücktranslokation der POST Komplexe in Gegenwart von EF-G und GDPNP, GDPCP und GTP γ S erklären. Eine partielle Bewegung der tRNAs in die Hybridpositionen durch EF-G*GDPNP ist ebenfalls nicht nachweisbar, die Komplexe zeigen keine Reaktion mit Puromycin. Dieser Befund schließt die Bildung der Hybridpositionen aus (Dorner et al., 2006). Die Ergebnisse der Translationsexperimente stehen im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen aus verschiedenen Gruppen (Wilden et al., 2006; Zavialov and Ehrenberg, 2003; Zavialov et al., 2005), sind aber im Einklang mit früheren Ergebnissen von (Rodnina et al., 1997). Eine mögliche Erklärung für die gefundene Translokation ohne Nukleotid könnte in den 2,5-fachem Überschuss an EF-G/70S liegen, da sich möglicherweise in der Inkubationszeit von 60 Minuten das Gleichgewicht zwischen PRE und POST durch den Überschuss an EF-G zu POST verschiebt. Die Unterschiede zwischen gereinigtem und ungereinigtem GDPNP könnte möglicherweise durch einem Verlust bzw. der Zerstörung des GDPNP durch die Aufreinigung erklärt werden. Nach der Reinigung lassen sich zwar noch

Anteile an GDPNP in der massenspektroskopischen Analyse nachweisen, aber die Stärke der Signale für Bruchstücke und dem Guanosin-di-phospho-amitid (GDPN) überwiegen.

4.7.2 LepA (EF 4) ist ein Elongationsfaktor, der durch Rücktranslokation des POST zum PRE Zustand Translationsfehler vermeidet

Das *lepA* Gen ist das erste Cistron des bi-cistronischen Lep Operons in *E. coli*. Das zweite Cistron kodiert für die Signal-Peptidase Lep (leader peptidase), ein integrales Membranprotein, das die Signalsequenz (leader peptide) von exportierten und periplasmatischen Proteinen entfernt. *E. coli* LepA mit 67 kDa und 599 Aminosäuren zeigt hohe Sequenzhomologie zu bakteriellen GTPasen, *de facto* ist LepA eines der am höchsten konservierten Proteine überhaupt. LepA zeigt zwischen 55-68% Aminosäureidentität zu bakteriellen Homologen (Qin et al., 2006), eine höhere Konservierung als andere bakterienspezifischen Faktoren, wie Initiationsfaktor 3 (IF3) oder der Guaninnukleotid-Austauschfaktor EF-Ts des Elongationsfaktor Tu (EF-Tu), siehe Tabelle 4.5. Diese hohe Konservierung des LepA steht im Gegensatz zu dem Befund, dass die chromosomale Entfernung des *lepA* Genes in *E. coli* (*lepA* knock-out) keinen Phänotyp unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Dibb and Wolfe, 1986) zeigt.

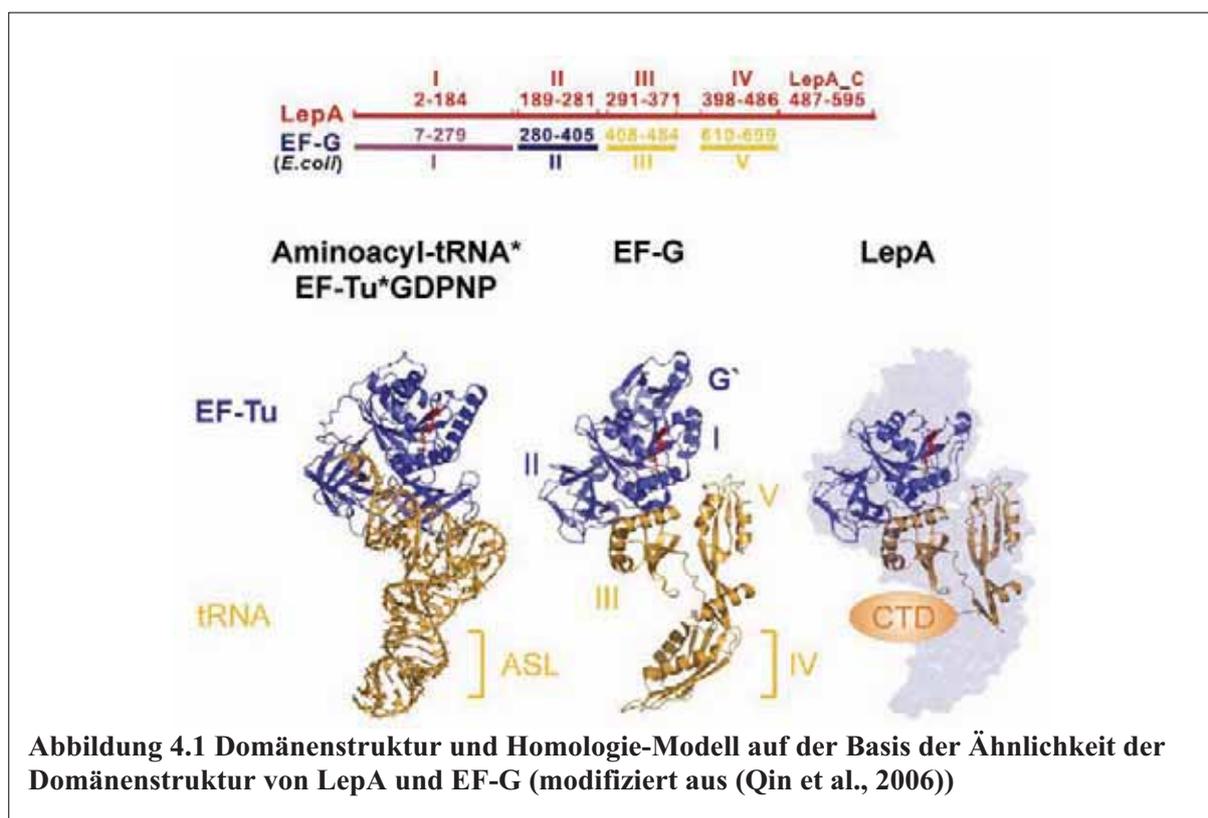
Fünf Domänen können für das LepA Protein vorhergesagt werden, von denen die ersten vier Domänen sehr hohe Sequenzhomologie zu EF-G zeigen. Die fünfte Domäne des LepA ist

Tabelle 4.5 Sequenzidentität einiger bakterieller Faktoren, modifiziert aus (Qin et al., 2006)

Protein	NCBI GenPept ID (gi) der <i>E. coli</i> Sequenz	Aminosäureidentität (in %) mit bakteriellen Orthologen	
EF-Tu	1790412	70.3	82.0
EF-G	62288080	58.3	70.3
LepA	16130494	54.6	67.7
IF-2	16131060	34.5	49.2
IF-3	16129674	42.8	69.4
EF-Ts	1786366	32.5	49.5

ebenfalls hoch konserviert innerhalb der LepA Homologen, und zeigt eine gewisse Homologie zum C-Terminus des *ffh* Genprodukt. Dieser Bereich könnte an der Verankerung des LepA an der Membran beteiligt sein. Domäne I bis IV des LepA entsprechen den Domänen I, II, III und V von EF-G, die vierte Domäne des EF-G ist nicht in LepA vorhanden. Auf der Basis der Ähnlichkeit der beiden Proteine konnte ein Homologie-Modell für LepA generiert werden, das zeigte, dass neben der fehlenden Domäne IV des EF-G in LepA keine G' Subdomäne vorhanden ist (Qin et al., 2006), Abbildung 4.1.

Die strukturelle Ähnlichkeit der Kristallstruktur des EF-G mit der des ternären Komplex aus Aminoacyl-tRNA*EF-Tu*GDPNP (Nissen et al., 2000) führte zu dem Modell der molekularen Mimikry der Translationsfaktoren. Nach diesem Modell korrespondiert die Domäne IV des EF-G mit dem Anticodon Bereich der tRNA des ternären Komplex, der in der ribosomalen A-Stelle mit dem Dekodierungsbereich interagiert. Ein EF-G Konstrukt, bei dem



gentechnisch die Domäne IV entfernt wurde, zeigte keine Translokationsaktivität (Martemyanov and Gudkov, 1999; Martemyanov et al., 1998).

EF-G zeigt die stärkste Ribosomen abhängige GTPase Aktivität aller in der Translation beteiligten Proteinfaktoren. Ist die GTP Spaltungsaktivität der Elongationsfaktoren nicht an die Translokationsreaktion des Ribosoms gekoppelt, so spricht man von entkoppelter GTPase

Aktivität. Der Vergleich der entkoppelten GTPase Aktivität von LepA und EF-G zeigte, dass die GTPase Aktivität des LepA im gleichen Maße wie die des EF-G durch reassozierte Ribosomen stimuliert wird (Qin, 2006).

EF-G katalysiert die Translokation des PRE Komplexes zum POST Komplex, dabei verschiebt sich die mRNA mit den tRNAs um ein Codon, d.h. die Peptidyl-tRNA wandert von der A-Stelle in die P-Stelle, die deacyl-tRNA von der P in die E-Stelle. Die klassische Unterscheidung zwischen PRE und POST Komplex erfolgt durch den Nachweis der Puromycinreaktion, siehe Abbildung 3.6 C. Die Peptidyl-tRNA ist im POST Komplex in der P-Stelle lokalisiert und die A-Stelle frei für den Zugang des Puromycin, sodass ein Peptidyltransfer von der Peptidyl-tRNA auf das Puromycin erfolgt. Im PRE Zustand ist die A-Stelle mit der Peptidyl-tRNA besetzt, sodass keine Puromycinreaktion stattfinden kann. Die Analyse der Puromycinreaktion der drei funktionellen Zustände des Ribosoms, P_i , PRE und POST in Gegenwart und Abwesenheit von LepA lieferte den ersten Hinweis auf eine mögliche LepA katalysierte Rücktranslokation des Ribosom von POST nach PRE (Qin et al., 2006). Erstaunlicherweise konnte für den POST Komplex, der mit LepA inkubiert wurde, ebenso wie für den PRE Komplex, keine Puromycinreaktion detektiert werden. Der P_i Komplex zeigt vor und nach Inkubation mit LepA vollständige Puromycinreaktion bis zum Ausmaß der gebundenen Peptidyl-tRNA.

Für den Nachweis der LepA abhängigen Rücktranslokation wurde das toeprint Experiment unter den optimierten Polyaminpuffer Bedingungen in dieser Arbeit etabliert (Kapitel 3.3, Seite 130 ff). Die Herstellung der ribosomalen Komplexe für die toeprint Experimente erfolgte im Watanabe Experiment. Es konnte eine eindeutige Besetzung der programmierten Ribosomen mit den entsprechenden tRNAs nachgewiesen werden. Diese Komplexe lieferten klare toeprint Signale für den PRE bzw. POST Zustand, die mit der ermittelten Puromycinreaktion korrelierten. Eine nahezu vollständige Translokation (bis zu 92%) des PRE Komplexes zum POST Komplex durch katalytische Mengen EF-G konnte erzielt werden.

Zur Analyse der GTP abhängigen Rücktranslokation durch LepA mussten EF-G freie POST Zustände hergestellt werden. In Gegenwart von EF-G und LepA zeigte sich ein Verlust der spezifischen toeprint Signale, vergleiche Kapitel 3.4.2.1, Abbildung 3.30 (Seite 148). Das Auftreten der unspezifischen toeprint Signale könnte auf eine Stabilisierung von Sekundärstrukturen der mRNA hinweisen, die nach einem Freisetzen der mRNA aus den ribosomalen Komplexen entstehen könnten. Eine mögliche Erklärung für das Freisetzen der

mRNA könnte eine Destabilisierung der Ribosomen durch wiederholte Translokation durch EF-G und Rücktranslokation durch LepA sein, was auch die toxische Wirkung der Überexpression von LepA *in vivo* erklärt (Qin et al., 2006), nämlich Folge einer unproduktiven Hin- und Her-reaktion von Translokation und Rücktranslokation gekoppelt an Verbrauch von Energie für beide Prozesse.

Der Nachweis einer produktiven Rücktranslokation durch LepA*GTP erfolgte mit EF-G freien POST Komplexen (Abbildung 3.32, Seite 150). Diese Komplexe zeigten eine nahezu vollständige Rücktranslokation durch LepA*GTP. Für das Entfernen des EF-G von POST Komplexen konnte zwei Methoden etabliert werden. A) Die Entfernung von löslichen Komponenten erfolgt durch Zentrifugation der POST Komplexe durch ein Saccharose-Kissen. Das erhaltene Ribosomenpellet enthält neben dem Ribosomen nur fest gebundene mRNA und tRNAs, es ist frei von EF-G und Nukleotiden. Bei dieser Methode zeigte sich, dass durch das Entfernen des EF-G's die POST Komplexe eine beschränkte Neigung zeigen, sich in PRE Komplexe zurück zu verwandeln: Nach der Zentrifugation wurden Mischungen von PRE und POST von ungefähr jeweils 50% erhalten. B) Die Entfernung des His₆-markierten EF-G erfolgte durch Bindung an Nickel-Agarose. Diese Methode hat den Vorteil, dass nur das His₆-markierten EF-G entfernt wird, aber die anderen freien Moleküle (tRNA, mRNA, Energie) des Watanabe Experiments vorhanden bleiben. Auch bei dieser Methode zeigte sich die Tendenz der Rücktranslokation des POST zum PRE. Möglicherweise liegt ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen POST und PRE Zustand, das *in vitro* nach Entfernung des EF-G sich innerhalb der Inkubationszeit einstellt. Ein weiteren Hinweis für eine Bevorzugung des PRE Zustand lieferte das Experiment der E-Stellen Füllung von Initiationskomplexen, vergleiche Kapitel 3.3.1.7. In diesem Experiment wird der erwartete POST Zustand, der durch die Füllung der E-Stelle eines Initiationskomplexes mit deacyl-tRNA entstehen sollte, vollständig in einen PRE Zustand umgewandelt. Eine Rücktranslokation von POST Komplexen in Gegenwart von EF-G erfolgte durch nicht spaltbare GTP Analoga (GDPNP; GTP γ S; GDPCP), wenn auch nicht in dem Ausmaß wie durch die LepA katalysierte Rücktranslokation. Auch EF-G freie POST Komplexen zeigen eine Rücktranslokation durch nichtspaltbare GTP Analoga, diese ist aber weniger stark ausgeprägt.

Die Bedeutung der LepA abhängigen Rücktranslokation liegt in der Vermeidung von Translationsfehlern, die durch ungünstige ionische Bedingungen, wie zum Beispiel einer erhöhten Magnesiumionenkonzentration, entstehen (Qin et al., 2006). Tatsächlich konnte im

gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem durch Zugabe einer substöchiometrischen Menge von LepA (0.1-0.3/70S) vollaktives GFP synthetisiert werden. Dieser Befund sollte bei Herstellern/Vertreibern gekoppelter Systeme (Roche, Promega) Beachtung finden, da gekoppelte Transkriptions-/Translationssysteme für die *in vitro* Synthese von aktiven toxischen Proteinen oder mit spezifischen Isotopen dotierte Proteine für NMR Untersuchungen hergestellt werden könnten.

Das gekoppelte System von Roche (RTS), das sich durch eine hohe Ausbeute von bis zu 4mg/ml Protein auszeichnet, wurde mit dem weniger effizienten System von Promega verglichen. In beiden Systemen konnte eine Steigerung der aktiven Fraktion gezeigt werden, vergleiche Abbildung 3.39 (Seite 158). Für das S30 System von Promega konnte in dieser Arbeit durch die Zugabe von LepA eine deutliche Steigerung der aktiven Fraktion von 30% auf 50% erreicht werden, aber 100% aktives Protein, wie für das Roche (RTS) System, war unter den gewählten Bedingungen in diesem System nicht nachweisbar.

Für den Mechanismus der LepA vermittelten Vermeidung von Translationsfehlern wurde von unserer Gruppe folgender Mechanismus vorgeschlagen, Abbildung 4.2.

Unter optimalen Bedingungen erfolgt der Elongationszyklus nahezu fehlerfrei, der PRE Komplex wird durch EF-G*GTP nach erfolgter Hydrolyse des GTP in den POST Zustand überführt. Die mRNA und beide tRNA wandern um eine Codonlänge durch das Ribosomen. Die A-Stelle ist nun frei und das Ribosom bereit die nächste Aminoacyl-tRNA auszuwählen (Abbildung 4.2A.) Unter Stressbedingungen, wie hohe Ionenkonzentrationen außerhalb der Zelle, kann es zu einer intrazellulären Erhöhung der stark regulierten Ionenkonzentrationen kommen. Unter diesen Bedingungen könnte es sein, dass die EF-G abhängige Translokation nicht in 100% der Fälle erfolgreich ist. Ein „fehl-transloziertes“ Ribosomen, das nicht dem klassischen POST Zustand entspricht, könnte zu „stecken gebliebenen“, unproduktiven Ribosomen führen. Diese könnten eine erhöhte fehlerhafte Selektion in der A-Stelle aufweisen. Ein solches Ereignis würde den letalen Befund einer chromosomalen Entfernung des LepA Gens (*knock-out*) unter Stressbedingungen durch erhöhte Ionenstärke erklären (Qin et al., 2006), Karim nicht publizierte Ergebnisse). Bei geringen Konzentrationen von LepA (z.B. 0,3-fach über Ribosomen) konnte LepA spezifisch unvollständig translozierte Ribosomen erkennen und eine Rücktranslokation fördern. Somit erhält EF-G eine weitere Gelegenheit die Translokation auszuführen. Möglicherweise kommt es bei hohen LepA Konzentrationen zu einem Verlust der Spezifität und LepA katalysiert bei jedem POST Zustand eine Rücktranslokation. Dies würde sowohl die Inhibition der *in vitro*

Proteinsynthese durch stöchiometrische Mengen an LepA im RTS System (Roche) erklären, als auch den toxischen Effekt der Überexpression von LepA (Qin et al., 2006).

4.6.3 Effekte der Aminoglykosid-Antibiotika *in vitro*

Streptomycin ist eines der am Besten untersuchten Antibiotika, das direkt am Ribosomen bindet. Streptomycin ist strukturell mit den Aminoglykosiden verwandt und zeigt auch den

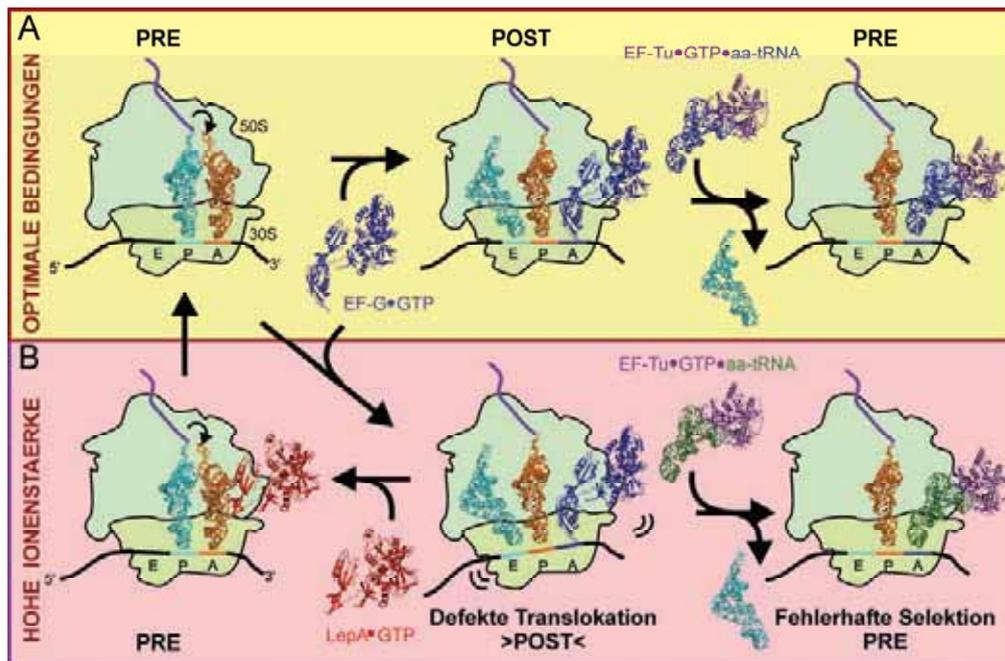


Abbildung 4.2 Modell der LepA vermittelten Vermeidung von Translationsfehlern.

A) Unter optimalen Bedingungen erfolgt die Translokation des PRE zum POST Zustand durch EF-G. Der $tRNA_2 \cdot mRNA$ Komplex bewegt sich um ein Codon in 5' Richtung. Der ternäre Komplex EF-Tu*GTP*Aa-tRNA bindet in die A Stelle und entlässt die E-Stellen tRNA.

B) Unter ungünstigen Bedingungen kann es zu einer unvollständigen Translokation durch EF-G kommen. Dies führt entweder zu einer fehlerhaften Selektion der Aminoacyl-tRNA oder zur Korrektur durch LepA. LepA bewirkt eine Rücktranslokation und ermöglicht EF-G eine erneute, korrekte Translokation auszuführen.

klassischen Effekt der Aminoglykoside: Aminoglykosid-Antibiotika sind für ihren negativen Einfluss auf die Genauigkeit der Proteinbiosynthese bekannt. Streptomycin konnte mit der 30S Untereinheit aus *T. thermophilus* co-kristallisiert werden und die Strukturanalyse der Kristalle zeigt eine einzelne Ribosomen-Bindestelle. Über diese Bindestelle verknüpft Streptomycin vier Helices aus vier verschiedenen Domänen der 16S rRNA (h1, h18, h27 und h44) und kontaktiert das ribosomale Protein S12. Streptomycin ist eines der stärksten Fehler-induzierenden Antibiotika, einige Mutationen innerhalb des S12, die Resistenz gegen Streptomycin vermitteln, zeigen den Phänotyp der Streptomycin-Abhängigkeit. Mutationen, die den Phänotyp der Streptomycin-Abhängigkeit aufheben konnten, zeigten sich in den

Proteinen S4 und S5. Ribosomen mit S12 Mutationen zeigen hyperakkurate Aminoacyl-tRNA Selektion, während Mutationen in S4 und S5 (*ram*: ribosome ambiguity mutants) zu einer erhöhten Fehlerrate führen (Zimmermann et al., 1971).

Streptomycin erhöht *in vitro* einen Leucin-Fehleinbau bis zu 30-fach in der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese, einen fast ebenso starken Effekt löst die Erhöhung der Magnesiumkonzentration um 10 mM aus, vergleiche Kapitel 3.1.4; Abbildung 3.5 (Seite 103). Obwohl die Steigerung der Ungenauigkeit einen erheblichen Einfluss auf die Proteinsynthese nimmt, kann dieser Effekt nicht mit der bakteriziden Wirkung der Aminoglykoside korreliert werden, da Mutationen in S4 eine vergleichbare Steigerung der Ungenauigkeit der Proteinsynthese, aber keinen bakteriziden Effekt zeigen.

4.6.3.1 Aminoglykoside hemmen die Proteinsynthese von heteropolymeren mRNA, aber stimulieren die Poly(Phe) und Poly(Lys) Synthese

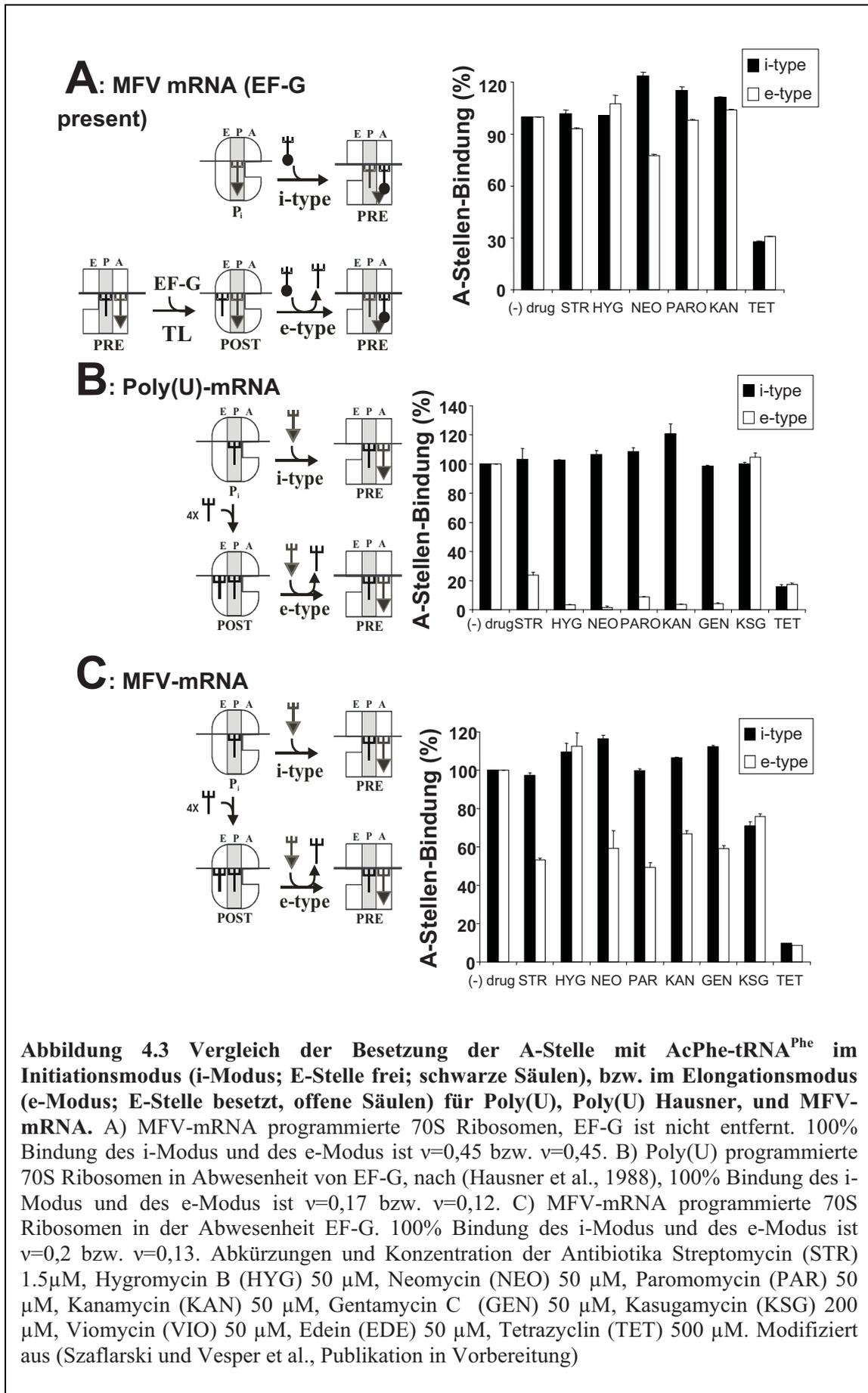
Die Synthese des Green Fluoreszenz Protein (GFP) im gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem zeigte unter Einwirkung von Streptomycin sowohl eine Abnahme der Gesamtmenge der Proteinsynthese als auch eine Abnahme der Genauigkeit der Proteinsynthese, Abbildung 3.46 (Szaflarski und Vesper et al., Publikation in Vorbereitung). In der Poly(U) abhängigen Poly(Phe) Synthese zeigte Streptomycin neben der erhöhten Fehlerrate eine Steigerung der Gesamtsynthese des Poly(Phe), ein Effekt der nicht mit natürlichen mRNA (wie z.B. zur Synthese von GFP) beobachtet werden konnte. Ähnlich wie Streptomycin wirken auch andere Aminoglykoside, Vertreter aller drei Hauptgruppen (Gentamycin, Kanamycin und Neomycin) wurden untersucht. Eine entsprechende Steigerung der Syntheseleistung durch Aminoglykoside wurde auch im poly(A) abhängigen poly(Lys) System beobachtet wie auch mit einer mRNA, die mit 12 UUC Codone für oligo(Phe) codiert. Der letztere Befund schließt eine Leserasterverschiebung als Ursache für die vermehrte Synthese aus. Möglicherweise wird die mRNA in Gegenwart von Aminoglykosiden weniger stark am Ribosomen gebunden. Dies würde eine erhöhte Recyclingrate der Ribosomen und eine dadurch bedingte Steigerung der Poly(Phe) und Poly(Lys) Synthese erklären (Szaflarski und Vesper et al.; Publikation in Vorbereitung, Abbildung 3.46 auf Seite 168).

4.6.3.2 Aminoglykoside führen zu einer Rücktranslokation von EF-G freien POST Komplexen

Der erste Hinweis auf den Hemmmechanismus der Aminoglykoside erfolgte durch Hausner et al. (Hausner et al., 1988). Das allosterische Drei-Stellen-Modell, später erweitert zum α - ϵ -Modell (Dabrowski et al., 1998), beschreibt zwei Arten der A-Stellen Besetzung (Rheinberger

and Nierhaus, 1986). Ein Initiationsmodus (i-Modus), wenn nur die P-Stelle mit tRNA besetzt ist, und den Elongationsmodus (e-Modus), wenn jeweils eine tRNA in P- und E-Stelle gebunden ist.

Hausner et al. zeigten, dass die Besetzung der A-Stelle nicht durch Aminoglykoside gehemmt wird, wenn nur eine tRNA in der P-Stelle gebunden ist (i-Modus), hingegen erfolgte eine vollständige Hemmung der A-Stellenbesetzung im e-Modus (Hausner et al., 1988). In diesen Experimenten wurde eine Poly(U) mRNA in einem Polyaminsystem mit 6 mM Magnesium verwendet. Die Interpretation von Experimenten, die in Gegenwart von Poly(U) durchgeführt werden und damit das gleiche Codon an A-, P- und E-Stelle im Ribosomen tragen, ist nicht immer eindeutig. Die Wiederholung der Hausner Experiment im optimierten Watanabe Experiment (Polyaminsystem; 4,5 mM Magnesiumacetat) bestätigten den Befund von 1988. Allerdings zeigte die Analyse mit einer heteropolymerer MFV-mRNA deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen mit Poly(U), wenn die POST Zustände über eine Translokationsreaktion hergestellt wurden und nicht wie bei Hausner durch Füllung der E-Stelle in einem Bindungsschritt. Eine Hemmung der A-Stellen Besetzung durch Aminoglykoside erfolgte nicht in Gegenwart von EF-G, aber kann zum Teil für EF-G freie POST Komplexe gezeigt werden, siehe Abbildung 4.3 B und C.



Diese widersprüchlichen Befunde konnten aufgeklärt werden, indem wir eine Beobachtung der von Fredrick und Kollegen stehen (Shoji et al., 2006) aufnahmen und weiterführten: Der Block der A-Stellenbesetzung vom e-Typ beruht möglicherweise darauf, dass Aminoglykoside die beiden tRNAs in P und E Stellen rücktranslozieren und damit die A-Stelle für eine Besetzung mittels AcPhe-tRNA blockieren. Unsere systematischen Untersuchungen bestätigen und erweitern den Befund: die meisten Aminoglykoside lösen eine Rücktranslokation aus, jedoch nicht Hygromycin. Ebenfalls zeigen Antibiotika wie Viomycin und Edein, die nicht zu den Aminoglykosiden gehören, eine starke Rücktranslokation. Alle Antibiotika mit dieser Funktion haben gemeinsam, dass sie Fehleinbauten während der Dekodierung hervorrufen. Antibiotika wie Kasugamycin, Thiostrepton oder Tetracyclin, die die Genauigkeit der Proteinsynthese nicht beeinträchtigen, lösen keine Rücktranslokation aus (siehe Abbildung 3.43 im Kapitel 3.4.6.1, Seite 164). Da die Aminoglykosid induzierte Rücktranslokation nur bei EF-G freien Komplexen auftritt, ein Zustand der niemals *in vivo* beobachtet werden kann, kann dieser Effekt ebenfalls nicht mit der bakteriziden Wirkung der Aminoglykoside korreliert werden. Einen möglichen Hinweis auf die bakterizide Wirkung lieferte die Entdeckung der zweiten Bindestelle der Aminoglykoside am 70S Ribosom (Borovinskaya et al., 2007). Neben der biochemisch und strukturell gut bekannten Bindestelle innerhalb der Helix 44 (h44) der kleinen Untereinheit, wurde eine weitere Bindestelle innerhalb Helix 69 der großen Untereinheit für Viomycin und Gentamycin beschrieben. Der Kontakt der Helix 69 (H69) mit der Helix 44 (h44) bildet eine der massivsten Brücken (B2a) zwischen den ribosomalen Untereinheiten, siehe Kapitel 4.7, Abbildung 4.6, Seite 205. Die Bindung der Aminoglykoside stabilisierte die Struktur der Helix 69 und unterdrückte eine Ribosomrecycling Faktor (RRF) induzierte Konformationsänderung der Helix 69 (Borovinskaya et al., 2007; Wilson et al., 2005), die im Zusammenhang mit der Dissoziation des Ribosoms im Zuge des Ribosomrecycling steht (Vesper and Wilson, 2006; Wilson et al., 2005). Diese Stabilisierung der Brücke B2a und die Inhibition der Dissoziation des Ribosoms könnte die bakterizide Wirkung der Aminoglykoside erklären.

4.7 Termination und Ribosomrecycling: Offene Fragen und erste Hinweise

Die Termination der Proteinsynthese beginnt mit dem POST Zustand des letzten Elongationszyklus. Dieser so genannte Prä-Terminationskomplex trägt eine Peptidyl-tRNA in der P-Stelle und eine deacyl-tRNA in der E-Stelle, während sich im Dekodierungszentrum der A-Stelle ein Stopp-Codon befindet. Dieser Präterminationskomplex ist das Ziel der Klasse I Terminationsfaktoren (RF1 oder RF2) (Zavialov et al., 2001; Zavialov and Ehrenberg, 2003). Ehrenberg und Kollegen haben die Abläufe der Termination bis zur Bindung des Ribosomrecycling Faktors (RRF) untersucht, jedoch die Dissoziation der tRNAs aus E und P Stellen außer acht gelassen (Zavialov and Ehrenberg, 2003). Die Kryo-EM Rekonstruktionen von RF2*Terminationskomplexen zeigten in der Analyse von (Rawat et al., 2003) eine E-Stellen tRNA, hingegen ist in der Rekonstruktion von (Klaholz et al., 2003) keine E-Stellen vorhanden, obwohl beide Präparate von der Ehrenberg Gruppe stammen. Die kürzlich publizierte Kristallstruktur von *T. thermophilus* Terminationskomplexen mit RF2 und RF1 zeigen ebenfalls eine E-Stellen tRNA. Die umfangreichen, aber widersprüchlichen Strukturdaten werfen die Frage auf, wie der POST Terminationskomplex aussieht und zu welchem Zeitpunkt die tRNAs das Ribosomen verlassen.

4.7.1 Die E-Stellen tRNA wird nach der Hydrolyse der Esterbindung der Peptidyl-tRNA der P-Stelle durch Klasse I Terminationsfaktoren freigesetzt

Die Bedeutung einer stabilen E-Stellen 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-cognaten Aminoacyl-tRNAs während der Dekodierung in der ribosomalen A-Stelle (zur Diskussion siehe (Nierhaus, 2006a; Nierhaus, 2006b) und Kapitel 4.3).

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 letzte gebildete POST Komplex der Proteinsynthese den so genannten Präterminationskomplex ergibt, muss vom Vorhandensein der deacyl-tRNA ausgegangen werden. Die bisherigen Analysen der Termination in verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgten unter Pufferbedingungen, die keine stabile E-Stellenbindung zeigen. In Experimenten unter konventionellen (Polyamin freien)

Puffern verlieren die Ribosomen die E-tRNA während der Prozedur des Nachweises (Filterbindung oder auch schnelle Kinetiken). Im Polymixsystem der Ehrenberg-Gruppe erfolgt der Verlust der E-Stellen tRNA verzögert innerhalb weniger Minuten, so dass in diesem System die volle Kraft der allosterischen Wechselwirkung der A- und E-Stelle während der Proteinsynthese ausgenutzt werden kann. Die Fehlergenauigkeit erreicht auch in diesem System *in vivo* nahe Werte. Eine stabile Bindung der E-Stellen tRNA über 12 Stunden konnte im Watanabe Experiment mit dem Polyamin-System erreicht werden. Da das Freisetzen der E-Stellen tRNA zu einem Komplex mit nur einer tRNA in der ribosomalen P-Stelle führt, nimmt das einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität des Terminationskomplexes nach der RF2 Aktion. Kaji und Kollegen beschreiben das Freisetzen von tRNAs im Zuge des Ribosomenrecycling, allerdings muss hier, unter den verwendeten Pufferbedingungen, davon ausgegangen werden, dass keine E-Stellen tRNA gebunden ist, möglicherweise beschreiben sie hier das Freisetzen der P-Stellen tRNA. Wintermeyer und Kollegen arbeiten ebenfalls mit konventionellen Pufferbedingungen, die keine stabile E-Stellen Bindung erlauben.

4.7.2 Ribosomrecycling: Konsens oder Kontroverse?

Konsens besteht in der Beteiligung der Faktoren EF-G, RRF und IF-3 im Prozess des Ribosomrecycling. Die Gruppen von Kaji, Ehrenberg, Wintermeyer und Varshney zeigten, dass RRF und EF-G zu einer Dissoziation der Post Terminationskomplexe führt (Übersichtsartikel (Hirokawa et al., 2006; Vesper and Wilson, 2006)). Die Kontroverse besteht über die Funktion des IF-3 und über die Frage, ob die Dissoziation der Post-Terminationskomplexe stabil oder nur transient ist. Weiterhin besteht Unsicherheit über die Art des Post Terminationskomplex. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Laufe der Termination die E-Stellen tRNA freigesetzt wird, siehe Abbildung 3.44 auf Seite 166 Ein Recycling von Post-Terminationskomplexen (Puromycin behandelte Polysomen) unter konventionellen Pufferbedingungen konnte für RRF und EF-G gezeigt werden (Abbildung 3.47, Seite 170). Die unter diesen Bedingungen entstehenden Monosomen dissoziieren nicht in die Untereinheiten. Das Recycling durch RRF und EF-G unter den optimierten Polyaminpuffer Bedingungen erfolgte weder im „Polysomen break down“ Experiment, Abbildung 3.52, noch für das isolierte System mit Komplexen, die im Watanabe Experiment hergestellt wurden. Ferner können RRF und EF-G nicht die E-tRNA freisetzen, Abbildung 3.49 (Seite 173). Diese Ergebnisse sowie das des Freisetzens der E-Stellen tRNA durch den

Terminationsfaktor RF2 zeichnen das folgende Bild: Der Post-Terminationskomplex trägt eine einzelne deacyl-tRNA, siehe Abbildung 4.4

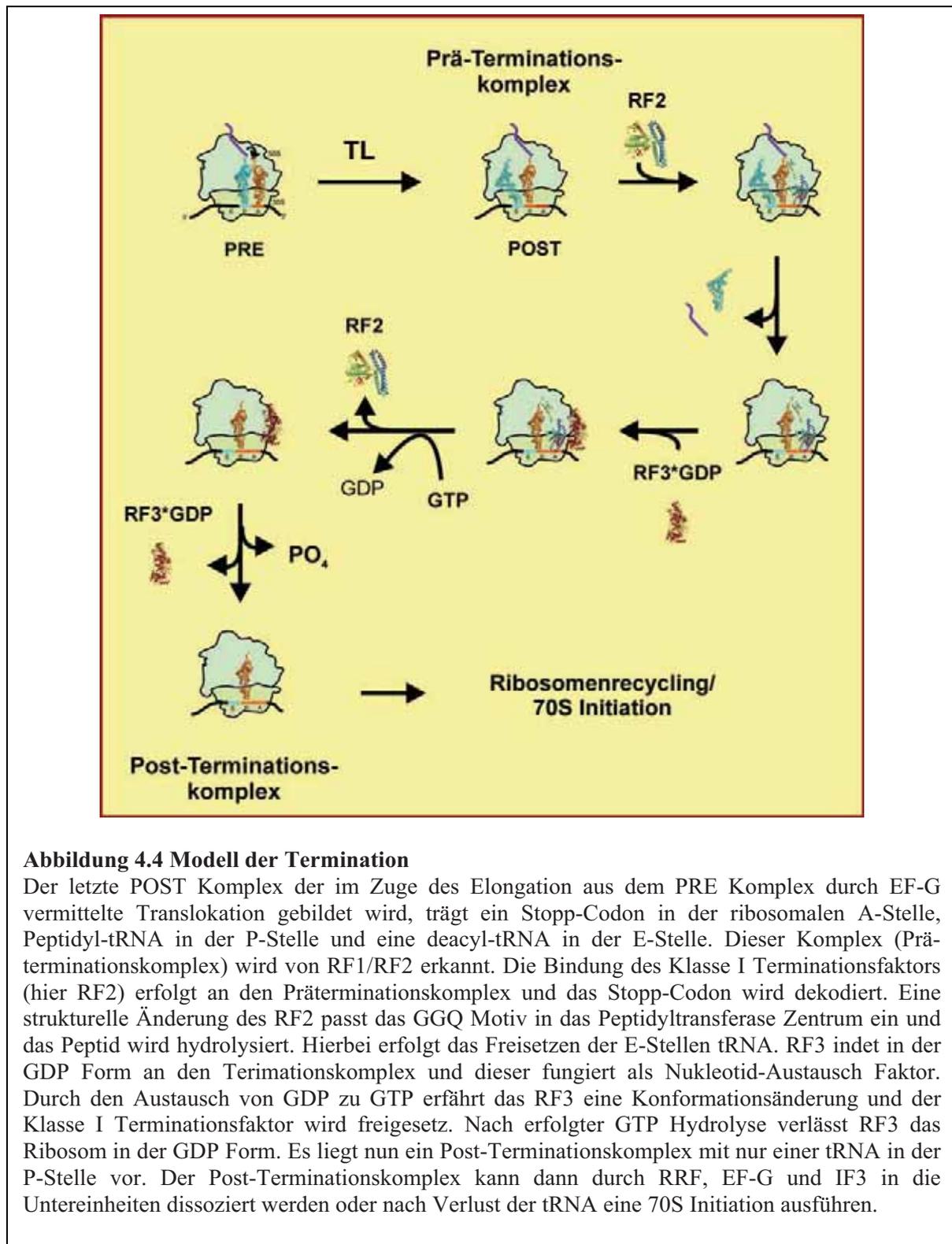
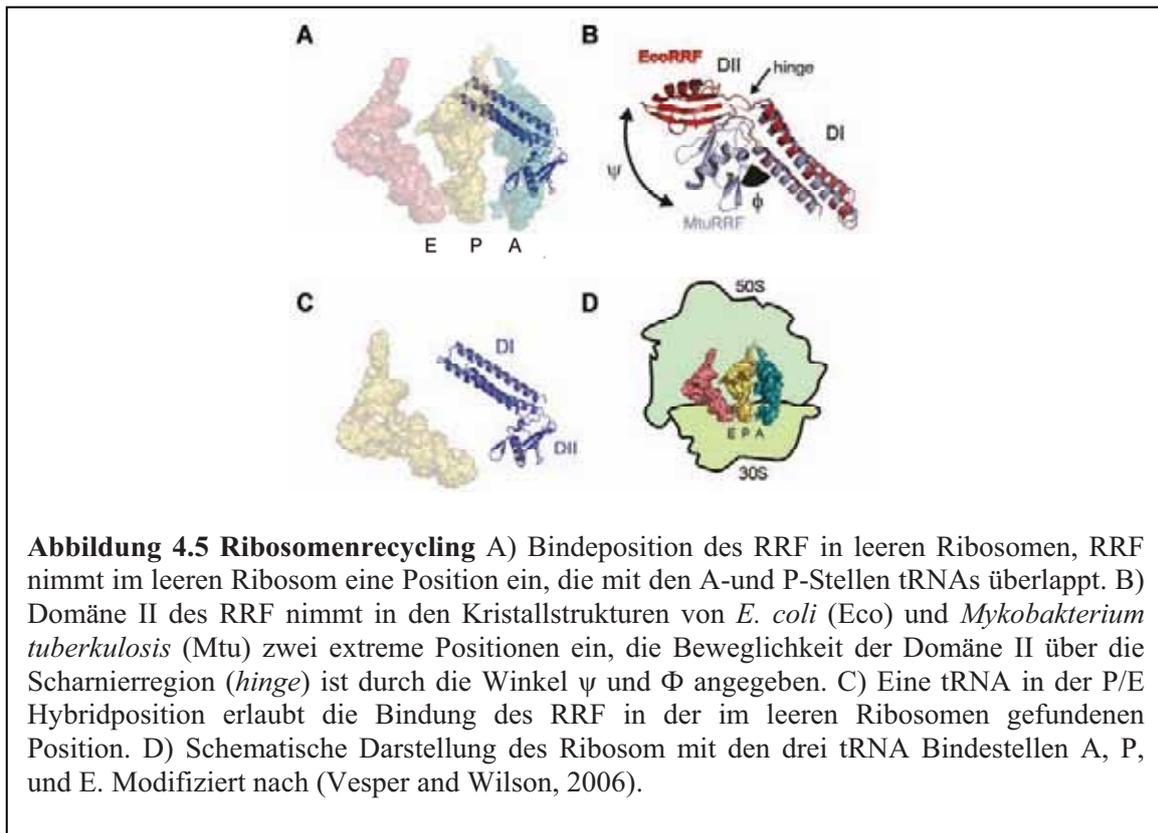


Abbildung 4.4 Modell der Termination

Der letzte POST Komplex der im Zuge des Elongation aus dem PRE Komplex durch EF-G vermittelte Translokation gebildet wird, trägt ein Stopp-Codon in der ribosomalen A-Stelle, Peptidyl-tRNA in der P-Stelle und eine deacyl-tRNA in der E-Stelle. Dieser Komplex (Prä-terminationskomplex) wird von RF1/RF2 erkannt. Die Bindung des Klasse I Terminationsfaktors (hier RF2) erfolgt an den Präterminationskomplex und das Stopp-Codon wird dekodiert. Eine strukturelle Änderung des RF2 passt das GGQ Motiv in das Peptidyltransferase Zentrum ein und das Peptid wird hydrolysiert. Hierbei erfolgt das Freisetzen der E-Stellen tRNA. RF3 bindet in der GDP Form an den Terimationskomplex und dieser fungiert als Nukleotid-Austausch Faktor. Durch den Austausch von GDP zu GTP erfährt das RF3 eine Konformationsänderung und der Klasse I Terminationsfaktor wird freigesetzt. Nach erfolgter GTP Hydrolyse verlässt RF3 das Ribosom in der GDP Form. Es liegt nun ein Post-Terminationskomplex mit nur einer tRNA in der P-Stelle vor. Der Post-Terminationskomplex kann dann durch RRF, EF-G und IF3 in die Untereinheiten dissoziiert werden oder nach Verlust der tRNA eine 70S Initiation ausführen.

In der Arbeit von Wintermeyer und Kollegen wurde für einen solchen Komplex mit nur einer tRNA eine transiente Dissoziation durch RRF und EF-G gezeigt, die durch die Wirkung von IF3 stabilisiert wird (Peske et al., 2005). Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde von Kaji und Kollegen (Hirokawa et al., 2005), aber stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ehrenberg (Karimi et al., 1999).

Strukturbiologische Methoden identifizierten eine Bindungsstelle des RRF in „leeren“ 70S Ribosomen (Gao et al., 2005; Lancaster et al., 2002; Wilson et al., 2005). In dieser Bindestelle nutzt RRF gänzlich unerwartet nicht seine Ähnlichkeit mit der tRNA-Form (= tRNA Mimikry) aus. Diese Bindposition des RRF überlappt mit den Bindestellen für die A- und die P-Stellen tRNA (Abbildung 4.5). In einem programmierten Ribosom mit nur einer tRNA in der P-Stelle könnte durch die Bindung des RRF die P-Stellen tRNA in die P/E Hybridposition gedrängt werden. Dadurch könnte eine erste Destabilisierung des Postterminationskomplexes erfolgen. In der Kristallstruktur der großen ribosomalen Untereinheit aus *D. radiodurans* im Komplex mit der Domäne I des RRF lag diese Domäne ebenfalls in einer A- und P-Stellen überlappenden Position (Wilson et al., 2005). Die Modellierung der fehlenden Domäne II des RRF wies auf einen möglichen Mechanismus der Dissoziation durch RRF und EF-G hin. Die flexibel über ein „Scharnier“ mit der Domäne I verbundene Domäne II des RRF nahm in den verschiedenen Kristallstrukturen des RRF unterschiedliche Positionen ein. Die Modellierung der beiden extremsten Winkel zwischen Domäne I und II zeigte, dass eine Bindung von EF-G die Domäne II aus der Position des einen Extrems in die des anderen Extrems drückt. Dabei entsteht eine Position der Domäne II, in der sie mit Bereichen der Helix 44 (h44) überlappt. Ein Verdrängen dieser Bereiche der h44 könnte zu einer Destabilisierung der Brücke 2a zwischen den Untereinheiten führen und damit zu einer tRNA Entlassung und transienten Dissoziation der Ribosomen (Vesper and Wilson, 2006; Wilson et al., 2005), Abbildung 4.5. Zusätzlich wird eine geringe Überlagerung der Domäne I des RRF mit Helix 69 (H69) beschrieben; (Abbildung 4.6).



Die transiente Dissoziation könnte durch IF3 in eine vollständige Dissoziation in die Untereinheiten überführt werden. IF3 würde in diesem Fall seine beschriebene Antiassoziationsfunktion wahrnehmen (Kaempfer, 1972). Dieses Modell erklärt ebenfalls, dass es nach Verlust der letzten tRNA zu einer 70S Initiation kommen kann. Kaji und Kollegen beschreiben eine erhöhte Rate der 70S Initiation von *leaderless* mRNA und ein vermehrtes Überlesen von Stopp Codonen in Stämmen ohne das RRF Gens (RRF knock out Stämmen) (Moll et al., 2004; Ogawa and Kaji, 1975a; Ogawa and Kaji, 1975b). Beides spricht für eine Stabilisierung der 70S Struktur in Abwesenheit des RRF und könnte im Falle einer 70S Initiation auf 3' abwärts gelegenen Leserastern eine regulative Rolle spielen. Varshney und Kollegen berichten, dass eine Dissoziation innerhalb des Prozesses des Ribosomrecyclings nur in Gegenwart von IF3 erfolgt, in Abwesenheit von IF3 käme es damit immer zu einer stabilen 70S Assoziation (Singh et al., 2005).

Die kontroversen Ergebnisse zu dem Mechanismus des Ribosom-Recyclings beruhen im Wesentlichen auf den unterschiedlichen Experimentalbedingungen. Hier kann das optimierte Polyaminsystem zur Klärung beitragen, was wir schon – wie oben dargestellt - für einige Fälle nachgewiesen haben: für die RF2 abhängigen Hydrolyse, die RF2 abhängigen Entfernung der E-tRNA und schließlich die negative Rolle von RRF und EF-G für die Entfernung der E-Stellen tRNA.

