

Antibiotics as translation inhibitors: new methods – new insights

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

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

vorgelegt von

WITOLD SZAFLARSKI

aus Krotoszyn, Polen

Juni 2007

Gutachter:

1. Prof. Dr. Knud H. Nierhaus
2. Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Disputation am 27. Juli 2007

Acknowledgements

I would like to thank Prof. Knud Nierhaus for giving me the opportunity to work in his group, for his supervision and help. It was a pleasure to be his Ph.D. student and coworker. I am very thankful for the knowledge and laboratory experience I have gained in molecular biology and ribosomal structure and function during the time of my Ph.D. studies.

Especially I would like to thank Dr. Daniel Wilson, on who's help I always could count.

I am grateful to all members of Ribosome Research Group at Max-Planck-Institute for Molecular Genetics: Edda Einfeldt, Dr. Oliver Vesper, Daniela Wittek, Romi Gupta, Dr. Yan Qin, Detlev Kamp, Dr. Viter Marquez, Dr. Isabella Moll, Dr. Tamara Budkevich, Zhala Karim, Dr. Philipp Angenendt and Dr. Madina Iskakova.

A very special thank is to my wife Sylwia and my parents, who always supported me in the difficulties of my scientific education.

Summary

Parameters of two *in vitro* systems for protein synthesis were analyzed and improved. The optimized systems were used to study some selected antibiotic and to unravel their inhibition mechanisms. The following results have been achieved:

1. Optimization of a coupled transcription-translation system (Rapid Translation System, Roche). By using the reporter Green Fluorescent Protein (GFP) we demonstrated that proteins are synthesized in high yield (up to 4 mg per ml) but with an unsatisfyingly low-active fraction (50% \pm 20). One reason could be the T7 RNA polymerase routinely used in standard expression systems. The T7 polymerase is up to eight times faster than the intrinsic *E. coli* transcriptase thus breaking the coupling between transcription and translation in a bacterial system. Accordingly we could demonstrate that the active fraction of the synthesized protein was substantially improved by using either a slower T7 transcriptase mutant or lowering the incubation temperature to 20°C. A drop of protein synthesis observed after 7 h incubation time was not due to a shortage of nucleotide triphosphates, but rather to a shortage of amino acids. Accordingly, a second addition of amino acids after 7 h during an incubation at 20 degrees C led to synthesis of up to 4 mg/ml of GFP with virtually 100% activity.
2. We developed the RTS to a simple and comprehensive tool for studying the accuracy of protein synthesis. Here, among others edeine (Ede) and pactamycin (Pct) were analyzed, EDE was found to be a strong inducer of misreading in contrast to Pct. The new drug NRI was found to be the first antibiotic showing a strong accuracy defect in the RTS system but a perfect accuracy on the standard poly(Phe) synthesis demonstrating the limitation of the latter.
3. We developed a poly(U)-dependent poly(Phe) synthesis to a robust system yielding 100 to 300 Phe incorporation per ribosome with the following features: (i) 4.5 mM Mg²⁺ appears to be optimal concerning efficiency and accuracy in the polyamine system, (ii) high Phe incorporation allows the assessment of misincorporation [Leu/(Leu+Phe)] with a resolution limit of 1:10.000 (one misincorporation per 10.000 incorporated Phe) and determined the accuracy of

poly(Phe) to be about 1:2000 (one Leu per 2000 Leu+Phe incorporations), (iii) misreading concerning the second nucleotide position is not observed and only very moderate misincorporation was found concerning the first nucleotide position, even when misreading was amplified by streptomycin or increased Mg^{2+} concentrations.

4. Kasugamycin: The inhibitions mechanism was unraveled and together with crystallographic studies its binding site determined. We demonstrated that kasugamycin inhibits P-site tRNA binding through perturbation of the mRNA-tRNA codon-anticodon interaction near the E-site position during 30S canonical initiation. Our data explained why the 70S-type initiation on leaderless mRNA is not inhibited by this drug.
5. Contradicting data on aminoglycoside effects on inhibition of the A site could be resolved. We showed that aminoglycoside can under artificial conditions induce a back-translocation of ribosomes confirming recent results from another group, but we could demonstrate that this effect plays no role for the inhibition mode of this important group of drugs and cannot be used to explain the bactericidal effect.

Zusammenfassung

Parameter zweier *in vitro* Systeme zur Proteinsynthese wurden analysiert und verbessert, die optimierten Systeme wurden zum Studium ausgesuchter Antibiotika und Aufklärung ihrer Hemmechanismen angewendet. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Optimierung eines gekoppelten Transkriptions-Translations-Systems (Rapid Translation System, Roche). Mit GFP als Reporter konnten große Mengen synthetisiert werden (bis zu 4 mg/ml), jedoch mit unbefriedigender Aktivität ($50 \pm 20\%$). Ein Grund könnte die weit verbreitete T7 RNA Polymerase sein, deren Transkriptionsrate bis zu achtmal schneller ist als die der *E. coli* Transkriptase und damit die Kopplung von Transkription und Translation aufhebt. Tatsächlich wurde die aktive Fraktion erheblich angehoben, wenn entweder eine genetisch manipulierte, langsamere T7 Polymerase eingesetzt wurde oder die Inkubationstemperatur auf 20 °C erniedrigt wurde. Eine Abnahme der Proteinsynthese nach siebenstündiger Inkubation wurde nicht durch einen Mangel an Triphosphaten, sondern einen Mangel an Aminosäuren verursacht. Ein zweite Aminosäuregabe nach 7 Stunden bei 20 °C führte zur Synthese von etwa 4 mg/ml bei praktisch voller GFP Aktivität.
2. Das RTS wurde zu einem System für umfassende Analyse der Proteinsynthese-Genauigkeit modifiziert. Es wurden unter anderen Edein und Pactamycin analysiert. Das Edein, aber nicht Pactamycin entpuppte sich als starker Induktor von Fehleinbau. Einen überraschenden Befund gab es bei NRI: Es verursacht hohe Fehlereinbau, jedoch nicht im Standard poly(U) System (Leu gegenüber Phe Einbau), was eine Grenze des poly(U) Systems aufzeigt.
3. Wir entwickelten unser Standard poly(U) System zu einem robusten Instrument und erzielten statistisch 100 bis 300 eingebaute Phe Reste per Ribosom. Es hat folgende Merkmale: (i) 4.5 mM Mg^{2+} erscheint optimal gemessen an Synthese- und Fehleinbaurate. (ii) Hoher Phe-Einbau erlaubt eine genaue Messung der Fehlerrate mit einer Auflösungsgrenze von 1:10.000 (ein Fehleinbau per 10.000 eingebauten Phe). Das System weist einen Fehlereinbau von 1:2.000 auf, was der *in vivo* Genauigkeit entspricht. (iii) Ein

Fehleinbau bezüglich der „wobble“ Position des Codons (dritte Nukleotidposition) häufig, einen bezüglich des mittleren Nucleotids des A-Codons wird nicht beobachtet, auch wenn der Fehleinbau dramatisch von Streptomycin oder angehobener Mg^{2+} Konzentration verstärkt wird; wohl aber ein sehr geringer Fehleinbau bezüglich der ersten Position.

4. Kasugamycin: Der Hemmechanismus wurde aufgeklärt und zusammen mit kristallographischen Untersuchungen der Bindeort bestimmt: Das Antibiotikum hemmt die Bindung der P-tRNA nur in der 30S Untereinheit (jedoch nicht am 70S Ribosom), durch Störung der Codon-Anticodon Wechselwirkung nahe auf der Seite der E-Stelle. Unsere Daten erklären, warum die 70S Initiation von „leaderless“ mRNA nicht von Kasugamycin gestört wird.
5. Widersprechende Daten zu Aminoglycosid-Effekten auf die A-Stellen Besetzung wurden aufgelöst. Wir zeigten, dass unter artifiziellen Bedingungen Aminoglykoside eine Rück-Translokation auslösen (in Übereinstimmung mit jüngst publizierte Daten einer anderen Gruppe), aber auch dass dieser Effekt keinen Bedeutung für den Hemmechanismus hat und den bakteriziden Effekt dieser wichtigen Antibiotikagruppe erklären könnte.

Streszczenie

W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono badania mające na celu zwiększenie wydajności dwóch systemów pozakomórkowej (*in vitro*) produkcji białka. Zrewidowano wpływ kilku istotnych czynników biologicznych i chemicznych. Udoskonalone systemy wykorzystano m.in. do badań wybranych antybiotyków w celu wyjaśnienia molekularnych mechanizmów blokowania biosyntezy białka, a w szczególności tych antybiotyków, które działają na proces przepisywania informacji genetycznej z sekwencji nukleotydowej w mRNA na sekwencję aminokwasów w syntetyzowanym polipeptydzie.

Uzyskano następujące wyniki:

1. Udoskonalono pozakomórkowy system sprzężonej transkrypcji i translacji (*Rapid Translation System, RTS*, produkowany przez firmę Roche). Wykorzystując białko GFP (ang. *Green Fluorescence Protein*) wykazano, że system RTS pozwala na wydajną syntezę białka na poziomie 4 mg/ml. Istotnym jednak ograniczeniem tego systemu jest niska zawartość aktywnych cząsteczek białka, którą oceniono na ok. 50% \pm 20 wszystkich zsyntetyzowanych cząsteczek. Przyczyną tego może być rutynowo stosowana w systemie RTS polimeraza T7, która jest ośmiokrotnie szybsza od endogennej polimerazy znajdującej się w komórce *E. coli*. Powoduje to zerwanie funkcjonalnego połączenia transkrypcji i translacji, przez co dochodzi do powstania struktur przestrzennych w mRNA pomiędzy polimerazą a rybosomem, a co w komórce w naturalny sposób nie występuje. Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie mutantów polimerazy T7 o zmniejszonej aktywności lub obniżenie temperatury reakcji do 20°C. Jak zostało wykazane, niższa temperatura dużo bardziej wpływa na aktywność polimerazy niż rybosomu skracając w ten sposób fragment mRNA znajdujący się pomiędzy nimi. Innym ograniczeniem systemu RTS jest obserwowany spadek wydajności syntezy białka po siedmiu godzinach, co nie było wynikiem wyczerpania się cząsteczek energetycznych (ATP i GTP), ale wykorzystaniem dostępnej puli aminokwasów. Dostarczenie dodatkowej porcji aminokwasów po siedmiu godzinach i prowadzeniu reakcji w temperaturze 20°C pozwoliło na syntezę do

- 4 mg/ml białka GFP, przy zawartości aktywnych cząsteczek na poziomie 100%.
2. Przystosowano system RTS do łatwego i wydajnego badania antybiotyków blokujących proces biosyntezy białka. Spośród wielu antybiotyków szczegółowo zbadano edeinę i paktymycynę, i odkryto, że edeina, w przeciwieństwie do paktamycyny, jest silnym induktorem wprowadzania błędnych aminokwasów do łańcucha polipeptydowego. Ponadto system RTS zastosowano do badania nowego antybiotyku NRI (ang. *Novel Ribosomal Inhibitor*, NRI) i wykazano jego silne działanie obniżające ilość aktywnych cząstek białka, przy jego całkowitej nieskuteczności w systemie poli(U)-zależnej syntezy poli(Phe), gdzie nie indukował on wprowadzania błędnych aminokwasów do łańcucha polifenyloalaninowego - poli(Phe), efektu typowego dla aminoglikozydów.
 3. Udoskonalono pozakomórkowy systemu syntezy poli(Phe) zależnej od poli-U (ang. *Poly(U)-dependent poly(Phe) synthesis*). Osiągnięto syntezę na poziomie 100-300 inkorporacji Phe przez pojedynczą cząsteczkę rybosomu. Po udoskonaleniu system posiada następujące cechy (i) stężenie jonów magnezu odpowiadające 4.5 mM wydaje się być wartością łączącą zadowalającą wydajność i poprawność syntezy łańcucha poli(Phe), (ii) wysoki poziom inkorporacji Phe pozwolił na ocenę ilości błędnie wprowadzanej leucyny (Leu) [Leu/(Leu+Phe)] z dolnym ograniczeniem wykrywalności jednej Leu na 10.000 inkorporacji Phe. Pozwoliło to na określenie poprawności syntezy poli(Phe), która w opisywanym systemie wyniosła 1:2000 (jedna błędnie wprowadzana Leu na 2000 inkorporowanych Phe). (iii) Analiza dotycząca wprowadzania aminokwasów o innych antykodonach niż AAA (codon UUU odpowiadający Phe) do łańcucha poli(Phe) pokazała, że do tego łańcucha mogą być wprowadzane wyłącznie aminokwasy dostarczane przez tRNA o zmienionym tylko pierwszym nukleotydem w antykodonie. Zamiana nukleotydu w drugim i trzecim miejscu antykodonu nie pozwoliła na wprowadzenie niosącego przez ten tRNA aminokwasu, nawet w sytuacjach, kiedy na rybosom działały silne czynniki wpływające na proces dekodowania, jak streptomycyna i duże stężenie jonów magnezu (Mg^{2+}).

4. Kazugamycyna: badania krystalograficzne pozwoliły na określenie miejsca wiązania tego antybiotyku do rybosomu zlokalizowanego pomiędzy miejscem P i A w obszarze, przez który przechodzi łańcuch mRNA. Pokazano, że kazugamycyna blokuje wiązanie aminoacylowanego tRNA do miejsca P na rybosomie przez destabilizację ułożenia mRNA w pobliżu miejsca E, co powoduje zakłócenie formowania się kompleksu inicjacyjnego 30S. Określenie pozycji wiązania kazugamycyny wyjaśnia, dlaczego formowanie kompleksu inicjacyjnego 70S z użyciem tzw. „leaderless mRNA” (tj. mRNA, który zaczyna się od kodonu AUG i pozbawiony jest jakiegokolwiek niekodującego rejonu po stronie 5') nie jest blokowane przez kazugamycynę.
5. Częściowo rozwiązano mechanizm blokowania biosyntezy białka przez antybiotyki aminoglikozydowe. Pokazano, że antybiotyki tej grupy mogą w sztucznych warunkach syntezy białka *in vitro* indukować tzw. zwrotną translokację (ang. *back-translocation*), czyli przesunięcie dwóch cząstek tRNA z miejsc E i P do miejsc P i A, a więc w kierunku przeciwnym niż w opisywanej od lat reakcji translokacji zależnej od czynnika elongacyjnego EF-G. Wyniki te uzupełniają prace innej grupy badawczej (Frederick i współpracownicy) i dodatkowo pokazują, że efekt zwrotnej translokacji nie do końca tłumaczy bakteriobójczy charakter aminoglikozydów, ponieważ dzięki dużemu stężeniu komórce, EF-G wygrywa współzawodnictwo z antybiotykami.

Table of contents

ACKNOWLEDGEMENTS	3
SUMMARY	4
ZUSAMMENFASSUNG	6
STRESZCZENIE	8
TABLE OF CONTENTS.....	11
ABBREVIATIONS.....	15
1 INTRODUCTION	17
1.1 PROTEIN SYNTHESIS IN THE PROKARYOTIC CELL.....	17
1.1.1 STRUCTURE OF PROKARYOTIC RIBOSOMES.....	18
1.1.2 THE INITIATION OF PROTEIN SYNTHESIS IN BACTERIA	19
1.1.3 ELONGATION OF TRANSLATION – DECODING OF TRANSLATION.....	22
1.1.4 THE ALLOSTERIC THREE-SITE MODEL FOR THE RIBOSOMAL ELONGATION CYCLE	25
1.1.5 TERMINATION OF PROTEIN SYNTHESIS	26
1.2 CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS SYSTEMS - RTS 100 AND RTS 500.....	27
1.3 INHIBITORS OF PROTEIN SYNTHESIS IN THE PROKARYOTIC CELL.....	28
1.3.1 KASUGAMYCIN	28
1.3.2 EDEINE AND PACTAMYCIN.....	30
1.3.3 ANTIBIOTICS INTERFERING WITH THE RIBOSOMAL A-SITE.....	33
1.3.4 NOVEL RIBOSOME INHIBITOR (NRI)	34
2 MATERIALS AND METHODS	35
2.1 MATERIALS.....	35
2.1.1 SETS OF BIOLOGICAL COMPONENTS	35
2.1.2 CHEMICALS AND SIMPLE BIOLOGICAL COMPONENTS.....	35
2.1.3 NON-TYPICAL LABORATORY MACHINES	39

2.1.4	BACTERIAL STRAINS OF E. COLI	39
2.1.5	PLASMIDS.....	40
2.1.6	SEQUENCES OF IN VITRO TRANSCRIBED MRNAS.....	40
2.1.7	ANTIBIOTICS.....	40
2.1.8	BUFFERS.....	41
2.1.9	SOFTWARE.....	44
2.2	METHODS.....	46
2.2.1	ISOLATION OF PLASMID DNA IN THE RANGE OF 20 µG TO 500 µG (QIAGEN).....	46
2.2.2	RESTRICTION HYDROLYSIS OF DNA	46
2.2.3	KINASE REACTION – LABELING DNA OR RNA WITH γ -[³² P]-ATP	47
2.2.4	LIGASE REACTION – INSERTION OF DNA FRAGMENTS INTO VECTORS	48
2.2.5	LIGASE REACTION - LABELING OF RNA BY PCP	49
2.2.6	EXTRACTION AND PRECIPITATION OF DNA OR RNA	49
2.2.7	AGAROSE ELECTROPHORESIS OF DNA OR RNA	50
2.2.8	ELUTION OF DNA OR RNA FROM AGAROSE AND POLYACRYLAMIDE GELS	51
2.2.9	TRANSFORMATION OF CELLS WITH HIGH-VOLTAGE METHOD (ELECTROPORATION)	51
2.2.10	SELECTION OF PLASMIDS RECOMBINANT BY DIRECT AMPLIFICATION DNA FROM CELLS COLONIES (COLONY PCR).....	52
2.2.11	IN VITRO TRANSCRIPTION.....	52
2.2.12	NORTHERN-BLOT HYBRIDIZATION.....	54
2.2.13	RNA INTEGRITY TEST IN 1D-ELECTROPHORESIS IN TUBE GEL	55
2.2.14	PREPARATION OF COMPETENT CELLS.....	55
2.2.15	BREAKING THE CELLS - SONICATION AND FRENCH-PRESS.....	56
2.2.16	PROTEIN IN VITRO EXPRESSION SYSTEMS.....	56
2.2.17	PROTEIN IN VIVO EXPRESSION SYSTEM.....	59
2.2.18	IN VITRO BINDING ASSAYS.....	59
2.2.19	QUANTIFICATION OF GFP AND LUCIFERASE EXPRESSION.....	60
2.2.20	ISOLATION OF RIBOSOMES.....	62
2.2.21	ANALYTICAL SUCROSE GRADIENT CENTRIFUGATION	65
2.2.22	WATANABE ASSAY: SITE SPECIFIC BINDING OF TRNA TO RIBOSOMES, TRANSLOCATION AND PUROMYCIN REACTION	66
2.2.23	PREPARATION OF POST STATE RIBOSOMES.....	69
2.2.24	TOEPRINT.....	70
3	RESULTS.....	72

3.1	<i>IN VITRO</i> PROTEIN SYNTHESIS: OPTIMIZATION OF RTS 100 AND RTS 500 SYSTEMS..	72
3.1.1	GFP AS REPORTER PROTEIN AND QUALITY CRITERIA FOR JUDGMENT OF THE PROTEIN EXPRESSION LEVEL	72
3.1.2	SYNCHRONIZING THE REACTIONS OF TRANSCRIPTION AND TRANSLATION	74
3.1.3	INCREASING THE TOTAL PROTEIN YIELD IN RTS 100/500	76
3.2	OPTIMIZED POLY(U)-DEPENDENT POLY(PHE) SYNTHESIS AS A TOOL FOR STUDIES OF PROTEIN SYNTHESIS PROCESS.....	80
3.2.1	MISREADING IN THE OPTIMIZED POLYAMINE SYSTEM	81
3.3	STUDIES ON THE PROKARYOTIC TRANSLATION INHIBITORS	83
3.3.1	KASUGAMYCIN	83
3.3.2	EDEINE AND PACTAMYCIN AND THEIR INFLUENCE ON TRANSLATION ACCURACY	89
3.3.3	EFFECTS OF AMINOGLYCOSIDES AND SOME OTHER ANTIBIOTICS ON PROTEIN SYNTHESIS IN VITRO	91
3.3.4	NOVEL RIBOSOMAL INHIBITOR (NRI)	95
3.3.5	EFFECTS OF AMINOGLYCOSIDES AND CONTROL DRUGS IN SINGLE REACTIONS OF THE ELONGATION CYCLE UNDER OPTIMAL CONDITIONS	96
4	DISCUSSION	101
4.1	OPTIMIZATION OF A SIMPLE <i>IN VITRO</i> SYSTEM FOR POLY(PHE) SYNTHESIS WITH NEAR <i>IN VIVO</i> FEATURES	101
4.2	DIFFERENT DEFINITIONS OF NEAR- AND NON-COGNATE AA-TRNAS	104
4.3	CELL-FREE COUPLED TRANSCRIPTION-TRANSLATION SYSTEMS	105
4.3.1	THE FOLDING OF GFP AND ITS USAGE IN RTS 100/500 AS A REPORTER PROTEIN ...	106
4.3.2	COUPLING OF TRANSCRIPTION AND TRANSLATION IN CELL-FREE SYSTEMS	108
4.3.3	HOW TO INCREASE THE TOTAL PROTEIN YIELD IN <i>IN VITRO</i> EXPRESSION SYSTEMS?..	110
4.3.4	RECENTLY DISCOVERED ELONGATION FACTOR 4 (EF-4 OR LEPA) INCREASES ACCURACY OF TRANSLATION.....	111
4.4	RTS SYSTEM AS A TOOL FOR OVERALL DETERMINATION OF THE ACCURACY OF PROTEIN SYNTHESIS	112
4.4.1	EDEINE AS MISINCORPORATION INDUCER FROM THE RIBOSOMAL E-SITE	113
4.5	THE PREVENTION OF tRNA BINDING AND INHIBITION OF CANONICAL TRANSLATION INITIATION CAUSED BY Ksg	114
4.5.1	OLD AND NEW STUDIES ON AMINOGLYCOSIDES.....	119
	APPENDIX – CHEMICAL FORMULAS OF ANTIBIOTICS	121

BIBLIOGRAPHY..... 124

CURRICULUM VITAE 142

Abbreviations

β -ME	β -mercaptoethanol
Ω	Ohm
A	ampere
Å	Ångstrom
aa-tRNA	aminoacyl-tRNA
APS	Ammonium peroxodisulfate
BSA	bovine serum albumine
Ci	Curie
Da	Dalton
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dpm	disintegration per minute
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF-G	elongation factor G
EF-Ts	elongation factor thermo-stable
EF-Tu	elongation factor thermo-unstable
F	Farad
f.c.	final concentration
GDP	guanosine diphosphate
GFP	Green Fluoresce Protein
GTP	guanosine triphosphate
IF	initiation factor
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactoside
kb	kilobase, 1,000 base pairs
mRNA	messenger RNA
MOPS	morpholinopropanesulfonic acids
MW	molecular weight
nt(s)	nucleotide(s)
NTP	nucleoside triphosphate
PCR	polymerase chain reaction
PEP	phosphoenol pyruvate

PK	pyruvate kinase
poly(A)	poly-adenylic acid (mRNA)
poly(U)	poly-uridylic acid (mRNA)
pCp	cytidine 3'5'-bis[α - ³² P]-phosphate
PAA	polyacrylamide gel
PTF	peptidyl transferase centre
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
RTS	Rapid Translation System
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomal RNA
S	Svedberg unit (sedimentation coefficient)
SDS	sodium dodecylsulphate
ssDNA	single strain DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-1-,2-diaminomethane
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
tRNA	transfer RNA
UTR	untranslated region
V	volt
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume