The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome and is essential for viability at high ionic strength

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs

Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Yan Qin

aus Tianjin, China

22, 02, 2006

Gutachter:

Herr Prof. Dr. K. H. Nierhaus

Frau Prof. Dr. P. Knaus

Datum der Dissertation:

Summary

The ribosomal elongation cycle describes a series of reactions prolonging the nascent polypeptide chain by one amino acid and driven by two universal elongation factors termed EF-Tu and EF-G in bacteria. EF-Tu brings aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) to the ribosome in an aa-tRNA • EF-Tu • GTP ternary complex form, delivers the cognate aa-tRNA at the decoding center of the ribosomal A-site and – after EF-Tu dependent GTP cleavage - leaves the ribosome in the EF-Tu•GDP form. After aa-tRNA has been accommodated completely at the A site (the aminoacyl residue is now present at the peptidyltransferase center), the dipeptide bond will be catalyzed to form, namely the peptide will be transferred to the aminoacyl-tRNA so that the peptide is prolonged by one amino acid residue. After that, EF-G•GTP enters, triggers the translocation of the two tRNAs from A- and P-site to the P- and E- sites respectively, the GTP is hydrolyzed and EF-G• GDP leaves ribosome. Now the A-site is free and a new cycle starts.

In this work an extremely conserved protein LepA, a protein belonging to the G-class and presenting in all bacteria and mitochondria, is identified and characterized as a third elongation factor required for accurate and efficient protein synthesis. LepA is essential for cell viability at high ionic strength, where – without LepA - translocation is occasionally impaired thus provoking translational misreading or probably even a translational halt. LepA•GTP recognizes this unfavorable situation of the ribosome and restores the translational fidelity, in that it back-translocates the stuck ribosome thus giving EF-G a second chance to translocate the tRNAs correctly. However, LepA does not counteract decoding errors induced by antibiotics such as aminoglycosides and edeine. The novel function of LepA as a back-translocator also has implications for the fundamental process of translocation.

LepA has an important application potential, since only after addition a small amount of LepA (less than 0.3 molecules per ribosome) to coupled transcription-translation systems 100% active proteins can be synthesized *in vitro*. This application has been patented.

Zusammenfassung

Der ribosomale Elongationszyklus beschreibt eine Reihe von Reaktionen, welche die werdende Polypeptidkette, angetrieben durch zwei Proteinfaktoren EF-Tu und EF-G, um eine Aminosäure verlängern (in Archaea und Eukarya heißen die entsperechene3n Faktoren EF1 und EF3). EF-Tu bringt Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) als ternären Komplex in der Form aa-tRNA•EF-Tu•GTP zum Dekodierungszentrum der ribosomalen A-Stelle. Die kognate aa-tRNA verbleibt dort, während nach EF-Tu abhängiger GTP Hydrolyse EF-Tu•GDP das Ribosom verläßt. Nachdem die kognate aa-tRNA vollständig in die A-Stelle akkommodiert, wird die Dipeptidbindung vom Peptidyltransferase Zentrum katalysiert. Dabei wird das Peptid auf die aa-tRNA übertragen, so dass das Peptid um einen Aminosäurerest verlängert wird. Schließlich dockt EF-G in seiner GTP-Form an das Ribosomen, katalysiert die Translokation der beiden tRNAs von der A- zur P-Stelle bzw. von der P- zur E-Stelle. Danach hydrolysiert EF-G das GTP und EF-G•GDP verlässt das Ribosom. Die A-Stelle ist nun frei und ein neuer Zyklus kann beginnen.

In dieser Arbeit wird das extrem konservierte Protein LepA, das in allen Bakterien und Mitochondrien vorhanden ist und zur klasse der G-Proteine gehört, als dritter Verlängerungsfaktor identifiziert und charakterisiert. LepA ist für eine fehlerfreie und effiziente Proteinsynthese erforderlich und für die Lebensfähigkeit von Zellen unter hohen Ionenstärken wesentlich. Ohne LepA ist die bakterielle Translokation gelegentlich unvollständig, was zu Aminosäuren-Fehleinbau und wahrscheinlich auch zur Blockierung des Ribosoms führen kann. LepA•GTP erkennt diese Situation und löst eine Rück-Translokation aus, so dass EF-G eine zweite Chance für eine korrekte Translokation erhält.

LepA korrigiert nicht Dekodierungsfehler, die durch Antibiotika wie Aminoglykoside und Edein verursacht werden. Vielmehr verhindert es Fehleinbau als Folge von Translokationsdefekten. Die neuartige Funktion von LepA als Rück-Translokator lässt somit auch neue Schlüsse für den Translokationsprozess selbst zu.

LepA hat ein bedeutendes Anwendungspotential für *in vitro* Proteinsynthese. Nur nach Zugabe kleiner Mengen von LepA (unter 0.3 Moleküle per Ribosom) ist es möglich, im gekoppelten Transkriptions-Translations-System 100% aktive Proteine zu synthetetisieren. Dieser LepA Effekt wurde von uns patentiert.

Table of contents

0 Abbreviations

AA	Acrylamide		
aa-tRNA	aminoacyl-tRNA		
AcPhe-tRNA^{Phe}	N-Acetyl-Phe-tRNA^{Phe}		
Å	Angstrom		
Asp	Aspartic acid		
ATP	Adenosine tri-phosphate		
BAA	Bis-acrylamide		
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl phosphate		
BPB	Bromophenol blue		
dsDNA	double strand DNA		
EF-G	Elongation factor G		
EF-Ts	Elongation factor thermo stable		
EF-Tu	Elongation factor thermo unstable		
eRF1	Eukaryote release factor 1		
GDP	Guanine di-phosphate		
Gly	Glycine		
GTP	Guanine tri-phosphate		
$H_tM_uN_vSH_wSpd_xSpm_y$	H	Hepes	t mM
	M	$MgAc_2$	u mM
	N	NH_4Ac	v mM
	SH	ß-Mercapto-ethanol	w mM
	Spd	Spermidine	x mM
	Spm	Spermine	y mM
HPLC	High Performance Liquid Chromatography		
IF	Initiation factor		
kb	kilo bases		
kJ	kilo Joules		
kV	kilo Volts		
Leu	Leucine		
mA	milli Ampere		

µCi	micro Curie
MDa	mega Dalton
$MgAc_2$	magnesium acetate
MQ	milli Q water
M.W.	molecular weight
N-AcPhe-$tRNA^{Phe}$	N-Acetyl-Phe-$tRNA^{Phe}$
NaAc	sodium acetate
NBT	nitroblue tetrazolium
NH_4Ac	ammonium acetate
nt	nucleotide(s)
NTP	Nucleoside tri-phosphate
Ω	Ohm
PEP	Phosphoenol pyruvate
PK	Pyruvate kinase
Phe	Phenylalanine
Poly(U)	Long poly-uridine mRNA
PP_i	Inorganic Pyrophosphate
PTF	Peptidyltransferase centre
RF	Release factor
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomal RNA
RRF	Ribosome recycling factor
SD	Shine Dalgarno sequence
TFA	Trifluoroacetic acid
30S	small ribosomal subunit
V	Volts
v/v	volume/volume
w/v	water/volume