

Untersuchungen zur stimulierten GTPase von EF-Tu aus *Thermus thermophilus*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der
Universität Bayreuth

vorgelegt von

Peter Milovník

aus Žilina, Slowakei

Bayreuth, 2002

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1988 bis Juni 2002 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Sprinzl angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 26.8.2002

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 05.12.2002

Erster Gutachter: Prof. Dr. M. Sprinzl

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. P. Rösch

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Translationszyklus	1
1.1.1 Initiation.....	1
1.1.2 Elongation.....	2
1.1.3 Termination.....	3
1.1.4 Die Hypothese der molekularen Mimikry	4
1.2 G-Proteine.....	5
1.2.1 Die Argininfinger-Hypothese der stimulierten GTP-Hydrolyse.....	7
1.3 Der Elongationsfaktor Tu	8
1.3.1 Die Struktur des EF-Tu.....	9
1.3.2 Nukleotidbindung und Mg ²⁺ -Koordination	10
1.3.3 Wechselwirkung mit EF-Ts	11
1.3.4 Wechselwirkung mit aa-tRNA.....	13
1.3.5 Wechselwirkung mit Kirromycin.....	14
1.3.6 Wechselwirkung mit Ribosom.....	15
1.4 Das ribosomale Protein L12	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte.....	21
2.1.2 Materialien	22
2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Proteine	22
2.1.3.1 Chemikalien	22
2.1.3.2 Enzyme, Proteine, Ribosomen und tRNAs	22
2.1.3.3 Kits.....	23
2.1.3.4 Radiochemikalien.....	23
2.1.3.5 Chromatographie-Materialien	23
2.1.4 Plasmide.....	23
2.1.5 Oligodesoxynukleotide.....	24
2.1.6 Bakterienstämme, Nährmedien und Lösungen	24
2.1.6.1 Bakterienstämme	24
2.1.6.2 Nährmedien	25
2.1.6.3 Lösungen.....	25

2.2	Methoden	27
2.2.1	Absorptionsmessung.....	27
2.2.2	Radioaktivitätsmessung.....	27
2.2.3	Zentrifugationen.....	28
2.2.4	Elektrospraymassenspektrometrie.....	28
2.2.5	Gelelektrophoretische Verfahren.....	28
2.2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.2.5.2	Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	29
2.2.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	29
2.2.5.4	Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen.....	30
2.2.6	Elution von tRNA aus Polyacrylamidgelen.....	30
2.2.7	Phenolextraktion und Ethanol-fällung von tRNA.....	31
2.2.8	Isolierung und Reinigung von DNA.....	31
2.2.8.1	Plasmidpräparation.....	31
2.2.8.2	Elution von DNA aus Agarose-Gelen.....	32
2.2.9	Enzymatische Behandlung von DNA.....	32
2.2.9.1	Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen.....	32
2.2.9.2	Ligation.....	32
2.2.10	Polymerasekettenreaktion.....	32
2.2.11	Sequenzspezifische Mutagenese mit PCR.....	33
2.2.12	DNA-Übertragung.....	33
2.2.12.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	33
2.2.12.2	Transformation von <i>E. coli</i>	34
2.2.13	Immunodetektion und Sequenzierung von Proteinen.....	34
2.2.13.1	Proteintransfer auf PDVF- oder Nitrocellulose-Membranen.....	34
2.2.13.2	Immunodetektion.....	35
2.2.13.3	Proteinsequenzierung.....	35
2.2.14	Überproduktion von <i>T. thermophilus</i> Proteinen in <i>E. coli</i>	35
2.2.14.1	Zellanzucht und Fermentation.....	35
2.2.14.2	Analytischer Zellaufschluß.....	36
2.2.14.3	Zellaufschluß im präparativen Maßstab.....	36
2.2.15	Isolierung von EF-Tu aus <i>T. thermophilus</i>	37
2.2.15.1	Anionenaustauschchromatographie und Hitzedenaturierung.....	37
2.2.15.2	Gelpermeationschromatographie.....	37
2.2.16	Präparation von Mg ²⁺ - und nukleotidfreiem EF-Tu.....	38
2.2.17	Isolierung von EF-Tu C82A/L404C und C82A/P357C Varianten.....	38
2.2.18	Isolierung von <i>T. thermophilus</i> L12-R80A.....	38
2.2.19	GDP-Bindungstests.....	40
2.2.19.1	Nitrocellulose-Filterbindungstest zur Bestimmung der spezifischen Aktivität.....	40
2.2.19.2	Assoziationskinetik von EF-Tu und GDP.....	40
2.2.19.3	Dissoziationskinetik von GDP aus EF-Tu*GDP.....	40
2.2.19.4	GDP-Austausch in Gegenwart von EF-Ts.....	41
2.2.19.5	Bestimmung der Dissoziationskonstanten von EF-Tu und Nukleotid.....	41
2.2.20	Isolierung des ternären Komplexes.....	41
2.2.20.1	Isolierung des ternären Komplexes mit „kaltem“ GTP.....	41
2.2.20.2	Isolierung des ternären Komplexes mit radiaktivem [γ - ³² P] GTP.....	42
2.2.21	Bestimmung der GTPase-Aktivität von EF-Tu.....	42
2.2.21.1	Intrinsische GTPase.....	43
2.2.21.2	Ribosomen-stimulierte GTPase.....	43
2.2.22	Kinetik der <i>in vitro</i> Translation.....	43

2.2.23	Aufreinigung von tRNA ^{Phe} aus <i>E. coli</i>	44
2.2.23.1	Präparation von tRNA _{bulk} aus <i>E. coli</i> D10-Zellen	44
2.2.23.2	Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	44
2.2.23.3	Chromatographie an BD-Cellulose	45
2.2.23.4	Aussalzchromatographie bei pH 4.5	45
2.2.23.5	Aussalzchromatographie bei pH 7.5	45
2.2.24	Aminoacylierung von tRNA	46
2.2.24.1	Präparative Aminoacylierung von tRNA	46
2.2.24.2	Analytische Aminoacylierung von tRNA	46
2.2.24.3	Testen der Fraktionen bei der Aufreinigung von tRNA ^{Phe} aus <i>E. coli</i>	47
2.2.25	Aa-tRNA Hydrolyseschutz-Experimente	47
2.2.26	Synthese der GTP-Analoga	47
2.2.27	Bestimmung der Bindungsaffinität und der Hydrolyseaktivität von EF-Tu und den GTP-Analoga	48
2.2.27.1	Bindungsaffinität und Hydrolyseaktivität von DABP-GTP	48
2.2.27.2	Bindungsaffinität und Hydrolyseaktivität von MAAP-GTP	49
2.2.27.3	Produkt der EF-Tu-katalysierten DABP-GTP Hydrolyse	50
2.2.28	Reinigung von Kirromycin	50
2.2.29	Fluoreszenzmarkierung von EF-Tu Varianten	51
2.2.29.1	Fluoreszenzmarkierung von EF-Tu Varianten mit Coumarin- Maleinimid (CPM)	51
2.2.29.2	Fluoreszenzmarkierung von EF-Tu mit 1,5-IAEDANS	52
2.2.30	Fluoreszenzmarkierung von tRNA	52
2.2.30.1	Fluoreszenzmarkierung von tRNA ^{Phe} aus <i>E. coli</i> mit Fluoreszein-Succinimidester (FAM-SE)	52
2.2.31	Vorbereitung der <i>T. thermophilus</i> 70S-L12-R80A Ribosomen	52
2.2.32	Stopped-Flow Experimente mit mant-dGTP	53
2.2.32.1	Vorbereitung der Ribosomen-Komplexe	54
2.2.32.2	Vorbereitung des ternären Komplexes mit mant-dGTP	54
2.2.32.3	Durchführung der Stopped-Flow Experimente	54
3	Ergebnisse	56
3.1	GTP-Analoga	56
3.1.1	Synthese und Aufreinigung von DABP-Analoga	56
3.1.2	Synthese und Aufreinigung von MAAP-GTP	60
3.2	Die GTP-Analoga binden an EF-Tu_f	62
3.2.1	Bindung der DABP-Analoga	62
3.2.2	Bindung des MAAP-GTP	64
3.3	Hydrolyse der GTP-Analoga	65
3.3.1	Hydrolyse des MAAP-GTP	65
3.3.2	Hydrolyse des DABP-GTP	67
3.3.2.1	Spontane DABP-GTP-Hydrolyse	67
3.3.2.2	EF-Tu-katalysierte DABP-GTP-Hydrolyse	69
3.3.2.3	Primärer Isotopeneffekt auf die DABP-GTP-Hydrolyse	71
3.3.2.4	Temperaturabhängigkeit der DABP-GTP-Hydrolyse	72

3.3.2.5	Das Produkt der DABP-GTP-Hydrolyse	73
3.4	GTP-Analoga bilden einen ternären Komplex mit EF-Tu und aa-tRNA	74
3.5	Die Variante EF-Tu T62A	75
3.5.1	Überexpression und Reinigung von EF-Tu T62A.....	76
3.5.1.1	Präparation von nukleotidfreiem EF-Tu _f T62A	79
3.5.1.2	N-terminale Sequenzierung des 60-405 Fragmentes von EF-Tu _f T62A ..	79
3.5.2	Charakterisierung der EF-Tu T62A Variante	80
3.6	FRET zur Detektion des ternären Komplexes	84
3.6.1	Überexpression und Reinigung von EF-Tu _{T.th.} C82A/L404C und P357C	85
3.6.2	Modifikation der EF-Tu C82A/L404C und P357C Varianten	86
3.6.3	Modifikation der EF-Tu Varianten mit Coumarin-Maleinimid	87
3.6.4	Modifikation der EF-Tu Varianten mit 1,5-IAEDANS	89
3.6.5	Charakterisierung der modifizierten EF-Tu _f C82A/L404C und P357C Varianten.....	90
3.6.6	Reinigung von <i>E. coli</i> tRNA ^{Phe}	94
3.6.7	Modifikation von <i>E. coli</i> tRNA ^{Phe} mit Fluoreszein-Succinimidester	97
3.6.8	Fluoreszenztitrations Experimente	100
3.6.9	Dissoziation des ternären Komplexes	102
3.7	Überexpression und Reinigung von <i>T. thermophilus</i> L12-R80A.....	103
3.8	Vorbereitung der <i>T. thermophilus</i> 70S-L12-R80A Ribosomen	106
3.9	Untersuchungen zur Argininfinger Hypothese	108
3.9.1	GTP-Hydrolyse Aktivität der Arginin-Mutanten von L12 und EF-Tu	108
3.9.2	Stopped-flow Messung der Aktivierung der GTPase.....	111
4	Diskussion	115
4.1	Substrat-assistierte Katalyse der GTPase von EF-Tu aus <i>T. thermophilus</i>	117
4.1.1	Interaktion der GTP-Analoga mit EF-Tu	117
4.1.2	Die spontane Hydrolyse der GTP-Analoga	119
4.1.3	Die EF-Tu-katalysierte Hydrolyse von DABP-GTP	121
4.2	FRET-Assay zur Detektion des ternären Komplexes	125
4.3	Untersuchungen zur Argininfinger-Hypothese	126
4.3.1	Intrinsische GTP-Hydrolyse der Arginin-Mutanten von EF-Tu.....	126
4.3.2	Ribosomen-stimulierte GTP-Hydrolyse	127
4.3.2.1	Aktivität der EF-Tu Mutanten.....	127
4.3.2.2	Aktivität der Ribosomen mit L12-R80A	130
5	Zusammenfassung.....	135

6	Summary	137
7	Literatur	139
8	Anhang.....	151
8.1	Vergleich der L11 Sequenzen.....	151
8.2	Vergleich der L6 Sequenzen.....	152
8.3	Vergleich der L6 Sequenzen.....	153
	Danksagung	154
	Erklärung...	155

Abkürzungen

Å	Angström (10^{-10} m)
A_x	Absorption bei x nm
aaRS	Aminoacyl-tRNA Synthetase
aa-tRNA	Aminoacyl-tRNA
Abb.	Abbildung
acp3U	3-(3-Amino-3-Carboxypropyl)Uridin
Amp ^r	Resistenz gegen Ampicilin
APS	Ammoniumperoxodisulphat
A-Stelle	aa-tRNA-Bindungsstelle am Ribosom
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BD	Benzoyl-DEAE
bp	<i>base paire</i> (Basenpaar)
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
caged-GTP	P ³ -[1-(2-Nitrophenyl)ethyl] Guanosin 5'-triphosphat
Ci	Curie
CM	Carboxymethyl
cpm	<i>counts per minute</i>
CPM	7-Diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4- methylcoumarin
cryoEM	<i>Cryo-Elektron-Microscopy</i> (Kryoelektronmikroskopie)
CTD	C-terminale Domäne
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
C-Terminus	Carboxylende einer Polypeptidkette
Da	Einheit für Molekülmasse (Dalton)
DABP	Diaminobenzophenone
DABP-GTP	3,4-Diaminobenzophenone-phosphoroamidate-GTP
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	Dimethylformamid

DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Gemisch aus 2'-Desoxyribonuklotiden dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTSSP	3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidyl Propionate)
DTT	1,4-Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-Ethyl-N'-Dimethylaminopropyl-carbodiimide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EF-G	Elongationsfaktor G
EF-Ts	Elongationsfaktor Ts (<i>thermostable</i>)
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu (<i>thermounstable</i>)
EF-Tu _f	nukleotidfreier Elongationsfaktor Tu
EF-Tu _{fM}	Mg ²⁺ und nukleotidfreier Elongationsfaktor Tu
ESI-MS	<i>Elektrospray Ionisation-Mass Spectrometry</i>
F _x	Fluoreszenzintensität bei x nm
5-FAM, SE	5-Carboxyfluoreszein, Succinimidyl Ester
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
G-Domäne	Guaninnukleotid-bindende Domäne
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GppCH ₂ p	Guanosin-5'-(β,γ -methylene) triphosphat
GppNHp	Guanosin-5'-(β,γ -imido) triphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-ethanesulfonic acid
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
1,5-IAEDANS	<i>5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-6-sulfonic acid</i>
IF	Initiationsfaktor
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

Kan ^r	Resistenz gegen Kanamycin
k _{app}	Apparente Geschwindigkeitskonstante
k _{cat}	Katalytische Geschwindigkeitskonstante
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k _{off}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
k _{on}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
LB	Luria-Bertani
L7/L12	ribosomales Protein L7/I12
L10	ribosomales Protein L10
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
MAAP	<i>m</i> -Aminoacetophenone
MAAP-GTP	<i>m</i> -Aminoacetophenone-phosphoramidate-GTP
mant-dGTP	3'-O-(N-methylanthraniloyl)-2'-deoxyguanosine triphosphat
Mes	2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid
Mops	3-[N-morpholino]propanesulfonic acid
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>Molecular Weight</i> (Molekulargewicht)
NBT	Nitroblue Tetrazolium Chlorid
NC	Nitrocellulose
NEF	<i>Nucleotide Exchange Factor</i> (Nukleotidaustauschfaktor)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
NTA	Nitrilotriacetic acid
NTD	N-terminale Domäne
N-Terminus	Aminoende einer Polypeptidkette
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Pi	Inorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylylsulfonyl fluorid
poly(U)	Poly-Uridin
POPOP	1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene
PPO	2,5-diphenyloxazol
P-Stelle	Peptidyl-tRNA Bindungsstelle am Ribosom
PTC	Peptidyltransferasezentrum
PVDF	Polyvinylidene fluorid
RF	<i>Release Factor</i> (Terminationsfaktor)
RGS	<i>Regulator of G-protein Signaling</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Revolution Per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SD-Sequenz	Shine-Dalgarno-Sequenz
S	Swedberg-Einheit
s4U	4-Thiouridin
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i>
<i>T.th.</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBHS	Tertbutylhydrogensulfat
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphine, hydrochloride
TEAA	Triethylamonium Acetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-ethanediamine
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> (Trifluoressigsäure)

Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethane

tRNA *transfer* RNA

UV *Ultra Violet*

WT *Wild Typ*

X-Base siehe acp3U

% (v/v) Volumenprozent

% (w/v) Gewichtsprozent

1 Einleitung

Die genetische Information wird von der DNA über mRNA zum Protein durch die Transkription und Translation exprimiert. Die Übersetzung (Translation) der Information von der mRNA erfordert ein koordiniertes Zusammenspiel von mehr als hundert Makromolekülen. Transfer-RNAs, mRNA, Translationsfaktoren und zahlreiche andere Proteine werden zusätzlich zu Ribosomen gebraucht. Die Proteinbiosynthese, als ein wichtiger Angriffspunkt verschiedener Regulationsmechanismen, wurde Jahrzehnte intensiv untersucht. Der Mechanismus der Translation ist aber sogar für die einfachsten Organismen, die Bakterien, keineswegs vollständig verstanden (für Review siehe Ramakrishnan, 2002).

1.1 Der Translationszyklus

Die Translation verläuft in drei Stufen: Initiation, Elongation und Termination. In weiterem beziehen sich alle Angaben auf die Translation in Prokaryonten. Die Basennummerierung der rRNAs entspricht für einen besseren Vergleich der *E. coli* Nummerierung.

1.1.1 Initiation

Bei der Initiation wird durch die Bildung des 30S Präinitiationskomplexes, der aus 30S Untereinheit, mRNA, aminoacylierter Initiator tRNA (fMet-tRNA^{fMet}) und Initiationsfaktoren (IF1, IF2 und IF3) besteht, und nach einer Konformationsänderung des 30S Initiationskomplexes der Leseraster festgelegt. Diese Schritte werden kinetisch durch die Initiationsfaktoren kontrolliert. Die Assoziation der 50S Untereinheit führt zur Bildung des 70S Initiationskomplexes. Die fMet-tRNA^{fMet} wird am Ende der Initiation durch die Kodon-Antikodon Interaktion mit dem Startkodon (AUG) auf der mRNA in der ribosomalen P-Stelle positioniert. Das Ribosom mit der besetzter P-Stelle und der freier A-Stelle ist dann bereit für die Elongationsphase der Translation (Gualerzi and Pon, 1990) (Abb. 1.1).

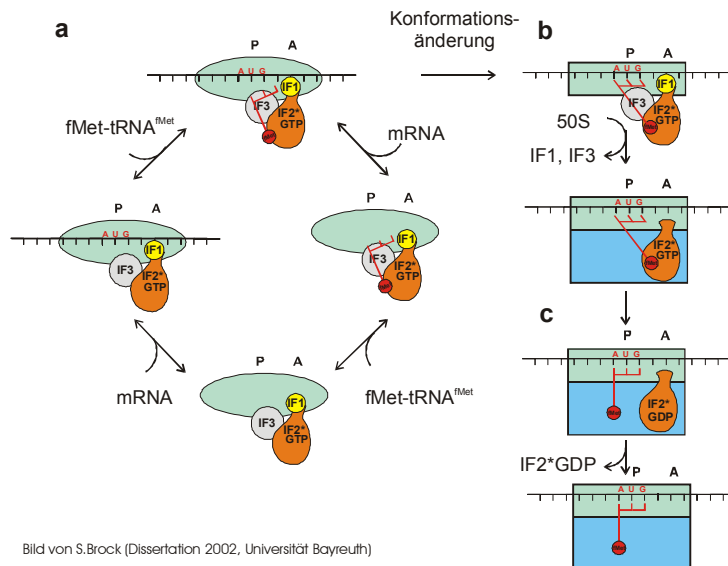


Abb 1.1 Das kinetische Modell der Initiation (Gualerzi and Pon, 1990).

(a) Bildung von 30S Präinitiationskomplexen. Die Bindungsreaktionen stehen in einem schnellen Gleichgewicht. **(b)** Eine Konformationsänderung führt zur Bildung des 30S Initiationskomplexes. **(c)** Die Assoziation der 50S Untereinheit an den 30S Initiationskomplex führt zur Bildung des 70S Initiationskomplexes. Die ribosomale 30S Untereinheit ist grün, die 50S Untereinheit blau dargestellt. Die ribosomalen A- bzw. P-Stellen sind angegeben. Die mRNA ist schwarz mit rot markiertem AUG Initiationskodon. Die Initiator-tRNA ist rot, die Initiationsfaktoren gelb (IF1), orange (IF2) und grau (IF3) dargestellt.

1.1.2 Elongation

Die Elongation ist ein zyklischer Prozess, bei welchem die wachsende Polypeptidkette in jeder Runde um eine Aminosäure verlängert wird. Die Elongation beginnt mit der Bindung des ternären Komplexes aus EF-Tu*GTP und einer aminoacylierten tRNA (aa-tRNA) ans Ribosom, wobei wird der Antikodon Arm der aa-tRNA in die A-Stelle der 30S Untereinheit inseriert. Eine korrekte Kodon-Antikodon Interaktion zwischen der aa-tRNA und mRNA resultiert in einer Konformationsänderung des Ribosom-Komplexes und der Aktivierung der GTPase von EF-Tu. Das führt zur Freisetzung der aa-tRNA und das Aminoacylende der aa-tRNA schwenkt in das Peptidyltransferasezentrum (PTC) der 50S Untereinheit, in einem Vorgang, der im engl. als *accommodation* bezeichnet wird. Durch die Bildung der Peptidbindung wird die in der P-Stelle gebundene tRNA deacyliert und das Peptid an die in der A-Stelle gebundene tRNA transferiert. Nachdem Peptidtransfer hat das Ribosom eine deacylierte tRNA in der P-Stelle und eine Peptidyl-tRNA in der A-Stelle. Die Translokation der tRNAs und mRNA und damit auch die Verschiebung des Ribosoms um ein Triplet in die 3'-Richtung der mRNA wird durch EF-G katalysiert. Das Ergebnis nach der EF-G Dissoziation ist ein Ribosom mit einer deacylierten tRNA in der E-Stelle, einer Peptidyl-tRNA in der P-Stelle und mit einer freier A-Stelle. Das Ribosom ist jetzt bereit für die nächste Runde (Abb. 1.2).

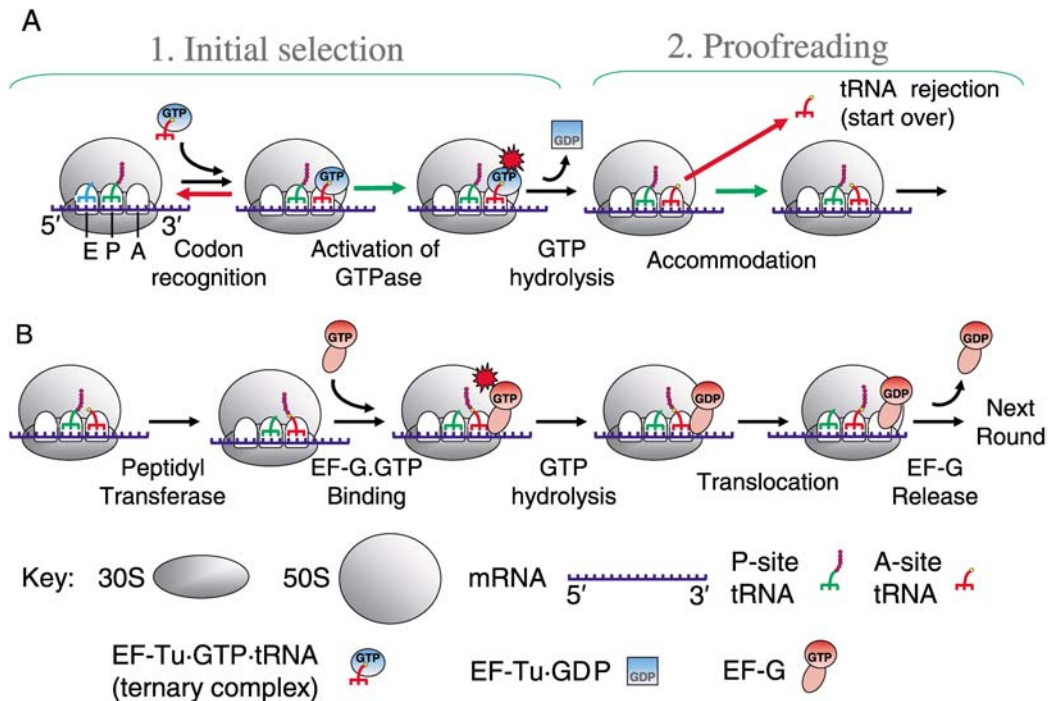


Abb. 1.2 Übersicht der Elongationsschritte (Ramakrishnan, 2002). Die roten Pfeile zeigen mögliche Zeitpunkte für die tRNA Dissoziation. Die grünen Pfeile deuten die Schritte an, in welchen die korrekte tRNA viel schneller als die nicht korrekte ist.

1.1.3 Termination

Die Termination der Translation beginnt, wenn sich ein Stoppkodon der mRNA in der ribosomalen A-Stelle befindet. In den Bakterien werden die Stoppkodons durch Terminationsfaktoren erkannt, RF1 und RF2 (Kisselev and Buckingham, 2000). Beide Faktoren erkennen den UAA-, RF1 außerdem den UAG- und RF2 den UGA-Stoppkodon. Das eukaryotische Homolog, eRF1 erkennt alle drei Terminationssignale. In den meisten Prokaryonten wurde zusätzlich ein Terminationsfaktor mit einer GTPase-Aktivität, RF3, gefunden. Die Bindung von RF1/2 ans Ribosom mit dem zugehörigen Stoppkodon in der A-Stelle aktiviert die Hydrolyse des Peptids von der A-Stelle tRNA. Die genaue Rolle des RF3 und seiner GTPase Aktivität bei der Dissoziation von RF1/2 aus dem Ribosom wird zur Zeit diskutiert (Zavialov et al., 2001), (Kisselev and Buckingham, 2000). Nach der Hydrolyse der Polypeptidkette befindet sich das Ribosom mit der deacylierten tRNA in der P-Stelle. Der Ribosomkomplex muss dissoziiert und die tRNA freigesetzt werden. Dieser Prozess wird

durch einen weiteren Faktor, RRF, zusammen mit EF-G katalysiert (Janosi et al., 1996) (Abb. 1.3).

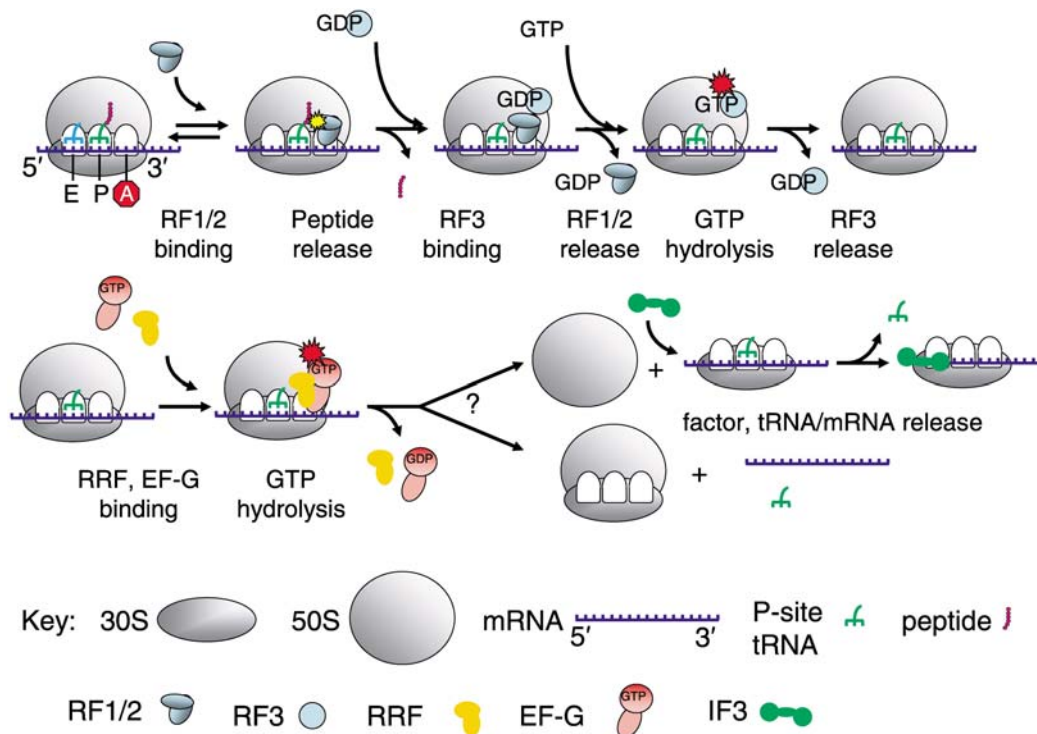


Abb. 1.3 Schematischer Mechanismus der Termination (Ramakrishnan, 2002).

1.1.4 Die Hypothese der molekularen Mimikry

Vergleicht man die Struktur des ternären aa-tRNA*EF-Tu*GTP Komplexes (Nissen et al., 1995) mit der des EF-G*GDP (Czworkowski et al., 1994) stellt man fest, dass sie sehr ähnliche dreidimensionale Form besitzen (Abb. 1.4A). So entspricht die Lage der Domänen III, IV und V des EF-G der Orientierung der tRNA im ternären Komplex. Diese tRNA-Mimikry deutet darauf hin, dass beide Komplexe am Ribosom eine gemeinsame Bindungsstelle besetzen. Dies wurde sowohl durch Footprinting-Experimente (Wilson and Noller, 1998), (Moazed and Noller, 1989), als auch durch cryoEM Aufnahmen (Stark et al., 1997), (Valle et al., 2002), (Agrawal et al., 1998) bestätigt. Der ternäre aa-tRNA*EF-Tu*GTP Komplex bringt die aa-tRNA in die ribosomale A-Stelle (Abb. 1.4B). EF-G katalysiert durch die Bindung in die A-Stelle die Translokation der Peptidyl-tRNA von der A- in die P-Stelle des Ribosoms. Ähnliche tRNA-Mimikry Eigenschaften wurden auch den Terminationsfaktoren RF1 und RF2 bzw. den Initiationsfaktoren IF1 und IF2 zugeschrieben (Ito et al., 1996), (Brock et al., 1998). Tatsächlich entsprechen die vor kurzem aufgeklärten

Strukturen von RF2 (Vestergaard et al., 2001) und RRF (Selmer et al., 1999) der räumlichen Form einer tRNA (Abb. 1.4C). Auf der Grundlage der strukturellen (Roll-Mecak et al., 2000), (Sette et al., 1997) und biochemischen (Moazed et al., 1995), (Pioletti et al., 2001), (Dahlquist and Puglisi, 2000) Daten kann auch für den IF1 und IF2 ein möglicher ribosomalen Komplex dargestellt werden.

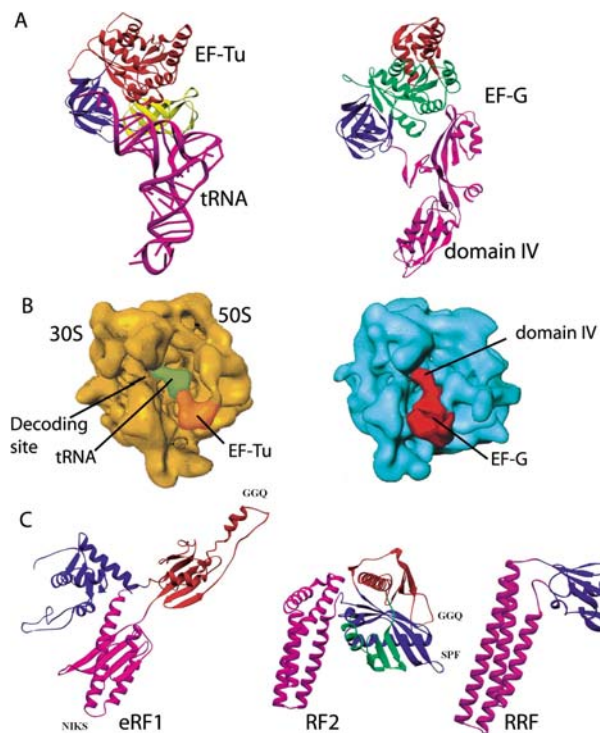


Abb. 1.4 Die tRNA-Mimikry Hypothese. Bild von (Ramakrishnan, 2002). **(A)** Kristallstruktur vom ternären Komplex EF-Tu*GppNHp*tRNA^{Phe} (links) (Nissen et al., 1995) und EF-G*GDP (rechts) (Czworkowski et al., 1994); (al-Karadaghi et al., 1996). **(B)** Cryo-EM Struktur von Ribosom mit ternärem Komplex (links) (Stark et al., 1997) und EF-G (Agrawal et al., 1998). **(C)** Strukturen von eRF1 (Song et al., 2000), RF2 (Vestergaard et al., 2001) und RRF (Selmer et al., 1999).

1.2 G-Proteine

Die Guaninnukleotid-bindende Proteine, kurz G-Proteine, sind die Regulatoren und Zeitschalter zahlreicher zellulären Prozesse (Bourne et al., 1990), (Bourne et al., 1991); (Sprang, 1997): Orientierung des Cytoskeletts (Rho, Rac), nuklear Transport (Ran), vesikulär Transport (Arf, Rab), Translation (EF-Tu, EF-G, IF2, RF3 und SRP), Mitogenese (Ras, Rap) und rezeptorgesteuerte Signalübertragung (G α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine). In der GTP-gebundenen, aktiven Form wechselwirken sie mit weiteren Molekülen, s.g. Effektoren. Die G-Proteine besitzen eine, in der Regel langsame, intrinsische GTPase Aktivität, die die Lebensdauer der Interaktion bestimmt. Um G-Proteine rasch zu inaktivieren wird bei den meisten die intrinsische GTPase durch *GTPase-activating proteins* (GAPs) bis

zu 10^5 -Fach stimuliert. Durch die GTP-Hydrolyse wird ein inorganisches Phosphat freigesetzt und das G-Protein wird in die GDP-gebundene Form überführt. Die GDP-Dissoziation wird bei vielen G-Proteinen durch Nukleotidaustauschfaktoren (GEFs – *Guanine nukleotid exchange factors*) beschleunigt. Dank den Energieerhaltungssystemen ist GTP bei einer 1 mM intrazellulären Konzentration (Neuhart, 1987) rund 10^3 -Fach konzentrierter als GDP und das Nuklotidfreie G-Protein kann durch die GTP-Bindung schnell wieder in die aktive Form überführt werden. Manche G-Proteine werden zusätzlich durch Nukleotiddissoziationsinhibitoren (GDIs – *Guanine nukleotid dissociation inhibitors*) reguliert.

Am intensivsten wurde der Mechanismus der GTPase für die Mitglieder zweier Subfamilien der GTPase Superfamilie studiert: kleine (20-25 kDa) Ras-ähnliche GTPasen (Scheffzek et al., 1997) und $G\alpha$ -Proteine (40-45 kDa) (Sondek et al., 1994), (Coleman et al., 1994). Dies wurde insbesondere durch eine Vielzahl von Kristallstrukturen ermöglicht. Anfangspunkt war die Lösung der dreidimensionalen Struktur von Ras, sowohl in der GDP- auch in der GppNHp-gebundener Form (Pai et al., 1989), (Pai et al., 1990), (Tong et al., 1991). Danach folgten schnell Kristallstrukturen anderer G-Proteinen (für Review siehe (Sprang, 1997)). Alle G-Proteine besitzen eine minimale G-Domäne, die aus einem sechssträngigen β -Faltblatt und fünf Helices besteht (Vetter and Wittinghofer, 2001). Weitere Extensionen sind G-Protein spezifisch. So besitzen alle G-Proteine vier konservierte Sequenzelemente in der Nukletidbindungstasche: eine Phosphatbindende-Schleife (P-Schleife); ein NKxD-Motiv, das die Guanodin-spezifität gewährleistet; und zwei Regionen (als Switch I und Switch II bezeichnet), die das γ -Phosphat des GTP erkennen und sind zugleich an der Koordination eines in den Strukturen aller G-Proteine vorhandenen Mg^{2+} -Ions beteiligt (Tab. 1.1).

Tab. 1.1 Sequenzvergleich der Aminosäuren der G-Proteine in der Nuklotidbindungsstelle. (Sprinzl et al., 2000)

G-Protein		P-Loop		Switch I	Switch II		Nukleosid	
EF-Tu	(68)	GH	DHGK ^{T/S}	E	RGITI	D	PGHADY	NK D SA
EF-G	(26)	AH	D GKTT	E	RGITI	D	DTPGHVDF	NK D SA
IF2	(14)	GHVD	DHGKT		GGITQ	D	DTPGH AF	NK D SA
RF3	(5)	SHP	DAGKT	E	RGIS	D	DTPGH DF	NK D SA
Consensus		H	D GK^{T/S}		GI	D	PGH^{F/Y}	NK D SA
Ras/Rho	(36)	G	GK ^{T/S}	Y	PT	D	DTAGQ Y	NK D SA
$G\alpha$	(72)	G	SGKS	LR	R T	D	DVGGQR E	FLNK D SA
ΣConsensus		G	GK^{T/S}		T^{T/S}	D	G	NK D SA

Die Nummer von verglichenen Sequenzen ist in den Klammern angegeben.

Die Genom-Sequenzierungsprojekte identifizierten in Bakterien ein Satz von 11 konservierten GTPasen (dazwischen EF-Tu und EF-G), welche alle mit RNA Wechselwirken und für die Ribosom-Funktion wichtig sind (Caldon et al., 2001).

1.2.1 Die Argininfinger-Hypothese der stimulierten GTP-Hydrolyse

Die Ras-ähnliche und die $G\alpha$ -Proteine benötigen ein GAP, RGS (*Regulator of G-Protein Signaling*) bei $G\alpha$ genannt, um rasch im Zeitraum der zellulären Prozesse inaktiviert zu werden (Scheffzek et al., 1998). GTPase inaktive Ras-Mutanten sind Onkogene, die zum unkontrollierten Zellwachstum beitragen, und in 25-30 % der menschlichen Tumore gefunden werden (Wiesmuller and Wittinghofer, 1994). Die GAP-Strukturen sind für einzelne Subfamilien der G-Proteine unterschiedlich (für Referenzen siehe Vetter and Wittinghofer, 2001). Die Nukleotidbindungszentren der Ras-Proteine und $G\alpha$'s zeigen jedoch ein hoch konserviertes Glutamin in der Nähe des γ -Phosphat. Die $G\alpha$ -Proteine haben zusätzlich ein invariantes Arginin. In den Kristallstrukturen von $G\alpha^*GDP$ mit AlF_4^- liegt das Aluminiumtetrafluorid-Anion in einer planaren Konformation die das γ -Phosphat im Übergangszustand der GTP-Hydrolyse nachzuahmen scheint. Das konservierte Arginin, das als Argininfinger bezeichnet wird, liegt in einer exponierten Schleife und stabilisiert dieses Übergangszustandsanalog {Tesmer, 1997}. Biochemische und strukturelle Analysen, mit AlF_x (AlF_4^- oder AlF_3), der Ras*RasGAP und Rho*RhoGAP Komplexe ergaben, dass das intramolekulare Argininfinger von $G\alpha$ hier in *trans* von den GAPs ins aktive Zentrum hinzugefügt wird (Scheffzek et al., 1997), (Rittinger et al., 1997b), (Nassar et al., 1998). Dieser allgemeine Mechanismus der GAP-aktivierten GTPase gilt aber höchstwahrscheinlich nicht für alle G-Proteine. Die Translationsfaktoren haben in der Switch I Schleife ein konserviertes Arginin, das homolog zu dem Argininfinger von $G\alpha$ ist. Seine Rolle, als eines, bei der ribosomen-stimulierter GTPase in *cis* wirkenden Arginins, konnte jedoch für EF-Tu (Zeidler et al., 1996) und EF-G (Mohr et al., 2000) nicht bestätigt werden. Stattdessen wird fürs *E. coli* EF-G ein anderer potentieller Argininfinger diskutiert (Mohr et al., 2000). Auch für andere G-Proteine, z.B. für den Nukleartransportfaktor Ran (Seewald et al., 2002), wurde ein alternativer Mechanismus der GAP-stimulierter GTPase vorgeschlagen. Zusätzlich besitzen Rap-Proteine ein Thr und die Translationsfaktoren ein His in der Position des katalytisch wichtigen Glutamins. Ähnlich wie bei den ATP-hydrolysierenden Enzymen Myosin und Kinesin (Rayment, 1996) könnten mehrere von Gln- und Arg-unabhängige GTPase-Mechanismen existieren. Eine wichtige Aufgabe bei der Katalyse der GTP-

Hydrolyse kann wahrscheinlich das zwischen den ATPasen und GTPasen invariante und in der P-Schleife vorhandene Lysin erfüllen (Vetter and Wittinghofer, 2001).

1.3 Der Elongationsfaktor Tu

Der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu, Tu steht für *thermo-unstable*) ist ein stark exprimiertes Protein, das in Bakterien 5-10 % des Gesamtzellextrakts bildet (Bosch et al., 1983). In mehreren Bakterien ist das Protein durch zwei Gene, *tufA* und *tufB*, kodiert. Die Genprodukte unterscheiden sich in *E. coli* nur in der C-terminalen Aminosäure, was keine funktionelle Unterschiede hervorruft (Anborgh et al., 1991). Der EF-Tu bindet nur in seiner aktiven GTP-Konformation eine Aminoacyl-tRNA. Der ternäre Komplex EF-Tu*GTP*aa-tRNA bindet an das mit einer mRNA programmierte Ribosom (Kaziro, 1978). Eine korrekte Kodon-Antikodon Interaktion der aa-tRNA mit dem A-Stellen Kodon der mRNA führt zu einer rund 10^5 -fachen Beschleunigung der intrinsischen GTPase-Aktivität von EF-Tu (Eccleston et al., 1985), (Rodnina et al., 1995). Nach der GTP-Hydrolyse dissoziiert der Faktor in der GDP-gebundener Form vom Ribosom. Der Funktionszyklus von EF-Tu wird durch den GTP/GDP-Austausch, der von dem Nukleotidaustauschfaktor EF-Ts katalysiert wird, abgeschlossen (Abb. 1.5).

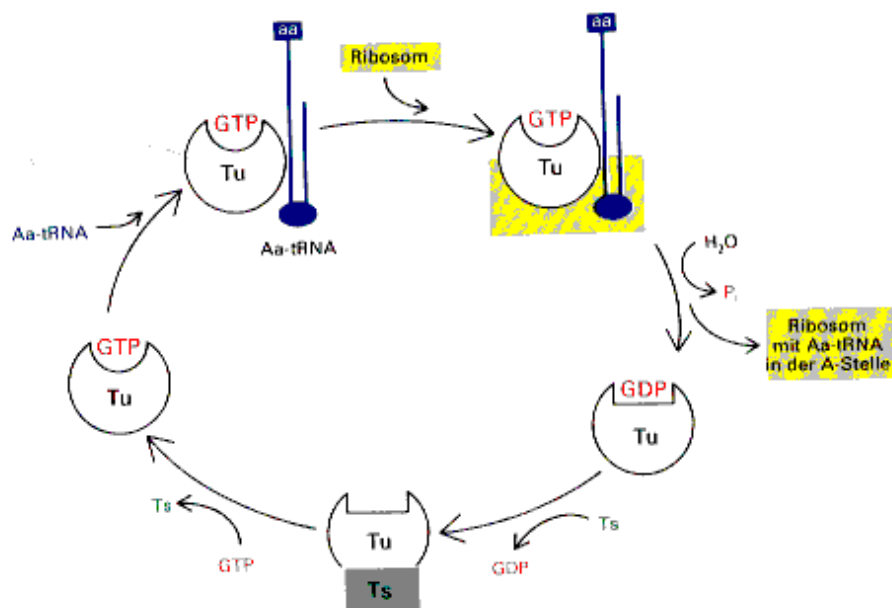


Abb. 1.5 Funktionszyklus des EF-Tu. Für Review siehe (Krab and Parmeggiani, 1998).

1.3.1 Die Struktur des EF-Tu

Zur Zeit gibt es mehrere Kristallstrukturen von EF-Tu aus thermophilen und mesophilen Organismen im Komplex mit seinen Liganden (Krab and Parmeggiani, 1998). Der EF-Tu aus *T.thermophilus* ist mit 405 Aminosäuren ein 44 651 Da großes monomere Protein (*E.coli* EF-Tu 43 kDa). Es besteht aus drei Domänen. Die Aminosäuren 1-211 bilden die GTP/GDP-bindende Domäne I (G-Domäne). Die Röntgenstrukturen von EF-Tu aus *T.thermophilus* im Komplex mit GppNHp, einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analog (Berchtold et al., 1993), und von EF-Tu aus *T. aquaticus* (Polekhina et al., 1996) mit GDP zeigen identische Gesamtorganisation der G-Domäne. Diese G-Domäne hat, wie bei allen G-Proteinen, eine α/β -Topologie und besteht aus einem β -Faltblatt mit einem antiparallelen (b) und 5 parallelen (a,c-f) Strängen, der an beiden Seiten mit gesamt 6 Helices (A-F) umgeben ist. Die Sekundärstrukturelemente sind durch 10 schleifenähnliche Segmente verbunden. Die Domäne II (Aminosäuren 212-311) und Domäne III (Aminosäuren 313-405) bestehen hauptsächlich aus antiparallelen β -Strängen und haben eine β -Fass Struktur. Die relative Orientierung der Domänen ist stark unterschiedlich in den GTP- und GDP-gebundenen Zuständen (Abb. 1.6). Während die Domänen in der GTP-Form eine kompakte Einheit bilden, sind die Domänen I und II in der GDP-Form durch eine breite Lücke getrennt. Die Domäne I ist nach der GTP-Hydrolyse um rund 90° von der Domäne II weggedreht (Sprinzl, 1994). In der G-Domäne selber durchgehen die größten Umlagerungen die Effektorregion (N41-T62) und die Switch II Region (G84-A96). In der GTP-Form, besteht die Effektorregion aus zwei kurzen β -Strängen und einer kleinen α -Helix (Aminosäuren 47-51). In dem GDP-Zustand dagegen bildet sich eine lange β -Faltblattstruktur, die in Kontakt mit der Domäne III tritt. Das Gly84 (Helix B in der Switch II Region) bildet mit seiner Amidgruppe eine Wasserstoffbrücke zu dem γ -Phosphat und nukleophilen Wassermolekül (H_2O 411). Durch die GTP-Hydrolyse und die Freisetzung des inorganisches Phosphats (Pi) wird diese Wasserstoffbindung gebrochen. Folglich ändert das Gly84 seine Konformation und geht eine Interaktion mit Asp87 ein, das in der GTP-Form eine Ionenbindung mit Arg59 aus der Switch I Region bildet. Ähnliche Konformationsänderungen zeigt auch das His85, das ebenso das reaktive Wassermolekül in der GTP-Form koordiniert. Als Folge ist die Helix B in der GDP-Form am N-Terminus um vier Aminosäuren länger und am C-Terminus um zwei Aminosäuren kürzer (His85-Thr94 vs. Ile89-Ala96). Die Flexibilität der Aminosäuren am Anfang und am Ende der Helix B spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der GTP-Hydrolyse (Knudsen et al., 2001). Die Helix dreht sich zusätzlich um rund 30° um ihre

Achse. Die Reorientierung der Helix B und die C-terminale Verkürzung zerstören die Oberflächenkomplementarität der Domänen I und II und die Domänen werden getrennt.

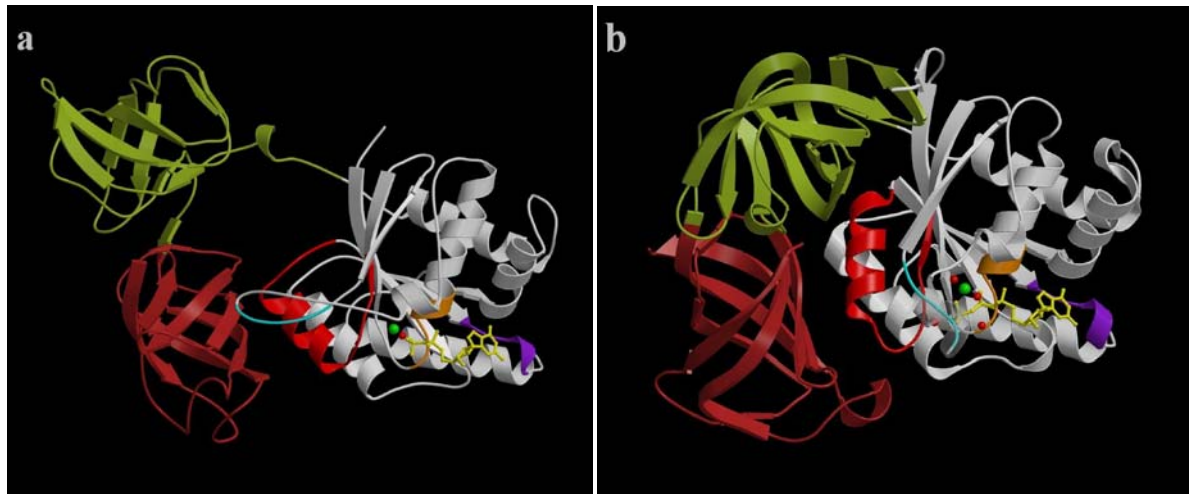


Abb. 1.6 Kristallstrukturen von (a) EF-Tu*GDP aus *T. aquaticus* (Polekhina et al., 1996) und (b) EF-Tu*GppNHp aus *T. thermophilus* (Berchtold et al., 1993). Domäne I grau, Domäne II grün, Domäne III dunkelrot. Konservierten Regionen : P-Loop (G18-K24) orange, Switch I (K52-T62) cyan, Switch II (G84-A96) hellrot, Nukleosiderkennungsmotiv (N136-D139) violett. Die Wassermolekülen im aktiven Zentrum sind als rote und das Mg^{2+} -Ion als grüne Kugel dargestellt.

1.3.2 Nukleotidbindung und Mg^{2+} -Koordination

Die Guaninnukleotide binden zusammen mit dem Cofaktor Mg^{2+} an EF-Tu aus *T. thermophilus* mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 10^{-8} - 10^{-9} M (Arai et al., 1978a), (Wagner et al., 1995). Die Nukleotidbindungsstelle ist zwischen G-Proteinen praktisch identisch (Pai et al., 1989), (Noel et al., 1993), (Coleman et al., 1994). Mit dem GTP-Analog, GppNHp, wurden viele spezifische Wasserstoffbindungen zum EF-Tu (Berchtold et al., 1993) identifiziert (Abb. 1.7). Die Guanin-Base wird durch zwei, zwischen G-Proteinen konservierte Segmente erkannt (Bourne et al., 1991): N136-K-X-D139 und S174-A-L176. Zusätzlich interagiert der Guaninring durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Leu176 und den Methylengruppen der Seitenkette von Lys137. Die ϵ -Aminogruppe von Lys137 interagiert mit 4'OH der Ribose während die 2'OH und 3'OH Lösungsmittel-exponiert sind und nicht mit dem EF-Tu wechselwirken. Die Phosphate sind hauptsächlich durch Wasserstoffbindungen mit den Seitenketten von Lys24, Thr25, Thr26, Tyr47, Thr62 und den Rückratamiden der glycinreichen P-Schleife G18-X₄-G-K-T25 sowie des Anfangs der Switch II Regions D78-G84 gebunden. Das Mg^{2+} -Ion ist ein essentieller Cofaktor in allen G-Proteinen (Gilman, 1987). In der EF-Tu*GppNHp Struktur wird das Mg^{2+} -Ion über die Koordination mit zwei Sauerstoffen der β - und γ -Phosphate und mit den Hydroxylgruppen

heterotetramären Komplexes weist eine zweifache Symmetrieachse auf (Wang et al., 1997) (Abb. 1.8). Diese Symmetrie ist eine Folge der EF-Ts Dimerisierung und bietet zwei symmetrisch angeordnete Oberflächen (Jiang et al., 1996), (Arai et al., 1978b). An jede dieser Oberflächen bindet ein EF-Tu Molekül. Beide EF-Ts Dimere tragen zu der Bindung von EF-Tu bei, wobei ein EF-Ts Monomer mit der Domäne I (G-Domäne) und der andere Monomer mit der Domäne III des EF-Tu interagiert. Der EF-Tu*EF-Ts Komplex aus *E. coli* ist dagegen ein einfacher Heterodimer (Kawashima et al., 1996). Auch wenn sich die quaternären Strukturen der Komplexe aus *E. coli* und *T. thermophilus* deutlich unterscheiden ist die Interaktionsoberfläche zwischen EF-Tu und EF-Ts fast gleich (Wang et al., 1997), (Kawashima et al., 1996). Mit seinen zwei Domänen imitiert der *E. coli* EF-Ts Monomer die zwei *T. thermophilus* Dimere strukturell.

Der EF-Ts katalysiert die Nukleotiddissoziation auf zweierlei Weise. Zum einen, verursacht die Insertion des konservierten Phe82 des EF-Ts in eine hydrophobe Tasche aus His85 in Helix B und His119 und Leu119 in Helix C, eine Verschiebung der Helix B in EF-Tu, die zur Destabilisierung der Mg^{2+} -Koordinations sphere führt. Eine Dissoziation des Mg^{2+} -Ions alleine führt im *E. coli* System zur 150-300-facher Erhöhung der GDP-Dissoziationsgeschwindigkeit (Gromadski et al., 2002). Zum zweiten, initiiert die Insertion vom EF-Ts Phe82 zwischen die Helices B und C eine kaskadenartige Verschiebung von Aminosäuren im EF-Tu, die sich über His119, Glu115 und His19 bis zum Val20 fortpflanzt. Das resultierende Umklappen der Val20/Asp21 Peptidbindung und die Verschiebung des Val20 einerseits bricht die Wasserstoffbrücken zwischen der P-Schleife (Aminosäuren 18-25) und den Phosphaten und andererseits verdrängt das Carbonyl des Val20 das β -Phosphat und damit das Nukleotid durch sterische und elektrostatische Interaktionen aus der Bindungstasche (Wang et al., 1997).

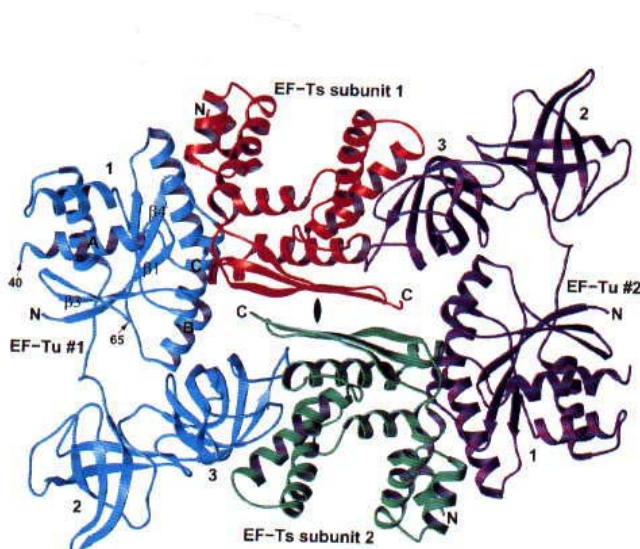


Abb. 1.8 Struktur des EF-Tu*EF-Ts Komplexes aus *T. thermophilus* (Wang et al., 1997). Blau und dunkelviolett EF-Tu (links und rechts), rot und grün EF-Ts. Die Aminosäuren 40-65 von EF-Tu sind im Kristallstrukturmodell nicht aufgelöst.

1.3.4 Wechselwirkung mit aa-tRNA

Der Elongationsfaktor Tu bindet in der GTP-Form alle korrekt aminoacylierten Elongator tRNAs mit einer ungefähr gleichen Affinität und eine nichtaminoacylierte tRNA mit einer um drei Größenordnungen niedrigeren Affinität (Louie et al., 1984); (Louie and Journak, 1985); (Ott et al., 1990); (Kurland, 1992); (Becker and Kern, 1998); (Ibba and Soll, 1999). Wegen dieser Fähigkeit tRNAs mit unterschiedlicher Sequenz zu binden, wurde der EF-Tu lange für ein unspezifisches tRNA-bindende Protein gehalten. Er kann jedoch zwischen den Elongator tRNAs, Initiator tRNA^{Met} und der Sec-tRNA^{Sec} unterscheiden, was ein Hinweis darauf ist, dass EF-Tu strukturelle Unterschiede erkennt (Janiak et al., 1990). Konsistent damit wurde gezeigt, dass der Aminoacyl-Rest und die tRNA unabhängig zu der Bindung beitragen (Knowlton and Yarus, 1980); (Wagner and Sprinzl, 1980). Zur Zeit stehen uns zwei Kristallstrukturen vom ternären Komplex aus *T. aquaticus* EF-Tu und Hefe Phe-tRNA^{Phe} (Nissen et al., 1995); (Nissen et al., 1996) und *E. coli* Cys-tRNA^{Cys} (Nissen et al., 1999) zur Verfügung. Die relative Positionen von EF-Tu und der tRNAs sind in beiden Komplexen sehr ähnlich (Abb. 1.9). Der EF-Tu interagiert vorwiegend mit dem Akzeptor-, T-Stamm und der D- und T-Schleife der tRNA. Die Erkennung wird von der tRNA-Seite ausschließlich durch die Interaktionen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat vermittelt.



Abb. 1.9 Struktur von EF-Tu*GppNHp*Phe-tRNA^{Phe} (Nissen et al., 1996). EF-Tu aus *T. aquaticus* : Domäne I grün (oben), Domäne II gelb (links), Domäne III rot (in der Mitte), Phe-tRNA^{Phe} aus Hefe grau.

P. Nissen et al., *Biochimie* (1996), 78, 921-933

Vor kurzem konnte es durch komparative Analyse der Bindungsaffinitäten verschieden misacylierter tRNAs zu *T. thermophilus* EF-Tu gezeigt werden, dass sich die energetischen

Beiträge des Aminoacyl-Restes und der tRNA zu der Bindung gegenseitig kompensieren (LaRiviere et al., 2001), (Asahara and Uhlenbeck, 2002). Dabei unterscheiden sich die relative Affinitäten von EF-Tu für verschiedene Aminoacyl-Reste, bzw. verschiedene tRNAs bis um über drei Größenordnungen (Asahara and Uhlenbeck, 2002). Die tRNA^{Glu}, zB., ist eine sehr gut bindende tRNA, die Glutaminsäure ist dagegen eine schwach bindende Aminosäure. Diese thermodynamische Kompensation führt zu einer ausgeglichenen Affinität von EF-Tu für alle korrekt aminoacylierte tRNAs. Mehrere Eubakterien und Archaeobakterien besitzen keine Gln-tRNA- (GlnRS) und Asn-tRNA-Synthetase (AsnRS) und benutzen einen Transamidierungsweg um die Gln-tRNA^{Gln} bzw. Asn-tRNA^{Asn} aus Glu-tRNA^{Gln} und Asp-tRNA^{Asn} herzustellen (Curnow et al., 1996), (Schon et al., 1988). Keine von den beiden misacylierten tRNAs bindet an EF-Tu mit ausreichender Affinität und es kommt nicht zum Einbau von Asp/Glu statt Asn/Gln in die wachsende Polypeptidkette (Becker and Kern, 1998), (Stanzel et al., 1994). Diese Diskriminierung zwischen einer misacylierten und einer korrekt aminoacylierten tRNA kann im Licht der vorhandenen Experimente verstanden werden (LaRiviere et al., 2001), (Asahara and Uhlenbeck, 2002). Der EF-Tu ist damit ein tRNA-spezifisches Protein und kann wahrscheinlich, zusätzlich zu dem Editing-Mechanismus der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und zur tRNA-Selektion auf dem Ribosom, die Genauigkeit der Proteinbiosynthese beeinflussen. Die molekulare Basis für die außergewöhnliche EF-Tu Spezifität für unterschiedliche Aminosäurenreste und tRNA-Moleküle ist jedoch nicht verstanden (für Diskussion siehe Asahara and Uhlenbeck, 2002).

1.3.5 Wechselwirkung mit Kirromycin

Kirromycin, auch Mocimycin genannt, ist ein Prototyp einer großen Antibiotikum-Familie (Parmeggiani and Sander, 1980), (Parmeggiani and Swart, 1985). Kirromycin bindet an EF-Tu (Wolf et al., 1974), stimuliert seine intrinsische GTPase Aktivität, nach der GTP-Hydrolyse blockiert EF-Tu in einer GTP-ähnlichen Form (Mesters et al., 1994), (Parmeggiani and Swart, 1985) und verhindert die Dissoziation von EF-Tu*GDP aus dem Ribosom (Wolf et al., 1977). Dadurch wird der ternäre Komplex EF-Tu*GDP*aa-tRNA fixiert in der ribosomalen A-Stelle und die Translation inhibiert. Vor kurzem wurde die Kristallstruktur von *T. thermophilus* EF-Tu im Komplex mit GDP und Aurodox, einem Methyl-Derivat von Kirromycin, publiziert (Vogelely et al., 2001) (Abb. 1.10). Diese Struktur erklärt sehr gut die Mutationen, die eine Resistenz von EF-Tu gegen Kirromycin verursachen (Duisterwinkel et

al., 1981); (Duisterwinkel et al., 1984); (Mesters et al., 1994). An der Bindung des Antibiotikums zwischen die Domänen I und III des EF-Tu sind hauptsächlich hydrophobe Interaktionen und wenige Wasserstoffbrücken beteiligt (Vogelely et al., 2001).

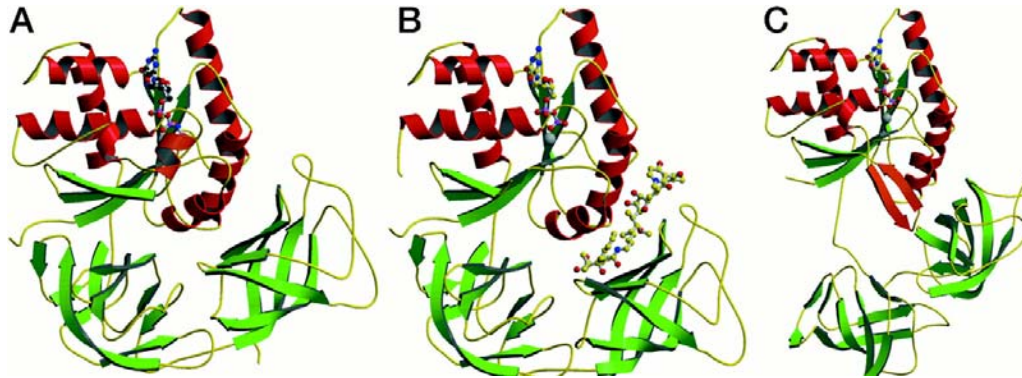


Abb. 1.10 Struktur von EF-Tu im Komplex mit (A) GppNHp (Berchtold et al., 1993), (B) GDP und Aurodox (Vogelely et al., 2001), (C) GDP (Polekhina et al., 1996).

1.3.6 Wechselwirkung mit Ribosom

Der ternäre Komplex aus EF-Tu, GTP und aa-tRNA bindet in die ribosomale A-Stelle. Eine korrekte Kodon-Antikodon Interaktion führt zur Aktivierung der EF-Tu-assoziierten GTPase Aktivität (Rodnina et al., 1995), wodurch wird die aa-tRNA vom EF-Tu freigesetzt und ihr CCA-Ende bindet in das Peptidyltransferasezentrum. In letzten 20 Jahren sammelten sich viele experimentelle Hinweise über die Interaktion vom EF-Tu mit Ribosom. Quervernetzungsexperimente mit programmierten *E. coli* 70S Ribosomen und EF-Tu und anschließende Immunelektronenmikroskopie lokalisierten den L7/L12-Stiel in der 50S Untereinheit und Teile der 30S Untereinheit als EF-Tu-Bindungsregion am Ribosom (Girshovich et al., 1986). Spätere Quervernetzungsexperimente definierten die ribosomalen Proteine L7/L12 und L10 als bevorzugte Interaktionspartner für EF-Tu (Nag et al., 1995). Erst eine Kombination aus genetischen und Footprinting-Untersuchungen ermöglichten eine genaue Lokalisierung der Kontakte von EF-Tu mit rRNA. Die Rolle der 530 Region der 16S rRNA in der Interaktion mit EF-Tu wurde durch eine Allelen-spezifische Footprinting-Strategie gezeigt (Powers and Noller, 1993). Diese Region ist wichtig für die tRNA Selektion in der A-Stelle der 30S Untereinheit (Noller, 1991). Die Region in der 23S rRNA um die Base 2660, auch Sarcin/Ricin-Schleife (SRL) genannt, wechselwirkt ebenfalls mit EF-Tu (Tapprich and Dahlberg, 1990), (Moazed et al., 1988). Diese biochemische Daten können Dank der vorhandenen Hochauflösungs-Kristallstrukturen von ribosomalen Untereinheiten

und des ganzen 70S Ribosoms aus verschiedenen Organismen besser verstanden werden (für Review siehe Ramakrishnan, 2002). Die zusätzlichen Fortschritte in der Kryoelektronenmikroskopie und der Bildbearbeitung ermöglichten es ribosomale Komplexe mit einer Auflösung unter 20 Å darzustellen. So bestätigte eine cryoEM Struktur von *E. coli* 70S Ribosomen mit gebundenem ternären Komplex in Gegenwart von Kirromycin die biochemischen Ergebnisse (Stark et al., 1997). Das Antibiotikum Kirromycin blockiert EF-Tu nach der GTP-Hydrolyse in dem GTP-Zustand (Vogelely et al., 2001) und inhibiert seine Dissoziation vom Ribosom. Dem zu Folge präsentiert die cryoEM Struktur den Zustand direkt nach der GTP-Hydrolyse und vor der Umlagerung der EF-Tu Struktur. Die Domäne I des EF-Tu interagiert in dieser cryoEM Rekonstruktion mit der Basis des L7/L12-Stiels, an der wahrscheinlich die Proteine L11, L10 und die Sarcin/Ricin-Schleife lokalisiert sind, und formt auch eine direkte Brücke mit der C-terminalen Domäne des L7/L12 (Stark et al., 1997) (Abb. 1.11).

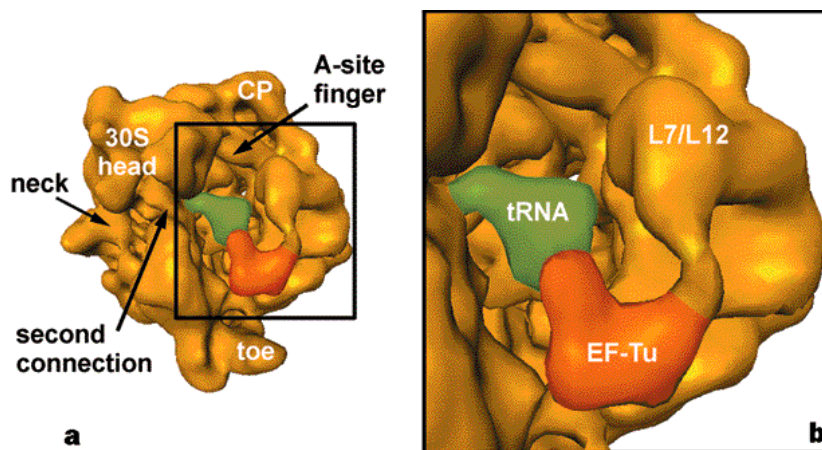


Abb. 1.11 Die 70S Ribosomen aus *E. coli* mit durch Kirromycin in der A-Stelle blockiertem ternären Komplex (Stark et al., 1997).

Auf Seite von EF-Tu wurden die Helices C und D für die Interaktion mit der C-terminalen Domäne des L7/L12 vorgeschlagen. Die Rolle von der Helix D des Faktors in der Bindung ans Ribosom wurde auch mittels Sequenzvergleich konservierter Motive zwischen EF-Ts und L7/L12 impliziert (Wieden et al., 2001). Interessanteweise wurde keine Wechselwirkung zwischen der Domäne I des EF-Tu und dem C-Terminus des L7/L12 in Anwesenheit von GppNHp, einem nichthydrolysierbaren GTP-Analog, gesehen. Die Domäne II ist im Kontakt mit der Region der 30S Untereinheit wo die Proteine S12, S5 und S4 und die 530-Haarnadelschleife, also das Dekodierungszentrum der 30S Untereinheit lokalisiert ist (Dontsova et al., 1992).

Kürzlich ist eine neue cryoEM Struktur vom selben Komplex publiziert worden (Valle et al., 2002). Durch eine optimierte Auswahl der Ribosomen-Komplexe für die Bildbearbeitung konnten die Autoren die Auflösung bis auf 11 Å verbessern. In der neuen cryoEM Struktur ist kein direkter Kontakt zwischen EF-Tu und der C-terminalen Domäne des L7/L12 sichtbar. Um präzisere Aussagen treffen zu können wurde die Kristallstruktur des ternären Komplexes in die cryoEM Dichte eingepasst. Diese *docking*-Prozedur zeigte, dass die Effektorregion von EF-Tu im Kontakt zur Sarcin/Ricin-Schleife (um die Position 2660 der 23S rRNA) (Wool et al., 1992) steht und die T-Schleife der tRNA mit dem 58-Nukleotid Segment der 23S rRNA, um die Basen 1060-1070, wo L11 bindet und das GTPase-aktivierendes Zentrum der 50S Untereinheit lokalisiert ist, interagiert. In der 30S Untereinheit kontaktiert die Domäne II des EF-Tu die Helix 5 der 16S rRNA, der Akzeptorstamm der tRNA wechselwirkt mit dem Protein S12 und die Antikodonschleife reicht ins Dekodierungszentrum (Abb. 1.12). Interessant an dieser Arbeit ist auch, dass es erneut klar wurde, dass die tRNA während der Bindung in die A-Stelle ihre Struktur ändern muss und vermutlich aktiv an der Signalübertragung vom Dekodierungszentrum der 30S in das GTPase-aktivierende Zentrum der 50S Untereinheit beteiligt ist.

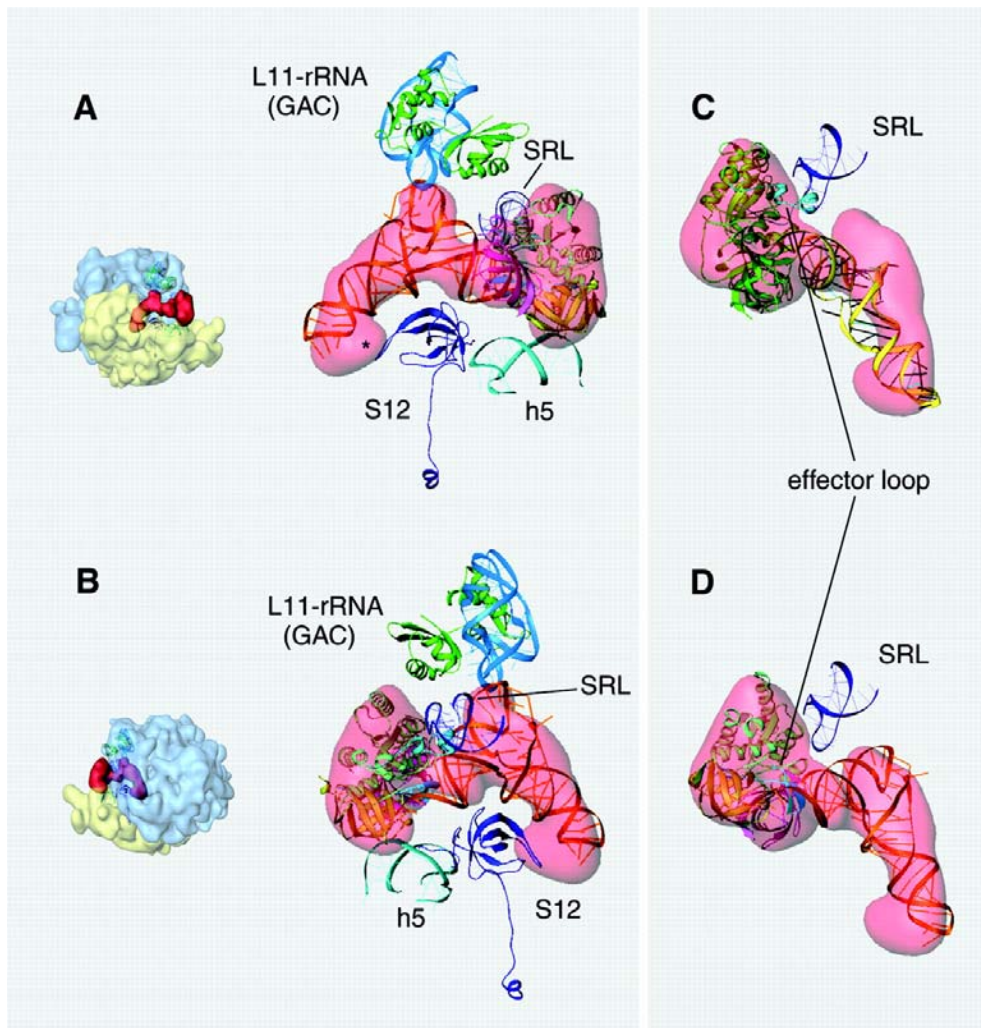


Abb. 1.12 Interaktion von EF-Tu und aa-tRNA mit dem Ribosom (Valle et al., 2002). **(A und B)** Darstellung der Anpassung der Kristallstruktur des ternären Komplexes (Nissen et al., 1995) in die cryoEM Dichte. **(C)** Interaktion vom SRL (blau) mit der Effektorschleife von EF-Tu (cyan) in der GTP-Form und **(D)** in der GDP-Form.

1.4 Das ribosomale Protein L12

Die cryoEM und Röntgenkristallographie halfen immens in den letzten Jahren beim Verständnis des Struktur-Funktion Verhältnisses im Ribosom (Ramakrishnan, 2002). Zusätzlich wurden auch individuelle ribosomale Komponenten, ribosomale Proteine und Fragmente der rRNA oder ihre Komplexe, strukturell untersucht (Nikonov et al., 1998); (Moore, 1998). Darunter wurde auch die Struktur von der C-terminalen Domäne des L7/L12 aus *E. coli* (Leijonmarck and Liljas, 1987) und des kompletten Proteins aus *Thermotoga maritima* (Wahl et al., 2000a) (Abb. 1.13) aufgeklärt. Das ribosomale Protein L7/L12 ist, in *E. coli*, ein ca. 12 kDa großes saures Protein. Das L7 unterscheidet sich von L12 nur durch N-terminale Acetylierung. Zwei Dimeren von L7/L12 bilden in der Lösung ein Tetramer der

durch L10 ans Ribosom bindet. Das Protein besteht aus drei Domänen. Die N-terminale Domäne ist wichtig für die Dimerisierung und die Bindung ans Ribosom (Gudkov et al., 1995). Die C-terminale Domäne ist involviert in der Interaktion mit Translationsfaktoren am Ribosom (Sommer et al., 1985). Die Verbindungsregion ermöglicht die relative Bewegung der C-terminalen Domänen (Hamman et al., 1996), (Bocharov et al., 1998). Wahrscheinlich wegen dieser Flexibilität konnte das L12 durch Quervernetzungsexperimente an unterschiedlichen Stellen des Ribosoms lokalisiert werden (Traut et al., 1995), (Dey et al., 1998).

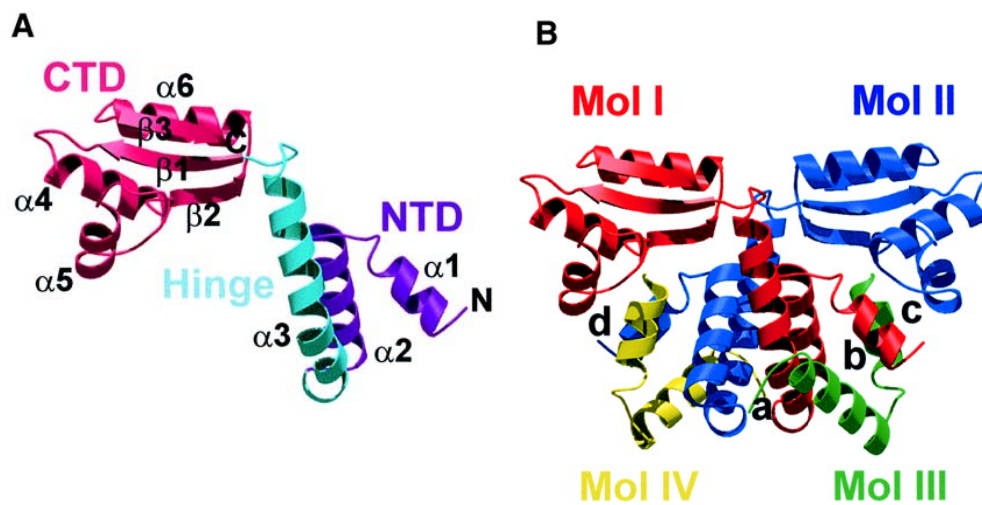


Abb. 1.13 Struktur des (A) Monomers von L12 aus *Thermotoga maritima*, (B) Tetramers aus zwei L12 (rot und blau) und zwei N-terminalen Domänen (gelb und grün) (Wahl et al., 2000a).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Mechanismus der stimulierten GTP-Hydrolyse von *T. thermophilus* EF-Tu untersucht werden. Dazu war, zum Einen, der Einfluss von GTP-Analoga auf die Funktion des EF-Tu und die Unterschiede in der Hydrolyseaktivität der Analoga und GTP-Hydrolyse zu begründen. Die GTP-Analoga sollten synthetisiert, gereinigt und charakterisiert werden. Um die Rolle der einzelnen Aminosäuren im aktiven Zentrum von EF-Tu bei der Hydrolyse zu verstehen sollte eine neue EF-Tu Variante durch gerichtete Mutagenese vorbereitet und in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Etablierung einer FRET-Assay zur Detektion des ternären Komplexes aus EF-Tu*GTP und aa-tRNA. Für die Fluoreszenzmarkierung sollten Cystein-Mutanten von EF-Tu vorbereitet und nach der Modifizierung mit einem Fluoreszenz-Donor charakterisiert werden. Ebenfalls sollte die tRNA mit einem Fluoreszenz-Akzeptor modifiziert werden. Die Bildung und der Zerfall des ternären Komplexes sollte durch FRET-Experimente getestet werden. Wenn geeignet, sollte dieser Assay zur Untersuchungen der stimulierten GTPase eingesetzt werden.

Außerdem sollte der Argininfinger Mechanismus der stimulierten GTPase untersucht werden. Unter Verwendung des $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ war die durch die Ribosomen stimulierte GTP-Hydrolyseaktivität von Arginin Mutanten von EF-Tu und Ribosomen mit einem mutierten L12 Protein zu untersuchen. Schließlich sollte die Aktivierung der GTP-Hydrolyse durch die Arginin Mutanten mittels der Fluoreszenzexperimente mit mant-dGTP untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarose-Gelkammer (Werkstatt, Universität Bayreuth); Analysewaage 1202 MP2 (Sartorius, Göttingen); Biofuge A (Heraeus, Osterode); Brutschrank B 50 (Memmert, Schwabach); Centrifuge 5414S (Eppendorf, Hamburg); Digital pH-Meter 643 (Knick, Berlin); DX17MV Sequential Stopped-Flow Spectrofluorimeter (Applied Photophysics, Leatherland, UK); Elektrophoreseapparaturen *Mighty-Small*-System aus Hoefer, San Francisco, USA und Pharmacia/LKB (Freiburg); Fluorescence-Spektrophotometer LS50B luminescence spectrometer (Perkin Elmer Cetus, Überlingen); Fraktionssammler LKB 2111 MultiRac und LKB 2070 UltraRac II (LKB-Produkte, Bromma, Schweden); Gerät zur Elektro-Elution Biotrap BT 1000 (Schleicher&Schuell, Dassel); HPLC System Gold (Beckman Coulter, Fullerton, USA); InstantImager 2024 (Packard, Meriden, USA); Kühlzentrifuge RC5B (Du Pont, Bad Homburg); Kühlzentrifuge Sorvall RC5B PLUS (Du Pont, Bad Homburg); LB- β -Detektor (Berthold, Bad Wildbad); Microfluidizer (Microfluidics, Newton, USA); Mass-Spektrometer LCT ESI-TOF-MS (Micromass, Manchester, UK); NMR-Spektrometer (Bruker, Billerica, USA); Parr-Bombe (Parr Instruments, Moline, USA); Peristaltische Pumpe LKB 2132 und MicroPerplex Pump; Semy-Dry-Blotting Einheit (Schleicher & Schüll, Dassel); Spannungsquelle EP C5 3000/150 (Pharmacia Biotech, Freiburg); Szintillationszähler LS 1801 (Beckman, München) und Tri-Carb 2900TR (Packard, Dreieich); *Thermocycler* (Perkin Elmer Cetus, Überlingen); Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg); Tischkühlzentrifugen Biofuge 13 R (Heraeus, Osterode) und MikroRapid/K (Hettich, Tuttlingen); Ultrazentrifugen OTB-65B (Du Pont, Bad Homburg) und TL-100 (Beckman, München), UV-Spektrophotometer Du 640 (Beckmann, München); UV-Durchflußdetektor LKB 2138 und Uvicord S Schreiber Potentiometer Recorder 2210 (LKB-Produkte, Bromma, Schweden); Wasserbad (Köttermann, Burgdorf).

2.1.2 Materialien

Cellulosefilter 3MM (Whatman, Maidstone, England), Nitrocellulosefilter 0,45 μm (Sartorius, Göttingen), Sterilfilter Porengröße 0,2 μm (Sartorius, Göttingen), Membranen - Amicon YM-10 und YM-30, Centricon-10 (Amicon, Beverly, USA), Visking Dialyseschläuche Ausschlussgrenze 14 kD (Serva, Heidelberg), Reaktionsgefäße : 0.5 ml (für PCR), 1.5 ml (Eppendorf, Köln).

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Proteine

2.1.3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien waren in Analysenqualität. ATP, GTP, GDP, dNTP, Poly(U), PMSF, BCIP, NBT waren von Boehringer (Mannheim) ; IPTG, Kanamycin, Antifoam, Hepes, Agarose, Guanidiniumhydrochlorid von Gerbu (Gailberg); Glycerin von Henkel (Düsseldorf); EDTA, Hepes, Mops, Rotiphorese 30 und 40 von Roth (Karlsruhe); Ampicilin, Xylenecyanol, DABP, MAAP, EDC von Sigma (München); TCEP, Coumarin- und Fluoreszein-Derivate von Molecular Probes (Leiden, Niederlande); Acrylamid, Bisacrylamid, Ethidiumbromid, Coomassie Brilliant Blue G-250 von Serva (Heidelberg). Alle anderen Chemikalien stammten von der Firma Merck (Darmstadt).

2.1.3.2 Enzyme, Proteine, Ribosomen und tRNAs

Rinderserumalbumin (BSA), alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, Lysosym, Restriktionsenzyme (Boehringer, Mannheim), DNase I, Nuclease P1 (Roche, Mannheim), Trypsin, T4-DNA-Ligase (Promega, Mannheim), *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen, Hiden), *T. thermophilus* EF-Ts, EF-Tu, EF-G, tRNA-Synthetasen aus *T. thermophilus* und *E.coli*, tRNAs aus *T.thermophilus* und *E.coli*, Nucleotidyltransferase aus *E. coli*, Ribosomen aus *T.thermophilus*. (Lehrstuhl Biochemie, Bayreuth), anti EF-Tu_{T.th.} und anti L10*L7/L12_{T.th.} polyklonale Antikörper (SeqLab, Göttingen), Protein Molekulargewichtsstandards (Pharmacia, Freiburg).

2.1.3.3 Kits

Gel Extraction Kit (Qiagen, Hiden)

FlexiPrep Plasmid Purification Kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

T4-DNA-Ligase Kit (Promega, Mannheim)

PCR Kit (Peqlab)

2.1.3.4 Radiochemikalien

[³H]GDP (~ 11 Ci/mmol), [³H]GTP (~ 10 Ci/mmol), [¹⁴C]-Aminosäuren (~ 400 Ci/mol) Amersham Buchler (Braunschweig), [^γ-³²P]GTP (~ 490 Ci/mmol) Hartman Analytic (Braunschweig), [¹⁴C]-Iodessigsäure (10 Ci/mol) Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden).

2.1.3.5 Chromatographie-Materialien

Q-Sepharose FF, Sephacryl S-200 HR, CM-Sepharose CL-6B, Q-Sepharose HP, Phenyl-Sepharose HP, DEAE Sephadex A-25, Sephadex G-25 (Pharmacia, Freiburg), Biogel P6 und P2 (Bio-Rad, München), BD-Cellulose, DEAE-Cellulose, HPLC Säulen: SP 250/10 Nucleosil 100-5 C18, ET 125/4.6 Nucleosil 4000-7 PEI, ET 250/4.6 Nucleosil 500-5 C18, EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel, Düren).

2.1.4 Plasmide

pKK233-3	Expressionsvektor mit <i>tac</i> -Promotor, Amp ^r (Brosius und Holy, 1944)
pET30a	Expressionsvektor mit T7-Promotor, Kan ^r (Novagen, Madison, USA)
pET30a-L12-RA	Expressionsvektor für L12-R80A
pQE-12	Expressionsvektor für die C-terminale 6xHis-tag Fusion, Amp ^r (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III) (Qiagen, Hiden)
pREP-4	Plasmid zur Überexpression des <i>lac</i> - Repressors, Kan ^r (Qiagen, Hiden)

pGEM-T	Klonierungsvektor, Amp ^r (Promega, Madison, USA)
pTu-T62A	pET30- <i>tufA</i> -T62A (<i>EcoRI/HindIII</i>)
pTu-C82A/L404C	pKK233-3- <i>tufA</i> -C82A/L404C (<i>EcoRI/HindIII</i>)
pTu-C82A/P357C	pKK233-3- <i>tufA</i> -C82A/P357C (<i>EcoRI/HindIII</i>)

2.1.5 Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide stammen von MWG-Biotech (Ebersberg.). Die fettgedruckten Nukleotide zeigen die Basenaustausche im *tufA*-Gen, die unterstrichenen Nukleotide die eingeführten *NdeI*- und *HindIII*-Schnittstellen und die im *tufA*-Gen vorhandene *PpuMI* und *StuI*- Schnittstellen, die in kursiv geschriebene Nukleotide das Start- und Stopcodon an.

pKKTu-uni	5' – <u>CAT</u> <i>ATG</i> GCG AAG GGC GAG TTT GTT CGG – 3'
pKKTu-rev	5' – <u>AAG CTT</u> <i>TCA</i> CTT CAG GAT CTT GGT G – 3'
pTuT62A-uni	5' – GCG GGG GAT TGC GAT CAA CAC GGC – 3'
pTuT62A-rev	5' – GCC GTG TTG ATC CGC AAT CCC CCG C – 3'
pKKTuL404C-rev	5' – <u>AAG CTT</u> <i>TCA</i> CTT GCA GAT CTT GGT G – 3'
pTuPpuMI-rev	5' – GGT TCA AAA <u>GGT CCC</u> GCA CCT CC – 3'
pTuStuI-uni	5' – GAA GTT TGA <u>GGC CTC</u> GGT GTA TGT G
pTuP357C-uni	5' – GCA GTT GCC TTG CGG CGT GGA GAT GG – 3'
pTuP357C-rev	5' – CTC CAC GCC GCA AGG CAA CTG CAC C – 3'

2.1.6 Bakterienstämme, Nährmedien und Lösungen

2.1.6.1 Bakterienstämme

Thermus thermophilus HB8 ATCC 27634

Escherichia coli:

DH10b F', *mcrA*Δ-(*mr hsdRMS-mcrBC*), φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*
, Δ(*ara*, *leu*)7696, *galU*, *galK*, λ', *rpsL*, *endA1*, *mupG* (Gibco BRL, Eggstein)

XL1-blue *supE44, hsdR17, endA1, gyrA96, relA1, thi-1, lac⁻, F⁻[proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15, Tn10]* (Stratagene, Heidelberg)

BL21(DE3)pLysSb *F⁻, dcm, ompT, hsdS(rB⁻, mB⁻), gal(DE3), [pLysSCamr]a* (Stratagene, Heidelberg)

D10 *F⁻, ileS, strC, trpA, galM, xyIU, mtlA, leuD, thiL, metA, purE, tonA, hisG, araD, argG, ponB⁺* (Braunschweig)

Der *E. coli* Stamm XL1-blue wurde für Klonierung und die Stämme DH10b und BL21 für Klonierung und Überexpression von *Thermus thermophilus* EF-Tu-Varianten verwendet. Der Stamm D10 diente zur Gewinnung von tRNA^{Phe}. Die Stämme wurden in LB-Medium mit 30% Glycerin (v/v) bei -20°C gelagert.

2.1.6.2 Nährmedien

LB (Luria-Bertani) Medium: 10 g Trypton/Pepton, 5 g Hefeextract, 5 g NaCl pro 1 Liter H₂O

Medien wurden bei 120°C und 1.2 bar Überdruck autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert. Feste Nährböden wurden durch Zusatz von 1.5% (w/v) Agar erhalten.

2.1.6.3 Lösungen

TAE-Puffer: 40 mM Tris (pH 8.0), 20 mM AcOH, 1 mM EDTA

TBE-Puffer: 89 mM Tris (pH 8.4), 89 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA

Laufpuffer für SDS-PAGE: 25 mM Tris/HCl (pH 8.0), 192 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS

Kathodenpuffer für

Schägger & von Jagow Gele: 0.1 M Tris (pH 8.25), 0.1 M Tricin, 0.1% (w/v) SDS

Anodenpuffer für

Schägger & von Jagow Gele: 0.2 M Tris/HCl (pH 8.9)

Probenpuffer für SDS-PAGE: 50 mM Tris (pH 8.3), 50 mM Bicin, 0.7 M β-ME, 2% (w/v) SDS

Laufpuffer für native PAGE: 25 mM Tris/AcOH (pH~7), 5 mM MgCl₂

- Probenpuffer für Agarose-Gele und native PAGE:** 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylenecyanol, 30% (v/v) Glycerin
- RNA-Probenpuffer:** 10 mM EDTA, 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylenecyanol, Formamid (HCHO)
- Coomassie-Lösung:** 30% (v/v) EtOH, 10% (v/v) AcOH, 0.4 % (w/v) Coomassie Brilliant blue in H₂O
- Enfärbelösung:** 30% (v/v) EtOH, 10% (v/v) AcOH in H₂O
- Toluidinblau-Lösung:** 0.05 % (w/v) Toluidinblau in H₂O
- PCR-Puffer 10 x:** 100 mM Tris/HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 1 % (w/v) Triton-X 100
- Tf-I-Puffer:** 30 mM AcOK/AcOH (pH 5.8), 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin
- Tf-II-Puffer:** 10 mM Mops/NaOH (pH 7.0), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin
- TBS-Puffer:** 20 mM Tris/HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl
- TBS-T:** 1 % Trockenmilch in 20 mM Tris/HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20
- AP-Puffer:** 100 mM Tris/HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂
- PBS-Puffer:** 50 mM Na Phosphat (pH 7.4), 100 mM NaCl
- Protein-Aufschlußpuffer:** 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1 mM β-ME, 100 μM PMSF, 5 % (v/v) Glycerin
- RNA-Aufschlußpuffer:** 50 mM AcONa/AcOH (pH 4.5), 10 mM MgCl₂
- Puffer A:** 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM β-ME, 20 μM GDP, 200 μM PMSF, 5 % (v/v) Glycerin
- Puffer B:** 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 500 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM β-ME, 20 μM GDP, 200 μM PMSF, 5 % (v/v) Glycerin
- Puffer C:** 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 2 M KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM β-ME, 20 μM GDP, 200 μM PMSF, 5 % (v/v) Glycerin
- Puffer D:** 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM β-ME, 20 μM GDP, 200 μM PMSF, 5 % (v/v) Glycerin
- Puffer L:** 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 1.5 M NH₄Cl, 1 mM β-ME
- Rib.mix:** 20 mM Mops/HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 50 mM NH₄Cl, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA
- Tu-Lagerpuffer:** 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM β-ME, 20 μM GDP, 5 % (v/v) Glycerin
- Tu_r-A-Puffer:** 10 mM NH₄H₂PO₄/H₃PO₄ (pH 5.65), 5 M Harnstoff

Tu_f-B-Puffer: 10 mM NH₄H₂PO₄/H₃PO₄ (pH 7.5), 5 M Harnstoff, 200 mM KCl

TCB-Puffer: 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5), 100 mM NH₄Cl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂

0.2 M AMS-Puffer : 50 mM Mops/NaOH (pH 7.0), 0.2 M (NH₄)₂SO₄

1 M AMS-Puffer: 50 mM Mops/NaOH (pH 7.0), 1 M (NH₄)₂SO₄

Aminoacylierung-Mix: 50 mM NaAsO₃/NaOH (pH 7.6), 50 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM ATP, (20-300 μM [¹⁴C] Phe (~25 Ci/mol))

2.2 Methoden

2.2.1 Absorptionsmessung

Spektralphotometrische Messungen wurden am UV-Spektrophotometer Du 640 durchgeführt. Die Bestimmung der Bakteriendichte durch Trübungsmessung erfolgte in Polystyrolküvetten bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Nährmedium als Referenz. Eine Absorptionseinheit (OD₆₀₀ =1) entspricht einer Zellzahl von 6*10⁸, wobei eine annähernd lineare Beziehung zwischen Zelldichte und OD₆₀₀ nur im Bereich von 0,1 bis 0,8 OD₆₀₀ besteht.

Die Absorptionsmessung von Proteinen und Nukleinsäuren erfolgte in 1ml bzw. 100 μl Quartzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die molaren Konzentrationen können aus den gemessenen Absorptionen mit Hilfe von Lambert-Beerschen Gesetzes ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$) bestimmt werden. Eine Absorptionseinheit (1 A₂₆₀) entspricht etwa 50 μg dsDNA, 40 μg ssDNA, 40 μg (1500 pmol) tRNA und 23 pmol Ribosomen.

Proteinkonzentrationen wurden nach (Ehresmann et al., 1973) bestimmt :

$$(A_{228} - A_{234.5}) / 3,14 = \text{Proteinkonzentration in mg / ml}$$

Für nukleotidfreien EF-Tu (EF-Tu_f) erfolgte die Proteinkonzentrationbestimmung nach (Whitaker and Granum, 1980):

$$(A_{235} - A_{280}) / 2,51 = \text{Proteinkonzentration in mg / ml}$$

2.2.2 Radioaktivitätsmessung

Alle Radioaktivitätsbestimmungen wurden in Rotiszint II, Toluol mit Triton X100, PPO und POPOP als Szintillatoren, mit einem Szintillationszähler vom Typ LS 1801 oder Tri-Carb 2900TR durchgeführt. Dabei wurden die Zerfälle pro Minute (cpm) detektiert.

2.2.3 Zentrifugationen

Standardzentrifugationen wurden je nach benötigter Temperatur und Probenvolumen mit folgenden Geräten durchgeführt:

Tischzentrifuge 5414S, bis 1.5 ml, RT

MikroRapid/K bis 13 ml, 4°C

Kühlzentrifuge Sorvall RC5B PLUS bis 400 ml, 4°C

OTB-65B bis 40 ml, 4°C

Ultrasenzentrifuge TL-100 bis 1.5 ml, 4°C

2.2.4 Elektrospraymassenspektrometrie

Die ESI-MS Messungen wurden auf einem LCT ESI-TOF-MS Massenspektrometer durchgeführt. Die Einstellungen waren (in der Regel) wie folgt : Kapillarenspannung 3200 V, *sample cone* Spannung 30-60 V, *extraction cone* Spannung 3-5 V, *RF-Lens* Spannung 200-300 V für organische Substrate und 600-800 V für Proteine. Die Temperatur des Desolvatisierungs-Gases wurde auf 150°C und der Quelle auf 120°C eingestellt. Sowohl für einen Direkteinlass als auch für HPLC-MS Läufe wurden ausschließlich flüchtige Puffer und Pufferzusätze (AcONH₄, MeOH, 0.1 % (v/v) HCOOH und 0.1 % (v/v) TFA in Wasser bzw. Acetonitril) benutzt.

2.2.5 Gelelektrophoretische Verfahren

2.2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Trennung von DNA erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese. Es wurden je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente Gele von 0.7-1.5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer mit 0.03 % (w/v) Ethidiumbromid verwendet.

Die DNA wurde mit 1/5 Volumen Probenpuffer vermischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 45-60 min bei 100 V in Agarose-Gelkammer. Als Standard diente 1kB DNA Marker. Die Detektion der DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator durch Anregung der Fluoreszenz von in die DNA interkaliertem Ethidiumbromid durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm.

2.2.5.2 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von tRNA wurde mit vertikaler Harnstoff-PAGE, unter Verwendung einer Elektrophoreseapparatur der Firma Pharmacia/LKB (Freiburg) durchgeführt. Die Gellösungen bestanden aus 15 % bzw. 10 % Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid = 19 : 1) und 7 M Harnstoff in TBE-Puffer. Die Polymerisation wurde durch 0.1 % (v/v) TEMED und 0.04% (w/v) APS gestartet. Zur gleichmäßigen Wärmeleitung wurde eine Aluminiumplatte an die Gelplatten angebracht. Nach einer Präelektrophorese (20-30 min) wurden die Proben mit RNA-Probenpuffer versetzt, für 1 min bei 95°C denaturiert und aufgetragen. Die Elektrophorese-Dauer wurde je nach der Gelgröße, angelegter Spannung und Acrylamidkonzentration gewählt (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1 : Elektrophoresebedingungen für Harnstoff-PAGE

Gelgröße	% Acrylamid	Spannung (V)	Dauer (h)
8x6x0.075	10-15	100-120	0.5-0.75
20x20x0.1	10-15	400	1-1.5
40x20x0.1	10-15	600-800	3-4
40x20x0.05	10-15	1000-1100	3

Fluoreszenz-markierte tRNA's wurden durch UV-Licht visualisiert. Eine Anfärbung der tRNA erfolgte mit „Stains-all“ für ca. 15 min im Dunkeln, die Entfärbung in H₂O bei Licht.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Elektrophoresen wurden im *Mighty-Small*-System nach Lämmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die Gele hatten die Dimensionen 80 x 60 x 0,75 mm. Das Verhältnis Trenngel zu Sammelgel betrug ca. 2:1.

Dabei bestand ein Trenngel aus: 12,5-15% (w/v) Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid = 19 : 1), 0.1% (w/v) SDS, 375 mM Tris/HCl, pH 8.8

und ein Sammelgel aus: 4 % Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid = 19 : 1), 0.1% (w/v) SDS, 125 mM Tris/HCl, pH 6.8).

Die Polymerisation wurde durch 0.05 % (v/v) TEMED und 0.05% (w/v) APS gestartet.

Zur Denaturierung wurden die Proteinproben (1-5 µg) mit minimal 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und 3-5 min bei 95°C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung

erfolgte je nach Acrylamidkonzentration für 1.5-2.5 h bei 100-150 V. Die Gele wurden anschließend für ca. 15 min in Coomassie-Lösung gefärbt und in Entfärbelösung entfärbt.

Die Auftrennung von L12 (~13.3 kDa) erfolgte in Gelen nach Schagger & von Jagow (Schagger and von Jagow, 1987) mit kleinen Modifikationen. Die Gele bestanden aus ~ 1/6 aus einem Sammelgel (4 % Acrylamid (19:1), 1 M Tris, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.45), aus ~ 1/6 aus einem Spacergel (11 % Acrylamid (19:1), 1 M Tris, 9 % (v/v) Glycerin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.45) und aus ~2/3 aus einem Trenngel (16.5 % Acrylamid (19:1), 1 M Tris, 9 % (v/v) Glycerin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.45). Als Kathodenpuffer wurde 0.1 M Tris, 0.1 M Tricin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.25 und als Anodenpuffer 0.2 M Tris, pH 8.9 benutzt. Die Elektrophorese erfolgte für 16-18 Stunden (20 x 20 x 0.1 cm Gel) oder für ca. 3 Stunden (8 x 6 x 0.075 cm Gel) bei 100 V. Die Anfärbung und Entfärbung erfolgte wie bei Laemmli-Gelen beschrieben.

2.2.5.4 Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Gelretardationsexperimente zum Nachweis der ternären Komplexe, EF-Tu*GTP*aa-tRNA wurden unter Verwendung nativer PAGE im *Mighty-Small-System* durchgeführt. Die Polymerisation der Gele (6 % Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid = 19 : 1) in Lauffpuffer : 25 mM Tris/AcOH, 5 mM MgCl₂, pH~7) wurde durch 0.05 % (v/v) TEMED und 0.05 % (w/v) APS gestartet. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 45 min bei 100 V. Die Proteinbanden wurden ca. 15 min in Coomassie-Lösung gefärbt, in Entfärbelösung entfärbt, danach die tRNA mit Toluidinblau-Lösung ca. 5 min gefärbt und anschließend in Wasser entfärbt.

2.2.6 Elution von tRNA aus Polyacrylamidgelen

Die tRNA-Banden wurden entweder durch „UV-Shadowing“ auf einer mit Cellulose- und Fluoreszenzindikator-beschichteten Platte oder aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung unter UV-Licht detektiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die Gelstücke wurden zerkleinert und für jeweils 4-6 Stunden in etwa 2 Volumina 0.3 M AcONa, pH 6.5 bei RT geschüttelt. Alternativ wurde die in 0.5 x TBE-Puffer aufgenommene

tRNA in einer Elektroelutions Apparatur Biotrap BT 1000 (Schleicher&Schuell, Dessel), aus den Gelstücken 1 Stunde eluiert. Die so erhaltene tRNA wurde durch Zugabe von EtOH gefällt (siehe Kapitel 2.2.7).

2.2.7 Phenolextraktion und Ethanolfällung von tRNA

Um Proteine und andere Verunreinigungen zu entfernen, wurden tRNA-Lösungen mit einem Volumen Phenol, gesättigt mit 50 mM AcONa (pH 4.5-5.0), intensiv durchmischt. Zur schnelleren Phasentrennung wurde kurz zentrifugiert und anschließend die obere wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang wurde wiederholt, bis kein weißer Niederschlag mehr zwischen den beiden Phasen zu sehen war. Anschließend wurde die Lösung mit Diethylether extrahiert. Zur Fällung der tRNA aus der wässrigen Phase wurde diese mit 1/10 Volumen 2 M AcONa (pH 4.5) und 2.5 Volumina EtOH versetzt. Für Fällung geringer tRNA-Mengen wurde Glykogen in einer Konzentration von 20 µg/ml als „carrier“ zugegeben. Die Lösungen wurden 1-2 Stunden bei -70°C oder 2-12 Stunden bei -20°C inkubiert und bei minimal 7000 g (Sigma 2MK Rotor ca. 9000 rpm, 13 ml PP-Becher) 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das tRNA Pellet wurde mit eiskaltem 70 % (v/v) EtOH gewaschen und 5 min zentrifugiert. Die gefällte tRNA wurde nach kurzem Trocknen je nach weiterer Anwendung in H₂O oder in Puffer gelöst.

2.2.8 Isolierung und Reinigung von DNA

2.2.8.1 Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde ausgehend von 1.5 ml Bakterienkultur der *Flexiprep-Kit* nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei werden Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die plasmidale DNA in Gegenwart von einem chaotropen Salz an eine Glasoberfläche gebunden. Nach mehreren Waschschrinen wird die Plasmid-DNA eluiert und kann direkt zur Restriktionsanalyse bzw. zur Sequenzierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.8.2 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Um ein bestimmtes DNA-Fragment aus einem Gemisch von Fragmenten, z.B. nach Restriktionsendonuklease-Behandlung oder PCR, zu isolieren, wurde die DNA durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Die DNA wurde mittels des *QIAEX II Agarose Gel-extraction-Kit* aus dem Gel extrahiert. Dabei wird die Agarose in Gegenwart von einem chaotropen Salz solubilisiert und die DNA an eine Glas-Matrix gebunden. Nach mehreren Waschschritten wird die Plasmid-DNA eluiert und kann direkt zur Ligation eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.9 Enzymatische Behandlung von DNA

2.2.9.1 Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. In der Regel wurden $0,5\ \mu\text{g}$ DNA mit 1 U Enzym 60-120 min bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.

2.2.9.2 Ligation

Der Einbau von DNA-Fragmenten in einen Vektor erfolgte durch Ligation mit der T4-DNA-Ligase. Für die Reaktion wurden in einem Volumen von $10\ \mu\text{l}$ $50\ \text{ng}$ linearisierte Vektor-DNA mit $200\ \text{ng}$ zu ligierendem DNA-Fragment und 1 U T4-DNA-Ligase in 1 x Ligationspuffer 16 h bei 17°C bzw. bei 4°C inkubiert.

2.2.10 Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde im *Thermocycler* durchgeführt. In einem Volumen von $100\ \mu\text{l}$ wurden $1,5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $500\ \mu\text{M}$ dNTP, je $1\ \mu\text{M}$ Primer, 2,5 U Taq-DNA-Polymerase und 5 nM Plasmid-DNA als Matrize in PCR-Puffer eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach einer Inkubation von 10 min bei 95°C zur anfänglichen Denaturierung der Matrize in 25 Zyklen

von je 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Annealing bei unterschiedlicher Temperatur, je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Primer und gewünschter Spezifität (in der Regel 55°C) und 30 s Polymerisation bei 72 °C. Zur Vervollständigung der PCR-Produkte, wurde am Ende nochmals 5 min bei 72 °C inkubiert. Ein Aliquot von 5 µl wurde durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.11 Sequenzspezifische Mutagenese mit PCR

Die PCR-Mutagenese wurde nach (Higuchi et al., 1988) durchgeführt. Es wurden vier Primer benötigt: zwei das zu mutierende Gen flankierende Außen-Primer, sowie zwei das mutierte Codon tragende Innen-Primer, die an der gleichen Stelle um das zu mutierende Codon herum an jeweils einen Strang der Matrizen-DNA hybridisierten. In der ersten PCR-Runde wurde die DNA in zwei getrennten Ansätzen jeweils von den Außen- bis zu den Innen-Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und im Verhältnis 1 : 1 in die zweite PCR-Runde eingesetzt. Die Hybridisierung der beiden Fragmente erfolgte über die beiden komplementären Enden (entsprechend den Sequenzen der Innen-Primer). Das vollständige Fragment konnte schließlich mit den beiden Außen-Primern erhalten und amplifiziert werden. Das erhaltene mutierte Genfragment wurde mit Restriktionsendonukleasen behandelt, über Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und kloniert. Das durch PCR-amplifizierte Fragment wurde komplett bei MWG-Biotech sequenziert.

2.2.12 DNA-Übertragung

2.2.12.1 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen wurden nach der Mehr-Ionen-Technik hergestellt (Hanahan, 1983). Hierzu wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml Bakterienkultur inokuliert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4 wurden die Zellen sofort 2 min auf Eis gekühlt und anschließend durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden in 30 ml eiskaltem Tff-Puffer resuspendiert und 30 – 60 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml TffII-Puffer aufgenommen und mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Je 100 µl Aliquots der Kultur

wurden in flüssigem Stickstoff oder im i-PrOH/Trockeneis schockgefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.12.2 Transformation von *E. coli*

Je $100\text{ }\mu\text{l}$ der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit $1\text{ }\mu\text{l}$ Plasmid-DNA oder einem kompletten Ligationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzebehandlung für 45 s bis 2 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen 45-60 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

2.2.13 Immunodetektion und Sequenzierung von Proteinen

2.2.13.1 Proteintransfer auf PDVF- oder Nitrocellulose-Membranen

Der Transfer von Proteinen aus ungefärbten SDS-PAGE Gelen auf PDVF- oder Nitrocellulose-Membranen (NC-Membranen) im elektrischen Feld erfolgte unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems in einer Semy-Dry-Blotting Einheit. Für den Transfer wurden 6 Bögen Filterpapier (Whatman 17Chr) im angegebenen Puffer getränkt und zusammen mit dem Gel und der PDVF-Membran in folgender Reihenfolge auf die Anode der Blotteinheit gestapelt:

1 Filter in Anodenpuffer II (25 mM Tris/HCl, pH 10,4, 20 % (v/v) Methanol)

2 Filter in Anodenpuffer I (300 mM Tris/HCl, pH 10,4, 20 % (v/v) Methanol)

PVDF-Membran

Gel

3 Filter in Kathodenpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 9,4, 40 mM ϵ -Aminocapronsäure)

Alternativ wurden alle Filter und das Gel in TGM-Puffer (25 mM Tris, 200 mM Glycine, 20 % MeOH) gewaschen. Dann wurde für 60-120 min Strom mit einer Stromstärke von $0.8\text{-}1.2\text{ A/cm}^2$ Gelfläche angelegt. Die Membran wurde anschließend getrocknet und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.13.2 Immunodetektion

Für die Immunodetektion von EF-Tu und L10/L12 aus *T. thermophilus* wurden polyklonale Antikörper aus Kaninchen gegen jedes dieser Proteine erzeugt (Seqlab, Göttingen). Als sekundärer Antikörper diente ein anti-Kaninchen Antikörper aus Mensch, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zuerst in einer Lösung von 3 % Trockenmilch in TBS-Puffer (Blocking solution) 60 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran 60 min mit einer 1:5000 Verdünnung des primären Antikörpers in einer Lösung von 1 % Trockenmilch in TBS-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in TBS-T, kurzem Waschen mit Wasser wurde 40 min mit einer 1:5000 Verdünnung des sekundären Antikörpers in einer Lösung von 1 % Trockenmilch in TBS-Puffer inkubiert. Anschließend wurde 2 x 5 min in TBS-T, 1 x 5 min in TBS-Puffer und kurz im Wasser gewaschen. Die Detektion erfolgte über die Spaltung von BCIP (ca. 80 µg/ml) durch das alkalische Phosphatase Konjugat und anschließende Oxidation des Spaltproduktes mit NBT (ca. 165 µg/ml) in AP-Puffer. Hierbei wurde entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen.

2.2.13.3 Proteinsequenzierung

Auf PDVF-Membran transferiertes Protein wurde zur Auftrags-Sequenzierung verschickt (Seqlab, Göttingen; WITA GmbH, Berlin). Zuvor wurden die Proteine durch Behandlung der Membran mit 0,2% (w/v) Ponceau-S in Methanol:Essigsäure:Wasser 25:10:65 (v/v/v) gefärbt und der Hintergrund anschließend mit Wasser entfärbt.

2.2.14 Überproduktion von *T. thermophilus* Proteinen in *E. coli*

2.2.14.1 Zellanzucht und Fermentation

Bakterienkulturen wurden in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert (Sambrook et al., 1989). Hierzu wurde 5 – 250 ml Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Fermentation zur Überproduktion von

T. thermophilus Proteinen erfolgte bei 37 °C in 10 l Fermentiergefäßen, die mit 500 ml einer Über-Nacht-Kultur inokuliert wurden. Zur Vermeidung von Schaumbildung wurde 1 ml Antifoam zugegeben. Bei einer A_{600} von ca. 0,8 wurden die Zellen mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden 4 h nach Induktion durch Zentrifugation (10 min, 6000 g, 4 °C) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.14.2 Analytischer Zellaufschluß

Um die Überexpression von Proteinen zu überprüfen, wurde ein Zellaufschluß nach Leberman durchgeführt (Leberman et al., 1980). Dazu wurden die Zellen aus 1 ml der Bakterienkultur pelletiert und in 250 µl Aufschlußpuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozym-Lösung (20 mg/ml in Aufschlußpuffer) und 10 µl Natriumdesoxycholat-Lösung (125 mg/ml in Aufschlußpuffer) wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 9 µl 1 M $MgCl_2$ und 2 µl DNaseI-Lösung (10 mg/ml in Aufschlußpuffer) zugegeben. Durch Zentrifugation wurden unlösliche Zellbestandteile abgetrennt. Um den Anteil an thermostabilem Protein zu bestimmen, wurde ein Teil des Ansatzes 15 min bei 55-70 °C inkubiert und denaturiertes Protein durch Zentrifugation abgetrennt. 10 µl des Ansatzes wurden durch SDS-PAGE analysiert.

2.2.14.3 Zellaufschluß im präparativen Maßstab

60 g gefrorene Zellen wurden in 120 ml Aufschlußpuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 40 mg Lysozym wurde 30 min auf Eis gerührt. Nach Zugabe von 5 mg DNaseI wurde die Magnesium Konzentration auf 30 mM eingestellt und weitere 60 min unter Rühren auf Eis inkubiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Stickstoffdekompression in einer Parr-Bombe. Die Zellsuspension wurde darin für 30 min Stickstoff mit einem Druck von 150 bar ausgesetzt. Das durch anschließende Dekompression gewonnene Homogenat wurde zur Entfernung von Zelltrümmern 30 min bei 4 °C und 20000 g (GS3-Rotor, 11000 rpm) zentrifugiert, der S30-Überstand abgenommen und zur Präparation eines S100 Überstandes 4 h bei 110000 g und 4 °C (A641-Rotor, 40000 rpm) zentrifugiert.

Alternativ zu dieser Methode erfolgte der Aufschluß der resuspendierten Zellen ohne Zugabe von Lysozym oder DNaseI in einem Microfluidizer.

2.2.15 Isolierung von EF-Tu aus *T. thermophilus*.

Die Präparation von überproduziertem *T. thermophilus* EF-Tu aus *E.coli* erfolgte mit einigen Veränderungen wie beschrieben (Limmer et al., 1992). Fraktionen der Chromatographien wurden mittels SDS-PAGE und GDP-Bindungstest getestet. Ammoniumsulfat-Fällungen wurden auf Eis mit 70 % (w/v) Sättigung (472 g/l) durchgeführt. Die Chromatographien und Dialysen wurden bei 4°C durchgeführt.

2.2.15.1 Anionenaustauschchromatographie und Hitzedenaturierung

Der Ribosomen-freie S100-Überstand wurde mit zu 70% gesättigtem Ammoniumsulfat gefällt und zentrifugiert (GS3-Rotor, 7.500 rpm, 4°C, 20 min). Die präzipitierten Proteine wurden anschließend in Puffer A gelöst und gegen Puffer A dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte Q-Sepharose FF Säule (50 x 5 cm, 2 ml/min) aufgetragen und mit Puffer A gewaschen, bis die Absorption wieder den Ausgangswert erreichte. Die gebundenen Proteine wurden mit einem Gradient linear ansteigender KCl Konzentration von je 2 l Puffer A und B eluiert. Das Vorhandensein von EF-Tu in den Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5.3) und GDP-Bindungstest kontrolliert (Kapitel 2.2.19). EF-Tu-haltige Fraktionen wurden vereinigt, 15 min bei 65°C hitzegefällt und zur vollständigen Fällung denaturierter Proteine weitere 15-30 min auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation (GSA-Rotor, 10000 rpm, 4°C, 15 min) wurde der Überstand mit 70 % Ammoniumsulfat gefällt.

2.2.15.2 Gelpermeationschromatographie

Die gefällten Proteine wurden in einem minimalen Volumen Puffer D gelöst und auf eine mit Puffer D äquilibrierte Sephacryl S200-HR Säule (100 x 5 cm, 1.5 ml/min) aufgetragen. Das Vorhandensein von EF-Tu in den Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5.3) und GDP-Bindungstest kontrolliert (Kapitel 2.2.19). EF-Tu-haltige Fraktionen wurden vereinigt und mit 70 % Ammoniumsulfat gefällt. Nach Zentrifugation (GSA-Rotor, 10000 rpm, 4°C, 15 min) wurde der EF-Tu in zweifach-konzentriertem Lagerpuffer ohne Glycerin gelöst und gegen diesen dialysiert. Anschließend wurde ein

Volumen Glycerin (50 % (v/v) Endkonzentration) zugegeben und die Lösung bei -20°C gelagert.

2.2.16 Präparation von Mg^{2+} - und nukleotidfreiem EF-Tu

Die Präparation erfolgte bei 4°C . Bei der Präparation von EF-Tu_{fM} enthielten die Puffer zusätzlich noch 10 mM EDTA. EF-Tu*GDP wurde mit 5-10 Volumina Tu_f-A-Puffer verdünnt und der pH-Wert mit verdünnter H_3PO_3 auf 5.65 eingestellt. Die Lösung wurde auf eine mit Tu_f-A-Puffer äquilibrierte CM-Sepharose CL-6B Säule (5 x 1 cm, 1ml/min) aufgetragen und mit Tu_f-A-Puffer gewaschen, bis die Absorption wieder den Ausgangswert erreichte. EF-Tu_{fM} und EF-Tu_f wurde mit Tu_f-B-Puffer eluiert.

Durch Dialyse gegen TCB-Puffer wurde der Harnstoff entfernt und das Protein renaturiert. Anschließend wurde die Proteinlösung durch Ultrafiltration mit Amicon YM-10 oder YM-30 Membran auf die gewünschte Konzentration konzentriert, mit einem Volumen Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

Alternativ zu der Kationenaustauscherchromatographie wurde der EF-Tu durch eine Gelpermeationschromatographie an BioGel P6 (9 x 1.5 cm, 0.6-0.8 ml/min) in Tu_f-B-Puffer vom Nukleotid befreit.

2.2.17 Isolierung von EF-Tu C82A/L404C und C82A/P357C Varianten

Die Aufreinigung erfolgte wie in Kapitel 2.2.15 beschrieben, mit der Ausnahme, dass die β -ME Konzentration in allen Puffern statt 10 mM beträgt.

2.2.18 Isolierung von *T. thermophilus* L12-R80A

Die L12-Mutante wurde in BL21(DE3)pLysS Zellen, die das Plasmid pET-30a-L12-RA (Yiwei Huang, Dissertation 2001) trugen, in der Gegenwart von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin wie in dem Kapitel 2.2.14 beschrieben überproduziert und ein S100-Überstand hergestellt.

Die Reinigung erfolgte wie in der Dissertation von Yiwei Huang (LS Biochemie I, Universität Bayreuth, 2001) beschrieben. Alle Chromatographien und Dialysen erfolgten bei 4°C.

200 ml von dem ribosomenfreien S100 wurden dreimal gegen 5 Liter 50 mM AcONH₄ (pH 5.5), 1 mM β-ME, 5 % (v/v) Glycerin dialysiert und das Präzipitat durch eine Zentrifugation (SLA1500, 13 000 rpm, 30 min, 4°C) entfernt. Der Überstand, ca. 170 ml, wurde mit 75 % Ammoniumsulfat gefällt und wieder zentrifugiert (SLA1500, 13 000 rpm, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde in 50 ml 50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM β-ME, 20 μM PMSF, 5 % (v/v) Glycerin gelöst und gegen 1.5 Liter desselben Puffer dialysiert. Die nicht termostabilen *E.coli* Proteine wurden anschließend durch Hitzedenaturierung bei 70°C und 30 min präzipitiert und durch Zentrifugation pelletiert (SLA1500, 13 000 rpm, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde zweimal gegen 1.5 Liter 50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM β-ME, 20 μM PMSF, 5 % (v/v) Glycerin dialysiert und auf eine, in dem gleichen Puffer äquilibrierte, DEAE-Cellulose Säule (2 x 15 cm, 1.8 ml/min) aufgetragen. Die Säule wurde mit 0.4 Liter Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradient von 0 bis 400 mM NH₄Cl (2 x 250 ml) gewaschen. Das Vorhandensein von L12 (wandert bei ca. 15-16 kDa in Shaegger & von Jagow Gelen) in den Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5.3) kontrolliert. L12 -haltige Fraktionen wurden vereinigt, die Proteine mit 75 % Ammoniumsulfat gefällt und durch Zentrifugation (SLA1500, 13 000 rpm, 30 min, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in 1-2 ml 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM KCl, 1 mM β-ME, 20 μM PMSF, 5 % (v/v) Glycerin gelöst und dreimal gegen 1 Liter desselben Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine, mit gleichem Puffer äquilibrierte, Sephacryl S-200 Gelpermeationssäule (2 x 50 ml, 0.4 ml /min) aufgetragen. L12 -haltige Fraktionen wurden vereinigt, das Protein mit 75 % Ammoniumsulfat gefällt und durch Zentrifugation (SLA1500, 13 000 rpm, 30 min, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in 1.5 ml 20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM β-ME, 50 % (v/v) Glycerin gelöst, dreimal gegen 0.6 Liter desselben Puffers dialysiert und bei -20°C gelagert.

2.2.19 GDP-Bindungstests

2.2.19.1 Nitrocellulose-Filterbindungstest zur Bestimmung der spezifischen Aktivität

Die spezifische Aktivität entspricht der GDP-Austauschaktivität des EF-Tu nach 10 min bei 37°C. Zu deren Bestimmung wurde der Austausch von proteingebundenem GDP gegen freies [³H]GDP mittels Nitrocellulose-Filterbindungstest wie beschrieben (Arai et al., 1978a) bestimmt. Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 µl : 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 1 mM β-ME, 0.1 mg/ml BSA und 5 µM [³H]GDP (100 Ci/mol). Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C inkubiert, durch Zugabe von 1 µM EF-Tu*GDP gestartet und nach 10 min mit 1 ml kaltem Waschpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM NH₄Cl) gestoppt. Die Lösung wurde sofort unter leichtem Wasserstrahlvakuum auf einen Nitrocellulosefilter aufgetragen, abgesaugt und der Filter mit 2 ml kaltem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Filter unter einer Infrarotlampe getrocknet. Die filtergebundene Radioaktivität wurde unter Verwendung von Szintillationscocktail im Szintillationszähler LS 1801 bzw. Tri-Carb 2900TR detektiert.

2.2.19.2 Assoziationskinetik von EF-Tu und GDP

Die Bestimmung der Assoziationskinetik erfolgte bei 0°C mit geringfügigen Modifikationen nach der von (Arai et al., 1974) beschriebenen Methode. Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml TCB-Puffer 10 nM EF-Tu und die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 nM [³H] GDP (11.3 Ci/mmol) gestartet. Anschließend wurde ein 100 µl Aliquot zu verschiedenen Zeiten auf Nitrocellulose-Filter pipettiert. Die proteingebundene Radioaktivität wurde durch Nitrocellulose-Filterbindungstests bestimmt (Kapitel 2.2.19.1).

2.2.19.3 Dissoziationskinetik von GDP aus EF-Tu*GDP

Die Bestimmung der Assoziationskinetik erfolgte bei 0°C in Anlehnung an die von (Arai et al., 1974) publizierte Methode. Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml TCB-Puffer 10 nM EF-Tu, 40 nM [³H] GDP (11.3 Ci/mmol) und wurde jeweils nach

10 min Inkubation bei RT und 0°C durch Zugabe von 200 μM „kaltem“ GDP gestartet. Anschließend wurden je 100 μl Aliquots in entsprechenden Zeitpunkten auf Nitrocellulose-Filter pipettiert. Die proteingebundene Radioaktivität wurde durch Nitrocellulose-Filterbindungstests bestimmt (Kapitel 2.2.19.1).

2.2.19.4 GDP-Austausch in Gegenwart von EF-Ts

Die Bestimmung der GDP-Austauschaktivität von EF-Tu in Anwesenheit von EF-Ts erfolgte mit dem Nitrocellulose-Filterbindungstest (Kapitel 2.2.19.1). Es wurden 1 μM EF-Tu*GDP und 0.1 μM EF-Ts in einem Gesamtvolumen von 300 μl verwendet, wovon zu entsprechenden Zeitpunkten je 50 μl entnommen und wie in Kapitel 2.2.19.1 behandelt wurden.

2.2.19.5 Bestimmung der Dissoziationskonstanten von EF-Tu und Nukleotid

Die Dissoziationskonstanten von EF-Tu und Nukleotid wurden mittels Nitrocellulose-Filterbindungstests ermittelt. Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 175 μl TCB-Puffer 50 nM EF-Tu_f, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, 10-1000 nM, [³H]GDP (2.2 Ci/mmol) und bei Konkurrenzexperimenten mit GTP-Analoga zusätzlich 1 μM DABP-GppNHp bzw. 1 μM MAAP-GTP. Die Ansätze wurden 15 min auf Eis inkubiert, zu verschiedenen Zeitpunkten 50 μl entnommen und wie in Kapitel 2.2.19.1 behandelt.

2.2.20 Isolierung des ternären Komplexes

2.2.20.1 Isolierung des ternären Komplexes mit „kaltem“ GTP

Der ternäre Komplex wurde im homologen *T. thermophilus* System mit den folgenden Komponenten in einem Gesamtvolumen von 100 μl gebildet: 38 μM tRNA^{Phe}, 300 μM L-Phe, 1-4 mM ATP, 1 mM CTP, ~ 5 U Ntase_{E.c.} wurden zuerst 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend 3 μM EF-Ts, 40 μM EF-Tu, ~ 2 U FRS_{T.th.}, 1 mM GppNHp bzw. GTP zugegeben. Nach 15 min bei 56°C wurden die Proben mindestens 5 min auf Eis gekühlt. Die

Isolierung des ternären Komplexes erfolgte bei 0°C. Die Proben wurden dazu auf ca. 0.3 ml Q-Sepharose (in einer 1 ml Pipettenspitze gefüllt und mit 0.2 M AMS-Puffer äquilibriert) aufgetragen, mit 2 x 2.5 ml 0.2 M AMS-Puffer gewaschen und mit 2.5 ml 1 M AMS-Puffer eluiert. Das Eluat wurde direkt auf ca. 0.3 ml Phenyl-Sepharose (in einer 1 ml Pipettenspitze gefüllt und mit 1 M AMS-Puffer äquilibriert) aufgetragen, mit 2 x 2.5 ml 1 M AMS-Puffer gewaschen und mit 2.5 ml CB-Puffer eluiert. Anschließend wurde das Eluat in Centricon YM-30 durch Ultrafiltration konzentriert (5000 g, 4°C), in i-PrOH/Trockeneis schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.2.20.2 Isolierung des ternären Komplexes mit radiaktivem [γ -³²P] GTP

Für die Ribosomen-stimulierte GTPase wurden in einem Gesamtvolumen von 75-100 μ l 10-30 μ M EF-Tu_f, 20-40 μ M aa-tRNA und 20-50 μ M [γ -³²P] GTP (0.5-10 Ci/mmol) im Rib.mix 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die Isolierung erfolgte auf Eis. Wie unter 2.2.20.1 beschrieben wurden die Proben mit 0.2 M AMS-Puffer auf 0.5 ml verdünnt, auf 0.1 ml Q-Sepharose aufgetragen, mit 0.8 ml 0.2 M AMS-Puffer gewaschen und mit 2 x 0.4 ml 1 M AMS-Puffer eluiert. Das Eluat wurde direkt auf 0.1 ml Phenyl-Sepharose aufgetragen, mit 0.6 ml 1 M AMS-Puffer nachgewaschen und mit 0.5 ml Rib.mix eluiert. Anschließend wurde der ternäre Komplex im Eluat durch Ultrafiltration in Amicon YM-10 auf 0.5-4 μ M konzentriert (5000 g, 4°C). Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 μ l des Konzentrats auf einen Cellulosefilter pipettiert und mit [γ -³²P] GTP-Referenz bekannter Konzentration (30 nM) verglichen. Die Proben wurden entweder direkt zur Messung benutzt oder in iPrOH/Trockeneis schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.2.21 Bestimmung der GTPase-Aktivität von EF-Tu

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurden die Daten der folgenden Formel unter Minimierung des mittleren quadratischen Fehlers (lineare Regression) angepasst :

$$c(t) = c_0 + (c_\infty - c_0) \cdot (1 - e^{-k \cdot t})$$

mit $c(t)$: GTP-Konzentration, c_0 : Anfangswert, c_∞ : Endwert.

2.2.21.1 *Intrinsische GTPase*

Die Bestimmung der intrinsischen GTPase-Aktivität von EF-Tu unter *single-turnover* Bedingungen erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μl mit 11 μM EF-Tu_f und 10 μM [γ -³²P] GTP (0.5 Ci/mmol) in TCB-Puffer bei 37°C oder 65°C. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde 1.5 μl des Ansatzes entnommen und in 4 μl eiskalter Ameisensäure abgestoppt. Zur Auftrennung von [γ -³²P] und [γ -³²P] GTP wurden die Proben auf PEI-Cellulose Dünnschichtchromatographie-Folien (10 cm) aufgetragen und in 1 M Ameisensäure, 0.8 M LiCl entwickelt. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit einem InstantImager 2024 gemessen.

2.2.21.2 *Ribosomen-stimulierte GTPase*

Zur Bestimmung der Ribosomen-stimulierten GTPase wurden zuerst 3 μM 70S Ribosomen mit 0.4 A₂₆₀/ml Poly(U) und 3.3 μM *T.th.* tRNA^{Phe} in Rib.mix 15 min bei 37°C inkubiert. Die ternären Komplexe (TC) wurden wie unter 2.2.20.2 beschrieben vorbereitet und vor dem Experiment mit Rib.mix auf 0.225 μM verdünnt. Die Reaktion wurde durch eine Zugabe von 20 μl 0.225 μM TC zu 10 μl der 3 μM 70S Lösung gestartet (0.15 μM TC und 1 μM 70S Endkonzentrationen). Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde 2 μl des Ansatzes entnommen, in 4 μl eiskalter Ameisensäure abgestoppt und wie unter 2.2.21.1 beschrieben weiter verfahren.

2.2.22 *Kinetik der in vitro Translation*

Die poly(U)-abhängige poly(Phe)-Synthese erfolgte im homologen *in vitro* Translationssystem aus *T.thermophilus* (Ohno-Iwashita et al., 1975). Der Translationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 100 μl enthielt 20 mM Mops/KOH (pH 7.5), 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 3 mM Spermin, 3 mM ATP, 0.4 mM GTP, 1 μM EF-Tu, 0.1 μM EF-Ts, 0.16 μM EF-G, 0.3 U FRS, 50 μg poly(U), 0.1 μM 70S-Ribosomen, 1 μM tRNA^{Phe} und 2 μM [¹⁴C] Phe (395 Ci/mol). Die Ribosomen, poly(U) und tRNA^{Phe} wurden 15 min auf Eis vorinkubiert. Die restlichen Komponenten wurden separat 30 s bei 65°C inkubiert und die Reaktion bei 65°C durch die Zugabe der Ribosomen

enthaltenden Lösung gestartet. Zu den entsprechenden Zeiten wurden 15 μ l entnommen, auf Cellulosefilter 3 MM übertragen und die Translation in kalter 10 % (v/v) TCA gestoppt. Nach 20 min wurden alle Filter 15 min bei 100°C in 10 % TCA gekocht, anschließend zweimal 7 min in 10 % TCA und einmal 7 min in EtOH gewaschen. Die präzipitierte filtergebundene Radioaktivität wurde im Flüssig-Szintillationszähler LS 1801 bzw. Tri-Carb 2900TR bestimmt.

2.2.23 Aufreinigung von tRNA^{Phe} aus *E. coli*

E. coli tRNA^{Phe} wurde aus *E. coli* D10-Zellen präpariert. Die Ethanol-fällungen wurden wie in dem Kapitel 2.2.7 beschrieben durchgeführt. Die Zentrifugationen wurden in einem SLA 3000 Rotor 15 min bei 7000 rpm und wenn nicht anders angegeben bei 4°C durchgeführt. Alle Chromatographien erfolgten bei RT. Das Testen der Pools und der chromatographischen Fraktionen wurde wie in Kapiteln 2.2.24.2 und 2.2.24.3 beschrieben durchgeführt.

2.2.23.1 Präparation von tRNA_{bulk} aus *E. coli* D10-Zellen

Es wurden 456 g *E. coli* D10-Zellen übernacht bei 4°C aufgetaut und in 0.5 l RNA-Aufschlusspuffer suspendiert. Dann wurden ca. 0.7 l von RNA-Aufschlusspuffer-gepuffertem Phenol zugegeben und für 1 Stunde bei RT im Abzug gerührt (RPG-Rührer). Die Phasen wurden durch eine Zentrifugation bei RT getrennt, die wässrige mit 0.6 l Chloroform versetzt und weitere 20-30 min bei RT gerührt. Die Phasen wurden durch eine Zentrifugation bei RT getrennt und die wässrige Phase auf DEAE-Cellulose aufgetragen.

2.2.23.2 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Die wässrige Phase aus der Chloroform-Extraktion wurde auf eine mit Puffer I (140 mM AcONa, 10 mM MgCl₂, pH 4.5) äquilibrierte DEAE-Cellulose Säule (4 x 20 cm, 5-6 ml / min) aufgetragen und stufenweise mit Puffer I und 0.2 M, 0.3 M, 0.65 M und 2 M NaCl in

Puffer I gewaschen. Die Pools wurden mit EtOH gefällt und in Wasser gelöst. Der Pool mit der meisten tRNA^{Phe} (Kapitel 2.2.24.3) wurde an einer BD-Cellulose chromatographiert.

2.2.23.3 Chromatographie an BD-Cellulose

Der tRNA-Pool aus der DEAE-Cellulose wurde auf eine mit BD-Puffer (20 mM AcONa, 10 mM MgCl₂, 2 % (v/v) DMF, pH 5.2) äquilibrierte BD-Cellulose Säule (5 x 40 cm) aufgetragen und stufenweise mit BD-Puffer, 0.2 M und 0.4 M NaCl in BD-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde ein linear ansteigender NaCl-Gradient von 0.4-1 M NaCl (2 x 2 l, 2-3 ml / min) eingesetzt und anschließend die tRNA mit 1 M NaCl, 1 M NaCl + 10 % (v/v) EtOH und 2 M NaCl + 20 % (v/v) EtOH eluiert. Der Pool mit der meisten tRNA^{Phe} (Kapitel 2.2.24.3) wurde an einer Sepharose CL-6B weiter gereinigt.

2.2.23.4 Aussalzchromatographie bei pH 4.5

Der tRNA^{Phe}-Pool aus der BD-Cellulose wurde gegen Puffer II (50 mM AcONa, 10 mM MgCl₂, 2 M Ammoniumsulfat, pH 4.5) bei 4°C dialysiert und mit Puffer II ohne Ammoniumsulfat zu einer opalleszehnten Lösung verdünnt. Diese wurde auf eine in Puffer II äquilibrierte Sepharose CL-6B Säule (2.5 x 29 cm, 2-3 ml / min) aufgetragen. Die tRNA wurde mit einem linearen Gradient von 2 M bis 0 M Ammoniumsulfat (2 x 2 l) in Puffer II eluiert. Die Fraktionen wurden getestet (Kapitel 2.2.24.3) und die tRNA^{Phe}-enthaltenden Fraktionen mit Ethanol gefällt und durch eine zweite Aussalzchromatographie weiter gereinigt.

2.2.23.5 Aussalzchromatographie bei pH 7.5

Der tRNA^{Phe}-Pool aus der ersten Aussalzchromatographie wurde mit Puffer III auf ca. 2 M Ammoniumsulfat eingestellt und die opalleszehnte Lösung auf eine in Puffer IV (50 mM AcONa, 10 mM MgCl₂, 2 M Ammoniumsulfat, pH 7.5) äquilibrierte Sepharose CL-6B Säule (2.5 x 29 cm, 2-3 ml / min) aufgetragen. Die tRNA wurde mit einem linearen Gradient von 2 M bis 0 M Ammoniumsulfat (2 x 2 l) in Puffer IV eluiert. Die Fraktionen wurden getestet

(Kapitel 2.2.24.3) und tRNA^{Phe}-enthaltenden Fraktionen vereinigt und intensiv gegen 1 mM AcONa (pH 5.0) dialysiert, im Vakuum ankonzentriert, schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.2.24 Aminoacylierung von tRNA

2.2.24.1 Präparative Aminoacylierung von tRNA

Die Aminoacylierung erfolgte für 12-15 min bei 37°C für *E. coli* und bei 56°C für *T. thermophilus* tRNAs in Aminoacylierung-Mix. Der Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml 200 µM [¹⁴C] Aminosäure (15-40 Ci/mol), 30-60 µM tRNA und 2-10 U aa-tRNA-Synthetase. Anschließend wurde die Lösung mit saurem Phenol (gesättigt mit 50 mM AcONa, pH 4.5) und Ether extrahiert. Überschüssiges ATP wurde auf einer DEAE-Sephadex A-25 (ca. 1 ml Säulenvolumen in 20 mM AcONa, pH 5.0, 0.3 M NaCl äquilibriert) entfernt und die tRNA mit 1 M NaCl eluiert. Anschließend wurde die tRNA auf einer BioGel P6 (2 x 8 cm, in 20 mM AcONa, pH 5.0 äquilibriert) entsalzt, im Vakuum eingengt und mit EtOH präzipitiert.

2.2.24.2 Analytische Aminoacylierung von tRNA

Der Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 µl : 50 mM Na Cacodylat (pH 7.6), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 20 µM [¹⁴C]Aminosäure (~ 25 Ci/mol), 0.05-0.25 A₂₆₀ tRNA und 0.1-0.5 U aa-tRNA-Synthetase. Die Aminoacylierung erfolgte für 10 min bei 37°C für *E.coli* und bei 56°C für *T. thermophilus* tRNAs, dabei wurden nach 1, 3, 6 und 10 min 20 µl auf einen Cellulose-Filter pipettiert. Die Filter wurden anschließend zweimal 7 min in 10 % (v/v) TCA, einmal für 7 min in 5 % (v/v) TCA, einmal 7 min in EtOH gewaschen, unter einer Infrarotlampe getrocknet und die filtergebundene Radiaktivität in einem Szintillationszähler LS 1801 bzw. Tri-Carb 2900TR detektiert.

2.2.24.3 Testen der Fraktionen bei der Aufreinigung von $tRNA^{Phe}$ aus *E. coli*

Es wurden je nach tRNA-Konzentration 10-50 μ l (0.02-0.2 A_{260}) pro Fraktion entnommen und in einem Aminoacylierungsansatz (Kapitel 2.2.24.2) 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz auf einen Cellulose-Filter pipettiert und wie in dem Kapitel 2.2.24.2 beschrieben behandelt.

2.2.25 Aa-tRNA Hydrolyseschutz-Experimente

Der Schutz der Aminoacylbindung vor Hydrolyse durch die Bindung der aa-tRNA an EF-Tu wurde wie folgt getestet: in einem Gesamtvolumen von 200 μ l TCB-Puffer wurden zuerst für 10 min bei 0°C 1 μ M aa-tRNA, 5 μ M EF-Tu_f und 8 μ M Nukleotid inkubiert. Nach der Übertragung ins 37°C wurden in angegebenen Intervallen, in der Regel 0, 30, 60, 120 und 180 min, 30 μ l entnommen und auf einen NC-Filter pipettiert. Die Filter wurden anschließend zweimal 7 min in 10 % (v/v) TCA, einmal 7 min in 5 % (v/v) TCA, einmal für 7 min in EtOH gewaschen unter einer Infrarotlampe getrocknet und die filtergebundene Radiaktivität in einem Szintillationszähler LS 1801 bzw. Tri-Carb 2900TR gezählt.

2.2.26 Synthese der GTP-Analoga

DABP-GTP, seine nichthydrolysierbaren Derivate DABP-GppNHp, DABP-GppCH₂p und MAAP-GTP wurden wie beschrieben synthetisiert (Zor et al., 1997). Die Reinigung wurde modifiziert. Die Ansätze enthielten in 1 ml 125 mM Mes/NaOH (pH 6.3-7.0, in der Regel pH 6.8) 30 μ mol Li₂GTP (oder Na₃GppNHp, Na₃GppCH₂p) und 150 μ mol EDC. Dazu wurden 300 μ mol DABP oder MAAP in peroxidfreiem (mit Al₂O₃ behandelt) 1,4-Dioxan zugegeben und 3-5 Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die DABP-Reaktionsansätze mit 0.5-1 ml Mes-Puffer verdünnt, mit 2 x 2 ml AcOEt extrahiert und die wässrige Phase auf DEAE-Sephadex A-25 (1 x 9 cm, in 10 mM Tris/HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl äquilibriert) aufgetragen. Die GTP-Analoga wurden bei einer Flußrate von ca. 1 ml /min mit einem linearen Gradient von 100 mM bis 400 mM NaCl (2 x 250 ml) eluiert. Die Fraktionen die gleichzeitig eine Guanosin ($\lambda_{max} = 260$ nm) und Diaminobenzophenone ($\lambda_{max} = 355$ nm) Absorption aufwiesen wurden vereinigt und auf eine Sep-Pak Säule (C18-Cartridge, Millipore-Waters) aufgetragen, die Säule mit 10 mM Hepes (pH 7.5) gewaschen

und die entsalzte Probe mit 10 % (v/v) CH₃CN in Wasser eluiert. Anschließend wurde das Eluat im Hochvakuum aufkonzentriert. Die Reinheit der Produkte wurde mittels Ionenpaar RP-HPLC bestimmt. Dazu wurden die Proben auf eine EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel, Düren) Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradient von 20-25 % CH₃CN in 100 mM Tris (oder 100 mM K-Pi), pH 6.5, 10 mM TBHS in 10 min eluiert.

Die MAAP-GTP-Reaktionsansätze wurden direkt auf eine semipräparative in 1 mM TEAB (pH 8.0) äquilibrierte SP 250/10 Nucleosil 100-5 C18 PNN Säule aufgetragen, 5 min bei einer Flußrate von 2.5 ml / min gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0-20% CH₃CN in 20 min eluiert. Der MAAP-GTP Pool wurde im Hochvakuum aufkonzentriert. Dabei wurde mehrfach MeOH zur vollständigen Entfernung des Triethylamins zugegeben. Alternativ zur Ionenpaar RP-HPLC wurde für analytische Zwecke auch eine Anionenaustauscher-HPLC durchgeführt. Dazu wurden die Proben auf eine ET 125/4.6 Nucleosil 4000-7 PEI aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) bis 20 mM Tris/HCl (pH 8.2), 1.5 M NaCl in 10 min eluiert. Bei den HPLC-Läufen wurden die Substanzen bei zwei Wellenlängen detektiert (bei 254 nm für Guanosin und 350 nm für DABP oder 230 nm für MAAP). Die Identität der GTP-Analoga wurde zusätzlich mittels ESI-MS überprüft.

2.2.27 Bestimmung der Bindungsaffinität und der Hydrolyseaktivität von EF-Tu und den GTP-Analoga

2.2.27.1 Bindungsaffinität und Hydrolyseaktivität von DABP-GTP

Als ein Signal für die DABP-GTP Bindung wurde das Quenching der intrinsischen EF-Tu-Tryptophanfluoreszenz durch den DABP-Chromophor verfolgt. Die Bindungsaffinität von DABP-GppCH₂p zu EF-Tu wurde indirekt durch die Messung der Abhängigkeit der apparenten Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{obs}) von DABP-GppCH₂p Konzentration ($k_{obs} = k_{off} + c_{DABP-GppCH_2p} \cdot k_{on}$) bestimmt. Die Experimente wurden mit der Stopped-Flow-Technik auf einem DX17MV Sequential Stopped-Flow Spectrofluorimeter (Applied Photophysics, Leatherland, UK) in der Arbeitsgruppe von Prof.F.X.Schmid am Lehrstuhl Biochemie III der Universität Bayreuth durchgeführt. Die Exzitationswellenlänge (λ_{ex}) wurde auf das Absorptionsmaximum des Tryptophans von 280 nm und die Emissionswellenlänge (λ_{em}) auf 334 nm eingestellt. Die Messungen erfolgten in TCB-Puffer

bei 2-3°C. Dabei wurden 100 µl einer 350 nM EF-Tu_f Lösung mit 100 µl 0.5-40 µM DABP-GppCH₂p Lösung in dem Spektrofluorimeter rasch vermischt und der Zeitverlauf der Änderungen der Tryptophanfluoreszenz detektiert. Die apparenten Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{app}) wurden durch eine nichtlineare Anpassung der Messwerte an eine mono-exponentielle Funktion ($y = y_0 + const.e^{-k.t}$) berechnet. Anschließend wurden die k_{app} -Werte gegen die DABP-GppCH₂p-Konzentration aufgetragen. Die lineare Regression lieferte k_{off} als den Schnittpunkt mit der Ordinatenachse und k_{on} als die Steigung der Geraden. Der Quotient k_{off} / k_{on} ist gleich der Dissoziationskonstante K_D . Zusätzlich wurde die Affinität durch Kompetitionsexperimente mit GDP wie in dem Kapitel 2.2.19.5 beschrieben bestimmt.

Die Messungen der DABP-GTPase Aktivität von EF-Tu erfolgten standardmäßig in einem LS50B Luminiscence Spectrometer und wurden in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml in TCB-Puffer durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Messung bei 10°C. Die Spaltbreiten wurden je nach benutzter Proteinkonzentration gewählt (für 5 µM EF-Tu 10 nm Exzitationsspaltbreite und 0 nm Emissionsspaltbreite). Die Ansätze enthielten in der Regel 5.1 µM EF-Tu_f und die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µM DABP-GTP gestartet. Die Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse (k_{cat}) wurden durch eine nichtlineare Anpassung der Messwerte an eine mono-exponentielle Funktion ($y = y_0 + A.e^{-k.t}$) berechnet. Die Hydrolyse wurde zusätzlich entweder durch RP-HPLC oder durch Anionenaustauscher-HPLC wie in Kapitel 2.2.26 beschrieben mit der Ausnahme, dass die Puffer für die Anionenaustauscher-HPLC zusätzlich 7 M Harnstoff enthielten, nachgewiesen.

2.2.27.2 Bindungsaffinität und Hydrolyseaktivität von MAAP-GTP

Die Bindungsaffinität von MAAP-GTP und EF-Tu wurde mittels der Veränderung der schwachen MAAP-GTP Fluoreszenz bei der Assoziation mit EF-Tu standardmäßig in einem LS50B Luminiscence Spectrometer bestimmt. Hierzu wurde die MAAP-Fluoreszenz bei $\lambda_{ex} = 330$ nm angeregt und bei $\lambda_{em} = 478$ nm detektiert. Dabei wurde die Hintergrundfluoreszenz von den Messwerten abgezogen. Die Messungen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml in entgastem TCB-Puffer bei 10°C. Die Bindungsansätze enthielten 5 µM MAAP-GTP und 0-16 µM EF-Tu_f. Die Daten wurden einer Bindungsisotherme angepasst und die

Dissoziationskonstante aus der Anpassung bestimmt. Zusätzlich wurde die Affinität durch Konkurrenzexperimente mit GDP wie in Kapitel 2.2.19.5 beschrieben bestimmt.

Das Hydrolyseverhalten von MAAP-GTP in Gegenwart und Abwesenheit von EF-Tu wurde mittels Anionenaustauscher-HPLC wie in Kapitel 2.2.26 beschrieben getestet. Alternativ wurde die MAAP-GTP-Hydrolyseaktivität des EF-Tu mittels der MAAP-Fluoreszenz gemessen. In der Regel enthielten die Ansätze in 0.5 ml TCB-Puffer 10 μ M EF-Tu_f und 10 μ M MAAP-GTP. Die Hydrolysemessungen wurden bei 10-37°C durchgeführt.

2.2.27.3 Produkt der EF-Tu-katalysierten DABP-GTP Hydrolyse

Zur Identifizierung des Hydrolyseproduktes der DABP-GTPase wurden in einem Gesamtvolumen von 100 μ l TCB-Puffer 20 μ M DABP-GTP und 36 μ M EF-Tu_f für 15 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde auf eine Sep-Pak Säule (C18-Cartridge, Millipore-Waters) aufgetragen, mit Wasser gewaschen und mit MeOH in 5 % (v/v) Stufen eluiert. Die Fraktionen wurden anschließend mittels ESI-MS analysiert.

2.2.28 Reinigung von Kirromycin

Das Antibiotikum Kirromycin (auch Mocimycin) wurde aus einem Rohextrakt (Gist-Brocades, Leiden, Niederlande) aus einem Mycelium Stamm aufgereinigt. Das Rohextrakt besteht aus einer Mischung von Mocimycin, Dihydromocimycin und anderen organischen Molekülen. Für die Reinigung wurden 0.5 g des Rohextraktes in 10 ml Wasser gelöst und mit 10 M NaOH auf pH von 9-10 eingestellt. Die Lösung wurde in einem Scheidetrichter mit 15 ml Chloroform für eine Stunde vorsichtig gerührt. Die untere Dihydromocimycin-haltige Chloroformphase wurde entfernt und die Extraktion der wässrigen Phase wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit verdünnter Phosphorsäure auf pH~7 angesäuert und wieder mit Chloroform der 1 % (v/v) EtOH enthielt extrahiert. Jetzt wurde die Chloroformphase im Hochvakuum auf ca. 3 ml eingeengt und tropfenweise zu 20 ml n-Heptan gegeben. Der Niederschlag wurde in einem Büchnertrichter abfiltriert und das gelbliche Pulver in 1.5 ml 50 % (v/v) MeOH aufgelöst. Anschließend wurde das Kirromycin mittels RP-HPLC auf einer semipräparativen SP 250/10 Nucleosil 500-5 C18 (Macherey Nagel, Düren) Säule gereinigt. Dazu wurden 100-200 μ l der Methanollösung aufgetragen, 5 min mit 68 % MeOH bei einer Flussrate von 2 ml/min gewaschen und mit einem linearen

Gradient von 68 bis 100 % MeOH in 30 min eluiert. Die Detektionswellenlängen waren 220 nm und 320 nm. Die Identität des Kirromycin wurde mittels ESI-MS nachgewiesen. Dazu wurden weniger als 3 nmol Kirromycin in MeOH gelöst und direkt in das Massenspektrometer injiziert.

2.2.29 Fluoreszenzmarkierung von EF-Tu Varianten

2.2.29.1 *Fluoreszenzmarkierung von EF-Tu Varianten mit Coumarin- Maleinimid (CPM)*

In der Regel wurden 1-10 mg von einer EF-Tu-Cystein-Mutante gegen 10 mM Mops (pH 7.9), 100 mM NaCl, 1mM EDTA bei 0-4°C dialysiert und um die potentiellen Disulfidbrücken zu reduzieren mit 5-10-fachem molaren Überschuss von TCEP inkubiert. Die Lösung wurde in Centricon YM-10 bei 5000 g zu einer 50-100 µM Proteinkonzentration konzentriert und 15-25 molare Äquivalente von CPM, gelöst im DMF, zugegeben. Anschließend wurde die DMF-Konzentration auf 30 % (v/v) eingestellt und der Reaktionsansatz bei RT für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Dann wurde das Protein durch Zugabe von 5 Volumina Aceton und eine Inkubation bei -20°C für 30-60 min präzipitiert. Der Niederschlag wurde bei 7000 g abzentrifugiert mit 1 ml kaltem Aceton gewaschen, im Tuf-A-Puffer gelöst und auf eine im Tuf-A-Puffer äquilibrierte CM-Sepharose (1 x 5 cm, 1-1.5 ml/min) bei 4°C aufgetragen. Die Säule wurde mit Tuf-A-Puffer gewaschen und das Protein mit Tu_f-B-Puffer eluiert. Der Durchbruch der CM-Sepharose wurde mit Tuf-A-Puffer auf 50-100 mM KCl verdünnt und auf eine im Tu_f-B-Puffer äquilibrierte Q-Sepharose (1 x 3 cm, 1 ml/min) aufgetragen. Die Säule wurde mit Tu_f-B-Puffer gewaschen und das Protein mit 1 M KCl in Tu_f-B-Puffer eluiert. Die Proteineluate aus der Q- und CM-Sepharose wurden vereinigt und viermal gegen 2 l : 50 mM Tris (pH 7.5), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ bei 4°C dialysiert. Das Dialysat wurde in Centricon YM-30 bei 5000 g einkonzentriert, ein Volumen Glycerin zugegeben und bei -20°C gelagert.

2.2.29.2 *Fluoreszenzmarkierung von EF-Tu mit 1,5-IAEDANS*

Es wurden 2 mg der EF-Tu C82A/L404C oder EF-Tu C82A/P357C Mutante zweimal gegen 0.8 l PBS-Puffer bei 4°C dialysiert und potentielle Disulfidbrücken mit 10 molaren Äquivalenten TCEP während der Konzentrierung zu einer Proteinkonzentration von 70-100 µM durch eine Zentrifugation in Centricon YM-10 bei 5000 g und 4°C reduziert. Anschließend wurde 1,5-IAEDANS in einem 18-fachen Überschuss zu EF-Tu zugegeben und für 2 Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von β-ME zu einer Endkonzentration von 50 mM und eine 10-minütige Inkubation gestoppt. Dann wurde Harnstoff zu einer 5 M Endkonzentration zugegeben und das GDP und der Überschuss an 1,5-IAEDAS auf einer mit Tu_r-B-Puffer äquilibrierten BioGel P6 (2 x 10 cm, 0.8 ml/min) Gelpermeationssäule entfernt. Der Proteinpool wurde dreimal gegen 1.5 l 100 mM Tris/HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂ bei 4°C dialysiert, in Centricon YM-10 bei 5000 g und 4°C ankonzentriert, ein Volumen Glycerin zugegeben und bei -20°C gelagert.

2.2.30 *Fluoreszenzmarkierung von tRNA*

2.2.30.1 *Fluoreszenzmarkierung von tRNA^{Phe} aus E. coli mit Fluoreszeinsuccinimidester (FAM-SE)*

In der Regel wurden 10 A₂₆₀ tRNA^{Phe} mit EtOH präzipitiert und in 40-50 µl 100 mM Na Phosphat, 50 mM HEPES, pH 9.0 aufgenommen. Anschließend wurde FAM-SE in einem 15-20-fachen Überschuss zugegeben und für 2 Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Tris/HCl (pH 8.0) zu einer Endkonzentration von 100 mM und 15-minütige Inkubation gestoppt. Die tRNA-Lösung wurde gegebenenfalls mit Phenol extrahiert und mit EtOH gefällt.

2.2.31 *Vorbereitung der T. thermophilus 70S-L12-R80A Ribosomen*

Das selektive Auswaschen vom L12-Protein aus *T.thermophilus* 70S Ribosomen wurde mit geringfügigen Modifikationen nach der von (Tokimatsu et al., 1981) und (Dey et al., 1995) für das homologe Protein L12 aus *E. coli* und von (Marquis and Fahnestock, 1980) für

L13 aus *B. stearothermophilus* beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz ca. 2 nmol 70S-Ribosomen (200 μ l 10 μ M 70S_{T.th.} WT, vorbereitet von Y.Huang oder S.Brock, LS Biochemie I) mit Puffer L auf 1 M NH₄Cl eingestellt. Nach einer kurzen Vorinkubation bei 30°C wurde ½-Volumen EtOH (auf 30°C vorgewärmt) zugegeben und 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das zweite ½-Volumen EtOH (50 % Endkonzentration) zugegeben und die Ribosomen 5 min bei 30°C präzipitiert. Die Suspension wurde dann auf Eis gekühlt und die Ribosomen durch eine Ultrazentrifugation pelletiert (TLA-100 Beckman, 35 000 g, 10 min, 4°C). Die im Überstand vorhandenen Proteine wurden durch eine Zugabe von 2 Volumina Aceton bei –20°C präzipitiert, in 70-100 μ l TCB-Puffer aufgenommen und für eine spätere SDS-PAGE Analyse aufbewahrt. Das Pellet wurde in ca. 200 μ l Puffer L (NH₄Cl-Konzentration auf 1M eingestellt) resuspendiert und der Waschschrift noch einmal wiederholt. Die so gewonnenen 70S-Kerne (70S ohne L7/L12) wurden in ca. 200 μ l TCB-Puffer + 1 mM β -ME resuspendiert und 15 min bei 37°C mit einem 8-fachen molaren Überschuss von L12-R80A (Kapitel 2.2.18) inkubiert. Die Ribosomen wurden durch eine Ultrazentrifugation (TLA-100 Beckman, 170000 g, 45 min, 4°C) durch ein 1 ml Kissen aus 10 % Saccharose (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 60 mM NH₄Cl, 20 mM MgCl₂, 3 mM β -ME, 0.5 mM EDTA, 10 % (w/v) Saccharose) von überschüssigem Protein getrennt und in ca. 200 μ l Rib.mix resuspendiert. Die 70S-L12-R80A Ribosomen (im Weiteren 70S-RA genannt) wurden aliquotiert, im i-PrOH/Trockeneis schockgefroren und bei –70°C gelagert.

2.2.32 Stopped-Flow Experimente mit mant-dGTP

Die Experimente wurden mit der Stopped-Flow-Technik auf einem DX17MV Sequential Stopped-Flow Spectrofluorimeter in der Arbeitsgruppe von Prof.F.X.Schmid am Lehrstuhl Biochemie III der Universität Bayreuth durchgeführt. Dafür wurden die Ribosomen-Komplexe und der ternäre Komplex separat vorbereitet und wie weiter unten beschrieben im Stopped-Flow Spectrofluorimeter gemischt und die zeitabhängige Fluoreszenzänderung verfolgt (Rodnina et al., 1995) und (Rodnina et al., 1996).

2.2.32.1 *Vorbereitung der Ribosomen-Komplexe*

Für die Durchführung einer Stopped-Flow-Messreihe wurde 1 ml einer 1 μM Ribosomen-Lösung benötigt. Zum Blockieren der ribosomalen P-Stelle wurde in 1 ml Rib.mix 1 μM 70S oder 70S-RA (Kapitel 2.2.31) mit 1.1 μM tRNA^{Phe} aus *T. thermophilus* und 2 A₂₆₀/ml poly(U) 15 min bei 37°C inkubiert und bis zu ihrer Verwendung auf Eis aufbewahrt.

2.2.32.2 *Vorbereitung des ternären Komplexes mit mant-dGTP*

Für die Durchführung einer Stopped-Flow-Messreihe wurde 1 ml einer 0.3 μM EF-Tu-Lösung benötigt. Es wurden in einem Gesamtvolumen von 200 μl Rib.mix 10 nmol EF-Tu_f (WT, R57L oder R59A), 1 mM mant-dGTP, 6 mM PEP, 3 mM ATP und 50-100 $\mu\text{g/ml}$ Pyruvat Kinase 10 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Überschüssiges mant-dGTP wurde durch eine Gelpermeationschromatographie an einer mit Rib.mix äquilibrierten BioGel P6 Säule (1 x 15 cm, 0.5 ml/min, 4°C) getrennt. Der eluierte binäre Komplex EF-Tu**mant*-dGTP (gewöhnlich 4-10 μM) wurde dann auf Eis im Dunkeln bereitgehalten. Die absolute EF-Tu -Konzentration wurde spektrophotometrisch (Ehresmann et al., 1973) und die aktive EF-Tu**mant*-dGTP-Konzentration mittels GDP-Bindungstests in Gegenwart von EF-Ts (Kapitel 2.2.19.4) bestimmt. Kurz vor der Stopped-Flow Messung wurde 1 ml einer 0.3 μM EF-Tu**mant*-dGTP und 0.9 μM Phe-tRNA^{Phe} aus *T. thermophilus* (ca. 800 pmol Phe/A₂₆₀, Konzentration wurde auf den aminoacylierten Anteil berechnet) Lösung mit Rib.mix verdünnt und durch 5-10-minütige Inkubation bei RT für die Messung vorbereitet (weiter TC**mant*-GTP-Lösung) .

2.2.32.3 *Durchführung der Stopped-Flow Experimente*

Wenn nicht anders angegeben wurden die Experimente bei 20°C durchgeführt. Eine Mischung aus p-Nitrophenol und p-Nitroanilin wurde als Emissionsfilter verwendet (0 % Transmission unter 385 nm, 100 % Transmission über 465 nm). Bei jeder Messung wurden 1000 Messpunkten über 10 s gesammelt (logarithmische Zeitskala, Filter 200 μs). Die Exzitation der *mant*-Fluoreszenz erfolgte bei 360 nm.

Vor dem Experiment wurde eine Spritze mit 1 ml der 1 μM Ribosomen-Lösung (2.2.32.1) und die zweite mit 1 ml der ca. 0.3 μM TC**mant*-GTP-Lösung (2.2.32.2) (wenn angegeben zusätzlich 100 μM Kirromycin, Kapitel 2.2.28) gefüllt und 3 min in dem Stopped-Flow Gehäuse bei 20°C temperiert. Die Messung wurde durch ein schnelles Mischen von je ca. 65 μl der beiden Lösungen gestartet. Die ersten vier „Schüsse“ wurden nicht bei der Auswertung berücksichtigt. Um ein besseres Signal/Rauschen Verhältnis zu bekommen wurde mindestens über 8 Messungen gemittelt. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten (k_{app}) der Fluoreszenzänderung wurden aus einer Anpassung der Messdaten an eine *bi-exponentielle* ($y = y_0 + A_1 \cdot e^{-k_{\text{app}1} \cdot t} + A_2 \cdot e^{-k_{\text{app}2} \cdot t}$) und *mono-exponentielle* ($y = y_0 + A \cdot e^{-k_{\text{app}} \cdot t}$) Funktion gewonnen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen unabhängigen ternären Komplex und programmierten 70S Präparationen war $\pm 30 \%$ und zwischen einzelnen Schüssen $\pm 10 \%$.

3 Ergebnisse

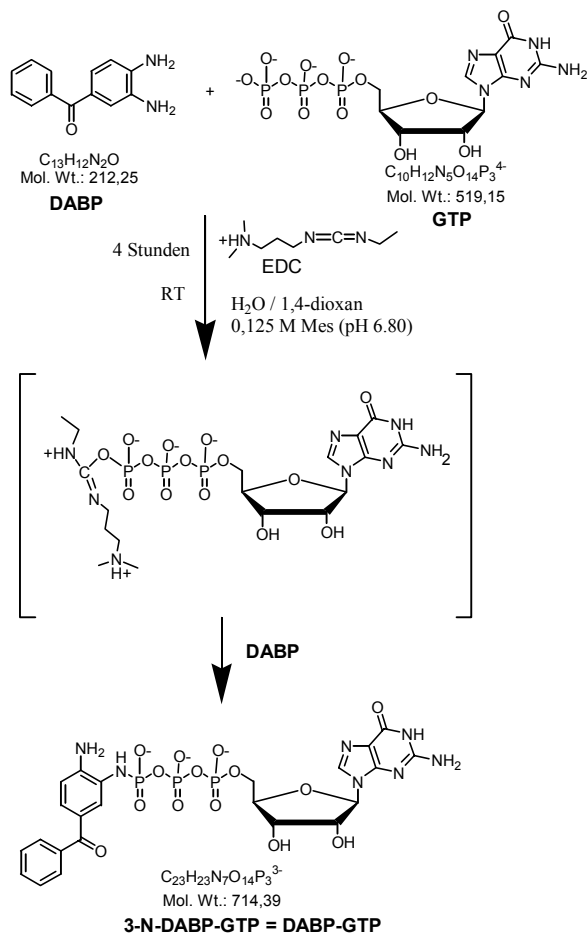
3.1 GTP-Analoga

Verschiedene fluoreszierende Nukleotid-Analoga werden benutzt um die Funktion von ATPasen/GTPasen zu untersuchen (Jameson and Eccleston, 1997). Unter ihnen auch Nukleotid-Analoga mit einem modifizierten γ -Phosphat. Ein Phosphoester von GTP, das caged-GTP, ist ein nicht hydrolysierbares GTP-Analog, das durch Photolyse in GTP überführt werden kann. Diese Eigenschaft wird bei kinetischen Studien an verschiedenen GTPasen benutzt. Die Laser-induzierte Photolyse des caged-GTP wurde auch bei der Aufklärung der Ras*GTP Kristallstruktur verwendet (Schlichting et al., 1989). Auch Phosphoamide werden angewendet. Ein GTP-Analog mit einer m-Acetylanilido-Modifikation am γ -Phosphat (MAAP-GTP) wurde zur Photoaffinitätsmarkierung von G α -Proteinen eingesetzt (Zor et al., 1995a). Inzwischen ist bekannt, dass der Substituent an dem γ -Phosphat die Hydrolysierbarkeit dieser Analoga durch G-Proteine beeinflussen kann (Zor et al., 1998), (Ahmadian et al., 1999), (Gail et al., 2001). Diese Arbeiten zeigten, dass für die erhöhte Hydrolysegeschwindigkeit der Analoga eine vicinal zum γ -Phosphat stehende Hydroxyl- oder Aminogruppe essentiell ist. Eine Stabilisierung des Übergangszustandes der Hydrolyse durch eine Wasserstoffbrücke von der vicinalen Gruppe zum γ -Phosphat wurde als eine Erklärung dieses Effektes vorgeschlagen.

In dieser Arbeit wurden zwei GTP-Analoga eingesetzt, eines ohne (MAAP-GTP) und eines mit (DABP-GTP) einer vicinal zum γ -Phosphat stehenden Aminogruppe. Mit Hilfe dieser Analoga sollte gezeigt werden, ob diese Art der Substrat-assistierten Katalyse auch bei EF-Tu existiert (Dall'Acqua and Carter, 2000). Weiterhin sollte untersucht werden, ob es Unterschiede im Mechanismus der Hydrolyse dieser Analoga und GTP gibt und ob diese zum besseren Verständnis der stimulierten GTPase von EF-Tu beitragen können.

3.1.1 Synthese und Aufreinigung von DABP-Analoga

Das DABP-GTP wurde nach (Zor et al., 1997) wie in Kapitel 2.2.26 beschrieben synthetisiert. Die Reaktion erfolgte bei einem neutralen pH durch eine Kopplung von DABP mit einem Carbodiimid-aktivierten GTP-Phosphoester. Schema 3.1 zeigt den Mechanismus der Reaktion an.



Schema 3.1. Reaktionsschema der Synthese von 3,4-Diaminobenzophenon-Phosphoramidate-GTP (DABP-GTP).

Nach der Reaktion wurde das überschüssige DABP mit Ethylacetat extrahiert und das DABP-GTP mittels einer Anionenaustauschchromatographie bei pH 7.6 gereinigt (Abb 3.1.1).

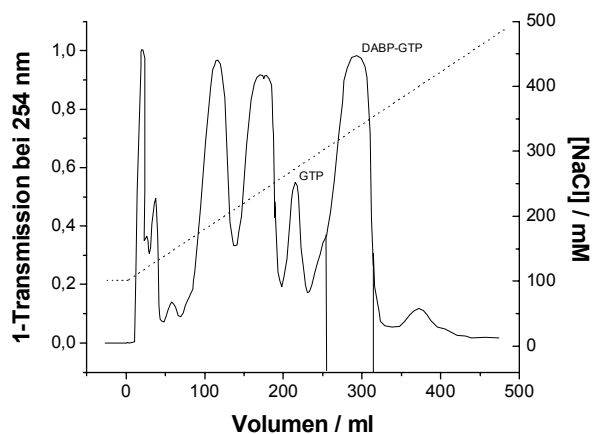


Abb. 3.1.1 Chromatographische Aufreinigung von DABP-GTP.

Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-25. Die gepunktete Linie zeigt die NaCl-Konzentration an. Die Fraktionen wurden auf UV-Absorption getestet. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Das DABP-GTP eluierte nach GTP bei rund 350 mM NaCl. Der DABP-GTP Pool aus der Anionenaustauscherchromatographie wurde auf einer Sep-Pak C18 Säule entsalzt. Das noch vorhandene GTP/GDP konnte mit einem niedrig konzentrierten Puffer (10 mM Hepes, pH 7.5) entfernt und das DABP-GTP mit Wasser oder 5-10 % Acetonitril eluiert werden.

Die Absorptionskoeffizienten von DABP bei 252 nm und 354 nm wurden nach dem Lambert-Berschen Gesetz aus der linearen Abhängigkeit der Absorptionen von der DABP-Konzentration berechnet ($\epsilon_{252} = 9000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{354} = 6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Zusammen mit dem bekannten $\epsilon_{252}(\text{GTP}) = 13700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ folgt daraus ein Absorptionskoeffizient für DABP-GTP von $\epsilon_{252}(\text{DABP-GTP}) = 22500 \pm 2000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Dieser Wert wurde im Weiteren für die Konzentrationsbestimmung verwendet.

Die Reinheit des DABP-GTP wurde mittels RP-HPLC geprüft. Diese Analyse zeigte, dass das gereinigte DABP-GTP über 95 % sauber war (Abb. 3.1.2a). Ausgehend von 30 μmol GTP lieferte die Methode ca. 10.6 μmol DABP-GTP, was einer Ausbeute von ca. 32 % entspricht.

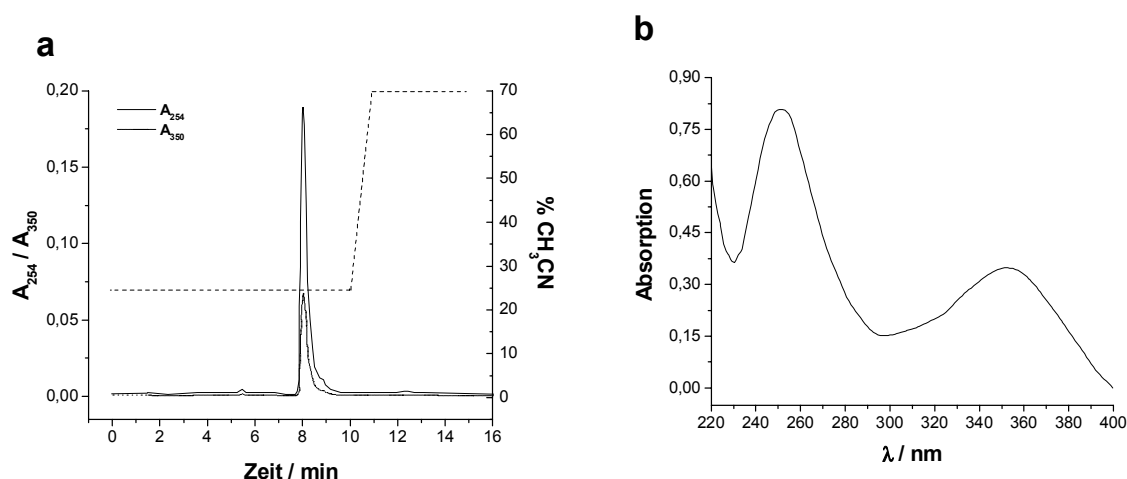


Abb. 3.1.2 Analyse des gereinigten DABP-GTP. (a) Elutionsprofil der RP-HPLC an ET Nucleosil 500-5 C18 PPN. Die gestrichelte Linie zeigt die Acetonitrilkonzentration an. (b) UV-Spektrum von DABP-GTP (ca. 35 μM).

Die zwei nichthydrolysierbaren Analoga, DABP-GppNHp und DABP-GppCH₂p, wurden auf gleiche Weise wie das DABP-GTP synthetisiert und gereinigt. Hier betragen die Ausbeuten ca. 10 %. Bei der Synthese reagierten, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, beide Aminogruppen des DABP und es entstanden zwei DABP-GppCH₂p bzw. DABP-GppNHp Regioisomere. Mit ca. 80-95 % ist das 3-N-DABP-GppXp gegen dem 4-N-DABP-GppXp

Isomer (Abb 3.1.3) überrepräsentiert. Das Verhältnis der beiden Regioisomere war von dem Verlauf der Reinigung abhängig, was auf eine langsame Isomerisierung hinweist.

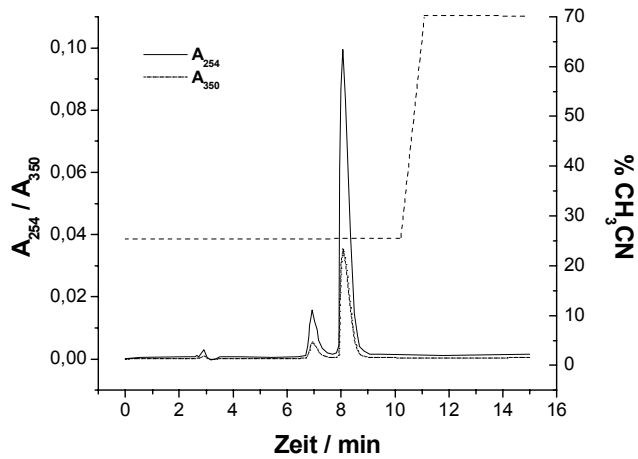
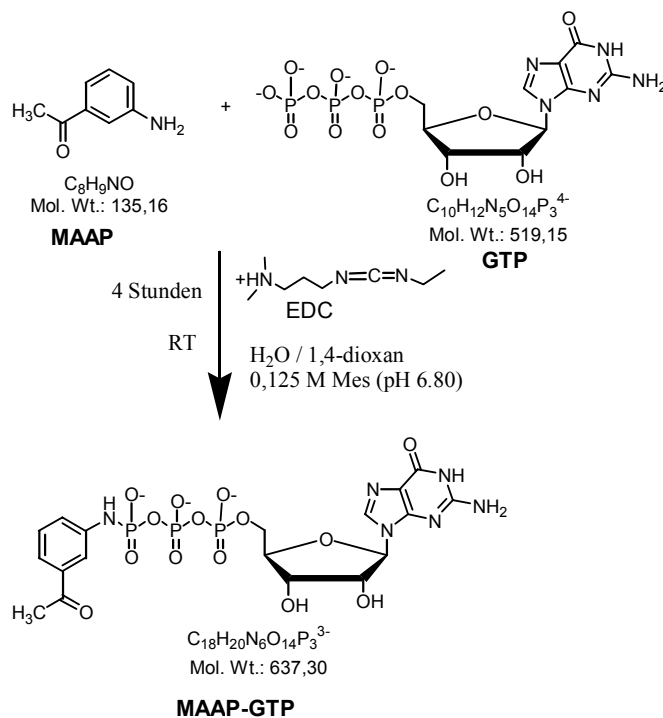


Abb. 3.1.3 RP-HPLC Analyse des gereinigten DABP-GppCH₂p an ET Nucleosil 500-5 C18 PPN. Die gestrichelte Linie zeigt die Acetonitrilkonzentration an.

3.1.2 Synthese und Aufreinigung von MAAP-GTP

Die Synthese des MAAP-GTP erfolgte nach dem Schema 3.2 wie in Kapitel 2.2.26 beschrieben.



Schema 3.2. Reaktionsschema der Synthese von *m*-Aminoacetophenone-phosphoramidate-GTP (MAAP-GTP).

Das DABP-GTP wurde, wie bereits beschrieben (Kapitel 3.1.1) durch eine Anionenaustauschchromatographie gereinigt und anschließend mittels einer Sep-Pak C18 Säule entsalzt und von GTP/GDP-Resten befreit. Da das MAAP-GTP nicht genug hydrophob ist um an der Sep-Pak C18 Säule zu binden wurde der MAAP-GTP Ansatz direkt durch eine semipräparative RP-HPLC gereinigt. Ein Beispiel einer solchen Chromatographie ist in Abbildung 3.1.4 gezeigt. Das MAAP-GTP eluierte zwischen 10-15 % Acetonitril.

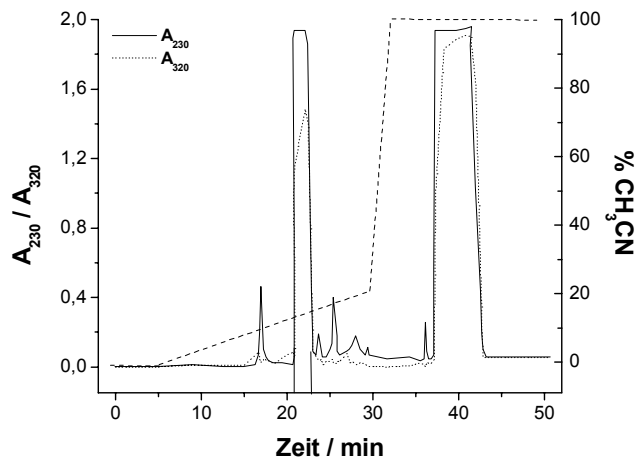


Abb. 3.1.4 Semipräparative RP-HPLC von einem MAAP-GTP-Ansatz an SP 250/10 Nucleosil 100-5 C18 PNN. Die gestrichelte Linie zeigt die Acetonitrilkonzentration in Prozenten an. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Für die Quantifizierung des MAAP-GTP wurde der Absorptionskoeffizient von $28800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 232 nm benutzt (Zor et al., 1995b). Die auf GTP-basierende Ausbeute betrug ca. 90 %. Durch eine analytische RP-HPLC wurde eine Reinheit von über 95 % ermittelt (Abb. 3.1.5a). Die Identität des aufgereinigten MAAP-GTP wurde mittels ESI-MS bestätigt (Abb. 3.1.5b).

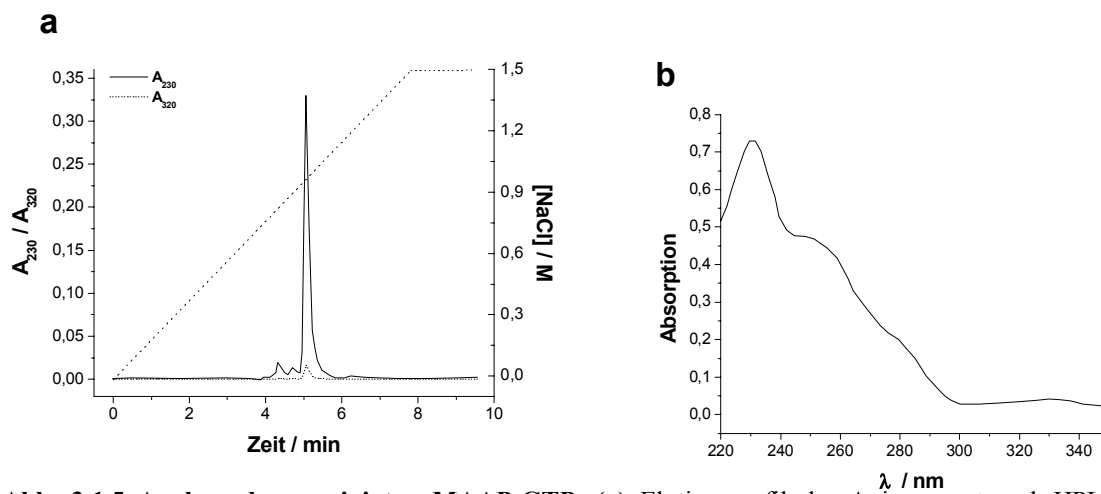


Abb. 3.1.5 Analyse des gereinigten MAAP-GTP. (a) Elutionsprofil der Anionenaustausch-HPLC an ET 125/4.6 Nucleosil 4000-7 PEI. Die gestrichelte Linie zeigt die Acetonitrilkonzentration an. (b) UV-Spektrum von ca. $35 \mu\text{M}$ DABP-GTP.

3.2 Die GTP-Analoga binden an EF-Tu_f

Die beide GTP-Analoga, MAAP-GTP und DABP-GTP, tragen eine relativ große hydrophobe Modifikation am γ -Phosphat. Auf welche Weise die Affinität der Analoga zu EF-Tu durch diese Modifikation beeinflusst wird, wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht.

3.2.1 Bindung der DABP-Analoga

Das DABP-Chromophor verleiht dem DABP-GTP ein Absorptionsmaximum bei 350 nm (siehe Abb. 3.1.2.). Diese Eigenschaft hat eine Spektralüberlappung von der Tryptophan-Fluoreszenz des EF-Tu ($\lambda_{em} = 334$ nm) und der DABP-Absorption ($\lambda_{max} = 350$ nm) zu Folge. Der Fluoreszenzresonanz Energietransfer (FRET) von den EF-Tu-eigenen Tryptophanen zu einem mant-Chromophor wurde schon früher für die Bestimmung der Nukleotidaffinität benutzt (Wagner et al., 1995). Die DABP-Analoga fluoreszieren zwar durch eine Anregung bei 350 nm nicht, aber das Quenching der intrinsischen Trp-Fluoreszenz von EF-Tu durch DABP konnte zur Detektion der Assoziation und Dissoziation angewendet werden (Abb. 3.2.1).

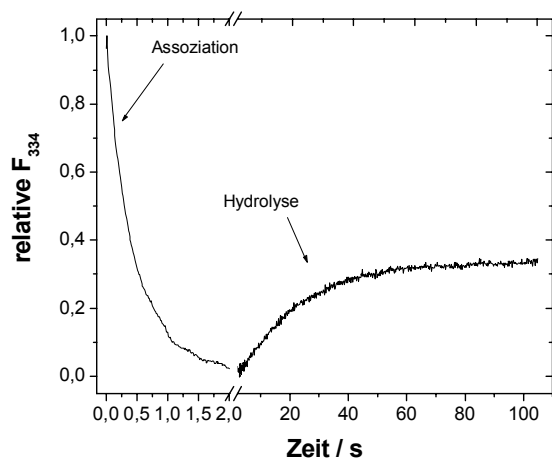


Abb. 3.2.1 Stopped-Flow Messung der GTP-Assoziation und Hydrolyse. 5 μ M EF-Tu_f und 87 μ M DABP-GTP in TCB-Puffer bei 3°C. Die Messung wurde durch ein rasches Vermischen jeweils 100 μ l EF-Tu_f- und DABP-GTP-Lösungen in TCB-Puffer gestartet. Exzitation bei 280 nm, Emission bei 334 nm. Die Geschwindigkeitsraten wurde aus einer Anpassung an eine einfach-exponentielle Funktion $y = y_0 + const \cdot e^{-k \cdot t}$ berechnet. $k_{app} = 0.02 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{cat} = 0.04 \text{s}^{-1}$.

Bei der Bindung von DABP-GTP an EF-Tu_f sinkt die Fluoreszenzintensität, wobei die Fluoreszenzänderung durch das Quenching und durch die Konformationsänderung des EF-Tu verursacht wird. Durch die Hydrolyse dissoziiert das DABP-Chromophor aus dem aktiven Zentrum und die Fluoreszenzintensität steigt zu dem Fluoreszenz-Wert für die GDP-

gebundene Form an (Abb. 3.2.1). Eine stopped-flow Messung der Assoziation von DABP-GTP und EF-Tu und der folgenden Hydrolyse lieferte eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von ca. 300 ms für die Bindung und 17 s für die Hydrolyse bei 3°C. Daraus ergibt sich eine Geschwindigkeit der Assoziation (k_{app}) von $0.02 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und der Hydrolyse von (k_{cat}) 0.04 s^{-1} .

Wegen der schnellen Hydrolyse wurde in analogen Experimenten für die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante (K_D) ein nichthydrolysierbares Analog, DABP-GppCH₂p, benutzt (Abb. 3.2.2).

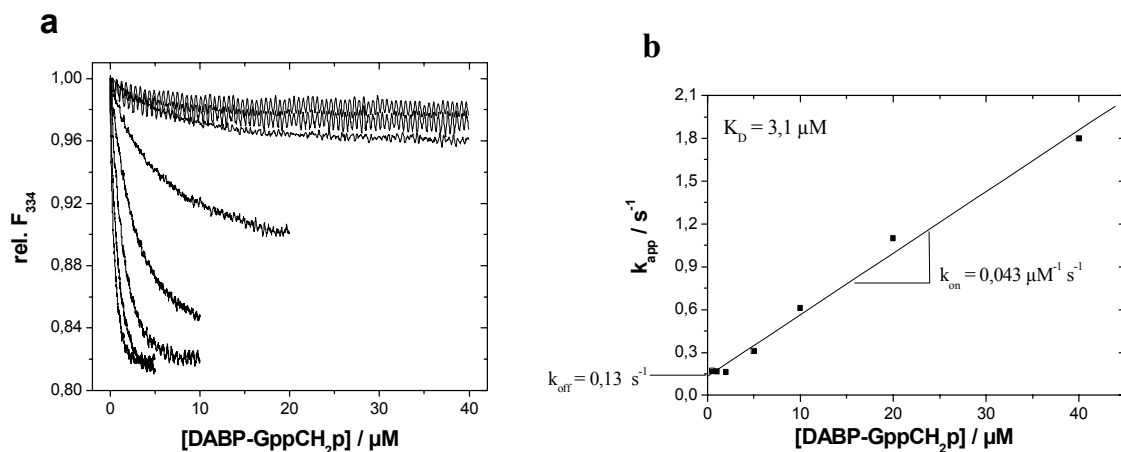
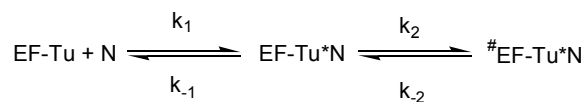


Abb. 3.2.2 Stopped-Flow Messungen der schnellen Assoziation. (a) Assoziationskinetiken von $0.35 \mu\text{M}$ EF-Tu_f und $0.5\text{-}40 \mu\text{M}$ DABP-GppCH₂p. Die apparenten Assoziationsraten (k_{app}) wurden aus einer Gleichung der pseudo-ersten Ordnung $y = y_0 + \text{const} \cdot e^{-k \cdot t}$ berechnet und (b) gegen die DABP-GppCH₂p-Konzentration aufgetragen. Exzitationswellenlänge $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 334 \text{ nm}$.

Die Nukleotid-Assoziationskinetiken könnten durch ein Zweizustands-Model erklärt werden (Wagner et al., 1995) (Schema 3.3).



Schema 3.3. Zweizustands-Model der Nukleotidassoziation.

Die Komplexbildung ist in einem schnellen Gleichgewicht und wird von einer relativ langsameren Isomerisierung der EF-Tu-Konformation, in der die Fluoreszenzänderung eintritt, gefolgt. Die Assoziationskurven (Abb. 3.2.2a) könnten gut durch eine Reaktion pseudo-erster Ordnung beschrieben werden, da DABP-GppCH₂p im Überschuss zu EF-Tu vorlag. Der Schnittpunkt der linearen Auftragung ($k_{app} = k_{off} + k_{on} \cdot [\text{DABP-GppCH}_2\text{p}]$) mit der

Ordinatenachse lieferte die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{off}) und die Steigung der Geraden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{on}). Die berechnete Dissoziationsgleichgewichtskonstante für DABP-GppCH₂p und EF-Tu, $K_D = 3.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$, stellt eine ca. 50-fach schlechtere Bindungsaffinität im Vergleich zu GppCH₂p dar (Wagner et al., 1995).

3.2.2 Bindung des MAAP-GTP

Durch eine Anregung bei 330 nm kann die schwache Fluoreszenz ($\lambda_{em} = 478 \text{ nm}$) von MAAP-GTP exzitert werden. Bei der Komplexbildung mit EF-Tu_f stieg diese Fluoreszenzintensität um das Vierfache an. Diese starke Änderung der Fluoreszenzintensität wurde zur Bestimmung der Bindungsaffinität benutzt (Abb. 3.2.3).

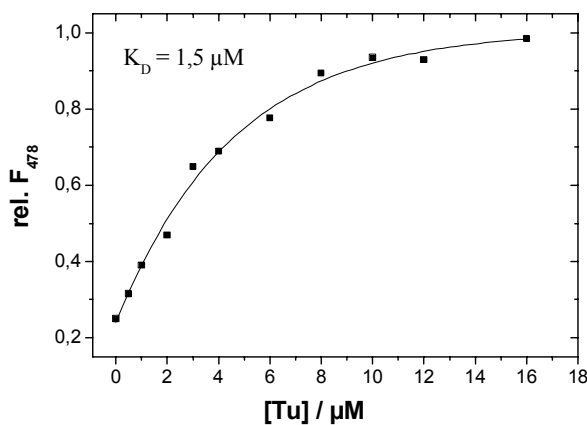


Abb. 3.2.3 Fluoreszenztitration von EF-Tu_f mit MAAP-GTP. 5 μM MAAP-GTP und 0-16 μM EF-Tu_f im TCB-Puffer bei 10°C. Exzitationswellenlänge $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$, Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 478 \text{ nm}$.

Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante für MAAP-GTP, $K_D = 1.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$, wurde aus der Anpassung der Bindungsdaten an die quadratische Form der Bindungsgleichung

($c_{ES} = \frac{c_{E0} + c_S}{K_D + c_S}$) berechnet :

$$c_{ES} = \frac{c_{E0} + c_{S0} + K_D - \sqrt{(c_{E0} + c_{S0} + K_D)^2 - 4 \cdot c_{E0} \cdot c_{S0}}}{2}$$

Wobei c_{ES} für die Konzentration des Enzym-Substrat Komplexes und c_{E0} und c_{S0} für die Anfangskonzentrationen des Enzyms bzw. des Substrats steht.

Aus den berechneten Affinitäten folgt, dass MAAP-GTP mit ungefähr zweimal höherer Affinität als DABP-GppCH₂p aber ca. 50-Mal schlechter als GTP an EF-Tu bindet.

3.3 Hydrolyse der GTP-Analoga

Die beiden GTP-Analoga, MAAP-GTP und DABP-GTP, binden an EF-Tu mit einer Affinität in niedermikromolarem Bereich (Kapitel 3.2). Die hydrophobe Modifikation des γ -Phosphates erniedrigte damit zwar die Bindungsaffinität fast um zwei Größenordnungen dennoch wurden dadurch keine experimentellen Probleme bei der Messung der Hydrolyse verursacht. Im Folgenden wurde die Hydrolyse der GTP-Analoga mittels Fluoreszenzexperimenten und HPLC untersucht.

3.3.1 Hydrolyse des MAAP-GTP

Das MAAP-GTP besitzt keine reaktive Gruppe, wie ein Amin, Hydroxyl oder Carboxyl, die zur Katalyse beitragen könnte (Schema 2). Stattdessen besitzt MAAP-GTP in der *meta*-Position zur Phosphoamidbindung einen Wasserstoffbindung-Akzeptor, eine Acetyl-Gruppe. Auf welche Weise wird die Hydrolyse durch diese Modifikation beeinflusst wurde durch Fluoreszenzmessungen untersucht. Dazu wurde der EF-Tu*MAAP-GTP Komplex vorgebildet (Abb. 3.2.3) und die Zeitabhängigkeit der Fluoreszenz verfolgt (Abb. 3.3.1). Eine Dissoziation des MAAP-Chromophors aus dem EF-Tu während einer Hydrolyse würde eine Fluoreszenzänderung hervorrufen. Es wurde keine Signaländerung, die eine MAAP-GTP-Hydrolyse bedeuten könnte, detektiert.

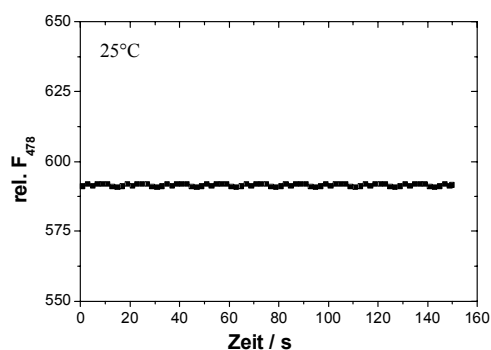


Abb. 3.3.1 Zeitabhängigkeit der MAAP-GTP-Fluoreszenzintensität. 10 μ M EF-Tu_f und 10 μ M MAAP-GTP in TCB-Puffer bei 25°C. Die gleichen Ergebnisse wurden auch bei einer verlängerten Inkubation (bis 15 min) bei 10°C und 37°C erhalten. Exzitationswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm, Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 478$ nm.

Die Möglichkeit, dass das MAAP auch nach der Hydrolyse in der EF-Tu Struktur interkaliert bliebe und deswegen keine Änderung der Fluoreszenz zeigt wurde zusätzlich mittels Anionenaustauscher-HPLC unter denaturierenden Bedingungen überprüft (Abb. 3.3.2).

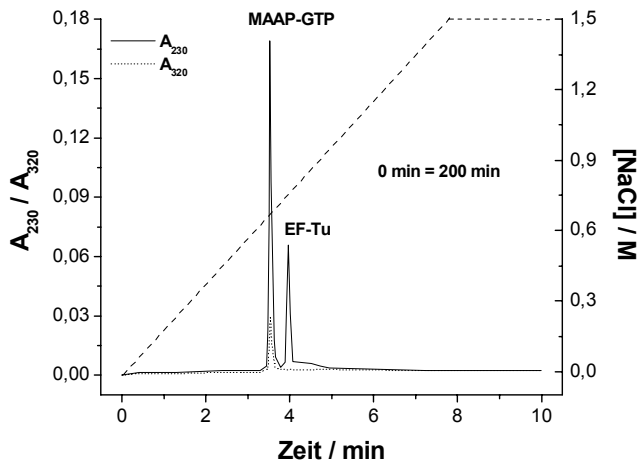


Abb. 3.3.2 HPLC-Test der MAAP-GTP-Hydrolysestabilität an ET 250/4 Nucleosil 4000-7 PEI. Der Ansatz enthielt bei 37°C in 150 µl TCB-Puffer : 40 µM EF-Tu_f und 35 µM MAAP-GTP. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0-200 min) wurden 20 µl mit HPLC-Puffer B auf 50 µl verdünnt und auf die HPLC-Säule aufgetragen. Puffer A : 10 mM Tris (pH 8.2), 6 M Harnstoff. Puffer B : 10 mM Tris (pH 8.0), 6 M Harnstoff, 1.5 M NaCl. Die gestrichelte Linie zeigt die NaCl-Konzentration an.

Die HPLC-Analyse zeigte, auch nach 200 min Inkubation, keine Hydrolyse von MAAP-GTP. Dieses Ergebnis bekräftigt die Aussage der Fluoreszenzexperimente (Abb. 3.3.1). Das MAAP-GTP kann man daher als ein durch EF-Tu nichthydrolysierbares GTP-Analog klassifizieren. In der Literatur sind auch andere nicht hydrolysierbare Phosphoester und Phosphoamidite von GTP, z.B. caged-GTP, beschrieben (Cepus et al., 1998), (Zor et al., 1998). Die über 90% hohe Ausbeute, mit welcher das MAAP-GTP präpariert werden konnte (Kapitel 3.1.2) deutet zusätzlich auf eine hohe Stabilität des Analogs in Lösung hin. Anschließend wurde noch die pH-Stabilität des MAAP-GTP in der Abwesenheit von EF-Tu untersucht (Abb. 3.3.3).

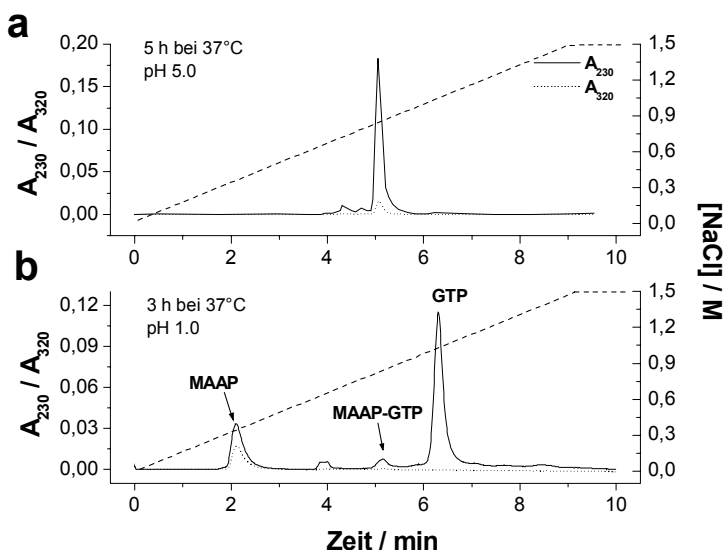


Abb. 3.3.3 HPLC-Analyse der pH-Stabilität von MAAP-GTP. (a) Bei pH=5.0; (b) bei pH=1.0. Es wurde 100 µM MAAP-GTP in 50 mM Hepes bei angegebenen pHs und 37°C inkubiert und 20 µl auf eine ET 250/4 Nucleosil 4000-7 PEI Säule aufgetragen. Puffer A: 10 mM Tris (pH 8.2). Puffer B: 10 mM Tris (pH 8.0), 1.5 M NaCl. Die gestrichelte Linie zeigt die NaCl-Konzentration an.

Das MAAP-GTP zeigte auch nach mehrstündiger Inkubation bei pH 5.0 keine Hydrolyse (Abb. 3.3.3a), erst bei $\text{pH} < 3.0$ konnten Hydrolyseprodukte festgestellt werden (Abb. 3.3.3b). Dabei verlief die eigentliche Hydrolyse durch eine Abspaltung von MAAP statt MAAP-Pi und es entstand dabei GTP statt GDP. Es wird folglich eine Phosphoamid- statt einer Phosphoanhydridbindung, die normalerweise viel labiler sein sollte, hydrolysiert. Weitere Untersuchungen würden für die Erklärung dieses Phänomens erforderlich sein.

3.3.2 Hydrolyse des DABP-GTP

3.3.2.1 Spontane DABP-GTP-Hydrolyse

Um die katalytische Wirkung des EF-Tu zu verstehen wurde die spontane DABP-GTP-Hydrolyse in Abwesenheit von dem Faktor untersucht. Dazu wurde DABP-GTP in TCB-Puffer bei 35°C inkubiert und der Verlauf der Hydrolyse durch eine Anionenaustauscher-HPLC, wie in Abbildung 3.3.3 beschrieben detektiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.4 dargestellt.

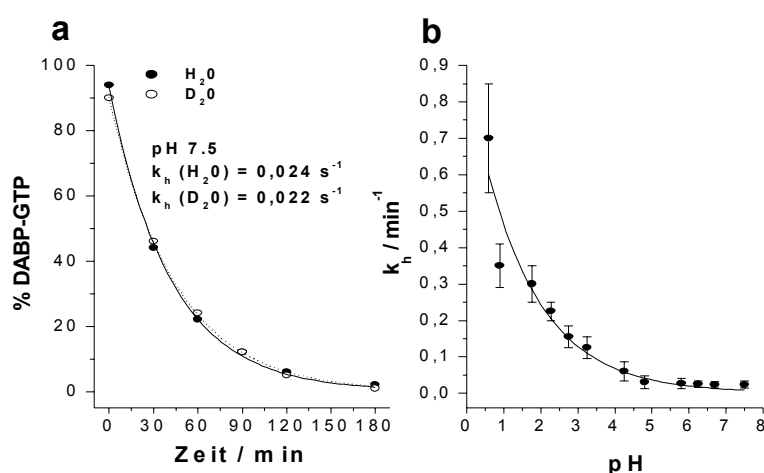


Abb. 3.3.4
Anionenaustauscher-HPLC-Analyse der spontanen DABP-GTP-Hydrolyse.

(a) Es wurde $50 \mu\text{M}$ DABP-GTP in TCB-Puffer bei 35°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden $35 \mu\text{l}$ wie in Abb. 3.3.2 beschrieben analysiert. (b) Die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitsrate der Hydrolyse. Der pH wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

Die DABP-GTP-Hydrolyse ist stark pH-abhängig (Abb. 3.3.4b), wobei DABP-GTP spontan bei 35°C und pH 7.5 mit einer Halbwertszeit von ca. $t_{1/2} = 30 \text{ min}$ ($k_h = 0.024 \text{ min}^{-1} = 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) hydrolysiert. Mit dieser Hydrolysegeschwindigkeit liegt die spontane DABP-GTP-Hydrolyse im Bereich der EF-Tu_{T.th.}-katalysierten GTP-Hydrolyse (Zeidler et al., 1996). Es ist denkbar, dass die Spaltung von DABP-GTP durch eine Protonierung des γ -Phosphates, wie es der Fall bei GTP ist (Schweins et al., 1995), initiiert wird. Um zu sehen, ob diese

Protonierung für die Reaktion kinetisch limitierend ist wurde die spontane Hydrolyse auch in D_2O untersucht. Bei einem neutralen pH konnte kein Isotopeneffekt auf die Hydrolysereaktion beobachtet werden (Abb.3.3.4a). Die spontane Hydrolyse konnte auch durch die Änderung des UV-Absorptionsmaximums während der Reaktion verfolgt werden (Abb. 3.3.5). Durch die DABP-GTP-Hydrolyse verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 350 nm zu ca. 320 nm. Bei niedrigeren pHs ($pH < 3.5$) wurde die Messung allerdings ungenau, da zu der λ_{max} -Änderung (350 \rightarrow 320 nm) nach kurzer Zeit ein entgegengesetzter Effekt (320 \rightarrow 350 nm) auftrat. Die Intermediate, vermutlich DABP-Pi mit der Phosphoamidbindung in der *meta*- resp. *para*-Position und potentiell auch ein zyklisches Phosphodiamid, werden dementsprechend kinetisch von der DABP-GTP-Hydrolyse nicht getrennt. Die UV-Methode ist daher im Vergleich zur HPLC-Analyse für quantitative Aussagen weniger geeignet.

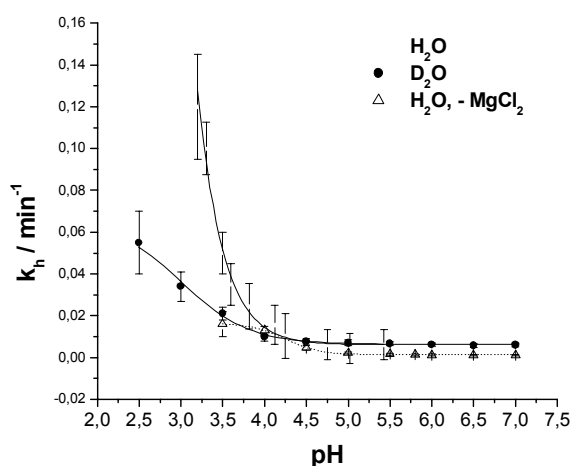


Abb. 3.3.5 Analyse der DABP-GTP-Hydrolyse durch λ_{max} -Änderung. Die Messungen wurden in einer Mikrotiterplatte bei RT durchgeführt. Die Ansätze enthielten in 100 μ l TCB-Puffer 70 μ M DABP-GTP. Die Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse (k_h) wurden durch eine Anpassung der Hydrolysedaten an eine einfach-exponentielle Funktion, $y=y_0 + Ae^{-kt}$, berechnet.

Bei saurem pH wurde die Hydrolyse deutlich langsamer, wenn man D_2O statt H_2O benutzte oder das Mg^{2+} -Ion aus dem Ansatz wegließ. Der starke Isotopeneffekt bei $pH < 3.5$ deutet auf einen Protontransfer während der DABP-GTP-Hydrolyse hin, obwohl man nicht völlig ausschließen kann, dass die Differenz in der Hydrolysegeschwindigkeit den Unterschied im pKa des γ -Phosphates im D_2O und H_2O reflektiert. Dieser Unterschied kann bis zu 0.4 pH-Einheiten betragen.

3.3.2.2 EF-Tu-katalysierte DABP-GTP-Hydrolyse

Wie schon in Abbildung 3.2.1 gezeigt wird DABP-GTP in der Gegenwart von EF-Tu rasch hydrolysiert. Der Zeitverlauf der Bindungsphase (ca. 2 s) ermöglichte es die Messungen in einem gewöhnlichem Fluoreszenzspektrometer durchzuführen (Abb. 3.3.6). Dabei wurde die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz des EF-Tu beobachtet (Kapitel 3.2.1)

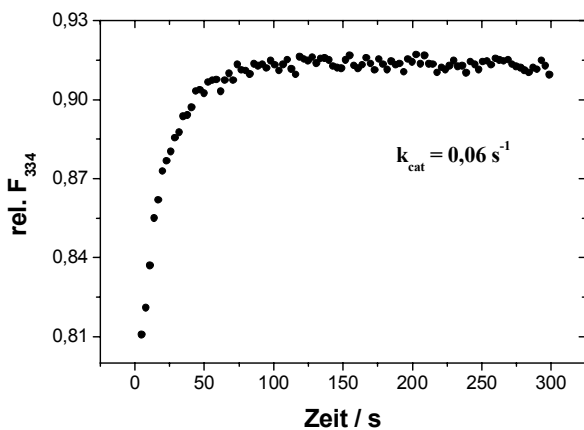


Abb. 3.3.6 Messung der DABP-GTP-Hydrolyse durch die Änderung der intrinsischen Trp-Fluoreszenz.

5.1 μM EF-Tu_F und 5 μM DABP-GTP in 0.5 ml TCB-Puffer bei 10°C. Die k_{cat} wurde aus einer einfach-exponentiellen Funktion, $y = y_0 + A \cdot e^{-k_{\text{cat}} \cdot t}$ berechnet.

Exzitationswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 334$ nm.

Die Messungen der DABP-GTP-Hydrolyse mittels Quenching der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz ergaben bei 10°C eine Hydrolysegeschwindigkeitskonstante (k_{cat}) von 0.06 s⁻¹.

Wittinghofer und Leberman (Wittinghofer and Leberman, 1979) beschreiben eine in der Anwesenheit von Divalenten Kationen qualitativ stärkere Bindung von GDP durch *B. stearothermophilus* EF-Tu als in deren Abwesenheit. In der Arbeit von Rütthard *et al.* (Rütthard *et al.*, 2001) ist in der Abwesenheit von Mg²⁺ eine für das GDP rund 30-fach und für das GTP 4-fach reduzierte Affinität zum *T. thermophilus* EF-Tu beschrieben. Der Einfluss von Mg²⁺-Ionen auf die DABP-GTPase wurde ebenfalls im Fluoreszenzassay bestimmt (Abb. 3.3.7).

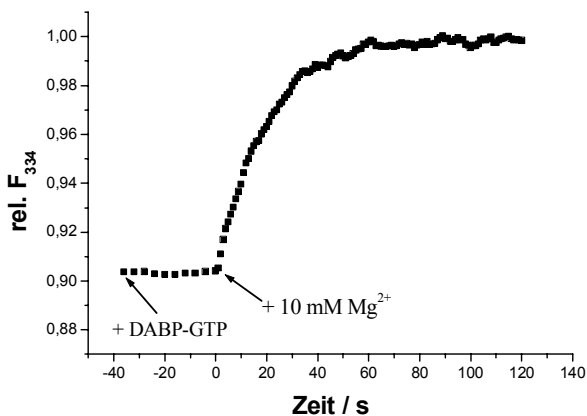


Abb. 3.3.7 Einfluss von Mg²⁺ auf die DABP-GTP-Hydrolyse. 5.1 μM EF-Tu_{FM} und 5 μM DABP-GTP in 100 μl TCB-Puffer ohne Mg²⁺ bei 10°C. Die Datenaquisition wurde durch die Zugabe von DABP-GTP gestartet. Nach 40 s wurde MgCl₂ zu 10 mM Endkonzentration zugegeben.

Exzitationswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 334$ nm.

Bei der Zugabe von 5 μM DABP-GTP zu einer 5.1 μM EF-Tu_{FM}-Lösung ohne Mg^{2+} -Ionen konnte keine Fluoreszenzänderung detektiert werden (Abb. 3.3.7). Erst nach der Einstellung der MgCl_2 -Konzentration auf 10 mM erfolgte eine DABP-GTP-Hydrolyse. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Affinität von DABP-GTP zu EF-Tu ($K_D = 1.5\text{-}3 \mu\text{M}$) durch das Fehlen des Mg^{2+} -Ions erniedrigt wird und das GTP-Analog bei den benutzten Konzentrationen keinen Komplex mit dem Faktor bildet. Weitere Experimente mit DABP-GppCH₂p zeigten, dass bei einer 5 μM -Konzentration von DABP-GppCH₂p und EF-Tu_{FM} schon eine 10 μM Mg^{2+} -Konzentration ausreichend für eine quantitative Komplexbildung ist.

Es wurden zahlreiche Mutationsstudien durchgeführt um Aminosäuren im aktiven Zentrum von EF-Tu, die an der GTP-Hydrolyse, Nukleotidbindung und Mg^{2+} -Koordination beteiligt sind zu identifizieren (Ahmadian et al., 1995), (Zeidler et al., 1996), (Zeidler et al., 1995), (Knudsen and Clark, 1995), (Krab and Parmeggiani, 1998). Die DABP-GTP-Hydrolyse wurde auch mit verschiedenen EF-Tu Varianten gemessen (Tab. 3.1.). Die Variante T62A wurde im Rahmen dieser Arbeit vorbereitet (Kapitel 3.5.1).

Tabelle 3.1. Geschwindigkeitskonstanten der GTPase und DABP-GTPase bei verschiedenen EF-Tu-Varianten.

EF-Tu Variante	GTPase bei 37°C	DABP-GTPase bei 10°C
	$k_{\text{cat}} [10^{-4} \text{s}^{-1}]^{\text{a}}$	$k_{\text{cat}} [10^{-4} \text{s}^{-1}]$
WT	5	600
H85Q	4	570
H85L	0.2	600
R59A	6.3	470
R59T	5	590
R57L	1.7	430
I61A	10	830
I61K	5.3	870
T62A	2	500
V20S	9.7	510

a) Außer für EF-Tu WT und die T62A Mutante sind die Daten für GTPase aus (Zeidler et al., 1995), (Zeidler et al., 1996), (Ahmadian et al., 1995), (Knudsen and Clark, 1995), und Rütthard H., 1998 (Dissertation)

Die Aminosäurenaustausche in den Switch-Regionen und die Mutation von Val20 im P-Loop des EF-Tu haben keinen großen Einfluss auf die DABP-GTPase. Die Unterschiede liegen meistens unterhalb 30 %. Die größte Differenz, eine knapp 50 %-ige Erhöhung der

Spaltungsrate, verursacht die Mutation Ile61Lys. Den getesteten Aminosäuren wurde eine Funktion bei einer Konformationsänderung, die während der Ribosomen-stimulierten GTP-Hydrolyse stattfindet, zugeschrieben (Krab and Parmeggiani, 1998), (Berchtold et al., 1993). Das Arg59 aus der Switch I-Region ist homolog zum Argininfinger in den $G\alpha$ -Proteinen und bildet eine starke Ionenbindung mit dem Asp87 aus der Switch II-Region. Dadurch werden die Switch-Regionen positioniert. Dem His85, das dem katalytischen Gln in Ras und $G\alpha$ -Proteinen entspricht, wurde eine Rolle bei der Positionierung und wegen der Basizität des Histidins auch bei der Aktivierung des attackierenden Wassermoleküls zugeschrieben. Der Imidazolring des His85 zeigt jedoch in der Kristallstruktur von EF-Tu*GppNHp in die Lösung und das Wassermolekül ist von ihm durch ein sogenanntes hydrophobe Tor aus Val20 und Ile61 gesichert (Berchtold et al., 1993). Bei der Bindung an das Ribosom wird die Effektorregion (41-62) wahrscheinlich reorientiert und die Ionenbindung Arg59-Asp87 gebrochen. Die eine Seite des hydrophoben Tors, Ile61 aus der Effektorregion, kann dabei geöffnet und das His85 durch eine Umklappung in die Bindungstasche gebracht werden (Krab and Parmeggiani, 1998), (Berchtold et al., 1993).

Alle getesteten EF-Tu-Varianten, darunter die mit mutiertem Thr62, einer Aminosäure die eine Wasserstoffbrücke zum γ -Phosphat bildet und das Mg^{2+} -Ion koordiniert (Berchtold et al., 1993), oder die Varianten mit ausgetauschten potentiellen intramolekularen Argininfingern der stimulierten GTPase, Arg59 und Arg57, (Sprinzl et al., 2000), zeigen eine vergleichbar zu EF-Tu WT ungestörte DABP-GTP-Hydrolyseaktivität. Zusätzlich ist die DABP-GTPase bei 10°C rund 120-fach und bei 37°C 780-fach (Kapitel 3.3.2.4) schneller als die GTPase.

3.3.2.3 Primärer Isotopeneffekt auf die DABP-GTP-Hydrolyse

Der primäre Isotopeneffekt, der Unterschied der Reaktionsgeschwindigkeit der Spaltung einer X-H oder X-D ($D = {}^2H$) Bindung (als k_H/k_D ausgedrückt), wird beim Studium der Protontransfer-Reaktionen verwendet (Fersht, 1985b). Hier wird ermittelt ob ein Protontransfer in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion stattfindet. Den Einfluss von D_2O auf die EF-Tu-katalysierte GTP- und DABP-GTP-Hydrolyse demonstriert Abbildung 3.3.8.

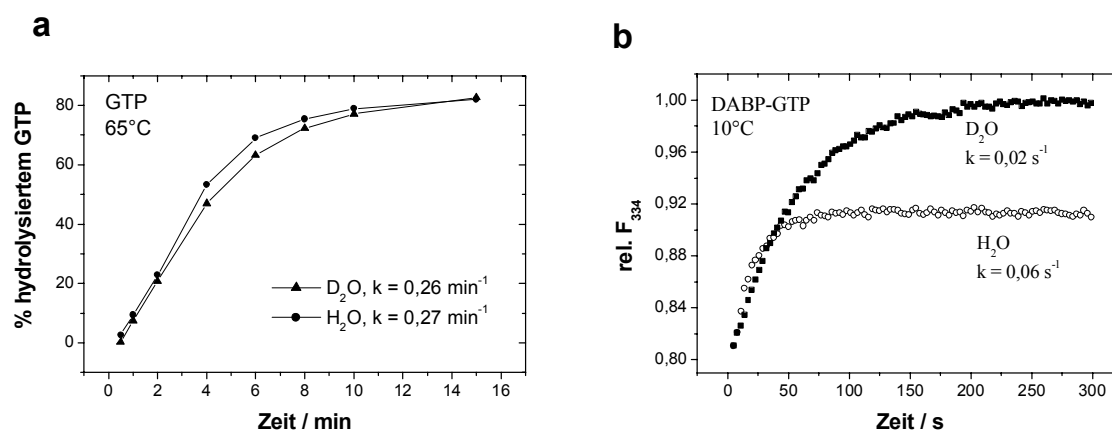


Abb. 3.3.8 Primärer Isotopeneffekt bei der (a) GTPase und (b) DABP-GTPase. (a) Die GTP-Hydrolyse erfolgte in H₂O und D₂O und wurde wie in dem Kapitel 2.2.21.1 beschrieben durchgeführt. (b) Fluoreszenzmessung der DABP-GTP-Hydrolyse in H₂O und D₂O. 5.1 μM EF-Tu_f und 5 μM DABP-GTP in 0.5 ml TCB-Puffer bei 10°C. Exzitationswellenlänge λ_{ex} = 280 nm, Emissionswellenlänge λ_{em} = 334 nm. Der TCB-Puffer in D₂O wurde durch wiederholtes Einrotieren von TCB-Puffer und Lösen in D₂O erhalten. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden aus einer einfach-exponentiellen Funktion, $y=y_0 + Ae^{-kt}$, berechnet.

Die intrinsische GTPase zeigte keinen Isotopeneffekt, k_H / k_D (GTP) ≈ 1 (Abb. 3.3.8a). Im Gegensatz dazu wurde bei der DABP-GTP-Hydrolyse zusätzlich zu einer Erhöhung der Fluoreszenzamplitude eine dreifach langsamere Hydrolyserate in D₂O als in H₂O beobachtet, k_H / k_D (DABP-GTP) ≈ 3 (Abb. 3.3.8b). Dementsprechend erfolgt bei der DABP-GTP-Hydrolyse, im Gegensatz zur GTP-Hydrolyse, ein Protontransfer in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und die zwei Mechanismen sind, zumindest kinetisch, nicht identisch.

3.3.2.4 Temperaturabhängigkeit der DABP-GTP-Hydrolyse

Laut der Übergangszustandstheorie kann man aus der Temperaturabhängigkeit einer Reaktion die thermodynamische Größen ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger , also die freie Aktivierungsenergie, Enthalpie und Entropie berechnen, z.B. (Fersht, 1985c). Aus der Gleichgewichtsthermodynamik, $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger = -RT \cdot \ln K^\ddagger$, und der Arrhenius-Gleichung $k_{cat} = A \cdot \exp(-E_a/RT)$ kann man folgende Abhängigkeit ableiten :

$$\ln k_{cat} = \ln A - \frac{E_a}{RT}, \text{ wo } E_a = \Delta H^\ddagger + RT \text{ und } A = \frac{k_b \cdot T}{h} \cdot e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}}$$

Dabei steht k_b für die Boltzmannsche- und h für die Plancksche-Konstante. Abbildung 3.3.9 zeigt die mittels Fluoreszenzexperimente erhaltenen Ergebnisse.

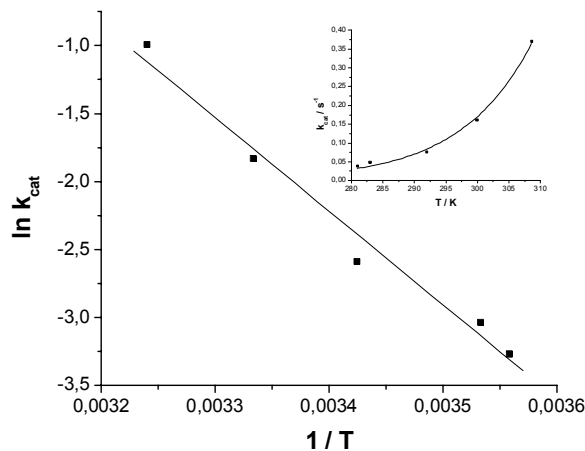


Abb. 3.3.9 Abhängigkeit der k_{cat} von der Temperatur (Arrhenius-Auftragung).

Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 8-37°C wie in Abb. 3.3.6 beschrieben. Das Insert zeigt die exponentielle Form der Arrhenius-Auftragung.

Der $\ln(k_{cat})$ -Wert wurde gegen $1/T$ aufgetragen und die thermodynamischen Größen aus den Regressionsparametern a und b ($\ln k_{cat} = a + b \cdot 1/T$) berechnet:

$$\Delta H^\ddagger = -R \cdot (b + T), \Delta S^\ddagger = R \cdot (a - \ln \frac{k_b \cdot T \cdot e}{h}) \text{ und } \Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$$

Für die EF-Tu-katalysierte DABP-GTP-Hydrolyse wurden folgende Aktivierungsparameter für 10°C erhalten: $\Delta H^\ddagger = 55 \pm 5$ kJ/mol, $\Delta S^\ddagger = -96 \pm 9$ J·mol⁻¹·K⁻¹, $\Delta G^\ddagger = 82 \pm 8$ kJ/mol.

3.3.2.5 Das Produkt der DABP-GTP-Hydrolyse

In Kapitel 3.3.2.2 wurde gezeigt, dass DABP-GTP durch EF-Tu_{T.th.} bei 10°C mit einer Halbwertszeit von ca. $t_{1/2} = 17$ s hydrolysiert wird. Diese schnelle Hydrolyse wurde, anders als die GTP-Hydrolyse, in D₂O langsamer (Kapitel 3.3.2.3), was auf einen Unterschied im Mechanismus der Hydrolyse hindeutet. Um das Produkt der DABP-GTPase zu identifizieren wurden EF-Tu und GDP nach der Reaktion durch eine RP-Chromatographie an Sep-Pak C18 wie in Kapitel 2.2.27.3 entfernt und das Hydrolyseprodukt mittels ESI-MS identifiziert (Abb. 3.3.10).

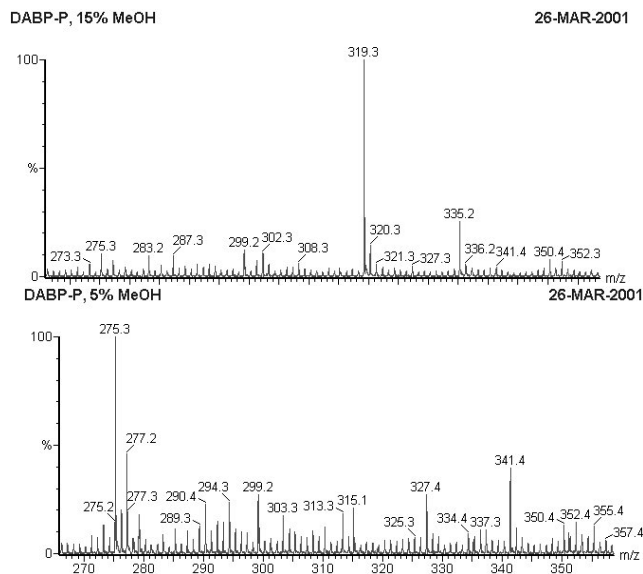
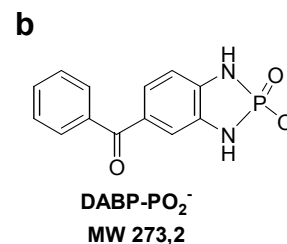
a

Abb. 3.3.10 (a) ESI-Massenspektren des Produktes der DABP-GTPase. Das Produkt der Hydrolyse wurde mit 5 % und 15 % Acetonitril aus der Sep-Pak C18 Säule eluiert (Kapitel 2.2.27.3) und die Acetonitril-Fractionen durch ESI-MS vermessen.

MS-Einstellungen : Kapillarspannung 3200 V, *Sample cone* 40 V, RF-Linse 200 V, desolvatisierung Temp. 150 °C, *Source Temp.* 120°C. Das Signal bei $m/z=275$ entspricht dem Molekularion $[\text{DABP-PH}_2]^+$ und $m/z=319$ entspricht dem $[\text{DABP-PNa}_2]^+$.

(b) Struktur des zyklischen Phosphodiamids.



Durch die GTP-Hydrolyse entsteht GDP und inorganisches Phosphat, Pi. Analog entsteht bei der DABP-GTP-Spaltung GDP und das Pi wird in der Form von DABP-Pi vom DABP-GTP abgespalten. Die ESI-MS-Spektren bestätigen, dass es sich bei der DABP-Pi Spezies um ein zyklisches Phosphoamid handelt (Abb. 3.3.10b). Das DABP-GTP wird demzufolge durch eine intramolekulare Aminolyse und nicht durch eine Hydrolyse gespalten.

3.4 GTP-Analoga bilden einen ternären Komplex mit EF-Tu und aa-tRNA

Wie auch der Name, GTP-Analoga, besagt sollten DABP-GTP und MAAP-GTP das GTP in seiner Funktion substituieren. Die Fähigkeit der GTP-Analoga einen ternären Komplex zu bilden wurde mittels Bandenretardations- (Kapitel 2.2.5.4) und Hydrolyseschutz-experimenten qualitativ überprüft (Kapitel 2.2.25). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4.1 gezeigt.

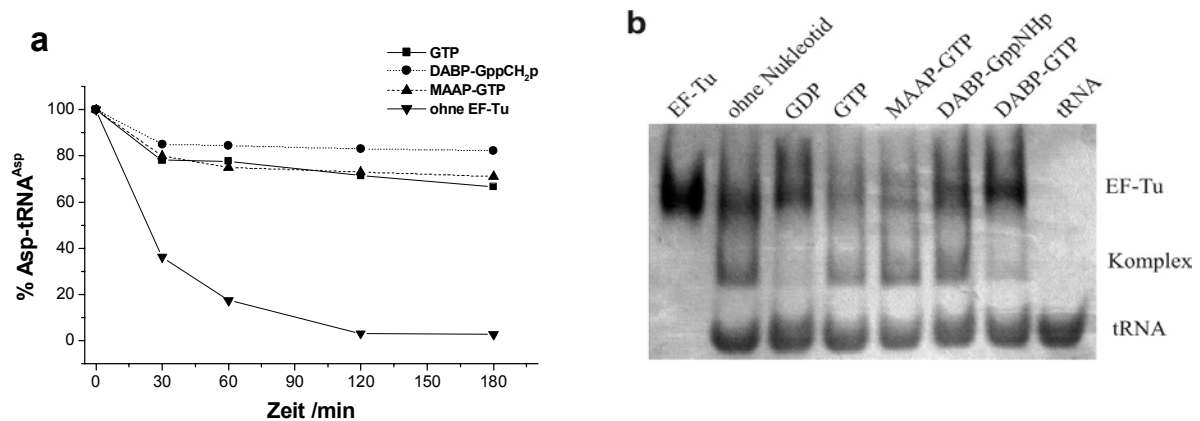


Abb. 3.4.1 Bildung des ternären Komplexes in Gegenwart von der GTP-Analoga. (a) EF-Tu-vermittelter Schutz der Aminoacylbindung von Asp-tRNA^{Asp} vor Hydrolyse. Der Ansatz enthielt 1 μ M *T.th.* Asp-tRNA^{Asp}, 5 μ M EF-Tu_f und 8 μ M Nukleotid. Die Analyse erfolgte wie in Kapitel 2.2.24 beschrieben. **(b) Bandenretardationsexperiment.** Die Ansätze enthielten in 10 μ l TCB-Puffer : 7 μ M EF-Tu_f, 34 μ M *T.th.* Phe-tRNA^{Phe} und je 100 μ M Nukleotid.

Der EF-Tu schützt im Komplex mit den nichthydrolysierbaren Analoga, DABP-GppCH₂p und MAAP-GTP, die Aminoacylbindung der Asp-tRNA^{Asp} vor der Hydrolyse (Abb. 3.4.1a) und verursacht eine Bandenretardation von der Phe-tRNA^{Phe} in der nativen PAGE (Abb. 3.4.1b). Wie schon auf Grund der schnellen Hydrolyserate des DABP-GTP erwartet (Kapitel 3.3.2.2), vermittelt DABP-GTP nur eine unspezifische Komplexbildung (vergleiche mit der GDP-Spur) zwischen EF-Tu und der aa-tRNA in der nativen PAGE (Abb. 3.4.1b). Da die benutzten Konzentrationen von EF-Tu und aa-tRNA im Bandenretardationsexperiment deutlich über dem K_D -Wert für die Bindung von nuklotidfreiem EF-Tu_f und aa-tRNA von ca. 2 μ M liegen, ist ebenfalls eine Komplexbildung in der Abwesenheit vom Nuklotid zu sehen (Abb. 3.4.1b, Bahn: ohne Nukleotid).

3.5 Die Variante EF-Tu T62A

Die Kristallstruktur von EF-Tu*GppHp zeigt, dass Thr 62 an der Interaktion mit dem γ -Phosphat und an der Koordination des Mg²⁺-Ions beteiligt ist (Berchtold et al., 1993). Es wurde beschrieben, dass die EF-Tu T62A Mutante bei 37°C nur 10% der intrinsischen GTPase-Aktivität von Wildtyp EF-Tu besitzt (Ahmadian et al., 1995). Die Thr62A Mutante (Tab. 3.1) diente als Negativkontrolle beim Vergleich der GTPase und DABP-GTPase (Kapitel 3.3.2.2).

Das Gen für die EF-Tu T62A Variante aus *T. thermophilus* wurde wie in Kapitel 2.2.9-2.2.11 beschrieben unter Kontrolle des *lacZ*-Operons zwischen die *Nde*I- und *Hind*III-Schnittstellen des Expressionsvektors pET-30a kloniert und in den *E.coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS übertragen.

3.5.1 Überexpression und Reinigung von EF-Tu T62A

Um die EF-Tu T62A Variante aus *T. thermophilus* überzuexprimieren wurden die transformierten *E. coli* BL21-Zellen in 10 l LB-Medium mit 25 µg/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Kanamycin wie in dem Kapitel 2.2.14.1 beschrieben kultiviert. Abbildung 3.5.1 zeigt die Wachstumskurve und die SDS-PAGE-Analyse der Expression.

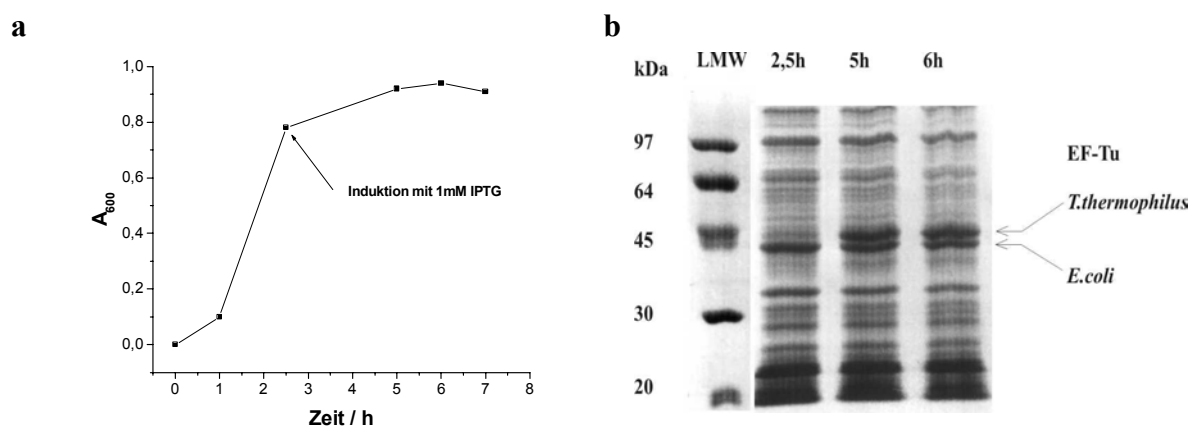


Abb. 3.5.1 Expression der EF-Tu T62A Variante in *E. coli* BL21-Zellen (a) Wachstumskurve der *E. coli* BL21-Kultur. Kultur bei 37°C in LB-Medium. **(b) Analyse der Überexpression durch SDS-PAGE.** Es wurden die Zellysate nach 2.5 (vor Induktion), 5 und 6 Stunden aufgetragen.

Der *T. thermophilus* EF-Tu T62A wurde erst nach der Induktion exprimiert (Abb. 3.5.1b). 2.5 Stunden nach Induktion bildet er einen wesentlichen Teil des Gesamtzellproteins. Es wurden aus 10 l induzierter Kultur 26 g *E. coli* BL21-Zellen angereichert. Nach dem Zellaufschluss mittels Lysozym, DNaseI und Parr-Bombe (Kapitel 2.2.14.3) und Ultrazentrifugation wurden die Proteine aus dem gewonnenen S100 mit Ammoniumsulfat präzipitiert, zentrifugiert und gegen Puffer A dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine in Puffer A äquilibrierte Q-Sepharose FF Säule aufgetragen, mit Puffer A und anschließend mit einem linearen KCl Gradient gewaschen (Abb. 3.5.2). Zum Nachweis des EF-Tu in den Eluaten wurde die GDP-Bindungsaktivität der Fraktionen nach (Blank et al., 1995) getestet.

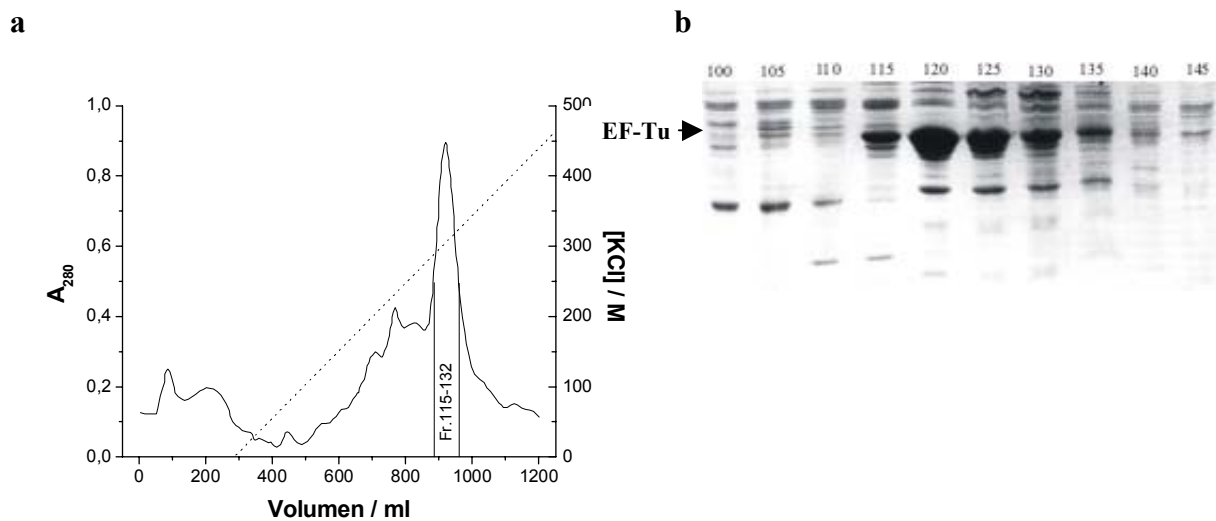


Abb. 3.5.2 Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF (a) Elutionsprofil. Linear ansteigender Gradient von 0 bis 400 mM KCl (gepunktete Linie). Die vereinigten Fraktionen sind markiert. **(b) Analyse der Fraktionen 100 bis 145 durch SDS-PAGE.**

Der EF-Tu eluiert bei etwa 300 mM KCl. Die SDS-PAGE Analyse zeigt neben zahlreichen schwachen Banden von *E. coli* Proteinen eine starke Bande von *T. thermophilus* EF-Tu T62A mit einem Molekulargewicht von ~45 kDa. Die vereinigten Fraktionen wurden nach Hitzedenaturierung und Ammoniumsulfat-Fällung mittels Gelpermeationschromatographie an Sepharose S-200 HR weiter gereinigt. Das in Abbildung 3.5.3 dargestellte Chromatogramm zeigt die erfolgreiche Entfernung größerer Proteine.

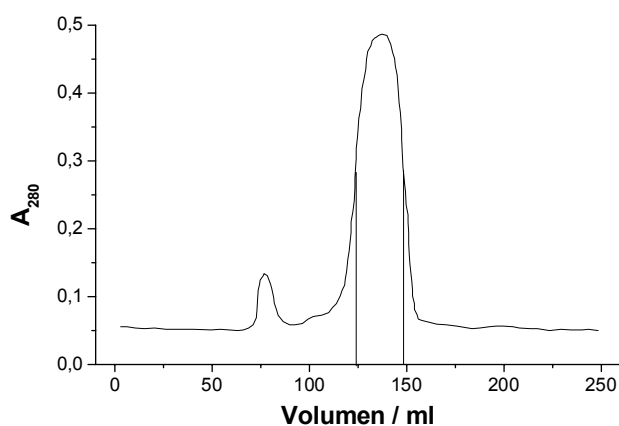


Abb. 3.5.3 Elutionsprofil der Gelpermeationschromatographie an Sepharose S-200 HR. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Die vereinigten Fraktionen der Gelpermeationschromatographie wurden nach Ammoniumsulfat-Fällung und anschließender Dialyse konzentriert, mit gleichem Volumen Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert. Abbildung 3.5.4 zeigt die SDS-PAGE Analyse der

einzelnen Reinigungsstufen und in Tabelle 3.2 sind die Daten der Proteinreinigung zusammengefasst.

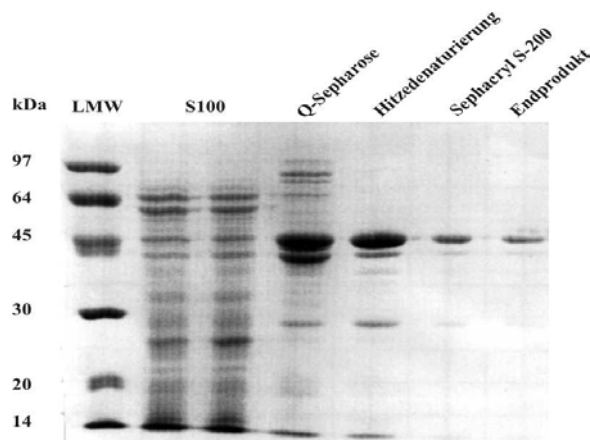


Abb. 3.5.4 SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der *T. thermophilus* EF-Tu T62A Variante.

Durch die Anionenaustauschchromatographie konnte ein Großteil der *E.coli* Proteine entfernt werden (Abb. 3.5.4). Der *E.coli* EF-Tu ist in der SDS-PAGE nach der Q-Sepharose knapp unter der *T. thermophilus* EF-Tu Bande zu sehen und konnte erfolgreich durch den folgenden Hitzeschritt abgetrennt werden. Die schwachen Banden, die auch nach der Gelpermeationschromatographie zusätzlich zu dem intakten EF-Tu vorhanden sind, deuten auf eine proteolytische Spaltung zwischen Arg59 und Gly60 hin. Es ist bekannt, dass diese Stelle hypersensitiv gegen Proteasespaltung ist (Zeidler et al., 1996).

Tab. 3.2 Übersicht über die Reinigung von *T. thermophilus* EF-Tu T62A Variante aus 26 g *E.coli* BL21 Zellen.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Ausbeute (% w/w)
S100	322	100
Q-Sepharose FF	154	47,8
Hitzedenaturierung	145	45,0
Sepharose S-200 HR	118	36,6
Endprodukt	44,2	13,7

Mit einem Molekulargewicht von 44651 Da entspricht 1 mg *T. thermophilus* EF-Tu ca. 22400 pMolen. Der isolierte EF-Tu T62A konnte 17300 pMole GDP / 1 mg Protein binden, was einer Aktivität von rund 80% entspricht. Die publizierten Ausbeuten von Wildtyp EF-Tu und seinen Varianten liegen unter 9 % (Blank et al., 1995) und H.Rütthard (Dissertation 1999), M.R.Ahmadian (Dissertation 1993). In dieser Arbeit wurden, auch wenn man die

Verluste bei der Ammoniumsulfat-Fällung nach der Gelpermeationschromatographie berücksichtigt (Tab. 3.2), mit rund 14% Ausbeute, bessere Ergebnisse erzielt. Das weist auf eine gute Überproduktion der *T. thermophilus* EF-Tu T62A Variante im *E. coli* System hin. Demzufolge ist die T62A-Mutation im *T. thermophilus* EF-Tu für die *E. coli* Zellen nicht toxisch.

3.5.1.1 Präparation von nukleotidfreiem EF-Tu_f T62A

Nukleotidfreier EF-Tu_f T62A wurde wie in Kapitel 2.2.16 beschrieben vorbereitet. Dazu wurde eine Kationenaustauscherchromatographie unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5.5 dargestellt.

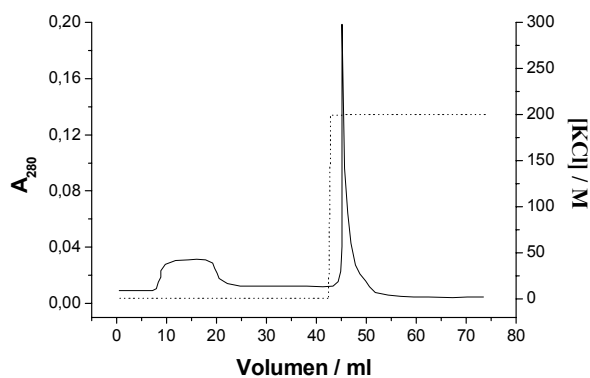


Abb. 3.5.5 Präparation von nukleotidfreiem EF-Tu_f T62A. Elutionsprofil der Kationenaustauscherchromatographie an CM-Sepharose CL-6B. Die gepunktete Linie zeigt die KCl-Konzentration an.

Das GDP ist im Durchbruch zu finden. Der EF-Tu kann mit 0.2 M Salz eluiert werden (Abb. 3.5.5). Bei dieser Präparation wurden aus 16 mg EF-Tu T62A 3 mg nukleotidfreier EF-Tu_f T62A präpariert, was einer Ausbeute von etwa 20% entspricht. Üblicherweise bewegen sich die Ausbeute um ca. 50%. Das deutet auf relativ große Verluste bei dieser Methode hin. Eine mögliche Erklärung ist die hochsensitive Anpassung des Optimums zwischen der CM-Sepharose-Kapazität, die deutlich unter pH 5.5 erniedrigt wird, und der Ladungsverteilung des EF-Tu (pI ~ 5.1) bei pH 5.65.

3.5.1.2 N-terminale Sequenzierung des 60-405 Fragmentes von EF-Tu_f T62A

Der EF-Tu aus *T. thermophilus* besitzt zwei hochsensitive Spaltstellen für Proteasen des Trypsin-Typs. Eine ist die Carboxylseite des Arg59 und die zweite die Carboxylseite des

Lys275. Bei einer Behandlung mit Trypsin entstehen hauptsächlich vier stabile Fragmente, Fragment 60-405 (MW 38310), Fragment 60-275 (MW 24239), Fragment 276-405 (MW 14089) und Fragment 1-59 (MW 6359). Die Spaltprodukte dissoziieren meistens nicht und koeluieren bei Chromatographieren mit dem intakten EF-Tu. Die labilste peptidische Bindung ist in der exponierten Switch I-Schleife zwischen Arg59 und Gly60 positioniert. Die Kinetik der Spaltung kann durch das molare Verhältnis EF-Tu : Trypsin so eingestellt werden das möglichst viel von dem Fragment 60-405 erhalten bleibt. Hier wurde ein Verhältnis EF-Tu : Trypsin von 1500 : 1 benutzt. Nach der Trennung der tryptischen Fragmente mittels 10 % SDS-PAGE und einer Übertragung der Peptide auf eine PVDF-Membran durch Western-Blotting wurden vier N-terminale Aminosäuren des 60-405 Fragmentes durch den Edman-Abbau sequenziert (ZMMK Servicelabor, Universität Köln). Die Abbildung 3.5.6 zeigt den Western-Blott nach der Färbung mit Ponceau S.

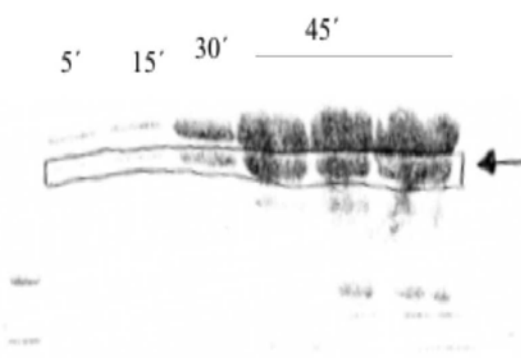


Abb.3.5.6 Western-Blott (PVDF-Membran) nach einer tryptischen Spaltung von EF-Tu_f T62A.

In einem Gesamtvolumen von 60 µl wurden 2.5 µM EF-Tu_f T62A und 1.25 nM Trypsin in TCB-Puffer bei 37°C inkubiert. Nach 5, 15, 30 und 45 min wurden 10 µl Aliquots entnommen und mit SDS-Probenpuffer und 20 mM PMSF gestoppt. Die tryptische Fragmente wurden mittels 10 % SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Ponceau S angefärbt. Das zu sequenzierende fragment 60-405 ist markiert.

Die Switch I-Region von *T. thermophilus* EF-Tu besitzt, ähnlich wie die von anderen GDP/GTP-Bindungsproteinen, eine hochkonservierte Sequenz 60-GITI-63. Die Edman-Sequenzierung des Fragmentes 60-405 lieferte die Sequenz 60-GIAI-63, was zusätzlich zu der DNA-Sequenzierung des veränderten *tufA*-Gens die erfolgreiche Mutation des Thr62 zu Ala und Reinigung des überexprimierten Proteins beweist.

3.5.2 Charakterisierung der EF-Tu T62A Variante

Die T62A Variante wurde für die Untersuchungen mit den GTP-Analoga (Kapitel 3.3.2.2) wegen ihrer bekannten gestörten GTPase-Aktivität (Ahmadian et al., 1995) als Negativ-kontrolle verwendet. Das Thr62 in *T. thermophilus* ist ein Teil der Switch I-Region und gilt als Sensor für die Anwesenheit resp. Abwesenheit des γ -Phosphates von GTP/GDP.

Gleichzeitig ist das Thr62 auch an der Koordination des zwischen den β - und γ -Phosphaten positionierten Mg^{2+} -Ions beteiligt (Berchtold et al., 1993); (Kjeldgaard et al., 1993).

Die Affinität von GDP zum EF-Tu T62A wurde durch die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}), wie in Kapitel 2.2.19 beschrieben, nach (Arai et al., 1974) erhalten. Die experimentellen Ergebnisse sind in Abbildung 3.5.7 gezeigt.

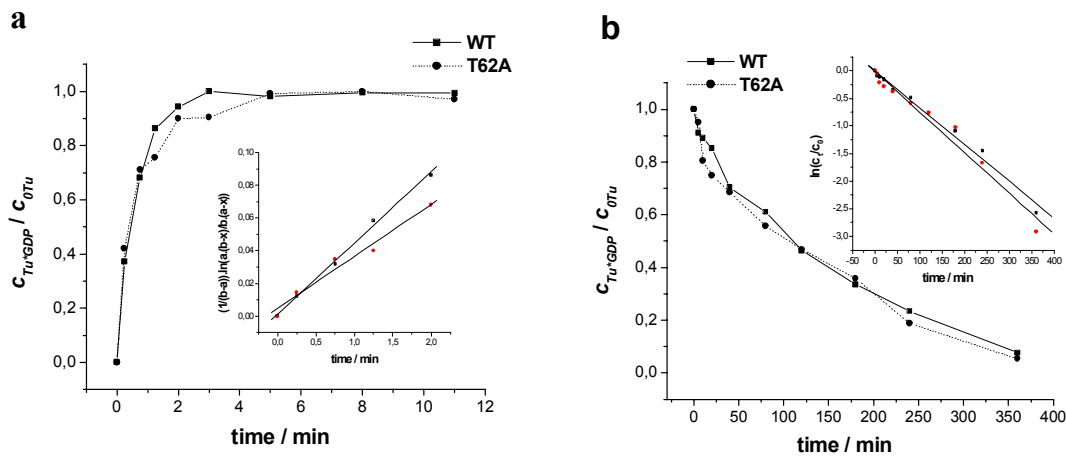


Abb. 3.5.7 Kinetik der Assoziation (a) und Dissoziation (b) von GDP bei 0°C. Die Inserts zeigen eine linearisierte Auftragung an. Zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_{on}) wurde nur die lineare Anfangsphase (die ersten 2 min) berücksichtigt.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und der Dissoziation (k_{off}) des binären Komplexes wurden durch eine lineare Regression aus folgenden kinetischen Gleichungen der zweiten bzw. ersten Ordnung berechnet:

$$\text{Assoziation} \quad \frac{1}{c_{Tu} - c_{GDP}} \cdot \ln \frac{c_{GDP} \cdot (c_{Tu} - c_t)}{c_{Tu} \cdot (c_{GDP} - c_t)} = k_{on} \cdot t$$

$$\text{Dissoziation} \quad \ln \frac{c_t}{c_0} = -k_{off} \cdot t$$

Wobei c_t und c_0 die Konzentrationen des binären Komplexes (EF-Tu*GDP) zur Zeit t und zu Beginn des Experimentes und c_{Tu} und c_{GDP} die angesetzten Konzentrationen von EF-Tu und GDP darstellen. In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tab. 3.4 Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) von EF-Tu T62A*GDP bei 0°C.

Variante	k_{on} [$M^{-1} \cdot s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]
EF-Tu WT	$7,3 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$0,15 \pm 0,04$
EF-Tu T62A	$5,3 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$0,23 \pm 0,07$
*EF-Tu WT	$3,1 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^{-4}$	1,1

*Aus (Arai et al., 1974). $K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$

Die experimentell gewonnenen Werte für die Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) des GDP unterscheiden sich im Rahmen des Messfehlers für EF-Tu WT und die T62A Variante nicht. Die gleichen Ergebnisse wurden auch von Ahmadian et al. (Ahmadian et al., 1995) beschrieben. Eine homologe Mutante im *E. coli* EF-Tu (T61A) zeigt zusätzlich eine ungestörte Affinität zum GTP (Krab and Parmeggiani, 1999). Die Hydroxylgruppe des Thr62 ist daher, trotz der Interaktion mit dem Mg^{2+} -Ion und dem γ -Phosphat, nicht essentiell für die Nukleotidbindung. Anders ist es mit der GTPase Aktivität. Die Mutation des Thr62 zu Ala im *T. thermophilus* EF-Tu führt, im Vergleich zum Wildtyp EF-Tu, zu einer nur ~10%-tigen GTP-Hydrolyseaktivität bei 37°C (Ahmadian et al., 1995). Die analoge Mutante von *E. coli* EF-Tu (T61A) hat weniger als 20 % der Wildtyp-Aktivität bei 30°C (Krab and Parmeggiani, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die GTPase Aktivität durch die Freisetzung und Trennung des [^{32}P] γ -Phosphates durch Dünnschichtchromatographie auf einer PEI-Cellulose wie in Kapitel 2.2.21.1 beschrieben bestimmt (Abb. 3.5.8).

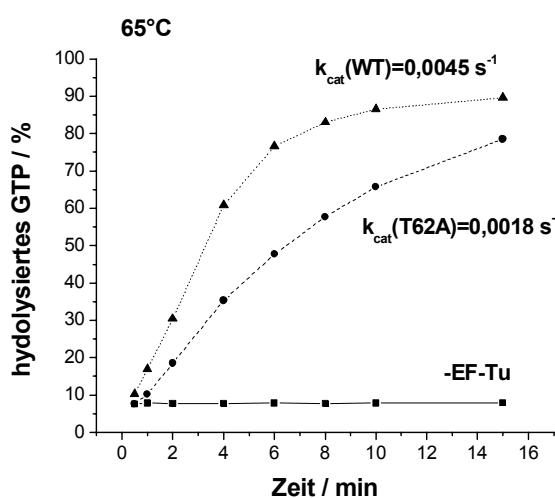


Abb. 3.5.8 GTP-Hydrolyse. (▲) EF-Tu WT, (●) T62A, (■) ohne EF-Tu. $k_{cat}(WT) = 4,5 \pm 0,6 \cdot 10^{-3} s^{-1}$, $k_{cat}(T62A) = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-3} s^{-1}$. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden aus einer mono-exponentiellen Gleichung, $y = y_0 + a \cdot e^{-k \cdot t}$, berechnet.

Die gemessene intrinsische GTPase Aktivität der T62A Variante betrug bei 65°C ca. 40 % der Wildtyp Aktivität (Abb. 3.5.8).

Es wurde bereits beschrieben, dass die T62A Variante eine, im Vergleich zum Wildtyp EF-Tu, 40-fach reduzierte Affinität zur Tyr-tRNA^{Tyr} hat und nur ~16% der Wildtypaktivität in der Poly(Phe)-Synthese mit der T62A Variante erreicht wurden. Zusätzlich konnte die intrinsische GTPase Aktivität der T62A Variante nicht durch Ribosomen stimuliert werden (Ahmadian et al., 1995). Die Poly(Phe)-Synthese wurde in dieser Dissertation an mit Poly(U)-programmierten *T. thermophilus* 70S Ribosomen wie in Kapitel 2.2.22 beschrieben getestet. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Translation sind in Abbildung 3.5.9 dargestellt.

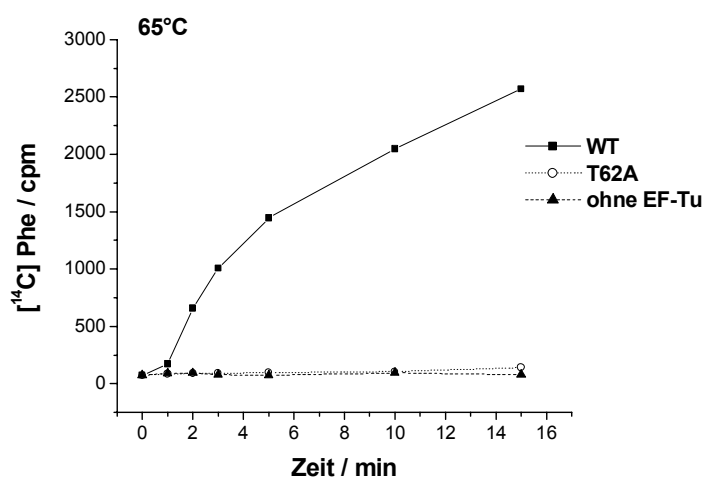


Abb. 3.5.9 Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese. (●) EF-Tu WT, (○) T62A, (▲) ohne EF-Tu. (1 pMol Phe entspricht ca. 600 cpm)

Der Verlauf der *in vitro* Translation mit dem Wildtyp EF-Tu zeigt, dass die Ribosomen und das Kontrollprotein (EF-Tu WT) aktiv sind. Nach dem Anfangsanstieg, auch „initial burst“ genannt, erreicht die poly(Phe)-Synthese eine Gleichgewichtsphase aus der man die aktive Ribosomenkonzentration bestimmen kann (Fersht, 1985a). Diese lag über 80 %, was eine sehr gute Ribosomenpräparation anzeigt. Die abgebildeten Ergebnisse besagen, dass die EF-Tu T62A Variante keine detektierbare Aktivität in dem *in vitro* Translationssystem aufweist. Das kann entweder durch eine schwächere Interaktion mit der aa-tRNA oder durch eine gestörte Dynamik der Switch I-Region und damit eine gestörte Ribosomen stimulierte GTPase Aktivität oder durch die Kombination beider Effekte verursacht werden (Ahmadian et al., 1995). Diese, zwischen G-Proteinen, stark konservierte Switch I-Region wird wegen ihrer Interaktion mit Effektoren auch Effektorschleife genannt und eine dort lokalisierte Mutation kann eine gestörte Interaktion mit den Ribosomen bewirken.

3.6 FRET zur Detektion des ternären Komplexes

In dieser Arbeit sollte auch die Komplexbildung zwischen EF-Tu und aa-tRNA mittels Fluoreszenzresonanz Energietransfer (FRET) untersucht werden. Für die FRET-Experimente war es erforderlich EF-Tu Doppelmutanten zu konstruieren. In EF-Tu wurde das Cys82 durch Ala ersetzt und zusätzlich, auf einer für die Modifikation mit einer Fluoreszenzreportergruppe und den Energietransfer zur tRNA geeigneten Position, ein Cystein eingeführt. Dazu wurde entweder die vorletzte Aminosäure am C-Terminus, das Leu404 oder ein nicht konserviertes Pro357 in einer exponierten Schleife der Domäne III zu Cystein mutiert. Die Reinigung der EF-Tu Cystein-Mutanten erfolgte analog zu der EF-Tu T62A Variante (Kapitel 3.5.1). Um die Oxidation der exponierten Cysteine zu verhindern wurde allen Puffern 10 mM statt 1 mM β -ME zugesetzt.

Zusätzlich musste auch die tRNA modifiziert werden. Für die Modifizierung wurde die tRNA^{Phe} aus *E. coli* ausgewählt. Sie enthält in der Position 47 eine modifizierte Base, acp3U47 (X-Base) (Sprinzl et al., 1998). Diese Base besitzt eine reaktive Aminogruppe, die sich unter schwach basischen Bedingungen relativ leicht mit aktivierten Säureestern modifizieren lässt. Die acp3U-Base ist in der Extra-Schleife lokalisiert und in dem ternären Komplex mit EF-Tu*GTP zeigt sie in die Richtung der Domäne III von EF-Tu (Nissen et al., 1996).

3.6.1 Überexpression und Reinigung von EF-Tu_{T.th.} C82A/L404C und P357C

Die Gene für die EF-Tu C82A/L404C und P357C Varianten wurden zwischen die *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstellen des Expressionsvektors pKK233-3 kloniert. Die Expression der Gene erfolgte im *E.coli*-Stamm DH10b, der den Vektor pREP4, der für das *lac*-Repressor Protein codiert, trug.

Die EF-Tu C82A Varianten wurden wie in Kapitel 2.2.14.1 beschrieben exprimiert. Die Wachstumskurven der überproduzierenden *E. coli* DH10b Zellen sind in Abbildung 3.6.1 dargestellt.

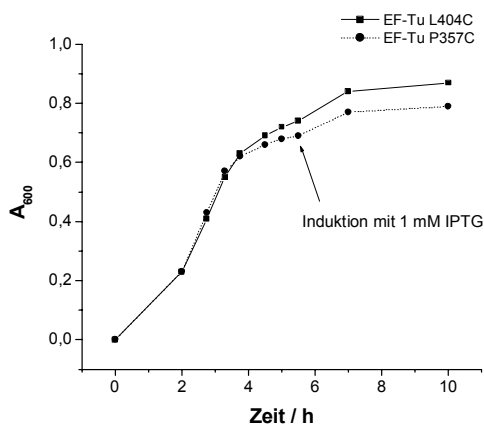


Abb. 3.6.1 Wachstumskurven der *E. coli* DH10b-Kulturen zur Überexpression der EF-Tu C82A Doppelmutanten. Kultur bei 37°C in LB-Medium.

Die DH10b Zellen wuchsen deutlich langsamer als die BL21 Zellen bei der Überexpression von der EF-Tu T62A Variante und erreichten nach 5,5 Stunden eine niedrigere Zelldichte als die BL21-Zellen nach 2,5 Stunden. Daher wurden die DH10b-Kulturen erst in der spätlogarithmischen Wachstumsphase induziert. Die Reinigung erfolgte analog zur EF-Tu T62A Variante (Kapitel 3.5.1), mit der Ausnahme, dass die Gelpermeationschromatographie an Sepharose S-200 zwei Mal durchgeführt wurde. Abbildung 3.6.2 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der einzelnen Reinigungsschritte und in Tabelle 3.3 sind die Reinigungsdaten zusammengefasst.

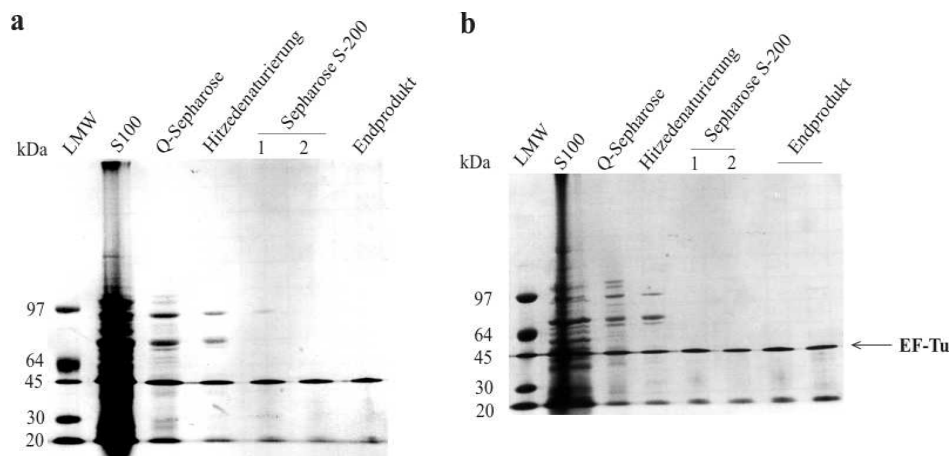


Abb. 3.6.2 SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der *T. thermophilus* EF-Tu C82A Doppelmutanten. (A) C82A/L404C und (B) C82A/P357C

Tab. 3.3 Übersicht über die Reinigungsschritte der *T.thermophilus* EF-Tu C82A Varianten aus der *E. coli* DH10b Zellen.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Ausbeute (% w/w)
L404C, 17 g Zellen		
S100	608	100
Q-Sepharose FF	120	19,7
Hitzenaturierung	62	10,2
Sepharose S-200 HR	24	3,9
Endprodukt	12	2,0
P357C, 15 g Zellen		
S100	150	100
Q-Sepharose FF	31	20,7
Hitzenaturierung	28	18,7
Sepharose S-200 HR	18	12,0
Endprodukt	11	7,3

Beide EF-Tu Varianten, C82A/L404C und C82A/P357C, wurden in *E. coli* DH10b Zellen schwächer exprimiert als die T62A Variante im *E. coli* BL21 Stamm (Kapitel 3.5.1). Obwohl die Ausbeute der Expression, insbesondere bei der C82A/L404C Variante, relativ niedrig war, reichte die Menge für die FRET-Experimente aus (Kapitel 3.6.8). Beide Varianten zeigten eine 90%-tige GDP-Bindungsaktivität.

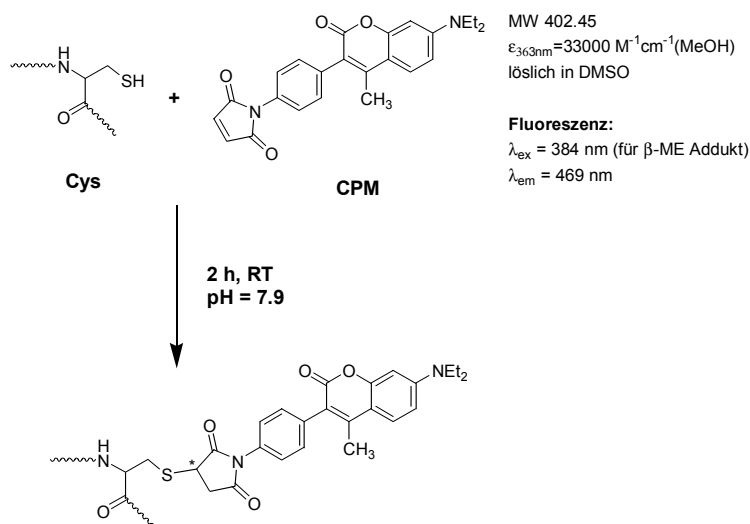
3.6.2 Modifikation der EF-Tu C82A/L404C und P357C Varianten

Die Kinetik der Bindung vom ternären Komplex an das Ribosom wurde intensiv durch kinetische *pre-steady state* Fluoreszenzexperimente mit Fluoreszenz markierten tRNAs und mant-dGTP untersucht (Rodnina et al., 1994), (Rodnina et al., 1995), (Pape et al., 1999). In diesen Arbeiten wurden fast ausschließlich tRNAs, die in der Dihydrouridin-Schleife mit Proflavin modifiziert wurden, verwendet. Die Bindung des ternären Komplexes in die ribosomale A-Stelle besteht aus mehreren Schritten (Pape et al., 1999). Durch die Verwendung vornehmlich eines Fluoreszenzreporters könnten die Ergebnisse einseitig interpretiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte deswegen ein alternatives, auf Fluoreszenz-basierendes System für die Interaktion vom ternären Komplex mit dem Ribosom etabliert werden. Die Bindung vom EF-Tu*GTP*aa-tRNA Komplex in die ribosomale A-Stelle sollte mittels des fluoreszenzmarkierten EF-Tu und dann mittels FRET zwischen markiertem EF-Tu und markierter tRNA untersucht werden.

Die beiden Cystein-Mutanten, C82A/L404C und C82A/P357C, von EF-Tu wurden wegen der räumlichen Nähe der Reste 404 und 357 zur acp3U47-Base der *E. coli* Phe-tRNA^{Phe} im ternären Komplex und ihrer exponierten Position für spätere Fluoreszenz- und FRET-Experimente präpariert. Die Cystein-Varianten vom EF-Tu C82A wurden analog zur T62A Variante überproduziert und gereinigt (Kapitel 3.6.1).

3.6.3 Modifikation der EF-Tu Varianten mit Coumarin-Maleinimid

Coumarin-Derivate sind fluoreszierende Farbstoffe mit relativ hohem Absorptionskoeffizienten und guten Quantenausbeuten. Wegen der Überlappung ihrer Emissionsbanden mit den Absorptionsbanden von Fluoreszein werden Coumarin-Derivate als Donor für FRET-Experimente benutzt. Das 7-Diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin (Schema 3.4), CPM abgekürzt, ist ein in Wasser schwer lösliches sulfhydrylspezifisches Coumarin-Derivat. Das Coumarin-Fluorophor kann durch die Maleinimidfunktionalität hochspezifisch mit Cysteinresten in einem Protein gekoppelt werden. Eventuelle Nebenreaktionen mit Lysinen bei schwachbasischem pH (7.0-8.0) sind deutlich geringer als bei Iodoacetyl-Derivaten. Die Ionisierungskonstante (pKa) der Seitenkette eines Cysteins liegt bei pH~9.0 und ein Teil der Population liegt bei einem schwachbasischen pH in der ionisierten Form vor. Die Reaktion erfolgt durch einen nukleophilen Angriff des ionisierten Thiolats an die Doppelbindung des Maleinimids. Es entstehen dabei, mit gleicher Wahrscheinlichkeit, zwei Stereoisomere (Schema 3.4). Das CPM fluoresziert erst nach der Reaktion und kann deswegen zum quantitativen Nachweis von Thiolen (im Picomol-Bereich) benutzt werden (Greiner et al., 1997).



Schema 3.4 Verlauf der Modifikation der Cystein-Varianten von EF-Tu und physikalische Daten des 7-Diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarins (CPM). Das Zeichen * zeigt die Position des asymmetrischen Zentrums an.

Die Modifizierung erfolgte für beide Cystein-Varianten in gleicher Weise. Die Reaktion wurde nach einer Reduktion mit Tris(carboxyethyl) Phosphin (TCEP) bei pH 7.9 in Gegenwart von EDTA und 30% DMF wie in Kapitel 2.2.29.1 beschrieben durchgeführt. Das TCEP stört bei der Reaktion nicht und muss daher nicht aus der Reaktionsmischung entfernt werden. Das EDTA soll in Spuren vorkommende Schwermetalle komplexieren und so die Thiole vor Oxidation schützen. Die relativ hohe DMF-Konzentration ist wegen der schwachen Wasserlöslichkeit des CPMs nötig. Nach der Reaktion wurden das überschüssige CPM und GDP durch eine Kationenaustauscherchromatographie entfernt. Abbildung 3.6.3 zeigt das Elutionsprofil für die EF-Tu C82A/L404C Variante.

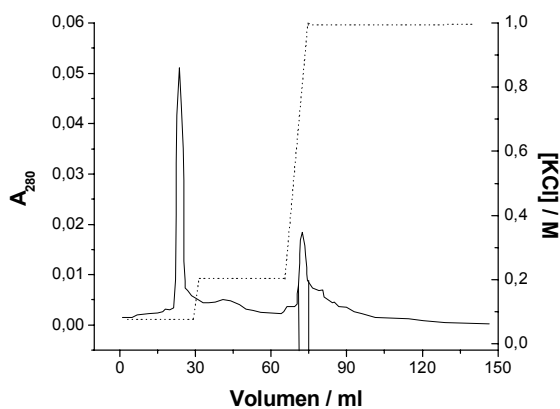


Abb. 3.6.3 Elutionsprofil der Kationenaustauscherchromatographie von EF-Tu C82A/L404C-CPM an CM-Sepharose CL-6B. Die gepunktete Linie zeigt die KCl-Konzentration an. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Der eingestellte pH bei der Chromatographie (pH=5.65) stellt einen Kompromiss zwischen der Bindungskapazität der CM-Sepharose und der Ladungsverteilung des EF-Tu (pI~5.1) dar. Das GDP und CPM waren im Durchbruch zu finden. Der markierte EF-Tu konnte mit 0.2 M Salz eluiert werden (Abb. 3.6.3). Wegen einer niedrigen Wiederfindungsrate des Proteins im Eluat wurde der Durchbruch auf einer Q-Sepharose rechromatographiert (Abb. 3.6.4).

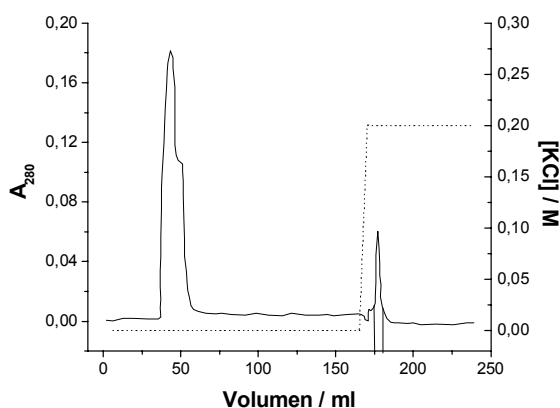
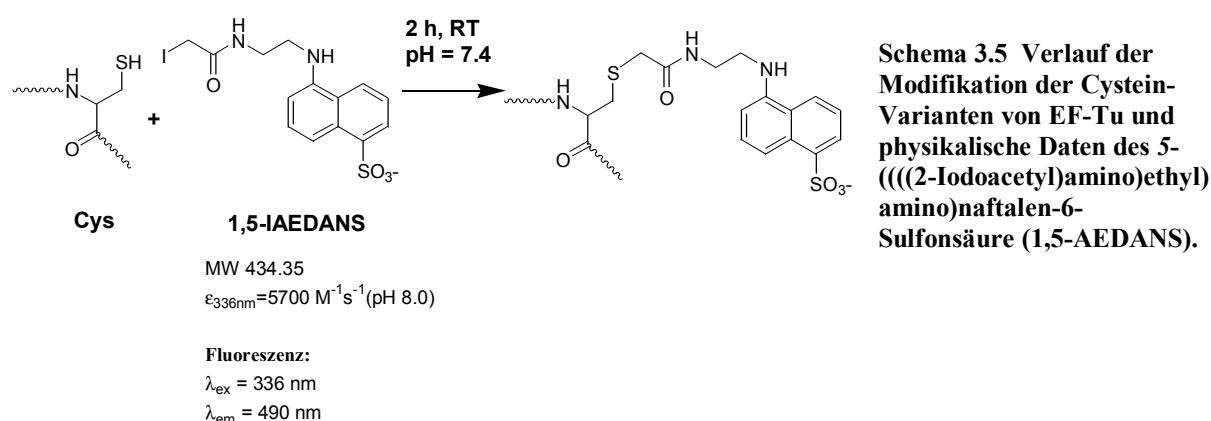


Abb. 3.6.4 Elutionsprofil der Anionenaustauscherchromatographie des Durchbruchs der CM-Sepharose an der Q-Sepharose FF. Die gepunktete Linie zeigt die KCl-Konzentration an. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Hier bindet der EF-Tu stärker und die Anionenaustauscher-Säule kann mit 0.2 M KCl gewaschen werden. Das Protein wird mit einer höheren Salzkonzentration (1 M) eluiert. Die Proteinpools aus den beiden Chromatographien wiesen eine Coumarin-Fluoreszenz auf. Die Modifikation und anschließende Reinigung lieferte EF-Tu_f C82A/L404C-CPM bzw. EF-Tu_f C82A/P357C-CPM mit einer Ausbeute unter 10%, basierend auf der EF-Tu Ausgangsmenge. Die Stochiometrie der Modifikation von 1-1.5 CPM / EF-Tu wurde unter Verwendung des Absorptionskoeffizienten von CPM ($\epsilon_{360} \sim 30000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnet.

3.6.4 Modifikation der EF-Tu Varianten mit 1,5-IAEDANS

Alternativ zu CPM wurden die EF-Tu Cystein-Varianten mit 1,5-IAEDANS (Schema 3.5) modifiziert.



1,5-IAEDANS ist ein oft verwendetes, bei neutralem pH negativ geladenes Fluorophor. Es ist ein thiolpezifisches Naftalen-Derivat das wegen dem großen Stokschen-Shift ($\lambda_{\text{ex}} = 336 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$) und sehr guter Überlappung mit der Exzitationsionsbande des Fluoreszeins häufig als Donor bei FRET-Experimenten gewählt wird. Die Nachteile der Iodoacetyl-Derivate sind ihre Photolabilität und die größere Gefahr von Nebenreaktionen mit Lysinresten. Die Modifikation von EF-Tu C82A/L404C und EF-Tu C82A/P357C mit 1,5-IAEDANS erfolgte nach der Reduktion mit Tris(carboxyethyl)Phosphin (TCEP) bei pH 7.4 (Kapitel 2.2.29.2). Die resultierenden Konjugate, EF-Tu C82A/L404C-AEDANS und EF-Tu C82A/P357C-AEDANS, tragen eine negative Ladung mehr als die Ausgangsproteine. Um die große Verluste bei der Kationenaustauschchromatographie an der CM-Sepharose CL-6B zu vermeiden wurden das überschüssige AEDANS und GDP durch eine

Gelpermeationschromatographie am Biogel P6 unter denaturierenden Bedingungen (Kapitel 2.2.29.2) entfernt (Abb. 3.6.5).

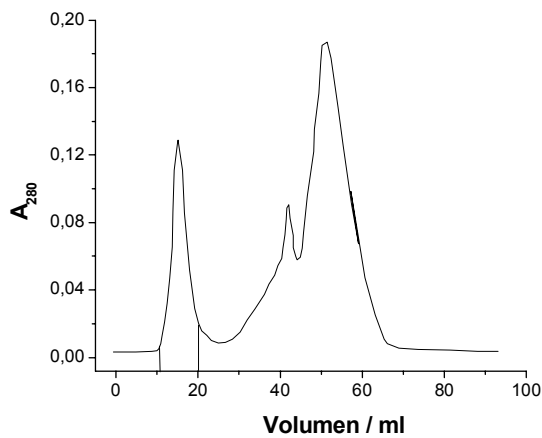


Abb. 3.6.5 Elutionsprofil der Gelpermeationschromatographie von EF-Tu C82A/L404C-AEDANS an Biogel P6. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Das modifizierte Protein eluierte im Durchbruch und konnte gut von den niedermolekularen Komponenten getrennt werden (Abb. 3.6.5). Die vereinigten Protein-Fractionen wiesen eine AEDANS Fluoreszenz auf. Die Modifikation und anschließende Reinigung lieferten EF-Tu_f C82A/L404C-AEDANS bzw. EF-Tu_f C82A/P357C-AEDANS mit einer Ausbeute von 90 bzw. 50 %, basierend auf der EF-Tu Ausgangsmenge. Die Stochiometrie der Modifikation von 1.3-2 AEDANS / EF-Tu wurde unter Verwendung des Absorptionskoeffizienten von AEDANS ($\epsilon_{336} \sim 5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnet.

3.6.5 Charakterisierung der modifizierten EF-Tu_f C82A/L404C und P357C Varianten

Bei der Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten EF-Tu Varianten wurde ein Denaturierungsschritt angewandt. Die Aktivität der Varianten in Nukleotidbindung, GTP-Hydrolyse, aa-tRNA Bindung und Poly(U)-abhängiger Poly(Phe)-Synthese wurde daher nach der Renaturierung getestet.

Die beiden Mutationen, L404C und P357C, sind weit von der Nukleotidbindungsstelle und von der Region der Domäne III, die mit der G-Domäne interagiert, entfernt. Folglich war es auch nicht wahrscheinlich, dass die Nukleotidbindung durch die Mutation und Modifikation gestört wurde. Die Stochiometrie der GDP-Bindung wurde wie in Kapitel 2.2.19.1 beschrieben getestet und die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6.6 und Tabelle 3.5 gezeigt.

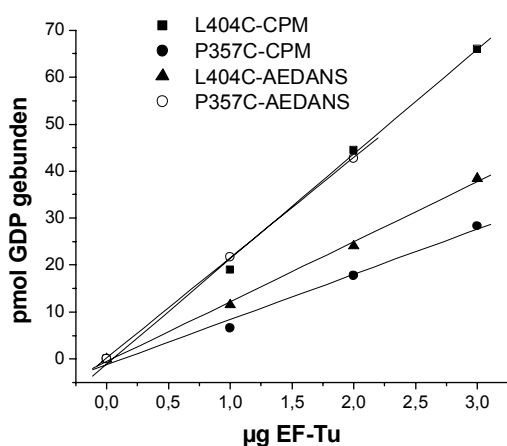


Abb. 3.6.6 GDP-Bindungstest der modifizierten EF-Tu_f Varianten. Die GDP-Bindungsaktivität der Varianten wurde durch einen Nitrocellulose-Filterbindungstest wie in Kapitel 2.2.19.1 beschrieben bestimmt. (1 µg EF-Tu entspricht 22.4 pMole)

Tab. 3.5 Spezifische Aktivität der modifizierten Varianten.

Variante	Spezifische Aktivität [pmol GDP / mg EF-Tu]
L404C-CPM	22000
P357C-CPM	10000
L404C-AEDANS	13000
P357C-AEDANS	21000

Aus dem Molekulargewicht von EF-Tu von 44651 Da ergibt sich eine 100%-ige Bindungsaktivität von 24000 pmol GDP / mg EF-Tu. Die spezifischen Aktivitäten von den EF-Tu_f P357C-CMP und L404C-AEDANS Varianten zeigen, dass bei der Präparation ca. 50% der Aktivität verloren gegangen sind. Die anderen zwei Varianten, Tu_f L404C-CPM und P357C-AEDANS, sind dagegen zu rund 90% aktiv in der Nukleotidbindung. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die 50%-tige Reduktion der GDP-Bindungsaktivität der ersten zwei Varianten durch die Modifikation verursacht wird. Die Differenzen in der Aktivität sind durch die Unterschiede in der Präparation auch nicht zu erklären, da die Varianten parallel vorbereitet wurden.

Zusätzlich wurde für die Coumarin-Konjugate auch die GDP-Bindungsaffinität gemessen. Die Messungen und Berechnungen der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation (k_{off}) und Assoziation (k_{on}) erfolgten, wie für die EF-Tu T62A Mutante beschrieben (Kapitel 3.5.2), nach (Arai et al., 1974). Die experimentellen Ergebnisse sind in Abbildung 3.6.7 und in Tabelle 3.6 dargestellt.

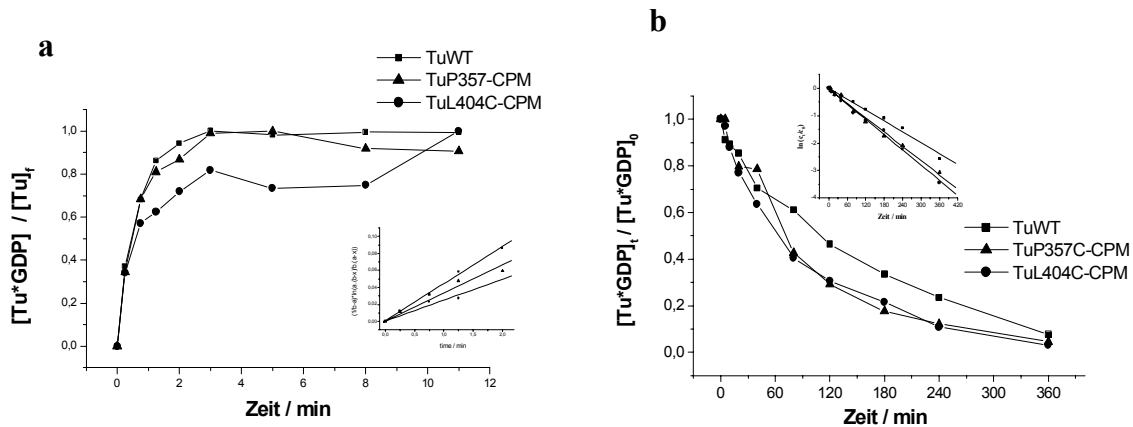


Abb. 3.6.7 Assoziationskinetik (a) und Dissoziationskinetik (b) der GDP-Bindung bei 0°C. Es wurden die Daten der Coumarin-Konjugate mit EF-Tu WT verglichen. Die Inserts zeigen eine linearisierte Auftragung an. Zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_{on}) wurde nur die lineare Anfangsphase (die ersten 2 min) berücksichtigt.

Tab. 3.6 Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) von EF-Tu Varianten bei 0°C.

Variante	k_{on} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
EF-Tu WT	$7,3 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$0,15 \pm 0,04$
EF-Tu L404C-CPM	$3,3 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$0,49 \pm 0,16$
EF-Tu P357C-CPM	$5,0 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$0,30 \pm 0,1$
*EF-Tu WT	$3,1 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^{-4}$	1,1

*Aus (Arai et al., 1974). $K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation von GDP und der modifizierten Varianten, EF-Tu_f C82A/L404C-CPM und P357C-CPM, unterscheiden sich im Rahmen des Messfehlers nicht von den Wildtyp Werten. Folglich sind auch die berechneten Bindungsaffinitäten ähnlich.

Die intrinsische GTPase Aktivität der EF-Tu_f C82A/L404C-CPM Variante wurde wie in Kapitel 2.2.21.1 beschrieben bestimmt.

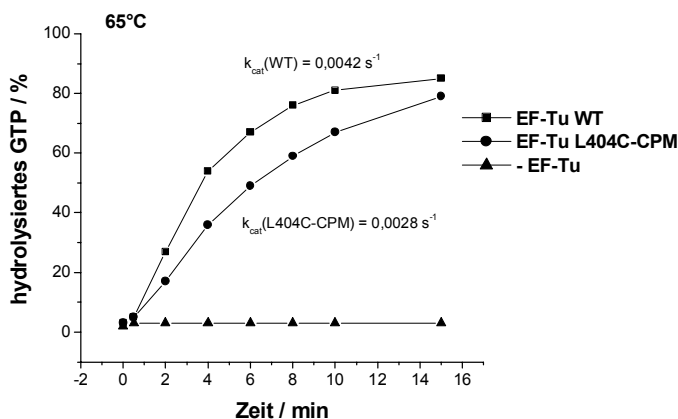


Abb. 3.6.8 GTPase der EF-Tu_f C82A/L404C-CPM Variante bei 65°C.

Abbildung 3.6.8 zeigt, dass der EF-Tu_f C82A/L404C-CPM ~70% der Wildtyp GTPase Aktivität besitzt. Damit ist auch die GTP-Hydrolyse durch die Mutation und Modifikation nicht erheblich gestört.

Die Fähigkeit der Varianten einen ternären Komplex zu bilden wurde durch Bandenretardationsexperimente (Kapitel 2.2.5.4), auch EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) genannt, qualitativ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6.9 gezeigt.

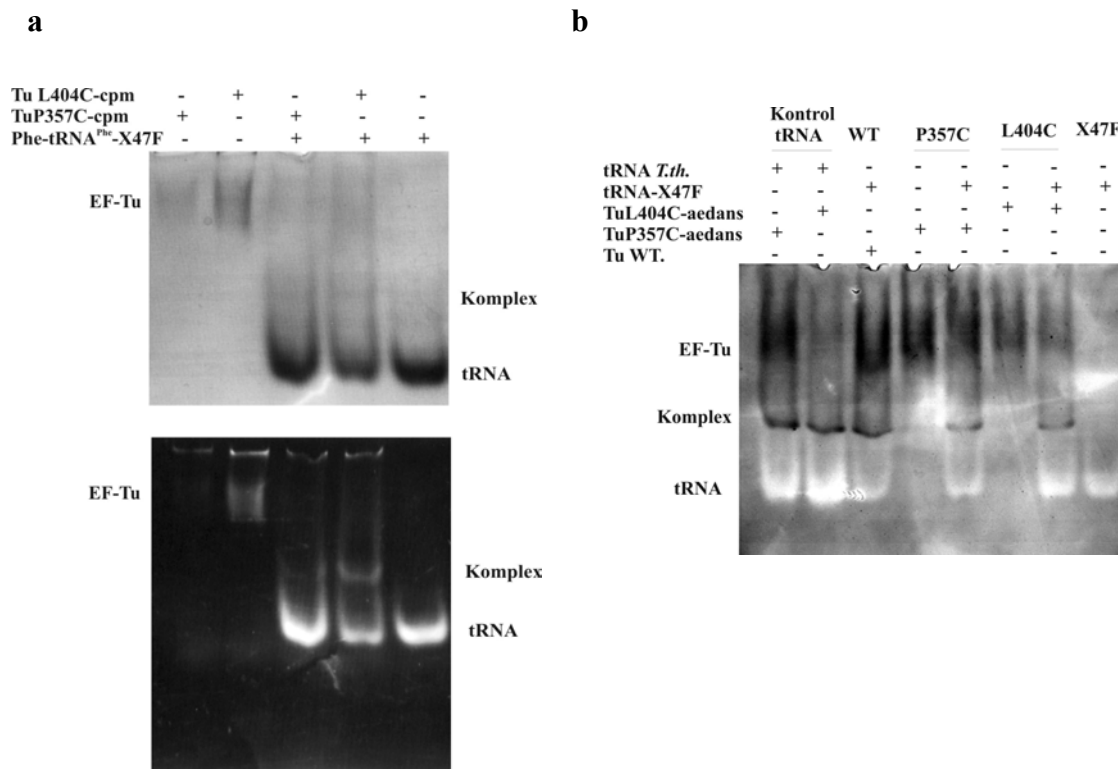


Abb. 3.6.9 EMSA zur Bestimmung der Wechselwirkung zwischen den modifizierten EF-Tu Varianten und aa-tRNA. Das Vorhandensein der einzelnen Komponenten ist mit + bzw. – dargestellt. Es wurden Phe-tRNA^{Phe} aus *T. thermophilus* (Kontrol tRNA) und eine an der X-Base mit Fluoreszein-modifizierte Phe-tRNA^{Phe}-X47F aus *E. coli* benutzt. **(a) Coumarin-Konjugate.** Coomassie/Toluidinblau Färbung (oben), Visualisierung mit UV-Licht (unten). **(b) AEDANS-Konjugate.**

Die Coumarin-Varianten von EF-Tu, L404C-CPM und P357C-CPM, verursachen eine Bandenretardation der Kontrol-tRNA (Phe-tRNA^{Phe} aus *T. thermophilus*) und der Fluoreszein markierten Phe-tRNA^{Phe}-X47F aus *E. coli* (Abb. 3.6.9). Die an der X-Base (acp3U47) markierte tRNA wurde für FRET-Experimente verwendet. Die EMSA-Experimente bestätigen, dass die modifizierten EF-Tu Varianten eine aa-tRNA binden können und die Modifikation der tRNA an der X-Base die Interaktion mit EF-Tu nicht stört.

Da die modifizierten EF-Tu Varianten bei Experimenten mit Ribosomen angesetzt werden sollten wurde ihr Verhalten in einem *in vitro* Translationssystem getestet. Die Experimente wurden wie in Kapitel 2.2.22 beschrieben durchgeführt und die Kinetik der Poly(Phe)-Synthese ist unten abgebildet (Abb. 3.6.10).

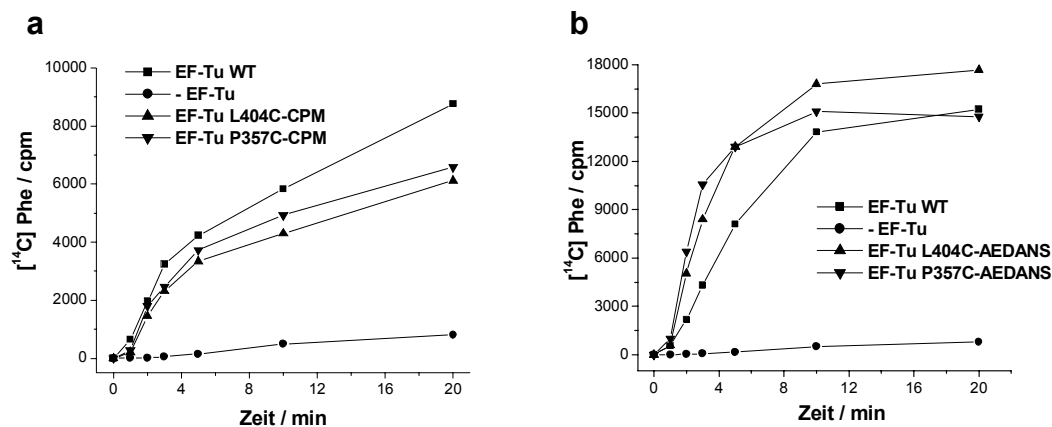


Abb. 3.6.10 Kinetik der poly(U)-abhängiger poly(Phe)-Synthese in Gegenwart von modifizierten EF-Tu Varianten. (a) Coumarin-Konjugate. (b) AEDANS-Konjugate. (1 pMol Phe entspricht ca. 600 cpm)

Alle modifizierte EF-Tu Varianten zeigen eine mit dem EF-Tu WT-vergleichbare Aktivität in dem *in vitro* Translationssystem. Demzufolge wird auch die Interaktion von den EF-Tu Varianten mit Ribosomen nicht durch die Modifikation beeinflusst.

3.6.6 Reinigung von *E. coli* tRNA^{Phe}

Die tRNA^{Phe} aus *E. coli* besitzt die modifizierte Base 3-(3-Amino-3-Carboxypropyl)Uridin (acp3U), auch X-Base genannt, an Position 47 (Sprinzl et al., 1998) und wurde deswegen für die Modifikation mit einem aminspezifischen Fluoreszein-Derivat präpariert. Die Reinigung erfolgte aus Wildtyp *E. coli* D10-Zellen wie in Kapitel 2.2.23 beschrieben.

Im ersten Schritt der Präparation wurden die Zellen durch eine Extraktion mit saurem Phenol lysiert und die Zellmembranen abgetrennt. Die zweite Extraktion mit Chloroform dient zur Entfernung der Phenolreste. Die wässrige Phase aus der Extraktion wurde auf einen Anionenaustauscher aufgetragen. Durch diese Chromatographie (Abb.3.6.11) wurden die tRNAs von den Proteinen, Nukleotiden, Metaboliten und von chromosomaler DNA getrennt.

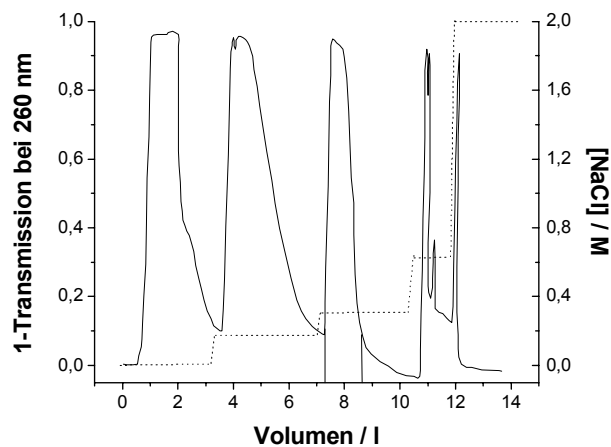


Abb. 3.6.11 Elutionsprofil der Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose. Die gepunktete Linie zeigt die NaCl-Konzentration an. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Pools mit unterschiedlicher Salzkonzentration wurden vereinigt. Eine tRNA eluiert normalerweise bei einer Salzkonzentration von 0.5-0.7 M. Bei dieser Präparation war der Großteil von der tRNA^{Phe} und den anderen tRNAs (tRNA^{bulk}) in dem 0.3 M NaCl-Pool zu finden. Viele der *E.coli* tRNAs aus diesem Pool wurden durch die folgende Chromatographie an BD-Cellulose, ein Anionenaustauscher, der mit hydrophoben Benzoyl-Resten modifiziert ist, von der tRNA^{Phe} abgetrennt (Abb. 3.6.12).

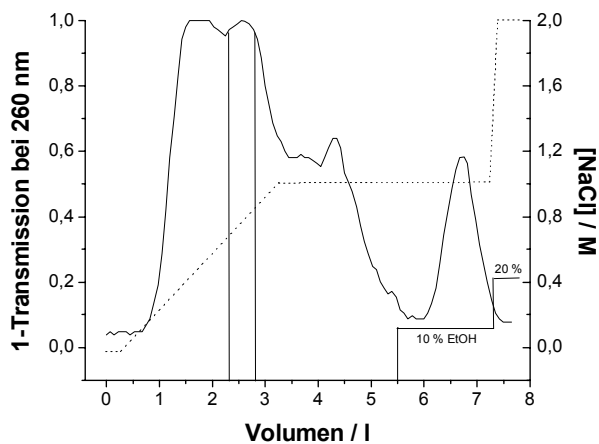


Abb. 3.6.12 Elutionsprofil der Chromatographie von tRNA^{bulk} an BD-Cellulose. Die gepunktete Linie zeigt die NaCl-Konzentration und die gezogene Linie die EtOH-Konzentration an. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Die tRNA^{Phe} eluierte bei 0.6-0.9 M NaCl. Für die folgende Trennung der einzelnen tRNA-Spezies wurden die Unterschiede in der Löslichkeit der tRNAs in einer Ammoniumsulfat-Lösung zu nutze gemacht. Dabei wurde die tRNA-Lösung zuerst vorsichtig mit Ammoniumsulfat an die Grenze der Löslichkeit, zu einer opaleszenten Lösung gebracht und auf eine mit 2 M Ammoniumsulfat äquilibrierte Sepharose CL-6B aufgetragen. Die tRNAs wurden dann bei pH 4.5 mit einem reversen, von 2 M bis 0 M, Ammoniumsulfat-Gradient eluiert. Die Fraktionen dieser Aussalzchromatographie (Abb. 3.6.13) wurden mittels

analytischer Aminoacylierungstests (Kapitel 2.2.24.3) geprüft und die tRNA^{Phe}-haltigen Fraktionen vereinigt.

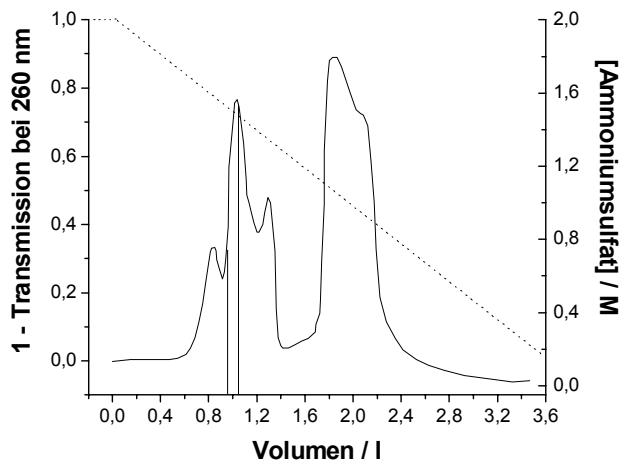


Abb. 3.6.13 Elutionsprofil der Aussalzchromatographie vom tRNA^{Phe}-Pool an Sepharose CL-6B bei pH 4.5. Die gepunktete Linie zeigt die (NH₄)₂SO₄-Konzentration an. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Die tRNA^{Phe} eluierte bei ~1.5 M Ammoniumsulfat. Der tRNA^{Phe}-Pool wurde im Folgenden zweimal durch eine Aussalzchromatographie bei pH 7.5 rechromatographiert (Abb. 3.6.14).

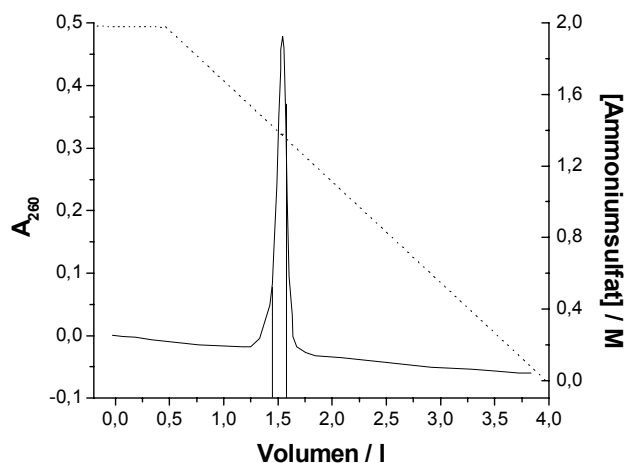


Abb. 3.6.14 Elutionsprofil der zweiten Aussalzchromatographie von tRNA^{Phe} an Sepharose CL-6B bei pH 7.5. Die gepunktete Linie zeigt die (NH₄)₂SO₄-Konzentration an. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Im neutralen pH eluierte die tRNA^{Phe} bei ~1.4 M Ammoniumsulfat. Die spezifische Aktivität, die Aminoacylierbarkeit der tRNA, zeigte, wie bei der Reinigung erwartet einen aufsteigenden Trend und erreichte ca. 800 pmol Phe / A₂₆₀ tRNA, wobei 1 A₂₆₀ tRNA 1500 pmol entspricht (Tab. 3.7). Eine denaturierende PAGE zeigte zusätzlich das Vorhandensein mehrerer Spezies in den aufgereinigten Pools. Deshalb wurde ein letzter Reinigungsschritt angeschlossen. Dabei wurde ein Teil der tRNA^{Phe} durch eine RP-HPLC gereinigt. Das Chromatogramm ist in Abbildung 3.6.15 dargestellt.

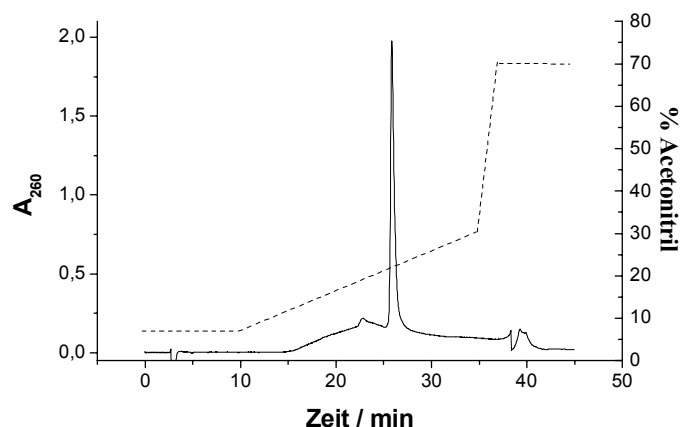


Abb. 3.6.15 Elutionprofil der RP-HPLC an EC 250/4 Nucleosil 500-5 C18 PPN. Es wurden 5 A_{260} tRNA^{Phe} aufgetragen. Puffer A : 95 mM TEAA (pH 7.0), 5 % (v/v) CH₃CN; Puffer B : 30 mM TEAA (pH 7.0), 70 % (v/v) CH₃CN. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 0.8 ml/min wie folgt : 10 min 5 % B, 24 min 5-30 % B, 1 min 30-100 % B und 10 min 100 % B. Die gestrichelte Linie zeigt die Acetonitril-Konzentration an.

Die tRNA^{Phe} eluierte bei der Ionenpaar RP-HPLC in einem scharfen Peak und konnte gut von den Verunreinigungen getrennt werden. In Tabelle 3.7 ist die Reinigung der tRNA^{Phe} aus *E. coli* zusammengefasst.

Tab. 3.7 Übersicht über die Reinigung von *E. coli* tRNA^{Phe} aus 456 g *E. coli* D10-Zellen.

Reinigungsschritt	gesamt tRNA	Aminoacylierungsaktivität	tRNA ^{Phe}
	[A ₂₆₀]	pmol Phe / A ₂₆₀ tRNA	[A ₂₆₀]
DEAE-Cellulose	42000	3,2*	84
BD-Cellulose	3400	20*	45
Sepharose CL-6B (pH 4.5)	160	770	82
1.Sepharose CL-6B (pH 7.5)	115	527	40
2.Sepharose CL-6B (pH 7.5)	42	590	17
RP-HPLC aus 10 A ₂₆₀	7,1	900	4,3

*Diese Werte stellen wegen einer großen Ungenauigkeit bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität nach der ersten zwei Säulen ein experimentellen Fehler dar.

Die Reinigung der *E. coli* tRNA^{Phe} aus *E. coli* D10-Zellen lieferte wiederholt relativ niedrige Ausbeuten mit einer Aminoacylierungsaktivität um 50 %. In dieser Arbeit wurden aus 456 g D10-Zellen knapp 40 A₂₆₀ tRNA^{Phe} mit einer Aminoacylierungsaktivität von 60 % (900 pmol Phe / A₂₆₀) gewonnen. Eine mögliche Erklärung der niedrigen Aminoacylierungsaktivität liegt in der potentiellen Untermodifizierung der Basen in der zellulären tRNA^{Phe}-Population.

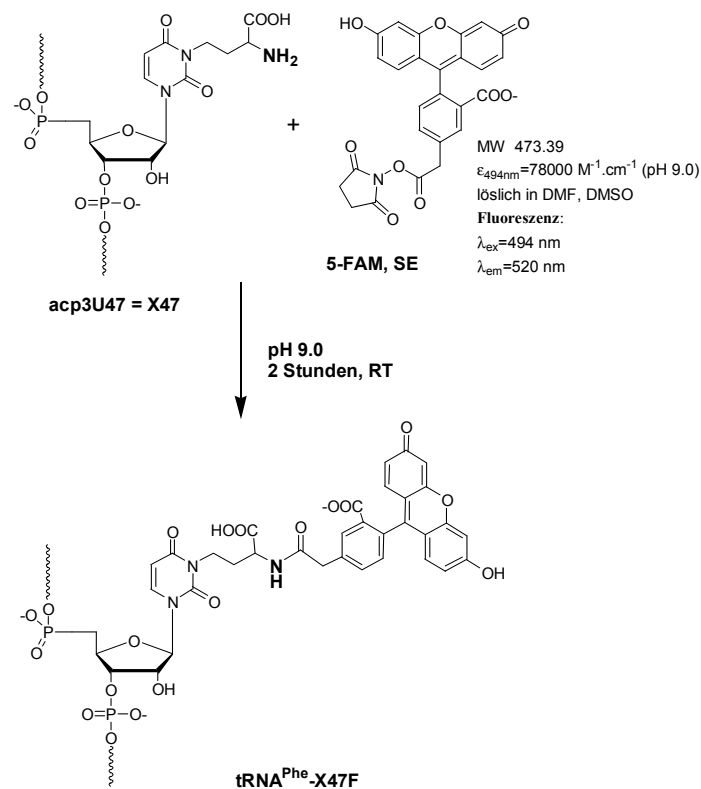
3.6.7 Modifikation von *E. coli* tRNA^{Phe} mit Fluoreszein-Succinimidester

Die tRNA^{Phe} aus *E. coli* enthält in der Position 47 eine modifizierte Base, acp3U (X-Base), mit einer reaktiven Aminogruppe, die sich unter schwach basischen Bedingungen

relativ leicht mit aktivierten Säureestern modifizieren lässt. Die acp3U-Base ist in der Extra-Schleife lokalisiert und in dem ternären Komplex mit EF-Tu*GTP zeigt sie in die Richtung der Domäne III von EF-Tu (Nissen et al., 1996).

Fluoreszein ist ein gut charakterisiertes Fluorophor, der oft bei Untersuchungen der Struktur und Funktion von Nukleinsäuren und Proteinen verwendet wird. Es besitzt einen hohen Absorptionskoeffizienten, der stark pH-abhängig ist. Fluoreszein emittiert im Bereich des blauen Lichts und seine Fluoreszenz neigt bei längerer Bestrahlung zum „photobleaching“.

Für die Markierung der *E.coli* tRNA^{Phe} wurde ein Succinimidyl Ester des 5-Carboxyfluoreszeins (FAM-SE) benutzt. Die Reaktion wurde bei pH 9.0 wie in Kapitel 2.2.30 beschrieben durchgeführt. Der Reaktionsablauf ist in Schema 3.6 dargestellt.



Schema 3.6 Verlauf der Modifikation von *E. coli* tRNA^{Phe} und physikalische Daten des 5-Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Esters (FAM-SE).

Die tRNA wurde nach der Markierungsreaktion direkt mit Ethanol gefällt. Die mit Fluoreszein markierte tRNA^{Phe}, tRNA^{Phe}-X47F, wurde präparativ aminoacyliert (Abb. 3.6.16). Die möglicherweise vorhandenen Reste von freiem FAM-SE, die Phe-tRNA-Synthetase (PheRS) und das überschüssige ATP wurden durch eine

Anionenaustauschchromatographie (Abb. 3.6.17a) entfernt und die Phe-tRNA^{Phe}-X47F durch eine Gelpermeationschromatographie entsalzt (Abb. 3.6.17b).

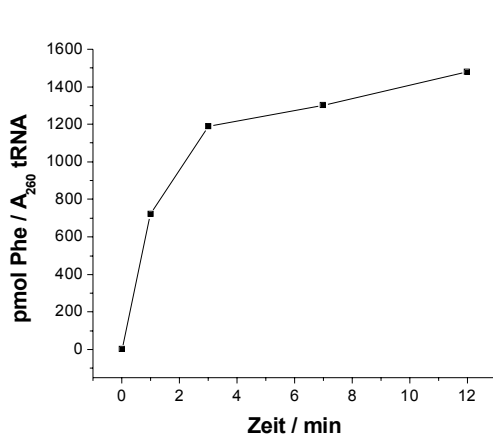


Abb. 3.6.16 Verlauf der Aminoacylierung der tRNA^{Phe}-X47F. Die Aminoacylierung von ca. 10 A₂₆₀ tRNA^{Phe}-X47F wurde wie in dem Kapitel 2.2.24.1 beschrieben durchgeführt. Zu den angegebenen Zeiten wurde 1 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und analysiert.

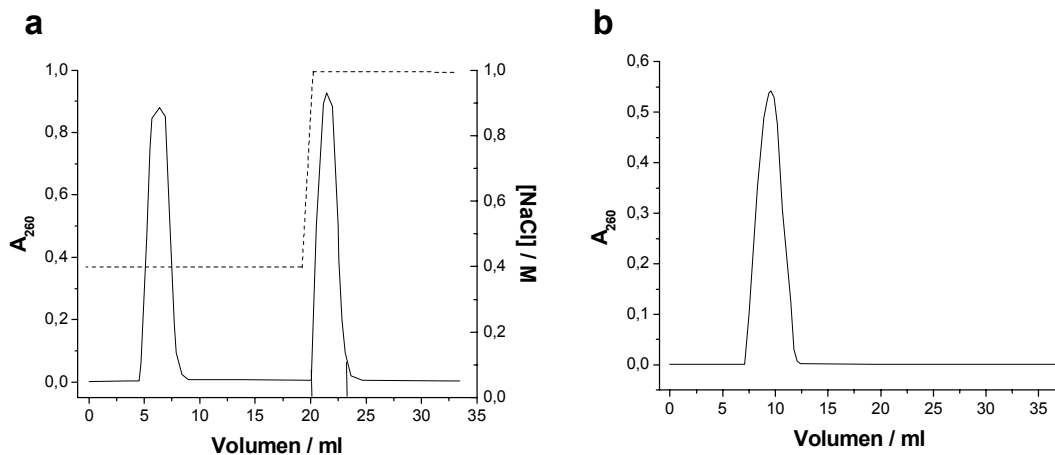


Abb. 3.6.17 Reinigung von Phe-tRNA^{Phe}-X47F nach der Modifikation und Aminoacylierung. (a) Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-25 (ca. 1 ml Säulenvolumen). Die gestrichelte Linie zeigt die NaCl-Konzentration an. (b) Elutionsprofil der Gelpermeationschromatographie an Biogel P6 (2 x 8 cm). Die Chromatographien wurden wie in Kapitel 2.2.24.1 beschrieben durchgeführt. Die vereinigten Fraktionen sind markiert.

Die Anionenaustauscher Säule (Abb. 3.6.17a) wurde intensiv mit 0.4 M NaCl gewaschen und die tRNA mit 1 M Salz eluiert. In beiden Chromatographien koeluierte die Fluoreszenz von Fluoreszein mit der Absorption (A₂₆₀) der tRNA.

Die Modifikation der acp3U Base der *E. coli* tRNA^{Phe} wurde bereits für funktionelle Untersuchungen benutzt und die Literaturdaten zeigen, dass die Modifikationen die Aktivität der tRNA, d.h. die Aminoacylierungsrate, die Bildung des ternären Komplexes und die Interaktion mit dem Ribosom nicht behindern, z.B. (Friedman, 1972), (Sprinzl and Faulhammer, 1978), (Watson et al., 1995). Die Ergebnisse der Aminoacylierungsreaktion

(Abb.3.6.16) zeigen, dass die Modifikation der X-Base die Erkennung durch die PheRS und die Beladungsreaktion nicht stört. Nach der Modifizierung und Aminoacylierung wurden aus 10 A_{260} tRNA^{Phe} rund 5.5 A_{260} Phe-tRNA^{Phe}-X47F gewonnen, die zu ~100% (1500 pmol Phe / A_{260} tRNA) mit Phenylalanin beladbar waren.

3.6.8 Fluoreszenztitrations Experimente

Fluoreszenzresonanz Energietransfer (FRET) wurde intensiv zum Studium der Translation benutzt, z.B. (Watson et al., 1995) und (Robbins and Hardesty, 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde der nicht radiative FRET zur Entwicklung eines Assay zur Detektion der Interaktion von aa-tRNA und EF-Tu*GTP angewendet. Im Folgenden sollte das Assay für kinetische Untersuchungen am Ribosom benutzt werden. Dazu wurde die tRNA^{Phe} aus *E. coli* an der acp3U Base (X47) mit Fluoreszein (Kapitel 3.6.7) und EF-Tu aus *T. thermophilus* an L404C und P357C mit Coumarin und AEDANS (Kapitel 3.6.2) modifiziert. Die apparenten Affinitäten (K_{Dapp}) zwischen Phe-tRNA^{Phe}-X47F und den fluoreszentmarkierten EF-Tus wurden durch Titrationsexperimente ermittelt. Dazu wurde die Phe-tRNA^{Phe}-X47F (Fluoreszenz Akzeptor) bei einer konstanten Konzentration gehalten und der mit Coumarin oder AEDANS markierte EF-Tu*GppNHp (Fluoreszenz Donor) in der Konzentration variiert. Bei den Experimenten wurde die Donor-Fluoreszenz angeregt und die Fluoreszein-Fluoreszenz detektiert. Da sich die Coumarin- und Fluoreszein-Fluoreszenzen teilweise überlappen (Abb 3.6.18) wurde die EF-Tu-CPM (Coumarin) Fluoreszenz zur Korrektur separat (in der Abwesenheit von Phe-tRNA^{Phe}-X47F) bestimmt und von dem Fluoreszein-Signal abgezogen.

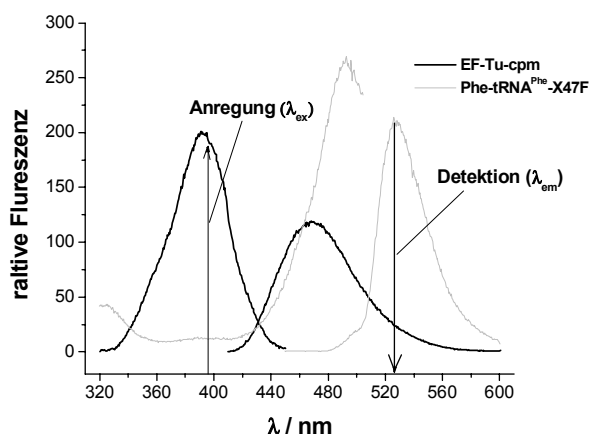


Abb. 3.6.18 Absorptions- und Emissionsspektren von EF-Tu-CPM*GppNHp (schwarze Linie) und Phe-tRNA^{Phe}-X47F (graue Linie). Die Exzitations- und Detektionswellenlängen sind mit einem Pfeil markiert.

Die gleiche Korrektur wurde auch bei den EF-Tu-AEDANS Varianten durchgeführt. Zusätzlich wurden die Messungen bei den EF-Tu-AEDANS Varianten durch ein sehr schwaches Signal (ϵ_{360} (AEDANS) = $5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) erschwert. Um interpretierbare Ergebnisse zu erhalten musste die tRNA-Konzentration (100 nM) deutlich über dem theoretischen K_D -Wert (20 nM) (Asahara and Uhlenbeck, 2002) gewählt und jedes Mal 2-3 Messreihen durchgeführt werden. Die Messungen mit EF-Tu L404C-AEDANS lieferten keine auswertbare Daten und sind in weiterem nicht diskutiert. Die Ergebnisse der Titrationsexperimente sind in Abbildung 3.6.19 dargestellt.

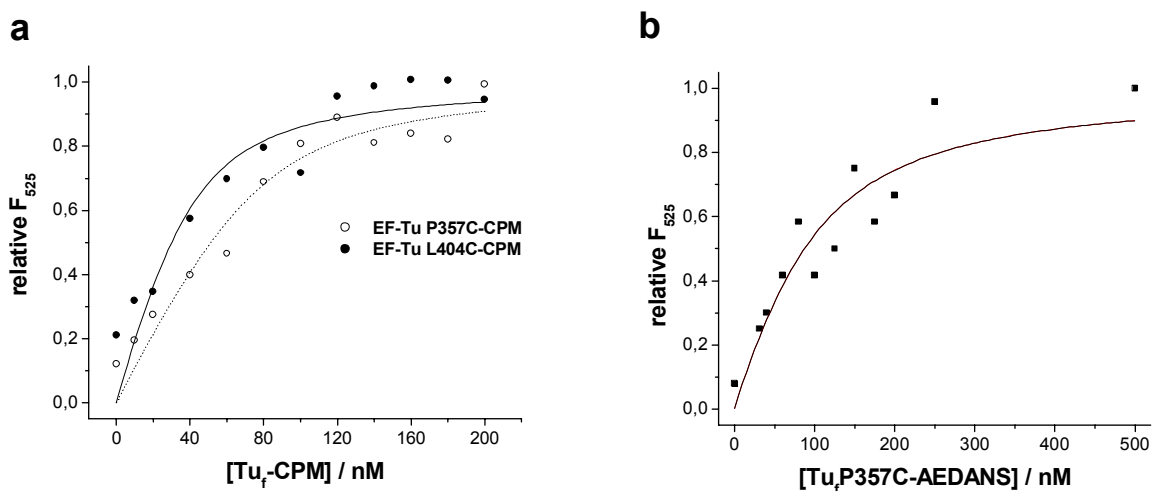


Abb. 3.6.19 Fluorezenztitration von Phe-tRNA^{Phe}-X47F mit (a) EF-Tu-CPM Varianten. Gesamtvolumen von 100 μl . Die Messreihe wurde mit : 100 nM Phe-tRNA^{Phe}-X47F, 200 nM EF-Tu-CPM und 200 μM GppNHp gestartet und weitere Messpunkte durch eine Verdünnung mit 100 nM Phe-tRNA^{Phe}-X47F und 200 μM GppNHp im TCB-Puffer erhalten. Nach jeder Verdünnung wurde 90 s gewartet. $\lambda_{\text{ex}} = 397 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$. Der Maximalwert überschritt $F_{525}=40$ a.u. nicht. **(b) EF-Tu P357C-AEDANS.** Die Messreihe wurde mit 500 nM EF-Tu P357C-AEDANS gestartet sonst wie in (a). $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$. Der Maximalwert überschritt $F_{525}=12$ a.u. nicht. Alle Messungen wurden bei $9 \pm 1^\circ\text{C}$ in einem LS50B Luminiscence Spectrometer (Perkin Elmer Cetus, Überlingen) durchgeführt.

Die apparenten K_D 's wurden aus der quadratischen Form der Bindungsgleichung berechnet.

$$c_{ES} = \frac{c_{E0} + c_{S0} + K_D - \sqrt{(c_{E0} + c_{S0} + K_D)^2 - 4 \cdot c_{E0} \cdot c_{S0}}}{2}$$

Wobei c_{ES} für die Konzentration des Enzym-Substrat Komplexes und c_{E0} und c_{S0} für die Anfangskonzentrationen des Enzyms bzw. des Substrats steht.

Für EF-Tu P357C-CPM und L404C-CPM wurden apparente K_D 's von $13 \pm 8 \text{ nM}$ und $11 \pm 7 \text{ nM}$ erhalten. Die FRET-Experimente lieferten für EF-Tu P357C-CPM eine apparente Dissoziationskonstante von $50 \pm 23 \text{ nM}$. Die Werte haben relativ hohe Standardabweichungen, liegen aber in dem Größenordnungsbereich der publizierten

Affinitäten von 20 nM (Asahara and Uhlenbeck, 2002) und 35 nM (LaRiviere et al., 2001) für *T. thermophilus* EF-Tu*GTP und Phe-tRNA^{Phe}.

3.6.9 Dissoziation des ternären Komplexes

Das FRET-Assay sollte bei kinetischen Untersuchungen der Interaktion vom ternären Komplex mit dem Ribosom angesetzt werden. Dabei sollte die Abstandsänderung zwischen den Fluorophoren am EF-Tu und der tRNA und die damit verbundene Änderung der FRET-Intensität das zu messende Signal liefern. Ob der FRET-Assay für kinetische Untersuchungen geeignet ist sollte durch die Bestimmung der Kinetik der Komplexdissoziation gezeigt werden. Da die aa-tRNA an EF-Tu nur in seiner GTP-gebundenen Form bindet wurde der ternäre Komplex aus Phe-tRNA^{Phe}-X47F, EF-TuL404C-CPM und GppNHp, vorgebildet und die Dissoziation durch die Zugabe eines Überschusses an GDP gestartet. Die erhaltenen Kinetiken konnten gut mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden (Abb. 3.6.20).

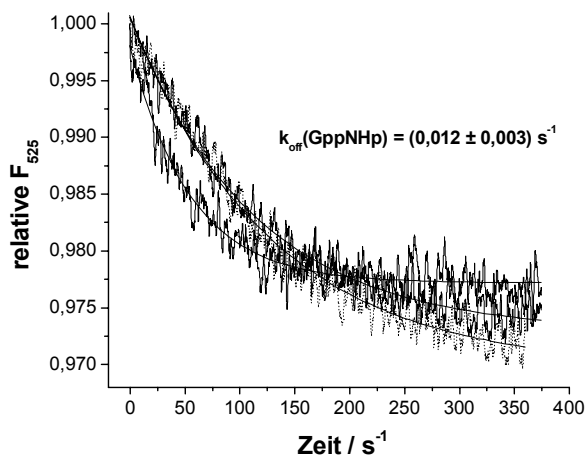


Abb. 3.6.20 Zeitverlauf der Dissoziation des ternären Komplexes. Drei unabhängige Messungen sind gezeigt. Die Messung erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 μ l TCB-Puffer bei ca. 9°C und der Ansatz enthielt : 150 nM Phe-tRNA^{Phe}-X47F, 200 nM EF-Tu_f L404C-cpm und 50 μ M GppNHp. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 mM GDP Endkonzentration gestartet. $\lambda_{\text{ex}} = 397$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm. Die Signaländerung lag unter 3 %. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden aus einer monoexponentiellen Funktion, $y = y_0 + Ae^{-kt}$, berechnet.

Nach der Zugabe von GDP sank das FRET-Signal mit einer Rate von $1.2 \pm 0.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (9°C). Der k_{off} -Wert für den ternären Komplex aus *T. thermophilus* Phe-tRNA^{Phe} und EF-Tu*GTP, ermittelt durch RNase-Schutzexperimente, liegt bei $2\text{-}3.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (LaRiviere et al., 2001). Das bedeutet, dass die Dissoziation des ternären Komplexes rund 5-10-fach langsamer verläuft als die hier gemessene FRET-Änderung. Die beobachtete Rate stimmt jedoch sehr gut mit der publizierten Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (k_{off}) von GppNHp, $0.9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (15°C) (Wagner et al., 1995), überein. Die Fluoreszenzabnahme in Abb. 3.6.20 entspricht demzufolge der Unterbrechung des Fluoreszenztransfers nach der strukturellen

Umlagerung von EF-Tu in die GDP-gebundene Form und der damit verbundenen Dissoziation der aa-tRNA. Dabei wird die Dissoziation der aa-tRNA nicht durch ihre Affinität zum EF-Tu, sondern durch die Nukleotiddissoziation kinetisch kontrolliert.

In Weiterem hat sich gezeigt, dass das FRET-Assay keine interpretierbare Ergebnisse bei der Wechselwirkung des ternären Komplexes mit dem Ribosom liefert. Infolgedessen wurde das FRET-Assay nicht zur Untersuchungen der Bindung des ternären Komplexes an das Ribosom verwendet.

3.7 Überexpression und Reinigung von *T. thermophilus* L12-R80A

Es wurde postuliert, dass die stimulierte GTPase Aktivität von manchen G-Proteinen durch ein Arginin (s.g. Argininfinger), das den Übergangszustand der GTP-Hydrolyse stabilisiert, katalysiert wird (Scheffzek et al., 1997), (Sondek et al., 1994), (Coleman et al., 1994), (Nassar et al., 1998). In den folgenden Kapiteln werden die Vorbereitung von *T. thermophilus* Ribosomen mit einem mutierten potentiellen Argininfinger und kinetische Untersuchungen zur Argininfinger Hypothese beschrieben.

Der *E. coli* EF-Tu interagiert während der Bindung von ternärem Komplex in die ribosomale pre-A-Stelle (auch A/T-Stelle genannt) mit dem ribosomalen Protein L7/L12 (L12 in *T. thermophilus*) (Stark et al., 1997), (Nag et al., 1995), (Girshovich et al., 1986). In der C-Domäne, die wichtig für die Faktorbindung ist (Gudkov et al., 1995), besitzt der *E. coli* EF-Tu ein hochkonserviertes Arg73 (Arg80 in L12 aus *T. thermophilus*). Nach der Argininfinger Hypothese stellt dieses Arginin einen potentiellen Argininfinger für die ribosomen-stimulierte GTPase von EF-Tu dar.

Das *rpL*-Gen, dessen Produkt das ribosomale Protein L12 ist, wurde mit der Mutation R80A mittels PCR-Mutagenese von Yiwei Huang (Dissertation 2001) in das Plasmid pET-30a kloniert. Die *T. thermophilus* L12-R80A Mutante wurde für kinetische Untersuchungen an der ribosomen-stimulierten GTPase von EF-Tu in *E. coli* BL21(DE3)pLysS Zellen überproduziert und gereinigt (Kapitel 2.2.18). Abbildung 3.7.1 zeigt die Wachstumskurve an.

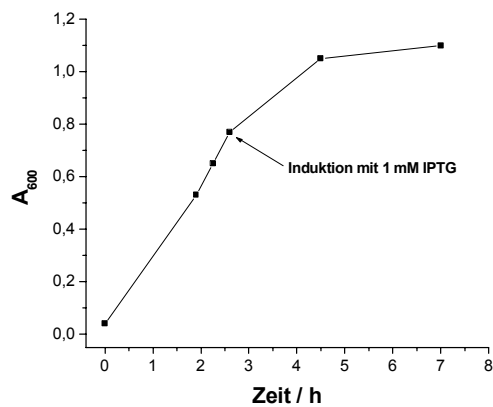
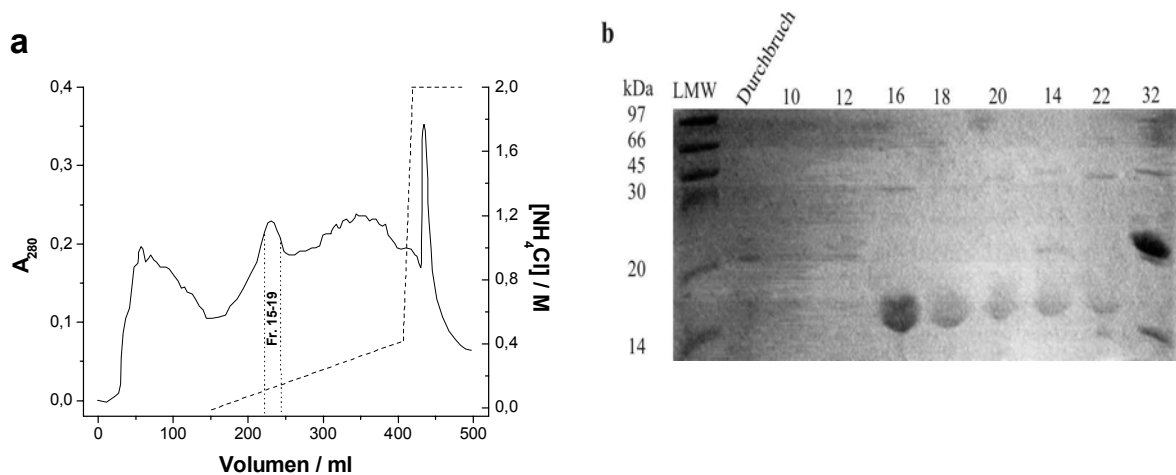


Abb. 3.7.1 (a) Wachstumskurve der *E. coli* BL21-Kultur zur Überexpression der L12-R80A Variante. Kultur bei 37°C in LB-Medium in Gegenwart von 25 µg/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Kanamycin.

Nach der Zellernte wurden die Zellen im Microfluidizer aufgeschlossen und ein S100-Überstand durch Ultrazentrifugation vorbereitet (Kapitel 2.2.14). Das L12 ist ein saures Protein mit einem pI-Wert von ca. 5,0. Durch eine Dialyse gegen ein Ammoniumacetat Puffer mit pH = 5,5 und Hitzedenaturierung bei 70°C konnte ein Teil der *E. coli* Proteine entfernt werden. Eine Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose lieferte ein, nach SDS-PAGE, relativ sauberes Protein (Abb. 3.7.2).



3.7.2 Chromatographie von dem Überstand nach der Hitzedenaturierung an DEAE-Cellulose (a) Elutionsprofil der Chromatographie. Die gestrichelte Linie zeigt die NH₄Cl-Konzentration an. Das Vorhandensein von L12 in den Fraktionen wurde durch SDS-PAGE getestet. Die vereinigten Fraktionen sind markiert. **(b) SDS-PAGE Analyse der Fraktionen.**

Das Protein L12 eluierte aus der Säule mit relativ niedriger Salzkonzentration von 0,2 M NH₄Cl. Es hat ein Molekulargewicht von 13300 Da. Die Expression lieferte ein Protein das im SDS-Gel bei ca. 16-17 kDa wandert, was typisch für L12 und andere saure Proteine ist

(Wahl et al., 2000b), . Das aus der Anionenaustauscherchromatographie isolierte Protein wurde anschließend mittels Gelpermeationschromatographie weiter gereinigt (Abb. 3.7.3).

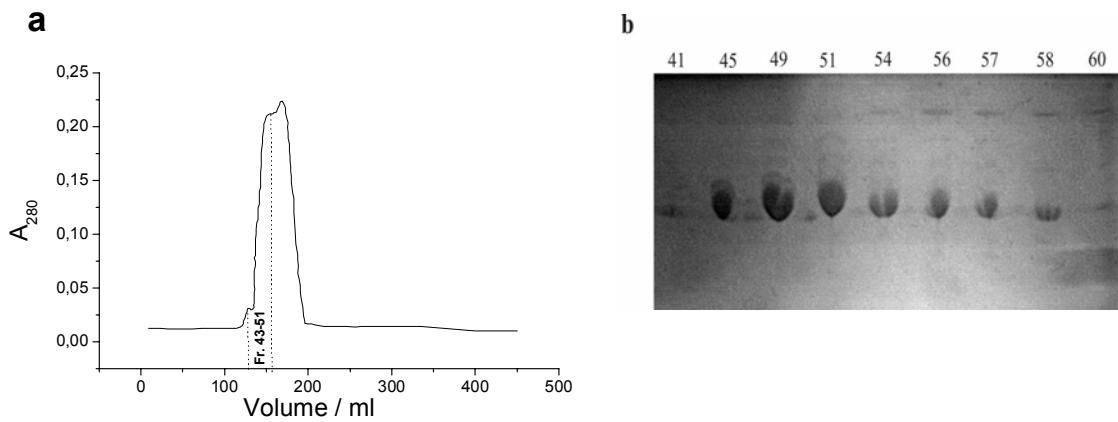


Abb. 3.7.3 Chromatographie L12 an Sephacyl S-200 (a) Elutionsprofil der Chromatographie. Die vereinigten Fraktionen sind markiert. (b) SDS-PAGE Analyse der Fraktionen.

Das Protein bildet in Lösung einen quaternären Komplex, der aus zwei L12 Dimeren besteht (Pettersson and Liljas, 1979), (Oleinikov et al., 1993). In der Gelpermeationschromatographie eluierte das L12 Protein in einem relativ breiten Peak, der aus mindestens vier weiteren Peaks zusammengesetzt war. Die nicht aufgelösten Peaks deuten auf die Gleichgewichtsverteilung der oligomeren Formen unter den Bedingungen der Gelpermeationschromatographie hin. Eine Zusammenfassung über die Reinigung ist in Tabelle 3.8 und Abbildung 3.7.4 dargestellt.

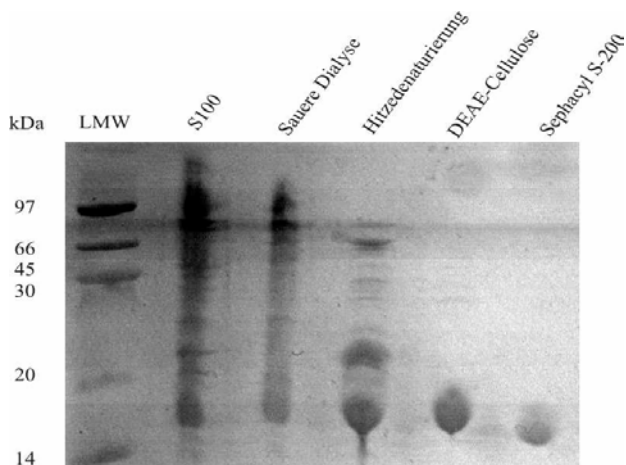


Abb. 3.7.4 SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der L12-R80A Variante.

Das *E. coli* L7/L12 Protein bildet in *E. coli* zusammen mit L10 einen stabilen pentameren Komplex, $(L7/L12)_4L10$ (Pettersson et al., 1976). Dieser Komplex ist durch L10 mit der GTPase-assoziierten Domäne der 23S RNA verbunden (Beauclerk et al., 1984). Das *E. coli* L10 Protein war nach der Hitzedenaturierung noch stark vorhanden (Abb. 3.7.4, Bande bei

ca. 22 kDa) und wurde erst durch die Anionenaustauscherchromatographie von L12 abgetrennt.

Tab. 3.8 Übersicht über die Reinigungsschritte der *T. thermophilus* L12-R80A Variante aus 30 g *E. coli* Zellen.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Konzentration (mg/ml)	Gesamtprotein (mg)	Ausbeute (% w/w)
S100	200	5.8	1160	100
Sauere Dialyse	170	6.2	1054	99
Hitzenaturierung	76	4.8	365	34
DEAE-Cellulose	32	1.4	45	4.2
Sephacyl S-200	24	0.8	19	1.8
Endprodukt	2	4.8	9.6	1

Aus 30 g *E. coli* BL21(DE3)pLysS Zellen wurden 9.6 mg L12-R80A gereinigt.

3.8 Vorbereitung der *T. thermophilus* 70S-L12-R80A Ribosomen

Das selektive Auswaschen von L7/L12 aus *E. coli* Ribosomen (L12 in *T. thermophilus*) wurde durch Waschen der Ribosomen mit 0.5 M NH₄Cl/EtOH bei 3°C beschrieben (Hamel et al., 1972). Später wurde gezeigt, dass schon eine niedrigere (0.125 M) NH₄Cl-Konzentration ausreichend für das komplette Auswaschen von L7/L12 ist (Tokimatsu et al., 1981). Bei einer NH₄Cl-Konzentration von 0.5 M werden bereits weitere Proteine aus dem Ribosom entfernt (Highland and Howard, 1975) und bei einer erhöhten Temperatur (37°C) wird der ganze pentamere L10*(L7/L12)₄ Komplex von den *E. coli* Ribosomen gelöst (Tokimatsu et al., 1981). Das selektive (80 % des Proteins im Eluat) Auswaschen wurde auch für ein thermophiles System beschrieben (Marquis and Fahnstock, 1980). Hier wurde das L13 Protein aus *B. stearothermophilus* (homolog zum *E. coli* L7/L12) durch das Waschen der Ribosomen mit 0.5 M NH₄Cl/EtOH bei 0°C entfernt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Auswaschen von L12 aus den *T. thermophilus* Ribosomen bei einer 0.5 M NH₄Cl-Konzentration und 30°C, wie in Kapitel 2.2.31 beschrieben durchgeführt. Der Verlauf des Experimentes wurde mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5.3) und *in vitro* Translationstest (Kapitel 2.2.22) verfolgt (Abb. 3.8.1).

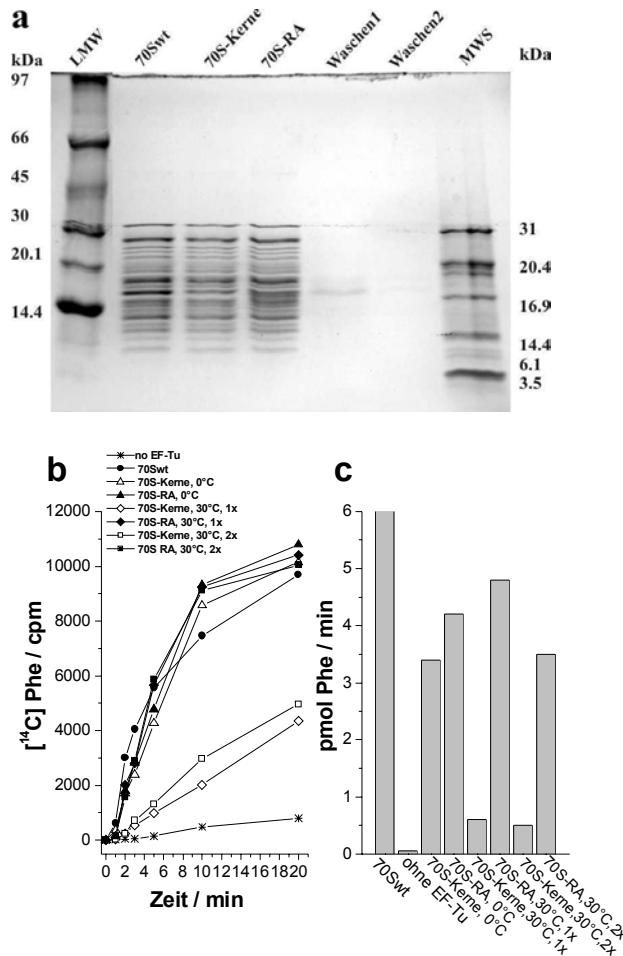


Abb. 3.8.1 Verlauf des L12-Austausches. (a) SDS-PAGE Analyse des L12-Austausches bei 30°C. Es wurden ca. 8 pmol 70S aufgetragen. In Spur W1 (Waschen1) wurde ca. 0.8 μg Protein (Whitaker and Granum, 1980) und in W2 (Waschen2) das doppelte Volumen wie in W1 aufgetragen. **(b) Kinetik der *in vitro* Translation.** Aktivität der Ribosomen (Kapitel 2.2.22) während des L12-Austausches bei unterschiedlichen Temperaturen (0°C und 30°C) und unterschiedlicher Anzahl der Waschschrte (1x und 2x). (1 pMol Phe entspricht ca. 600 cpm) **(c) Geschwindigkeit der Poly(Phe)-Synthese in der initial-burst Phase.** Der lineare Anstieg zwischen 1-2 min wurde berücksichtigt.

70S-Kerne steht für 70S Ribosomen ohne L12. 70S-RA steht für 70S Ribosomen mit L12-R80A.

Durch das Waschen bei 0°C, im Vergleich zu 30°C, wurde die Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Syntheseaktivität der *T. thermophilus* Ribosomen nur schwach beeinflusst (Abb. 3.8.1b,c). Daraus folgt, dass eine 10 min Inkubation in 0.5 M NH_4Cl und 25 % EtOH bei 0°C nicht ausreichend für eine vollständige Dissoziation von L12 ist. Daher wurden weitere Experimente bei 30°C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde ein Protein ausgewaschen das in der SDS-PAGE mit einer für L12 erwarteten Mobilität wandert (Abb. 3.8.1a, Spur Waschen1). Zusätzlich sind substöchiometrische Mengen von anderen ribosomalen Proteinen sichtbar. Die Gesamtsyntheseaktivität (nach 20 min) der 70S-Kerne (70S ohne L12) fiel auf ca. 40% (Abb. 3.8.1b) der Aktivität der 70S Wildtyp Ribosomen. Für *E.coli* Ribosomen wurde nach dem Auswaschen von L7/L12 durch Dey et al. (Dey et al., 1995) eine 30%-tige Restaktivität gefunden. Wenn man nur die Anfangsphase der Polyphenylalanin-Synthese betrachtet sank die Aktivität der 70S-Kerne unter 10% (Abb.3.8.1c). Nach der Zugabe von L12-R80A zu den 70S-Kernen und 15 min Inkubation wurde die Gesamtaktivität zurückgewonnen (Abb. 3.8.1b) und die Anfangsgeschwindigkeit stieg auf 60-70 % der Wildtypaktivität (Abb. 3.8.1c).

3.9 Untersuchungen zur Argininfinger Hypothese

Die Argininfinger Hypothese der stimulierten GTPase wurde für zwei Subfamilien der GTPase Superfamilie beschrieben: kleine Ras-ähnliche GTPasen (Scheffzek et al., 1997) und heterotrimere G-Proteine (Sondek et al., 1994), (Coleman et al., 1994). Die GTPase Aktivität der kleinen GTPasen Ras und Rho wird durch ein GAP (GTPase-aktivierendes Protein) stimuliert, das ein katalytisches Arginin in die Phosphat-Bindungstasche einführt und damit den Übergangszustand stabilisiert. Die GTPase Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine wird durch s.g. RGS (Regulators of G-protein Signaling) aktiviert. Die RGS stabilisieren den Übergangszustand, gewähren aber keine katalytische Aminosäure. In diesem Fall ist das katalytische Arginin ein Teil der $G\alpha$ -Untereinheit. Durch die Wechselwirkung von $G\alpha$ mit RGS wird das Arginin in der Phosphatbindungstasche positioniert (Nassar et al., 1998). Der *T. thermophilus* EF-Tu und alle GDP/GTP-bindenden Translationsfaktoren, außer IF2, besitzt in der Effektorschleife ein konserviertes Arginin (Arg59 in *T. th.* EF-Tu), das homolog zu dem katalytischen Arginin der $G\alpha$ -Proteine ist. Zusätzlich ist in EF-Tu eine positiv geladene Aminosäure, ein Lysin oder Arginin, in der Position 57 (Arg57 in *T. th.* EF-Tu) konserviert. Das L12 aus *T. thermophilus* besitzt in der C-terminalen Domäne, die verantwortlich für die Faktorbindung ist (Sommer et al., 1985), (Gudkov et al., 1995), ebenfalls ein konserviertes Arginin, Arg80. Das Arg80 von L12 stellt auch einen potentiellen Argininfinger für die ribosom-stimulierte GTPase von EF-Tu dar.

Der Einfluss der Mutation dieser Arginine auf die GTPase Aktivität des EF-Tu wurde mittels stopped-flow Experimenten (mant-dGTP-Fluoreszenz) und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ -Hydrolyse untersucht.

3.9.1 GTP-Hydrolyse Aktivität der Arginin-Mutanten von L12 und EF-Tu

Bislang wurden die Auswirkungen von Mutationen konservierter Argininen in der Effektorschleife des *T. thermophilus* (Zeidler et al., 1996) und *E. coli* (Knudsen and Clark, 1995) EF-Tu untersucht. Im EF-Tu aus *T. thermophilus* beeinflusste die R59T Mutation kaum die intrinsische und die stimulierte GTPase Aktivität. Lediglich die Tyr-tRNA^{Tyr} Bindungsaffinität senkte sich von 1.7 auf 3.6 nM (Zeidler et al., 1996). Für *E. coli* EF-Tu wurden die R58A und R58E Mutationen in einem System ohne aa-tRNA und mit nicht-programmierten Ribosomen studiert. Hier wurde dem Arg58 eher eine Funktion bei der aa-

tRNA- und Ribosomen-Bindung als bei der GTP-Hydrolyse zugeteilt (Knudsen and Clark, 1995).

Das isolierte L7/L12 aus *E. coli* konnte zwar die GTPase von EF-G, mit einem $K_m = 40 \mu\text{M}$, aber nicht die von EF-Tu stimulieren. Die Mutationen des konservierten Arg73 von L7/L12 aus *E. coli* zu Met und Lys hatten keinen Effekt auf die Stimulierung (Savelsbergh et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die intrinsische und stimulierte GTPase Aktivität ausschließlich mit aufgereinigten ternären Komplexen und in der Anwesenheit von programmierten Ribosomen mit besetzter P-Stelle studiert (Abb. 3.9.1). Die Vorbereitung der ternären Komplexe und der programmierten Ribosomen ist in Kapitel 2.2.20.2 und 2.2.21.2 beschrieben. Die Ribosomen wurden mit einer unnatürlichen mRNA, Poly(U), programmiert. Um einen 70S Initiationskomplex mit einer mRNA, die keine Shine-Dalgarno-Sequenz trägt, zu erhalten muss man entsprechend hohe Mg^{2+} -Konzentration benutzen (Revel et al., 1968); (van Knippenberg, 1990). In der Literatur wird diskutiert, dass eine hohe Mg^{2+} -Konzentration und das Fehlen stabilisierender Polyamine Artefakte in der Funktion von Ribosomen induzieren können (Marquez et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mg^{2+} -Konzentration von 15 mM benutzt. Bei diesen Bedingungen ist die Interaktion von tRNAs mit dem Ribosom, im Vergleich zur *in vivo* Situation (3-6 mM Mg^{2+}), stark begünstigt (Semenkov et al., 2000). Zusätzlich ist die ribosomen-stimulierte GTP-Hydrolyse von EF-Tu durch die Kodonerkennung und nicht durch die GTPase-Aktivierung limitiert (Pape et al., 1998). Man muss ebenfalls bei der Interpretation der Ergebnisse die Tatsache berücksichtigen, dass die benutzte Temperatur (20°C) rund 50°C unter dem Optimum für ein thermophiles System liegt.

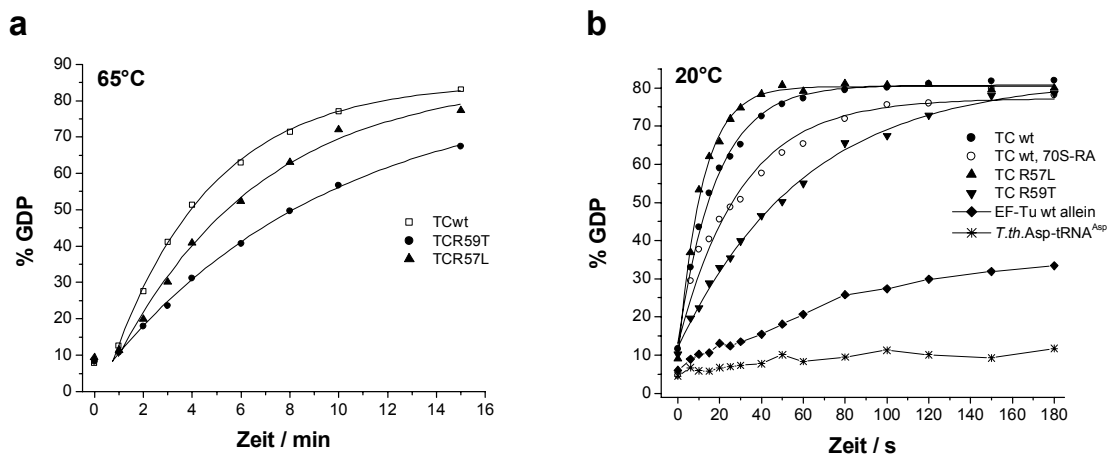


Abb. 3.9.1 Geschwindigkeit der GTPase. (a) Intrinsische GTPase. Es wurden 15 μl 0.5 μM TC (ternären Komplexes) in Rib.mix (20 mM Mops, pH 7.5, 50 mM KCl, 50 mM NH_4Cl , 15 mM MgCl_2) eingesetzt (Kapitel

2.2.20.2) und bei 65°C inkubiert. Nach 1,2,3,4,6,8,10 und 15 min wurden 1.3 µl entnommen und wie unter 2.2.21.1 beschrieben weiter verfahren. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden aus einer monoexponentiellen Funktion, $y=y_0+ Ae^{-kt}$, berechnet. **(b) Ribosomen-stimulierte GTPase.** Die Ansätze enthielten in 30 µl Rib.mix : 0.15 µM TC und 1 µM 70S (Kapitel 2.2.21.2). Die Reaktion wurde bei 20±1°C durchgeführt. 70S-RA steht für Ribosomen mit L12-R80A. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden aus einer monoexponentiellen Anpassung berechnet, $y=y_0+ Ae^{-kt}$.

Die experimentell ermittelten Hydrolysegeschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Tab. 3.9 Geschwindigkeitskonstanten der GTP-Hydrolyse

Ternärer Komplex mit EF-Tu	k_h ($10^{-2} s^{-1}$) der GTPase	
	intrinsische (65°C)	stimulierte (20°C)
WT	0.41±0.06	5.5±1.5
R57L	0.28±0.05	8.8±2.0
R59T	0.18±0.04	1.8±0.7
EF-Tu WT, 70S-RA	-	3.4±1.2

Die Standardabweichungen für die stimulierte GTPase wurden aus mehreren unabhängigen Messungen berechnet. 70S-RA steht für Ribosomen mit L12-R80A. Die EF-Tu Mutanten R57L und R59T wurden von H.Rütthard (Dissertation 1999) bzw. Y.Huang vorbereitet.

Die intrinsische GTPase des EF-Tu fiel bei der R57L-Mutante auf ca. 75% und bei der R59T-Mutante auf ca. 50 % der Wildtypaktivität. Bei der stimulierten GTPase zeigten sich entgegengesetzte Effekte der Mutationen. Die R57L-Mutante hydrolysierte das GTP in Gegenwart von mit Poly(U)-programmierten Ribosomen um 60% schneller als der Wildtyp, die R59T-Mutante dagegen, in Übereinstimmung mit dem Einfluss auf die intrinsische Hydrolyse, erzielte nur ca. 30% der Wildtypaktivität. Der Austausch des ribosomalen Proteins L12 durch L12-R80A war mit einer knapp 40%-tigen Absenkung der Hydrolysegeschwindigkeit verbunden. Die erhaltenen Ergebnisse für die EF-Tu R59T Mutante widersprechen teilweise den früher publizierten Daten (Zeidler et al., 1996), wo eine höhere intrinsische GTPase Aktivität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp gemessen wurde. Im Unterschied zu den publizierten Bedingungen wurde in dieser Arbeit auch die intrinsische GTPase in der Gegenwart von Phe-tRNA^{Phe} (als aufgereinigter ternärer Komplex) gemessen. In (Zeidler et al., 1996) konnte nur die untere Grenze der Geschwindigkeit der stimulierten GTPase bestimmt werden ($0.23 s^{-1}$ bei 37°C). Möglicherweise wurde deswegen keiner Effekt der R59T Mutation auf die ribosomen-abhängige GTPase gesehen.

3.9.2 Stopped-flow Messung der Aktivierung der GTPase

Die Bindung von mant-dGTP/mant-dGDP an EF-Tu führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität der mant-Gruppe um ~30% (Wagner et al., 1995) und (Rodnina et al., 1995). Die Fluoreszenz ändert sich durch die aa-tRNA Bindung und GTP-Hydrolyse nicht zusätzlich (Rodnina et al., 1995). Im *E. coli* System wird die Bindung von aufgereinigtem EF-Tu**mant*-dGTP*aa-tRNA Komplex an die mit Poly(U)-programmierten Ribosomen von einer biphasischen Änderung der *mant*-Fluoreszenz begleitet. Die Besetzung der P-Stelle mit tRNA^{Phe} resp. Phe-tRNA^{Phe} oder die Vakanz der P-Stelle hat keinen Einfluss auf die biphasische Änderung, aber eine gleichzeitige Besetzung der P- und A-Stelle führt zur Verlangsamung der ersten und zum Fehlen der zweiten Kinetik. Die Zugabe von Kirromycin, welches EF-Tu am Ribosom nach der GTP-Hydrolyse in einer GTP-ähnlicher Form fixiert (Parmeggiani and Swart, 1985), (Mesters et al., 1994), (Vogelely et al., 2001), hat ebenfalls das Fehlen der zweiten Kinetik zu Folge (Rodnina et al., 1995), (Rodnina et al., 1996). Aus diesen Beobachtungen wurde die biphasische Änderung der *mant*-Fluoreszenz auf folgende Weise interpretiert: der initiale Anstieg der *mant*-Fluoreszenz (die erste schnellere Kinetik) wird durch konformationelle Änderungen der EF-Tu-Struktur, die die GTPase Aktivierung begleiten, verursacht, wobei die anschließende Absenkung des *mant*-Signals (die zweite langsamere Kinetik) den konformationellen Übergang in die GDP-Form und die Dissoziation von EF-Tu**mant*-GDP aus dem Ribosom reflektiert (Rodnina et al., 1995), (Rodnina et al., 1996).

In dieser Dissertation wurden binäre EF-Tu**mant*-dGTP Komplexe gereinigt und die stopped-flow Messungen bei 20°C wie in Kapitel 2.2.32 beschrieben durchgeführt. Die Reaktion wurde durch ein schnelles Mischen der ternären EF-Tu**mant*-dGTP* Phe-tRNA^{Phe} Komplexe mit der Ribosomen-Lösung gestartet. Die Ribosomen-Lösung bestand aus 70S Ribosomen, die mit einer tRNA^{Phe} in 10%-tigem Überschuss inkubiert wurden. Nach dem allosterischen drei-Stellen Modell der Elongation kann eine deacylierte tRNA, nachdem die ribosomale P-Stelle schon besetzt ist, in die E-Stelle des Ribosoms binden und die Bindung des ternären Komplexes in die A-Stelle inhibieren (Gnirke et al., 1989). Unter der Annahme, dass dieses Modell richtig ist würde die Besetzung der E-Stelle vermutlich zur Missinterpretation des *mant*-Signals führen. Indem hier verwendeten Ansatz reicht der niedrige Überschuss von tRNA^{Phe} über den Ribosomen jedoch nur knapp für die Besetzung der P-Stelle (Rodnina et al., 1996) und es bleibt keine freie tRNA^{Phe} für die Bindung in die E-Stelle aus.

Die Ansätze enthielten 0.15 μM EF-Tu**mant*-dGTP Komplex, 0.45 μM Phe-tRNA^{Phe} und 0.5 μM Poly(U)-programmierte 70S Ribosomen. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten (k_{app}) wurden aus einer mono- bzw. bi-exponentiellen Anpassung berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9.2 gezeigt.

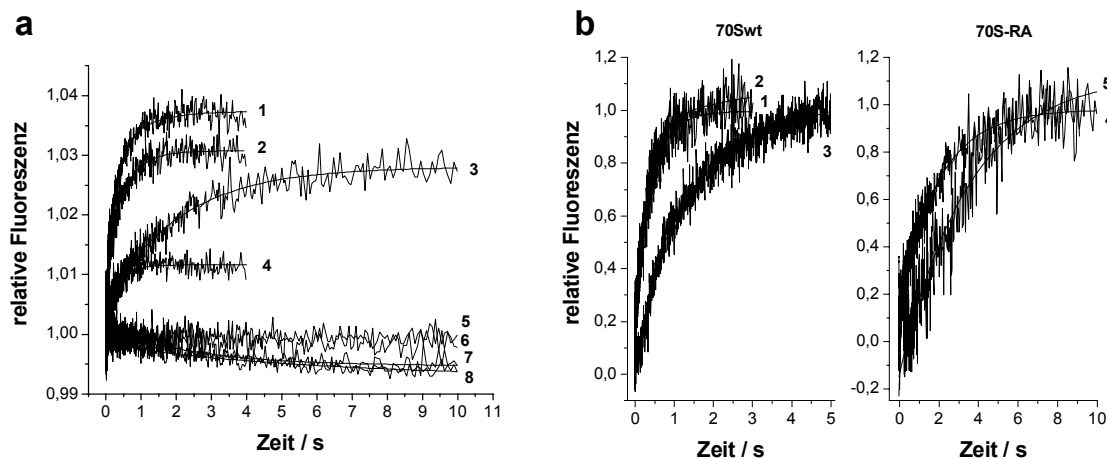


Abb. 3.9.2 Zeitverlauf der *mant*-dGTP Fluoreszenz während der Interaktion von EF-Tumant*-GTP*Phe-tRNA^{Phe} mit programmierten Ribosomen.** Alle Amplituden waren unter 4 % des Gesamtsignals. Bei jeder Kurve wurden mindestens 8 Messungen gemittelt. **(a)** Kurve (1) EF-Tu R57L; (2) EF-Tu wt; (3) EF-Tu wt und 70S-RA; (4) EF-Tu R59A; (5) EF-Tu wt ohne 70S; (6) EF-Tu wt mit *T.th.* Asp-tRNA^{Asp} (Anticodon GTC); (7) EF-Tu wt ohne aa-tRNA; (8) EF-Tu R57L ohne aa-tRNA **(b)** Kurve (1) EF-Tu wt; (2) EF-Tu wt und 70S mit freier P-Stelle; (3) EF-Tu wt + 50 μM Kirromycin; (4) EF-Tu wt und 70S-RA; (5) EF-Tu wt + 50 μM Kirromycin und 70S-RA.

Parameter der bi-exponentiellen (mono-exponentiellen in Klammern) Fits, $y = y_0 + A_1 e^{-k_{\text{app}1} t} + A_2 e^{-k_{\text{app}2} t}$:

(a) Kurve (1) $k_{\text{app}1} = 2.3 \text{ s}^{-1}$, $A_1 = 52 \%$, $k_{\text{app}2} = 34 \text{ s}^{-1}$, $A_2 = 48 \%$, ($3.5 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$); (2) $k_{\text{app}1} = 2.3 \text{ s}^{-1}$, $A_1 = 69 \%$, $k_{\text{app}2} = 33 \text{ s}^{-1}$, $A_2 = 31 \%$, ($3.1 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$); (3) $k_{\text{app}1} = 0.51 \text{ s}^{-1}$, $A_1 = 68 \%$, $k_{\text{app}2} = 27 \text{ s}^{-1}$, $A_2 = 32 \%$, ($0.72 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$); (4) $k_{\text{app}1} = 2.6 \text{ s}^{-1}$, $A_1 = 84 \%$, $k_{\text{app}2} = 9.6 \text{ s}^{-1}$, $A_2 = 16 \%$, ($3.0 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$); (7) $k_{\text{app}1} = 0.15 \text{ s}^{-1}$, $A_1 = -74 \%$, $k_{\text{app}2} = 1.7 \text{ s}^{-1}$, $A_2 = -26 \%$; (8) $k_{\text{app}1} = 0.39 \text{ s}^{-1}$, $A_1 = -89 \%$, $k_{\text{app}2} = 2.4 \text{ s}^{-1}$, $A_2 = -11 \%$. **(b)** Kurve (1) $k_{\text{app}1} = 2.3 \text{ s}^{-1}$, $A_1 = 52 \%$, $k_{\text{app}2} = 34 \text{ s}^{-1}$, $A_2 = 48 \%$, ($3.1 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$); (2) $k_{\text{app}1} = 3.0 \text{ s}^{-1}$, $A_1 = 77 \%$, $k_{\text{app}2} = 0.15 \text{ s}^{-1}$, $A_2 = 23 \%$, ($2.9 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$); (3) $k_{\text{app}1} = 0.44 \text{ s}^{-1}$, $A_1 = 57 \%$, $k_{\text{app}2} = 2.0 \text{ s}^{-1}$, $A_2 = 43 \%$, ($1.2 \pm 0.15 \text{ s}^{-1}$); (4) $k_{\text{app}1} = 0.51 \text{ s}^{-1}$, $A_1 = 68 \%$, $k_{\text{app}2} = 27 \text{ s}^{-1}$, $A_2 = 32 \%$, ($0.72 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$); (5) $k_{\text{app}} = 0.29 \text{ s}^{-1}$, $A = 68 \%$ (ein bi-exponentieller Fit für (5) lieferte die gleichen $k_{\text{app}1}$ und $k_{\text{app}2}$). Die Anpassungen wurden in Microcal Origin 6.0 durchgeführt.

Die Geschwindigkeitskonstanten aus den mono-exponentiellen Anpassungen sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Tab. 3.10 Kinetische Konstanten der mono-exponentiellen Anpassungen der mant-dGTP Fluoreszenz

Programmierte 70S + ternärer Komplex^{a)} mit :	k_{app} (s⁻¹)
EF-Tu wt	3.1 ± 0.3 (1.2 ± 0.15) ^{b)}
+70S mit freier P-Stelle	2.9 ± 0.3
-70S	-
+Asp-tRNA ^{Asp}	-
-aa-tRNA	0.4 ± 0.1 ^{c)}
+70S-RA	0.72 ± 0.08 (0.24 ± 0.06) ^{b)}
EF-Tu R57L	3.5 ± 0.4
-aa-tRNA	0.45 ± 0.1 ^{c)}
EF-Tu R59A	3.0 ± 0.3

a) Mit Poly(U)-programmierten 70S oder 70S-RA Ribosomen mit tRNA^{Phe} in der P-Stelle. Ternärer Komplex: EF-Tu**mant*-dGTP*Phe-tRNA^{Phe} (Materialien und Methoden, Kapitel 2.2.32). Alle Komponenten sind aus *T. thermophilus*.

b) + 50 μ M Kirromycin

c) Abnahme der *mant*-Fluoreszenz und Amplitude unter 0.5 %

Wie bereits erwähnt kann die GTPase-Aktivierung und die Dissoziation vom EF-Tu*GDP aus dem Ribosom im *E. coli* System durch die *mant*-Fluoreszenz beobachtet werden. Zusätzlich verschwindet nach der Zugabe von Kirromycin das *mant*-Signal, das die EF-Tu-Dissoziation begleitet (Rodnina et al., 1995), (Rodnina et al., 1996). Die Bindung des ternären EF-Tu**mant*-dGTP*Phe-tRNA^{Phe} Komplexes ans Ribosom wurde im *T. thermophilus* System von einem Anstieg der *mant*-Fluoreszenz begleitet, welcher dann, im Zeitfenster des Experimentes (bis 10s), durch keine weitere Kinetik gefolgt wurde (Abb. 3.9.2). Da nur die Kinetik dieses Anstieges (Tab. 3.10) und nicht der Effekt selbst, durch die Zugabe von Kirromycin beeinflusst wurde, handelt es sich hier um eine Fluoreszenzänderung, die die GTPase-Aktivierung und nicht die Dissoziation von EF-Tu*GDP aus dem Ribosom reflektiert (Rodnina et al., 1995).

Die beobachtete Kinetik lag also für *T. thermophilus* EF-Tu WT und die zwei Arginin-Mutanten, R57L und R59A, im Bereich von 3-4 s⁻¹. Die Fluoreszenzänderung war bei 20°C 5-8-Mal langsamer als im *E. coli* System (Rodnina et al., 1995), (Pape et al., 1998) und die Mutationen hatten keinen signifikanten Effekt auf die GTPase-Aktivierung.

Der Austausch des ribosomalen Proteins L12 durch die L12-R80A Mutante führte dagegen zu einer 4-5-fachen (0.7 s⁻¹) Verlangsamung der Kinetik.

Die Besetzung der ribosomalen P-Stelle hatte keinen Effekt auf die Fluoreszenzänderung. Die Zugabe von ternärem Komplex mit Asp-tRNA^{Asp} (Anticodon GTC) zu den mit Poly(U)-programmierten Ribosomen führte zu keiner Signaländerung, was

zeigt, dass der beobachtete Prozess erst nach der Codonerkennung stattfindet. Das Auslassen von aa-tRNA aus dem Assay führt zu einer schwachen (Gesamtamplitude $< 0.5\%$) und langsamen (ca. 0.4 s^{-1}) Fluoreszenzabnahme.

4 Diskussion

G-Proteine kann man in zwei Familien unterteilen: heterotrimere G-Proteine (mit dem Adenylat-Cyclase stimulierenden G-Protein, G_s, als prototypischen Beispiel) und monomere G-Proteine (mit Ras und EF-Tu als Prototypen) (Sprang, 1997). Sie sind Regulatoren und molekulare Schalter zahlreicher zellulären Prozesse (Bourne et al., 1991), (Bourne et al., 1990), (Vetter and Wittinghofer, 2001). G-Proteine wirken als konformationelle Sensoren indem sie ihre Konformation zwischen der GTP- und GDP-gebundenen Form und damit auch die Interaktion mit ihren Effektoren ändern (Sprang, 1997). Die Evolution hat die katalytische Aktivität (k_{cat}/K_m) der meisten Enzyme maximiert (Fersht, 1985d). G-Proteine stellen eine Ausnahme von dieser Regel dar. Ein G-Protein darf nur solange in seiner aktiven GTP-Form verbleiben, wie seine Funktion benötigt wird. G-Proteine besitzen nur eine geringe intrinsische GTPase Aktivität. Die Lebensdauer des aktivierten Zustandes wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) moduliert und der „Aus“-Zustand (GDP-Form) wird durch Nukleotidaustauschfaktoren (NEFs) in den „An“-Zustand (GTP-Form) überführt. Mehrere G-Protein Mutanten, hauptsächlich von G α und Ras, mit Defekten in der GTPase Aktivität, führen zu Tumorbildung und anderen Krankheiten. Ungefähr 30% aller menschlichen Tumorzellen besitzen Mutationen in Ras, die zur Inaktivierung seiner GTPase Aktivität führen (Ahmadian et al., 1999). Diese oncogenen Ras-Mutanten können auch durch RasGAP nicht ausgeschaltet werden, was eine unkontrollierte Zellteilung zur Folge hat (Ahmadian et al., 1999). Auch deshalb ist das Verständnis des Mechanismus der GTPase von großer Bedeutung. Durch die Aufklärung der Kristallstrukturen von Proteinen der Ras-Familie und G α -Proteinen im Komplex mit Übergangszustandsanaloga wurden in den letzten Jahren große Schritte im Verständnis der GTPase gemacht (Coleman et al., 1994), (Sondek et al., 1994), (Rittinger et al., 1997a), (Rittinger et al., 1997b), (Scheffzek et al., 1997), (Tesmer et al., 1997) (Abb. 4.1).

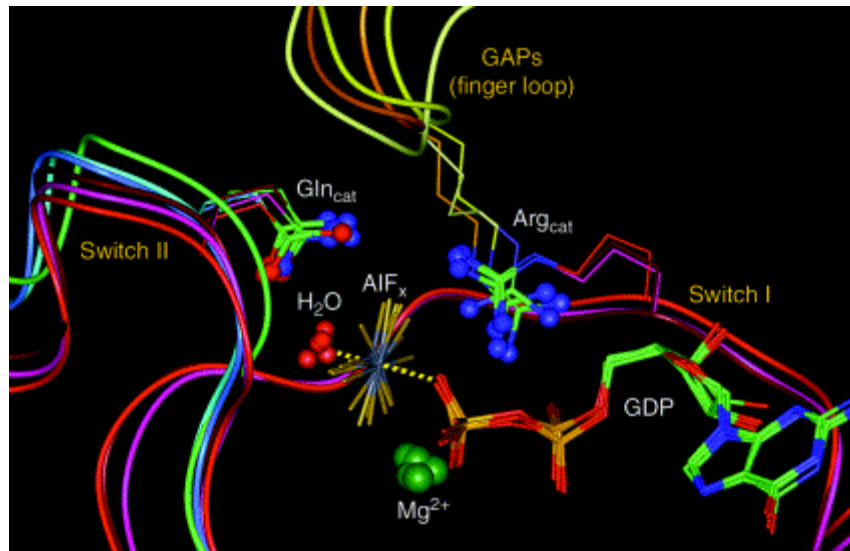


Abb. 4.1 Überlagerung von sechs verschiedenen G-Protein Strukturen im Komplex mit GDP- AlF_4 und entsprechendem GAP (Kosloff and Selinger, 2001). Farbkodierung : Ras (blau), RasGAP(gelb); Rho (grün), RhoGAP (gelb); CDC42 (cyan), CDC42GAP (orange); Transducin (magenta); Gi (dunkel rot), Gi mit RGS4 (rot).

Aus der Abbildung 4.1 geht hervor, dass in verschiedenen G-Proteinen die funktionellen Gruppen zweier konservierter Reste, eines Glutamins und eines Arginins, sehr ähnlich positioniert sind. Die Tatsache, dass ein katalytisches Arginin in das aktive Zentrum gebracht wird (bei $\text{G}\alpha$ -Proteinen intramolekular und bei Ras intermolekular), führte zur Postulierung der Argininfinger-Hypothese (Scheffzek et al., 1998). Anhand struktureller Daten und biochemischer Untersuchungen wird diesen konservierten Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Übergangszustandes während der GTP-Hydrolyse zugeschrieben. Der Mechanismus der GTP-Hydrolyse kann bei Translationsfaktoren unterschiedlich sein, da sich der detaillierte Aufbau ihrer aktiven Zentren von dem der Ras-ähnlichen und $\text{G}\alpha$ -Proteinen unterscheidet (Hilgenfeld, 1995). Die intrinsische GTPase Aktivität von allen Translationfaktoren: EF-Tu, EF-G, IF2 und RF3, ist sehr niedrig und wird durch ihre Bindung an das Ribosom um mehrere Größenordnungen erhöht (Rodnina et al., 2000). Es ist jedoch nicht bekannt, ob katalytische Aminosäurereste vom Ribosom bereitgestellt werden, oder ob die Bindung an das Ribosom eine Konformationsänderung der Translationsfaktoren induziert, die zur Reorganisation faktoreigener katalytischer Gruppen führt.

Die klassische Ansicht der enzymatischen Katalyse ist, dass ein Enzym alle, zur Katalyse-benötigten funktionellen Gruppen bereitstellt. In vielen Fällen wird jedoch mindestens eine katalytische Gruppe vom Substrat selbst zur Verfügung gestellt. Diese Substrat-assistierte Katalyse (SAK) könnte im Laufe der Evolution entstanden sein (Dall'Acqua and Carter, 2000). Es ist auch möglich solche funktionellen Gruppen synthetisch

einzuführen. Durch die Verwendung unterschiedlicher GTP-Analoga wurde die Substrat-assistierte Katalyse zur Untersuchung der GTPase von Ras und $G\alpha$ -Proteinen eingesetzt. Diese Studien zeigten, dass GTP-Analoga mit einer vicinal zum γ -Phosphat stehenden NH_2 - resp. OH-Gruppe, z.B. 3,4-Diaminobenzophenon-phosphoamidate-GTP (DABP-GTP), die Aktivität einer GTPase-defizienten Mutante wiederherstellen können (Zor et al., 1997b), (Zor et al., 1998), (Ahmadian et al., 1999). So konnte auch der Effekt oncogener Mutationen durch Substrat-assistierte Katalyse kompensiert werden, was ein neues Feld für das Design der Antitumor-Medikamente eröffnet hat (Ahmadian et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Untersuchung der Substrat-assistierten Katalyse in *T. thermophilus* EF-Tu zwei GTP-Analoga, DABP-GTP und MAAP-GTP, benutzt. Dabei wurde untersucht, ob die Analoga fähig sind das GTP funktionell in der Bindung an EF-Tu und in der Bildung des ternären Komplexes zu substituieren. Um die potentielle Ähnlichkeit zwischen der durch einen Argininfinger stimulierten GTPase und der Substrat-assistierten Katalyse zu studieren wurde der Mechanismus der DABP-GTP-Hydrolyse mittels kinetischer und thermodynamischer Experimente untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden EF-Tu und tRNA mit Fluoreszenzgruppen markiert und ein Fluoreszenzsystem für die Detektion des ternären Komplexes etabliert.

Die Interaktion von Ribosomen mit dem ternären Komplex wird intensiv mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht (Pape et al., 1999), (Rodnina et al., 1995), (Rodnina et al., 1994). Ein fluoreszierendes GTP-Analog, mant-dGTP, wurde bei den Untersuchungen der Argininfinger-Hypothese in der Ribosomen stimulierten GTPase von EF-Tu verwendet. Dazu wurden EF-Tu Varianten mit Mutationen an den Positionen konservierter Argininreste und Ribosomen mit einem mutierten L12 Protein eingesetzt.

4.1 Substrat-assistierte Katalyse der GTPase von EF-Tu aus *T. thermophilus*

4.1.1 Interaktion der GTP-Analoga mit EF-Tu

GTP bindet an EF-Tu mit einer Affinität von 30 nM. Diese wird um Faktor zwei erniedrigt, wenn GTP durch ein nichthydrolysierbares Analog, wie GppNHp oder GppCH₂p, ersetzt wird (Wagner et al., 1995). Die GTP-Analoga DABP-GTP und MAAP-GTP tragen am γ -Phosphat eine relativ große hydrophobe Modifikation. Der hohen Hydrolyserate von

DABP-GTP wegen wurde zur Abschätzung der Affinität zu EF-Tu das nichthydrolysierbare Analog, DABP-GppCH₂p, benutzt. Die Diaminobenzophenon Gruppe (DABP) von DABP-GppCH₂p erniedrigt, wahrscheinlich durch sterische Hindernisse im aktiven Zentrum, die Affinität des Nukleotids um rund das 50-fache ($K_D = 3.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$) im Vergleich zu GppCH₂p. Die Monoaminoacetophenon-Substitution (MAAP) ist kleiner als DABP und MAAP-GTP bindet mit einer 2-fach höheren apparenten Affinität als DABP-GppCH₂p ($K_D = 1.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$). Wenn man die unterschiedliche Methoden (Kapitel 3.2), die bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten verwendet wurden und die Methylen-Brücke im DABP-GppCH₂p berücksichtigt, kann gefolgert werden, dass die Analoga mit gleicher Affinität an EF-Tu binden. Die Bindungsaffinität liegt im niedrig-mikromolaren Bereich und ist somit rund 50-fach schlechter als die von GTP. Interessanterweise ist die Bindung von caged-GTP, einem GTP-Analog das auch eine Modifikation am γ -Phosphat trägt, nur um das dreifache schwächer als die von GTP (Wagner et al., 1995).

Bei Ras ist die Affinität von GppNHp ähnlich durch die DABP-Modifikation beeinflusst. Hier steigt der K_D -Wert um das 22-fache (Ahmadian et al., 1999). Die Affinität des Gs α -Proteins zu DABP-GTP wurde indirekt durch die Bestimmung der apparenten Michaelis-Konstante (K_m) für die Adenylat-Cyclase-Stimulierung in den Membranen von Erythrozyten ermittelt. Die K_m -Werte für GTP und DABP-GTP liegen hier bei $0.36 \mu\text{M}$ resp. $0.31 \mu\text{M}$ (Zor et al., 1997b). Diese K_m -Werte kann man jedoch nicht quantitativ mit den K_D -Werten für Ras und EF-Tu vergleichen, da die Hydrolyseraten von GTP und DABP-GTP ($k_h = 0.11$ - 0.13 s^{-1}) in Gs α viel höher sind als ihre jeweiligen k_{off} -Raten.

Die Geschwindigkeitsraten k_{on} und k_{off} , die die Affinität bestimmen, werden durch die Modifikation beeinträchtigt. In EF-Tu ist die Assoziationsrate von DABP-GppCH₂p ($k_{on} = 4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) knapp fünf Mal niedriger und die Dissoziationsrate ($k_{off} = 0.13 \text{ s}^{-1}$) zehn Mal höher als die Geschwindigkeitsraten von GppCH₂p (Wagner et al., 1995).

Im Vergleich zur GppNHp-gebundenen Form zeigt die Kristallstruktur von zwei oncogenen Ras-Mutanten (G12P und G12V) im Komplex mit DABP-GppNHp eine Reorientierung der Effektorregion (Ahmadian et al., 1999). Zusätzlich ist hier auch das katalytische Glutamin 61 aus der Bindungstasche verdrängt. Dennoch beeinflussen diese Veränderungen die Interaktion mit dem Effektor RafRBD nicht (Ahmadian et al., 1999). Der Gs α *DABP-GTP Komplex ist ebenfalls in der Lage unverändert mit seinen Effektoren zu wechselwirken, was durch die ähnlichen K_m -Werte für GTP und DABP-GTP bestätigt wird (Zor et al., 1997b). EF-Tu schützt im Komplex mit DABP-GppCH₂p oder MAAP-GTP die Aminoacylbindung der aa-tRNA vor Hydrolyse genauso gut wie im GTP-gebundenen

Zustand. Die Bindung von aa-tRNA an EF-Tu*DABP-GppNHp resp. EF-Tu*MAAP-GTP wurde in der vorliegenden Arbeit auch mittels Bandenretardationsexperimenten nachgewiesen (Kapitel 3.4). Demzufolge bewirken die GTP-Analoga bei der Bindung an G-Proteine eine funktionelle, der GTP-gebundenen Form ähnliche Konformation.

4.1.2 Die spontane Hydrolyse der GTP-Analoga

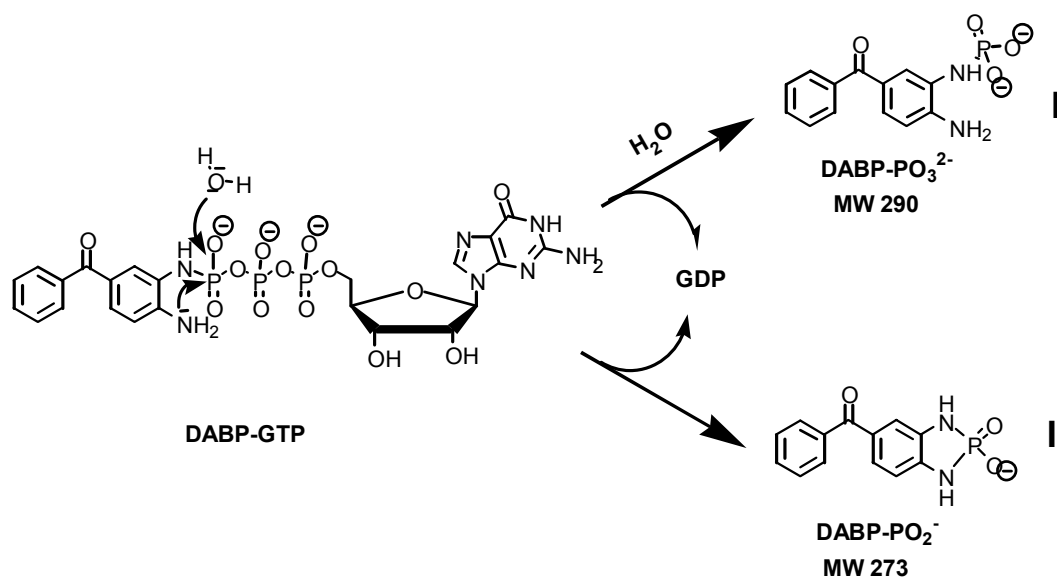
Um die Rolle des EF-Tu bei der Hydrolyse der GTP-Analoga verstehen zu können wurde auch ihre nichtenzymatische Hydrolyse untersucht. Bei der unkatalysierten Hydrolyse von GTP in Wasser wird eine Phosphoanhydridbindung zwischen dem β - und γ -Phosphat gespalten. Diese Art einer nukleophilen Substitution kann auf unterschiedliche Weise katalysiert werden. Der Nukleophil, in diesem Fall ein Wassermolekül, kann durch eine generelle Base aktiviert, der Übergangszustand und die Abgangsgruppe (GDP) können durch eine elektrostatische Interaktion oder durch eine generelle Säure stabilisiert werden. Im Gegensatz zu einer frei in der Lösung stattfindenden Hydrolyse bietet eine Proteinoberfläche eine bessere elektrostatische Stabilisierung und erniedrigt zusätzlich die entropischen Kosten für das Zusammenbringen von zwei Molekülen (Fersht, 1985d). Nach (Schweins et al., 1995) sind die γ -Phosphatester und γ -Phosphatamide von GTP hydrolysestabil, weil ihnen das freie Phosphat, das als eine generelle Base bei der GTP-Hydrolyse fungiert, fehlt. In biochemischen Studien werden verschiedene am γ -Phosphat-modifizierte Nukleotidanaloga angesetzt (Jameson and Eccleston, 1997), (Allin et al., 2001).

MAAP-GTP ist in Lösung sehr stabil (Kapitel 3.3). Es wird erst in sehr sauerem Milieu, wahrscheinlich nach der Protonierung mehrerer Phosphate, hydrolysiert. Dabei wird bei sauerem pH nicht die normalerweise labilere β - γ -Phosphoanhydridbindung sondern die Phosphoamidbindung gebrochen. Um dieses Phänomen zu verstehen wären zusätzliche Untersuchungen notwendig.

DABP-GTP ist dagegen in Lösung relativ labil. In (Zor et al., 1997b) wurde beschrieben, dass die spontane Hydrolyse von DABP-GTP rund 40-Mal schneller als die von GTP ist. DABP-GTP hydrolysiert spontan bei neutralem pH in Abwesenheit von Mg^{2+} , aber Anwesenheit von monovalenten Kationen, mit einer Rate von $1.3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ($35 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_{1/2} \sim 10 \text{ h}$). Die Zugabe von Mg^{2+} beschleunigt die Hydrolyse, vermutlich durch Erhöhung des pKa's des γ -Phosphates (Schweins et al., 1994), (Schweins et al., 1995), rund 20-fach ($k_h = 0.024 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} \sim 30 \text{ min}$).

Die relativ niedrigen Ausbeuten, ~35%, die in der vorliegenden Arbeit bei der Reinigung des DABP-GTP erzielt wurden, sind teilweise durch die 4-5-stündige Anionenaustauscherchromatographie und die Hydrolyse von DABP-GTP zu erklären. Im Vergleich dazu wurden bei der Verwendung einer RP-HPLC zur Reinigung von DABP-GTP Ausbeuten >60 % erhalten (Zor et al., 1997b).

Die Hydrolyselabilität des DABP-GTP, im Gegensatz zur Stabilität des MAAP-GTP, wird durch die freie aromatische Aminogruppe verursacht. Die Ausbeuten von ~ 10 % bei der Synthese der nichthydrolysierbaren Analoga, DABP-GppNHp und DABP-GppCH₂p, deuten auf eine niedrige Reaktivität der durch eine NH- bzw. CH₂-Brücke getrennten γ -Phosphate hin. Die HPLC-Analyse dieser Analoga zeigte, dass beide Aminogruppen des DABP, wenn auch unterschiedlich stark, nukleophil sind. Folglich entstehen bei der Synthese zwei Regioisomere, mit der Phosphoamidbindung in der *meta*- oder *para*-Position. Diese zwei Regioisomere können per RP-HPLC getrennt werden, jedoch sind immer ein paar Prozent des anderen Isomers vorhanden. Das, zusammen mit dem verändernden Verhältnis der Regioisomere von unabhängigen Reinigungen, weist auf eine Transisomerisierung und damit auf einen nukleophilen Angriff der aromatischen Amine auf das γ -Phosphat hin. Das Fehlen des zweiten Regioisomers beim DABP-GTP kann durch unterschiedliche Stabilitäten der Isomere erklärt werden. Wenn man eine DABP-GTP Lösung nach längerer Aufbewahrung bei R.T. durch ESI-MS analysiert, findet man zusätzlich zu DABP-GTP und GDP zwei DABP-Pi Produkte (Schema 4.1), ein DABP-Phosphoamid (I) und ein zyklisches DABP-Phosphodiamid (II).



Schema 4.1 Hydrolytische (I) und aminolytische (II) Spaltung des DABP-GTP.

Das zyklische Produkt entsteht nach dem nuklophilen Angriff der freien Aminogruppe auf das γ -Phosphat. Das bedeutet, dass die spontane Spaltung des DABP-GTP, mindestens teilweise, durch eine intramolekulare Aminolyse und nicht durch eine Hydrolyse erfolgt.

Bei Protontransfer-Reaktionen wird oft eine verlangsamte Kinetik, ein primärer Isotopeneffekt, beobachtet, wenn man H_2O durch D_2O ersetzt (Fersht, 1985b). Obwohl die Spaltungsrate von DABP-GTP pH-abhängig ist, verläuft die Spaltung in neutralem Milieu gleich schnell in D_2O und H_2O , es kommt demzufolge zu keinem Protontransfer in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion. Der nuklophile Angriff der Aminogruppe resp. des Wassermoleküls auf das γ -Phosphat ist in Lösung wahrscheinlich der langsamste Schritt. Die pH-Abhängigkeit der Hydrolyserate hat einen sigmoidalen Charakter und es werden im Übergangsbereich vermutlich das γ - bzw. auch das β -Phosphat protoniert.

4.1.3 Die EF-Tu-katalysierte Hydrolyse von DABP-GTP

In $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine (Zor et al., 1997b) und in der kleinen GTPase Ras (Ahmadian et al., 1999) ist DABP-GTP ein funktionelles Analog von GTP. Die Verwendung einer Serie von verschiedenen modifizierten GTP-Analoga zeigte, dass eine Amino- resp. Hydroxylgruppe essentiell für ihre Hydrolyse durch $\text{G}\alpha$ ist (Zor et al., 1998). Dies wurde auch für Ras bestätigt (Ahmadian et al., 1999). Die relative Position der funktionellen Gruppe zum γ -Phosphat ist dabei wichtig. Im DABP-GTP ist die freie Aminogruppe in der *ortho*-Position zur Phosphoamidbindung und DABP-GTP wird rasch durch das $\text{G}\alpha$ -Protein gespalten. Wenn man die Aminogruppe in die *meta*-Position verschiebt, ist das Analog stabil und wird nicht durch $\text{G}\alpha$ hydrolysiert (Zor et al., 1998). Diese Befunde deuteten darauf hin, dass die vicinal zum γ -Phosphat lokalisierte Amino- bzw. Hydroxylgruppe den Übergangszustand der Hydrolyse durch eine Wasserstoffbrücke zum γ -Phosphat stabilisieren könnte (Zor et al., 1998), (Ahmadian et al., 1999). Die Analyse der bei der Ras-katalysierten DABP-GTP-Spaltung entstehenden Produkte zeigte jedoch, dass die freie Aminogruppe aktiv als Nuklophil, das das γ -Phosphat angreift, an der Reaktion beteiligt ist (Gail et al., 2001). Bei der Reaktion entsteht folglich ein zyklisches Phosphodiamid (Schema 4.1, II). Das gleiche Produkt wurde auch in der vorliegenden Arbeit bei der EF-Tu-katalysierten DABP-GTPase nachgewiesen. Die enzymatische, ähnlich wie die spontane Spaltung von DABP-GTP, verläuft demzufolge über eine intramolekulare Aminolyse. Das stellt eine völlig neue Art der Substrat-assoziierten Katalyse (SAK) dar. Die bekannten

Funktionen der Substrate in verschiedenen SAK-Typen schließen die einer generellen Base, einer Orientierung des Wassers, eine elektostatische bzw. durch Wasserstoffbrücken vermittelte Stabilisierung der Intermediate und die Rolle der Abgangsgruppe ein (Dall'Acqua and Carter, 2000). Bei der DABP-GTPase stellt das Substrat eine funktionelle Gruppe zur Verfügung, die die Spaltung durchführt. Und das Substrat spaltet sich durch eine intramolekulare Aminolyse selbst. Da diese intramolekulare Reaktion auch spontan abläuft, wird sie nicht von dem Protein induziert.

Die spontane Spaltung von DABP-GTP wird durch das Ras Protein, je nach eingeführter Mutation, 18-180-fach beschleunigt (Gail et al., 2001), (Ahmadian et al., 1999). Der Vergleich mit der GTP-Hydrolyse zeigt, dass die vom Wildtyp Ras-katalysierte DABP-GTPase nur 10-fach, hingegen die von der onkogenen G12V-Mutante-katalysierte Reaktion bis 720-fach schneller ist (Ahmadian et al., 1999). Hauptsächlich die hydrophoben Modifikationen in der P-Schleife von Ras führen zu einer deutlichen Beschleunigung der DABP-GTP Spaltung. Dieser Effekt wird durch die Positionierung des Benzophenonrings und damit auch der freien Aminogruppe erklärt. In den Kristallstrukturen von RasG12V und G12P mit DABP-GppNHp ist das katalytische Gln61 durch den Benzophenonring aus der Bindungstasche verdrängt und kann sich nicht an der Katalyse beteiligen (Ahmadian et al., 1999). Wie durch den alternativen Mechanismus der DABP-GTP-Spaltung zu erwarten ist, ist die Ras Q61A Mutante trotz ihrer Inaktivität bei der GTP-Hydrolyse in der DABP-GTPase sehr aktiv (Ahmadian et al., 1999).

Das Gs α -Protein beschleunigt in Gegenwart von seinem GAP die spontane DABP-GTP Spaltung mehr als 1000-fach. Die DABP-GTPase ist allerdings bei Gs α genauso schnell wie die GTPase (Zor et al., 1997b). Dabei wurden die Spaltungsraten von DABP-GTP indirekt, durch die Aktivierung der Adenylat-Cyclase und cAMP-Produktion in Membranen der Erythrozyten bestimmt. Die Autoren berufen sich jedoch darauf, dass die so erhaltenen GTPase-Werte mit denen, die durch die Messung des freien [γ -³²P]-Phosphates erhaltenen wurden, in Übereinstimmung sind. Ähnlich wie beim Ras führt die Mutation des katalytischen Gln227 in Gs α zur kompletten Inhibition seiner GTPase Aktivität. Diese Mutation hat jedoch keinen Effekt auf die DABP-GTPase Reaktion (Zor et al., 1997b). Interessanterweise bewirkt die ADP-Ribosylierung des hypothetischen Argininfingers des Gs α , Arg201, durch das Cholera-Toxin eine starke und quantitativ gleiche Inhibition beider Reaktionen, sowohl der GTPase auch der DABP-GTPase (Zor et al., 1997b). Diese funktionelle Ähnlichkeit der beiden Nukleotide in ihrer Wechselwirkung mit Gs α steht im Kontrast zu den unterschiedlichen Spaltungsgeschwindigkeiten dieser Nukleotide in Ras

(Ahmadian et al., 1999) und zu den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Geschwindigkeiten in EF-Tu (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 Vergleich der DABP-GTPase und GTPase in EF-Tu aus *T. thermophilus*.

EF-Tu	Mg ²⁺	DABP-GTPase			GTPase	
		k_h (min ⁻¹)	Relative Rate	$t_{1/2}$ (min)	k_h (min ⁻¹)	DABP-GTP / GTP
+	+	23	1	0.044	0.03	780
+	-	- ^{a)}	-	-	0.03	-
-	+	0.024	0.0011	40	0.0006 ^{b)}	40
-	-	0.0013	0.00006	600	-	-

a) Wenn DABP-GTP und EF-Tu in μ M-Konzentration vorliegen bildet sich ohne Mg²⁺ kein Komplex (Kapitel 3.3.2). **b)** Aus (Zor et al., 1997b). Werte ohne EF-Tu bei 35°C, mit EF-Tu bei 37°C.

EF-Tu WT spaltet DABP-GTP bei 37°C mit einer Halbwertszeit von ~ 3 s. Damit ist die EF-Tu-katalysierte DABP-GTPase rund 780-fach schneller als die EF-Tu-katalysierte GTP-Hydrolyse. Im Vergleich zur spontanen Spaltung wird die Reaktion durch EF-Tu ~ 910 -fach beschleunigt. Außerdem weist die EF-Tu-katalysierte DABP-GTPase, im Gegensatz zur GTPase und spontanen Spaltung von DABP-GTP, einen deutlichen Isotopeneffekt, $k_h(H_2O)/k_h(D_2O) = 3$, auf. Die Schrittsequenz ist zwar bei der GTPase und DABP-GTPase prinzipiell identisch: Protonierung des γ -Phosphats (Schweins et al., 1994), Angriff des Nucleophils und Spaltung der β - γ -Phosphoanhydrid Bindung, die relativen Geschwindigkeiten sind aber unterschiedlich. Durch den niedrigeren pKa des γ -Phosphates des DABP-GTP (Schweins et al., 1995) und die Begünstigung des intramolekularen nukleophilen Angriffs der Aminogruppe im Vergleich zum Angriff des Wassers, wird die Protonierung des γ -Phosphats zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion. Wie bereits erwähnt, erhöht EF-Tu die Geschwindigkeit der DABP-GTP-Spaltung um knapp drei Größenordnungen. In Lösung ist der Angriff der Aminogruppe auf das γ -Phosphat zum Teil durch den schwereren Abgang des GDP verhindert. EF-Tu kann die Reaktion durch eine Stabilisierung der Abgangsgruppe (GDP) und einer Ladungsverteilung, die der im Übergangszustand ähnelt, beschleunigen. Allin et al. zeigten, dass durch die Bindung von GTP an Ras die negative Ladung am β -Phosphat stabilisiert wird, und dass dieser Effekt durch die Bindung von RasGAP noch verstärkt wird (Allin et al., 2001). Das bedeutet, dass die GTP-Hydrolyse durch die Stabilisierung der Abgangsgruppe (GDP) deutlich beschleunigt wird. Im Fall von EF-Tu und DABP-GTP kann das Protein den intramolekularen Angriff der Aminogruppe durch die Stabilisierung der sich entwickelnden negativen Ladung am β -Phosphat erleichtern.

Mutationen in Ras, besonders in der P-Schleife, haben einen großen Einfluss auf die DABP-GTPase (Ahmadian et al., 1999). Die verschiedenen Ras Mutanten spalten das

DABP-GTP mit einer 10- bis 70-fach unterschiedlichen Geschwindigkeit. Bei EF-Tu haben Mutationen in der Switch I- und Switch II-Region und die Mutation von Val20 in der P-Schleife des EF-Tu keinen signifikanten Einfluss auf die DABP-GTPase. Hier liegen die Unterschiede meistens unter 30%. Die größte Differenz, eine knapp 50%-ige Erhöhung der Spaltungsrate, verursacht die Mutation Ile61Lys.

Den getesteten Aminosäureresten wurde eine Rolle bei einer Konformationsänderung von EF-Tu, die während der ribosomstimulierten GTP-Hydrolyse statt findet, zugeschrieben (Krab and Parmeggiani, 1998), (Berchtold et al., 1993). Arg59 ist homolog zum intramolekularen Argininfinger in $G\alpha$ -Proteinen und bildet eine starke Ionenbindung mit Asp87 aus. Dadurch werden die Switch-Regionen in EF-Tu positioniert. Für His85, das homolog zum katalytischen Gln in Ras und $G\alpha$ -Proteinen ist, wurde eine Funktion bei der Positionierung und wegen der Basizität des Histidins auch bei der Aktivierung des angreifenden Wassermoleküls diskutiert. Der Imidazolring des His85 zeigt in der Kristallstruktur von EF-Tu*GppNHp jedoch in die Lösung und das nukleophile Wassermolekül ist durch ein sogenanntes hydrophobes Tor aus Val20 und Ile61 von His85 geschirmt (Berchtold et al., 1993). Bei der Bindung an das Ribosom könnte die Effektorregion (41-62) reorientiert und die Ionenbindung Arg59-Asp87 aufgebrochen werden. Die eine Seite des hydrophoben Tors, das Ile61 aus der Effektorregion, kann dabei geöffnet und das His85 durch ein Umklappen um die C_α - C_β Bindung in die Bindungstasche gebracht werden (Krab and Parmeggiani, 1998), (Berchtold et al., 1993).

Die DABP-GTPase geht einen anderen Weg und keine der Mutationen an Arg59, His85, Val20 und Ile61 hat daher einen signifikanten Einfluss auf die DABP-GTP-Spaltung. Eine Störung der Mg^{2+} -Koordinationsphäre durch die Thr62Ala Mutation stört stark die Ribosomen-stimulierte GTPase. Die DABP-GTPase wird dagegen durch die T62A Mutation nicht beeinflusst. Bei der Spaltung von DABP-GTP kommt EF-Tu mit den Aminosäureresten, die die Abgangsgruppe stabilisieren, aus. Ein Kandidat für eine bedeutende katalytische Rolle ist das Lys24, das sowohl in der GppNHp- auch in der GDP-Form in einer ionischen Interaktion mit dem β -Phosphat steht (Polekhina et al., 1996), (Berchtold et al., 1993).

4.2 FRET-Assay zur Detektion des ternären Komplexes

Lange bevor wir strukturelle Daten aus den kristallographischen und cryoEM Untersuchungen der Ribosomen-Komplexe erhielten wurde der nichtradiative Singlet-Singlet Energietransfer (FRET) hauptsächlich zur Messung der Abstände zwischen einzelnen Regionen im Ribosom und der relativen Position der am Ribosom gebundenen tRNA's verwendet. Die meiste Arbeit in diesem Gebiet wurde durch die Arbeitsgruppe von B. Hardesty (Odom et al., 1990), (Rychlik et al., 1983) erbracht. Die Gruppen von A.E. Johnson und D.M. Jameson untersuchten mittels FRET vorwiegend die Orientierung der Komponenten im ternären Komplex (Hazlett et al., 1989), (Watson et al., 1995). In dieser Dissertation wurde die *E. coli* tRNA^{Phe} an der X-Base (acp3U47) und der EF-Tu an zwei Positionen in der Domäne III mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der FRET von an EF-Tu lokalisiertem Donor zum an der tRNA-gebundenen Akzeptor sollte letztlich zur Präzisierung unserer Kenntnisse über die Bindung des ternären Komplexes in die ribosomale A-Stelle beitragen. Bei der theoretischen Vorbereitung dieser Experimente wurde vorausgesetzt, dass die Intensitätsänderung des FRETs direkt die Abstandsänderung zwischen definierten Positionen an der tRNA und am EF-Tu reflektieren würde. Bislang wurde der Mechanismus der Interaktion des ternären Komplexes mit der ribosomalen A-Stelle mittels der Signaländerung der Fluoreszenz modifizierter tRNA's und des EF-Tu gebundenen mant-dGTPs untersucht (Rodnina et al., 1994), (Rodnina et al., 1995), (Rodnina et al., 1996), (Pape et al., 1999). Fast alle tRNAs die in diesen Arbeiten ein Signal während der Bindung in die A-Stelle gaben, waren in der Ellbogen Region der tRNA Modifiziert. Die X-Base ist ebenfalls in dieser Region der tRNA lokalisiert. Damit kann das Fluoreszenzsignal nicht nur durch den FRET interpretiert werden.

Das hier entwickelte FRET-Assay eignet sich folglich eher zur Detektion der Komplexbildung zwischen EF-Tu und aa-tRNA (Kapitel 3.6.9). Beispielsweise kann die Aminoacylierungsreaktion mittels dieses Assay verfolgt werden. Das kleine Signal, das die Detektion stark erschwert kann durch das Ersetzen des Fluoreszenzakzeptors durch einen Quencher deutlich erhöht werden.

4.3 Untersuchungen zur Argininfinger-Hypothese

4.3.1 Intrinsische GTP-Hydrolyse der Arginin-Mutanten von EF-Tu

Alle G-Proteine besitzen eine Region, die wegen ihrer Wechselwirkung mit anderen Molekülen als die Effektorregion bezeichnet wird. Im EF-Tu wird die Effektorregion durch Aminosäuren 41-62 gebildet. Aus der Kristallstruktur des ternären Komplexes ist ersichtlich, dass die Switch I (52-64) und Switch II-Regionen (84-96) des EF-Tu stark in der Erkennung des Akzeptorstammes und in der Positionierung der großen Furche der tRNA involviert sind (Nissen et al., 1996). Beispielsweise bewirkt das Asp87 aus der Switch II-Region, zusammen mit dem Glu390, ein elektrostatisches Gleichgewicht zwischen der Proteinoberfläche und der tRNA. Gleichzeitig geht Asp87 eine ionische Wechselwirkung mit Arg59 aus der Switch I-Region ein (Nissen et al., 1996). Diese ionische Interaktion wird während der GTP-Hydrolyse aufgebrochen und ist vermutlich wichtig für die Dynamik dieser Region im EF-Tu. Eine ähnliche Interaktion ist in der Kristallstruktur des ternären Komplexes auch zwischen Arg57 und Asp49 zu sehen. Die evolutionäre Konservierung des Arg59 und einer positiven Ladung (Arg oder Lys) an Position 57 zwischen den Translationsfaktoren deutet auf eine wichtige Rolle dieser Aminosäuren in der Switch I-Region hin. Mehrere Aminosäuren der Switch-Regionen sind auch an der Nukleotidbindung beteiligt (Polekhina et al., 1996), (Berchtold et al., 1993). So ist auch die Beweglichkeit der Switch II-Region eine Voraussetzung für die Funktion des EF-Tu (Knudsen et al., 2001). Es ist denkbar, dass die Flexibilität dieser Region auch durch das Vorhandensein resp. Fehlen der Ionenbindung zwischen Arg59 und Asp87 moduliert wird.

Bei 37°C und in Abwesenheit von aa-tRNA toleriert der *T. thermophilus* EF-Tu relativ große Veränderungen in der Switch I-Region ohne eine deutliche Abnahme der intrinsischen GTPase Aktivität (Zeidler et al., 1996). Die größte Verringerung der Aktivität, knapp 35%, wurde bei einer E55L Mutante beobachtet. Der Austausch des potentiell wichtigen Arg59 zu Thr führte sogar zu einer fast 70%-tigen Erhöhung der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp EF-Tu. Dieser Effekt wurde durch eine erhöhte Mobilität des Asp87 und damit auch der Switch II-Region erklärt (Zeidler et al., 1996).

In der Anwesenheit von aa-tRNA und bei 65°C sieht die Situation anders aus (Kapitel 3.9.1). Die Mutation des Arg57 führt zu einer ~25%-tigen und des Arg59 zu einer ~50%-tigen Abnahme der intrinsischen GTPase Aktivität. Obwohl diese Effekte nicht groß sind, deuten sie darauf hin, dass der EF-Tu die Destabilisierung und veränderte Flexibilität der

Effektorregion mit einer Verlangsamung der Orientierung der katalytischen Gruppen einbüßen muss. Zu der niedrigeren apparenten Hydrolyseaktivität der Arg59 Mutante kann auch ihre erniedrigte Nukleotidbindungsaffinität, die bei einer erhöhten Temperatur bedeutend werden kann, beitragen (Zeidler et al., 1996), (Knudsen and Clark, 1995). Eine andere Möglichkeit, die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen in (Zeidler et al., 1996) und in dieser Arbeit zu erklären, ist das Vorhandensein der aa-tRNA. Die Bindung der aa-tRNA verlangsamt, wahrscheinlich durch die Hemmung des strukturellen GTP/GDP-Überganges, die intrinsische GTP-Hydrolyse von EF-Tu (Krab and Parmeggiani, 1999). Eine veränderte Interaktion der Arg57 und Arg59 Mutanten mit der aa-tRNA könnte diesen Effekt beeinflussen. Es ist jedoch, wegen der erniedrigten Affinität dieser Mutanten zur aa-tRNA (Zeidler et al., 1996), (Knudsen and Clark, 1995), weniger wahrscheinlich, dass dies zu einer weiteren Inhibition der GTP-Hydrolyse im Vergleich zum Wildtyp EF-Tu führt.

4.3.2 Ribosomen-stimulierte GTP-Hydrolyse

4.3.2.1 *Aktivität der EF-Tu Mutanten*

Die aktuellste cryoEM Struktur zeigt *E. coli* Ribosomen mit dem durch Kirromycin in der A/T-Stelle fixierten ternären Komplex (Valle et al., 2002). Eine Anpassung der Kristallstruktur des Phe-tRNA*EF-Tu*GppNHp Komplexes (Nissen et al., 1995) an die cryoEM Dichte zeigt, dass die Effektorregion des EF-Tu in diesem Zustand im Kontakt zur Sarcin/Ricin-Schleife der 23S rRNA steht. In diesem Komplex gleicht oder ist zumindest die Struktur des EF-Tu sehr ähnlich dem aktivierten Zustand der GTPase (Vogelely et al., 2001), (Rodnina et al., 1995). Um eine direkte Rolle bei der Stabilisierung des Übergangszustandes während der GTP-Hydrolyse zu erfüllen, müssten die Arginine aus der Effektorregion (Arg59 resp. Arg57), im Vergleich zur GTP-Form reorientiert werden. Jedoch gestattet die Auflösung von 11 Å keine präzisere Definierung der Orientierung der Effektorregion. Daher lässt sich nur feststellen, dass sich die Sarcin/Ricin-Schleife im Übergangszustand der GTP-Hydrolyse in unmittelbarer Nähe der Effektorregion befindet.

Neben der intrinsischen wurde in dieser Arbeit auch die stimulierte GTPase-Aktivität des Wildtyps und der beiden Arginin Mutanten von EF-Tu untersucht. Der *T. thermophilus* EF-Tu WT hydrolysiert GTP bei 20°C und in der Gegenwart von mit Poly(U)-programmierten Ribosomen und Phe-tRNA^{Phe} mit einer Hydrolyserate (k_h) von 0.055 s⁻¹ ($t_{1/2} = 18$ s) (Kapitel

3.9.1). Damit ist die stimulierte GTPase bei 20°C etwas über 100-fach schneller als die intrinsische GTPase bei 37°C. Wenn man den Temperaturunterschied von 17°C berücksichtigt, erhält man eine rund 500-fache Aktivierung der GTPase von EF-Tu durch *T. thermophilus* Ribosomen. Das stellt eine 20-200-fach niedrigere, abhängig von ionischen Bedingungen, als die für *E. coli* System beschriebene 10^4 - 10^5 -fache Stimulierung dar (Pape et al., 1998). In einem homologen *in vitro* Translationssystem aus *T. thermophilus* Komponenten (Dissertation S.Brock 2001) wurde bei 37°C, was ca. 35°C unter dem Temperaturoptimum für *T. thermophilus* liegt, eine Synthesegeschwindigkeit von 0.15 Aminosäuren pro Sekunde erhalten. Damit war die Geschwindigkeit auch um etwa Faktor 100 geringer als die *in vivo*, unter optimalen Bedingungen für *E. coli* gemessene Geschwindigkeit der Translation (Pavlov and Ehrenberg, 1996). Vergleicht man die 500-fache Stimulierung der GTP-Hydrolyse mit den publizierten Ergebnissen aus dem *T. thermophilus* System, so liegt sie in der gleichen Größenordnung wie die durch Zeidler et al. (Zeidler et al., 1996) bestimmte Stimulierung. Zugleich ist die Hydrolyserate bei 20°C rund vier Mal höher als der bei 0°C gewonnene Wert von 0.014 s^{-1} (Dissertation H.Rütthard 1999).

Im *E. coli* System wurde die Aktivierung der EF-Tu-katalysierten GTP-Hydrolyse und die Konformationsänderung aus dem aktivierten Zustand in die GDP-Form sowie die Dissoziation des EF-Tu aus dem Ribosom durch die Signaländerungen der mant-dGTP Fluoreszenz visualisiert (Rodnina et al., 1995), (Pape et al., 1999). Dabei wird die Bindung des ternären Komplexes an das Ribosom mit einer biphasischen Fluoreszenzänderung, einem Anstieg und einer darauffolgenden Absenkung begleitet (Rodnina et al., 1995). Der Fluoreszenzanstieg soll die Aktivierung der GTP-Hydrolyse, genauer gesagt die Strukturänderungen im EF-Tu, die damit verbunden sind, repräsentieren. Dieses Intermediat kann durch die Zugabe von Kirromycin blockiert und die Dissoziation von EF-Tu und somit die nachfolgende Fluoreszenzabsenkung unterbunden werden.

In *E. coli* ist die stimulierte GTP-Hydrolyse ($k_h = 12 \text{ s}^{-1}$ bei 20°C) nur um wenige Millisekunden langsamer als die durch die mant-Fluoreszenz ermittelte Aktivierung der GTPase ($k_{app1} = 18 \text{ s}^{-1}$ bei 20°C) (Rodnina et al., 1995). Damit wird die Aktivierung unmittelbar, mit einer Rate von bis zu 500 s^{-1} , von der Hydrolyse gefolgt (Pape et al., 1998). Gleichzeitig konnte auch die Dissoziationsrate des EF-Tu vom Ribosom aus der biphasischen Fluoreszenzänderung ermittelt werden ($k_{app2}=5 \text{ s}^{-1}$ bei 20°C).

Im in der vorliegenden Arbeit etablierten *T. thermophilus* System verläuft die Änderung der mant-dGTP Fluoreszenz bei der Bindung des ternären Komplexes an das Ribosom monophasisch ($k_{app} = 3.1 \text{ s}^{-1}$ bei 20°C). Dieser Fluoreszenzanstieg repräsentiert die

Aktivierung der GTP-Hydrolyse und wird durch die Zugabe von Kirromycin fast um das dreifache verlangsamt. Das Fehlen der zweiten Kinetik deutet auf eine sehr langsame Umlagerung der EF-Tu Struktur in die GDP-Form und Dissoziation des EF-Tu vom Ribosom hin (Kapitel 3.9.2).

Die Dissoziation des EF-Tu*GDP aus der ribosomalen Faktorbindungsstelle ist der langsamste Schritt während der Interaktion des ternären Komplexes mit dem Ribosom. So sind alle Schritte bis zur GTP-Hydrolyse in *E. coli* 10-30-Mal schneller, abhängig von der Mg^{2+} -Konzentration, als die Dissoziation von EF-Tu*GDP aus dem Ribosom (Pape et al., 1998). Die lange Halbwertszeit ($t_{1/2}$) der stimulierten GTP-Hydrolyse von 18 s, die im *T. thermophilus* System gemessen wurde, bedeutet, dass es im Zeitrahmen des Experimentes (10 s) zu keiner Dissoziation von EF-Tu aus dem Ribosom kommt und erklärt so das Fehlen der zweiten Kinetik. Der große Zeitabstand (>17 s) zwischen der Aktivierung und der eigentlichen GTP-Hydrolyse bei 20°C deutet darauf hin, dass wichtige katalytische Komponenten nicht ausreichend beweglich sind und eventuell eine höhere Temperatur benötigen um eine konformationelle Barriere zu überwinden.

Die Mutationen der Arginine in der Switch I-Region verursachten keine großen Änderungen der Kinetik der GTPase Aktivierung und GTP-Hydrolyse. Interessanterweise wurde die GTPase Aktivierung in der Gegenwart der EF-Tu Arg57 Mutante um etwas über 10% ($k_{app} = 3.5 \text{ s}^{-1}$) und die stimulierte Hydrolyse rund 1.6-Mal schneller ($k_h = 0.088 \text{ s}^{-1}$) als beim EF-Tu WT. Ein entgegengesetzter Effekt wurde bei der Arg59 Mutante gesehen. Hier war die Aktivierung mit 4% nur unwesentlich langsamer, die stimulierte GTP-Hydrolyse verlief jedoch nur mit etwa 30% ($k_h = 0.018 \text{ s}^{-1}$) der Wildtyp Geschwindigkeit. Diese rund 3-fach langsamere stimulierte GTP-Hydrolyse der Arg59 Mutante steht im Widerspruch zu einer unveränderten GTP-Hydrolyserate die von H.Rütthard (Dissertation 1999) bei 0°C gemessen wurde. Es bleibt fraglich, ob das auf einen Temperatureffekt zurückgeführt werden kann.

Die Unterschiede zwischen dem Wildtyp EF-Tu und den Arginin-Mutanten sind bei 20°C in stimulierter GTP-Hydrolyse größer als in der Kinetik der Aktivierung der GTPase. Der große Zeitabstand von der Aktivierung bis zur GTP-Hydrolyse bleibt dabei auch bei den Mutanten ähnlich. Vorausgesetzt, dass eines dieser Arginine den Argininfinger repräsentieren sollte, würde man größere Differenzen in den Aktivitäten von den Mutanten und dem Wildtyp EF-Tu erwarten. Die in der Literatur (Zeidler et al., 1996) präsentierten Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass das Arg59, das homolog zum Argininfinger in $G\alpha$ -Proteinen ist, auch nicht bei 37°C eine katalytische Aktivität aufweist. Dennoch kann nicht

ausgeschlossen werden, dass die *T. thermophilus* Ribosomen, bzw. das ganze thermophile System, eine deutlich höhere Temperatur für eine optimale Funktion nötig haben. Das wird, z.B., bei der Vorbereitung der *T. thermophilus* 30S-Initiationskomplexe sichtbar, wo eine Inkubation bei 55°C benötigt wurde um einen aktiven Komplex isolieren zu können (S. Brock, persönliche Mitteilung).

4.3.2.2 Aktivität der Ribosomen mit L12-R80A

L12, in *E. coli* als L7/L12 bezeichnet, kommt als einziges ribosomales Protein im Ribosom in mehreren Kopien vor. Dabei bilden zwei Homodimere von L12 ein Tetramer, das durch seine N-terminalen Domänen mit dem L10 interagiert und an das Ribosom bindet (Gudkov et al., 1995). Die C-terminalen Domänen sind Lösungsmittel-exponiert und interagieren mit den Translationsfaktoren (Sommer et al., 1985), (Girshovich et al., 1986), (Nag et al., 1995). Vor 5 Jahren wurde die cryoEM Struktur von *E. coli* Ribosomen mit in der A/T-Stelle gebundenem ternären Komplex mit einer Auflösung von 18 Å beschrieben (Stark et al., 1997). Hier interagierte der EF-Tu mit der Basis des L7/L12-Stiels. An dieser Position sind das GTPase-aktivierende Zentrum (Wimberly et al., 1999) und die Sarcin/Ricin-Schleife der 23S rRNA (Wool et al., 1992) lokalisiert. Zusätzlich wurde auch eine Brücke, vermutlich zwischen den Helices C und D von EF-Tu und der C-terminalen Domäne von L7/L12 gesehen. In einer neueren cryoEM Struktur (mit einer Auflösung von 11 Å) (Valle et al., 2002) wurde hingegen diese Interaktion von EF-Tu mit der C-terminalen Domäne des *E. coli* L7/L12 nicht beobachtet.

Für die Funktion von L12 ist die Ähnlichkeit eines Helix-Schleife-Helix Strukturmotives in seiner C-terminalen Domäne mit einem Motiv in der N-terminalen Domäne des EF-Ts interessant (Wieden et al., 2001). Die Analyse der biophysikalischen Eigenschaften und der Sequenzhomologie dieser Motive deutet auf eine konvergente Evolution dieser Domänen hin, die durch die Interaktion mit einem gemeinsamen Liganden, nämlich EF-Tu, gesteuert wurde. Es ist die N-terminale Domäne des EF-Ts, die die Helix D im Komplex mit EF-Tu kontaktiert (Kawashima et al., 1996), (Wang et al., 1997) und gerade in dem homologen Strukturelement in der C-terminalen Domäne des L12 ist ein hochkonserviertes Arginin (Arg74 in *E. coli* und Arg80 *T. thermophilus*) positioniert (Wieden et al., 2001). Dieses Arginin ist ein sehr guter Kandidat für den katalytischen Argininfinger, der die EF-Tu-katalysierte GTP-Hydrolyse in *trans* stimulieren könnte.

Daher wurde in dieser Arbeit die stimulierte GTP-Hydrolyse und die Aktivierung der GTPase von *T. thermophilus* EF-Tu durch 70S Ribosomen, die statt dem Wildtyp L12 die Mutante L12-R80A tragen (70S-RA) untersucht (Kapitel 3.9.2). Mit einer Rate von 0.72 s^{-1} ist die Aktivierung der GTPase durch die 70S-RA etwas mehr als 4-Mal langsamer als durch die 70S WT Ribosomen. Hier wurde, ebenso wie bei den Messungen mit 70S WT, nur der Fluoreszenzanstieg beobachtet, dessen Kinetik sich durch die Zugabe von Kirromycin verlangsamt. Die nachfolgende GTP-Hydrolyse wurde um knapp 40% inhibiert. Dieser, relativ zu RasGAP, G α und Cdc42-GAP, geringe Verlust in der GTPase Aktivität nach dem Austausch des Arginins lässt vermuten, dass es sich auch bei L12-Arg80 nicht um einen Argininfinger der EF-Tu-katalysierten GTP-Hydrolyse handelt (Ahmadian et al., 1997), (Sprang, 1997), (Leonard et al., 1998).

Wie schon angedeutet ist das Arg74 im *E. coli* L7/L12 (Arg80 im *T. thermophilus* L12) eher in die Bindung des EF-Tu an das Ribosom als in die GTPase involviert (Wieden et al., 2001). Die gemessene verlangsamte Aktivierung der GTPase kann durch die Beeinträchtigung der Bindung des ternären Komplexes an das Ribosom erklärt werden. Die Kinetik der Aktivierung der GTPase kann im *E. coli* System durch die Erhöhung der Ribosomen-Konzentration beschleunigt werden (Rodnina et al., 1996) und ist demzufolge je nach der Ribosomen-Konzentration entweder durch die Bindung oder durch die Kodonerkennung kinetisch limitiert. Die in dieser Dissertation benutzten Konzentrationen vom ternären Komplex ($0.15 \mu\text{M}$) und den 70S Ribosomen ($0.5 \mu\text{M}$) sind in einem Bereich, in welchem die Bindung durchaus limitierend sein kann (Rodnina et al., 1996), (Rodnina et al., 1994). Eine zusätzliche Verringerung der Affinität vom ternären Komplex zu den Ribosomen durch eine Mutation des Arg80 im L12 kann sich in Verlangsamung der Aktivierung der GTPase ausdrücken.

Die GTP-Hydrolyse bei Ras wird durch das RasGAP, das den katalytischen Argininfinger trägt, um 4-5-Größenordnungen beschleunigt. Der Austausch des katalytischen Arginins im RasGAP erniedrigt die stimulierte GTPase 100-1000-fach (Ahmadian et al., 1997), (Sprang, 1997). Die restliche ca. 100-fache Beschleunigung der GTPase bewirkt das GAP durch die Orientierung der katalytischen Reste und durch entropische Effekte. Bei der von den G α -Proteinen katalysierten GTP-Hydrolyse bewirkt der katalytische Effekt vom Arginin eine rund 100-fache Stimulierung der Hydrolyse (Sprang, 1997). Eine niedrigere, ~40-fache, Stimulierungskapazität wird bei der GTP-Hydrolyse des Cdc42 (eine GTPase der Rho Familie) dem Argininfinger aus dem Cdc42-GAP zugesprochen (Leonard et al., 1998).

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass die Mutation der potentiellen katalytischen Arginine eine maximal 3-fach verlangsamte GTP-Hydrolyse (Arg59 Mutante) bzw. 5-fach verlangsamte Aktivierung der GTPase (70S-RA) zu Folge hat. Diese Effekte sind deutlich kleiner als die o.g. Effekte bei anderen G-Proteinen.

Zusammen mit den zwei Arginin Mutanten vom EF-Tu wurden drei Kandidaten für den katalytischen Argininfinger der stimulierten EF-Tu GTPase untersucht. Keinem von diesen Argininen konnte diese Funktion zugeteilt werden. *Thermus thermophilus* lebt in einem Temperaturbereich von 50-85°C (Brock, 1986). So kann die Möglichkeit, dass sich die katalytische Aktivität eines Argininfingers in einem thermophilen Organismus wie *T. thermophilus* erst bei einer viel höheren Temperatur als 20 resp. 37°C ausübt, nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In neuen cryoEM Struktur des Ribosoms mit gebundenem ternären Komplex (Valle et al., 2002) und der Kristallstruktur des Ribosoms (Yusupov et al., 2001) kann man sich die Bindungsstelle des ternären Komplexes näher anschauen. Abbildung 4.2 zeigt die Position des ternären Komplexes zwischen den ribosomalen Untereinheiten an. Die gleiche Bindungsstelle, wie sie in der Kristallstruktur zu sehen ist, ist in drei Orientierungen ohne den ternären Komplex in Abbildung 4.3 dargestellt. Aus der cryoEM Struktur geht hervor, dass die Sarcin/Ricin-Schleife der 23S rRNA im Kontakt zur G-Domäne des EF-Tu und die s.g. L11-rRNA, 58 Nukleotiden-lange Region um die Base 1070, zur T-Schleife der tRNA steht (Valle et al., 2002). L11 bindet durch seine C-terminale Domäne an die 1070-Region der 23S rRNA (Wimberly et al., 1999). Die N-terminale Domäne des L11 ist in die Richtung der G-Domäne des EF-Tu orientiert und besitzt mehrere zwischen Bakterien konservierte (siehe Anhang) Lysin- bzw. Argininreste (Abb. 4.2 und 4.3).

Ebenfalls in der Nähe des EF-Tu ist die C-terminale Domäne (<20 Å zur Sarcin/Ricin-Schleife) des L6 positioniert (Abb. 4.3). Hier sind auch Aminosäurenpositionen mit konservierter positiven Ladung vorhanden (Anhang). Diese Domäne des L6 ist jedoch an der rRNA Bindung beteiligt und es würde für die Interaktion mit EF-Tu eine Reorganisation dieser Region der 50S Untereinheit benötigt (Davies et al., 1998), (Stelzl et al., 2000).

Zusätzlich zu L7/L12 ist das L10 Protein in diesem GTPase-assoziierten Zentrum des Ribosoms lokalisiert. Durch die N-terminale Domäne bindet L10 die rRNA und die C-terminale Domäne stellt Bindungsstellen für die L7/L12-Dimere bereit (Griaznova and Traut, 2000), (Gudkov et al., 1980). EF-Tu konnte zum L10 Protein quervernetzt werden (Nag et al., 1995).

Die Beantwortung der Frage, ob ein katalytischer Argininfinger, der die GTPase von EF-Tu stimuliert, in einem dieser Proteine (L6, L10, L11) vorhanden ist, benötigt weitere Untersuchungen. Zusätzlich bleibt auch die Möglichkeit, dass die EF-Tu-katalysierte GTP-Hydrolyse nicht über ein Argininfinger-Mechanismus, ähnlich wie bei manchen anderen GTPasen (Seewald et al., 2002) und ATPasen (Rayment, 1996), verläuft. Das in dieser Arbeit beschriebene Fluoreszenz-System ist geeignet weitere Untersuchungen bezüglich der stimulierten GTPase des EF-Tu aus *T. thermophilus* durchzuführen.

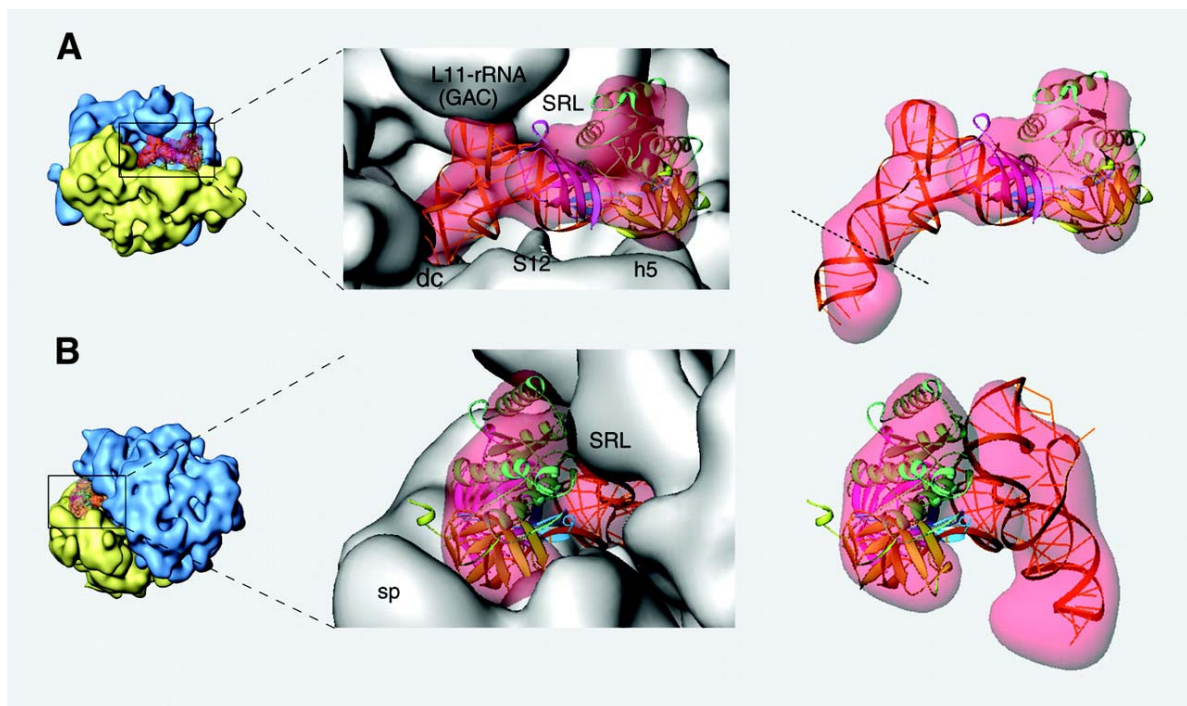
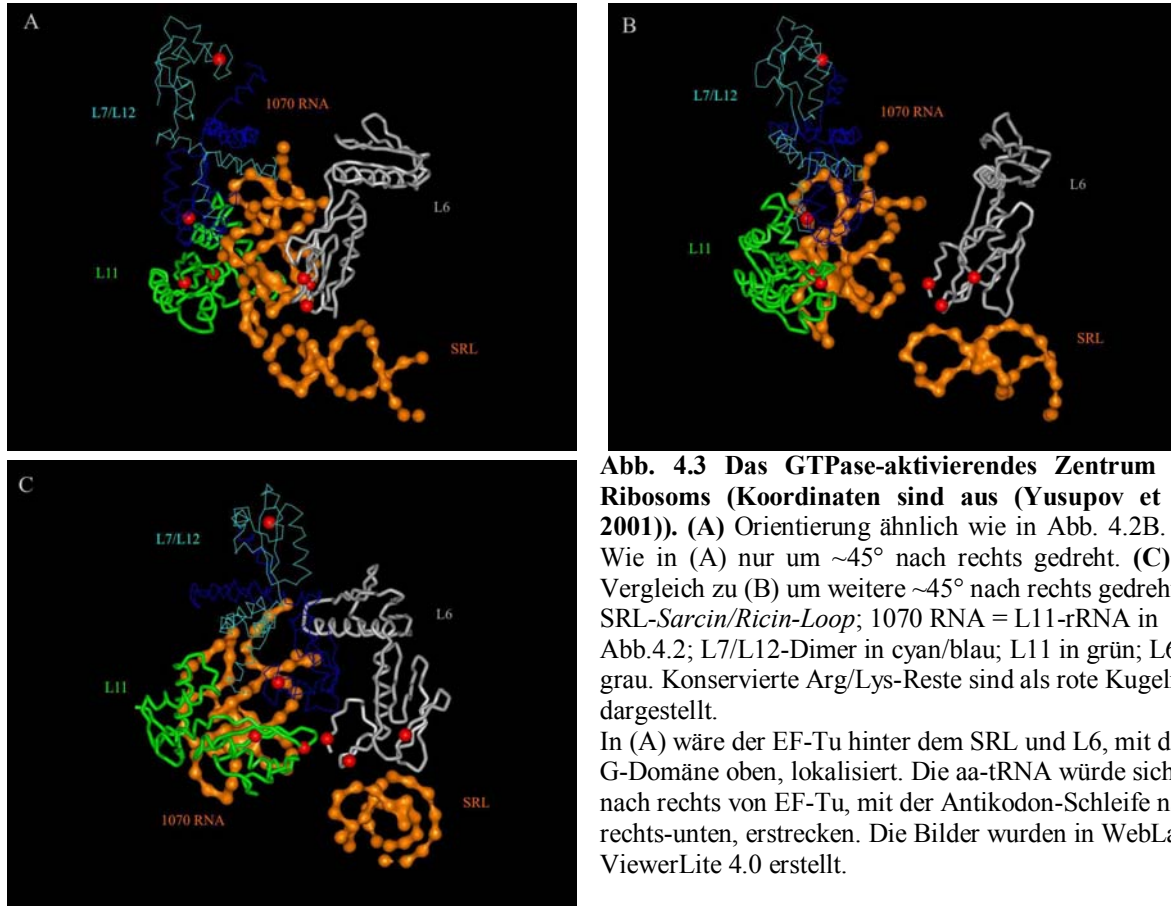


Abb. 4.2 Anpassung des EF-Tu und der aa-tRNA in die cryoEM Dichte des Ribosom Komplexes (Valle et al., 2002). (A) Ansicht von der Lösungsmittel-Seite. (B) Ansicht von der Interuntereinheit-Seite. SRL-Sarcin/Ricin-Loop; h5-Helix 5 der 16S rRNA; dc-decoding centre; sp-spur.



5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten die Unterschiede im Mechanismus der GTP-Hydrolyse und der Hydrolyse von GTP-Analoga identifiziert werden: i) Ein γ -Phosphoamid Derivat des GTP (MAAP-GTP) wird dabei gar nicht, ein anderes Derivat (DABP-GTP), das zusätzlich eine vicinal zum γ -Phosphat stehende Aminogruppe trägt, 780-fach schneller als GTP durch EF-Tu hydrolysiert. ii) Die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der DABP-GTPase und der GTPase unterscheiden sich. Bei der GTPase ist der nukleophile Angriff, bei der DABP-GTPase ein Protontransfer, vermutlich die Protonierung des γ -Phosphates, der langsamste Schritt der Reaktion. iii) Bei der DABP-GTPase spielt, im Gegensatz zur GTPase, keine der getesteten Aminosäuren aus dem aktiven Zentrum des EF-Tu eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse. iv) DABP-GTPase verläuft durch eine intramolekulare Aminolyse und nicht durch einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls. Diese aktive Beteiligung des DABP-GTP an seiner Spaltung stellt eine neue Art der Substrat-assistierten Katalyse dar. v) Die Analoga induzieren die GTP-gebundene Form des EF-Tu und ermöglichen die Bindung der aa-tRNA. Das bedeutet, dass eine hydrophobe Modifikation am γ -Phosphat des GTP zu keiner bedeutenden strukturellen Änderung der Regionen des EF-Tu, die wichtig für die Interaktion mit seinen Effektoren sind, führt.

Weiter wurden Cystein-Mutanten von EF-Tu, C82A/L404C und C82A/P357C, hergestellt und mit einem Coumarin-Derivat modifiziert. Eine tRNA^{Phe} aus *E. coli* wurde an der acp3U47-Base mit einem Fluoreszein-Derivat modifiziert und gereinigt. Bei den, auf FRET-basierenden, Fluoreszenztitrationsexperimenten konnten die Affinitäten der fluoreszierenden EF-Tu Varianten zur Phe-tRNA^{Phe}-X47F wegen einem starken Fluoreszenzhintergrund und dementsprechend schwachen Signal nur ungenau bestimmt werden. Das FRET-Assay konnte wegen dem kleinen Signal und seiner nicht eindeutigen Interpretation bei der Interaktion des fluoreszenzmarkierten ternären Komplexes mit dem Ribosom nicht zur kinetischen Untersuchungen der stimulierten GTPase von EF-Tu eingesetzt werden. Obwohl das FRET-Signal klein war, konnte die durch den Nukleotidaustausch bedingte Dissoziation des ternären Komplex kinetisch verfolgt werden.

Es wurden zusätzlich Experimente zur Argininfinger Hypothese durchgeführt. Um die Funktion des konservierten Arginins 80 im ribosomalen Protein L12 aus *T. thermophilus* zu untersuchen wurde eine L12-R80A Mutante gereinigt. Das Wildtyp L12 wurde in den Ribosomen durch die R80A Mutante ersetzt. Die Fähigkeit dieser Ribosomen die intrinsische GTPase von EF-Tu zu stimulieren wurde mittels Hydrolyse von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ geprüft. Für die

Untersuchungen der Aktivierung der stimulierten GTPase wurde ein auf mant-dGTP Fluoreszenz basiertes Assay im *T. thermophilus* System etabliert. Die gegenüber den Wildtyp Ribosomen kleinen Unterschiede in der Rate der GTP-Hydrolyse und GTPase-Aktivierung deuten eher auf eine Rolle des L12-Arg80 bei der Bindung des ternären Komplexes an das Ribosom als bei der Katalyse der GTPase hin. Ähnlich wurde auch die Funktion der Arginine 57 und 59 aus der Effektorregion des EF-Tu untersucht. Hier wurden ebenfalls für einen Argininfinger relativ zum Wildtyp EF-Tu zu kleine Differenzen in der GTP-Hydrolyse und GTPase-Aktivierung beobachtet.

6 Summary

The differences in the mechanism of EF-Tu catalysed hydrolysis of GTP and GTP-analogues were identified in this work: i) A γ -phosphoamide derivative of GTP (MAAP-GTP) is not hydrolysed. Another derivative (DABP-GTP), which bears an additional aminogroup vicinal to the γ -phosphate, is hydrolysed 780-times faster than GTP by EF-Tu. ii) The rate limiting steps are different for the hydrolysis of DABP-GTP and GTP. The nucleophilic attack is in the GTPase the rate limiting step. A proton transfer, most likely the protonation of the γ -phosphate, is the slowest step in the DABP-GTPase. iii) In contrast to the GTPase, no tested amino acid from the active site of the EF-Tu significantly affects the DABP-GTPase. iv) The DABP-GTP is cleaved by intramolecular aminolysis and not by a nucleophilic attack of a water molecule. This active participation of the DABP-GTP in its cleavage presents a new art of the substrate-assisted catalysis. v) The analogues induce the GTP-bound form of EF-Tu and make the binding of an aa-tRNA possible. This means that the hydrophobic modification of the γ -phosphate of GTP causes no significant structural changes in the regions of EF-Tu that are important for the interaction with its effectors.

Cysteine-mutants of EF-Tu, C82A/L404C and C82A/P357C, were prepared and modified with a coumarine derivative. A tRNA^{Phe} from *E. coli* was labeled with a fluorescein derivative on the acp3U47-Base and purified. Weak signal in the FRET-based fluorescence titration experiments prevented a precise determination of affinity between the EF-Tu variants and the Phe-tRNA^{Phe}-X47F. Because of the ambiguous interpretation, the FRET-assay was not used for kinetic studies of the ribosome stimulated GTPase. However, the dissociation of the ternary complex, which was promoted by the nucleotide exchange, could be analysed by the FRET-assay.

Finally, the arginine-finger hypothesis of the stimulated GTP-hydrolysis was tested for three arginines. A R80A mutant of the ribosomal protein L12 was purified. Wild type L12 was exchanged for the R80A Mutant in the *T. thermophilus* ribosomes. The ability of these ribosomes to stimulate the intrinsic GTPase of EF-Tu was followed by the hydrolysis of the [γ -³²P]GTP. For the studies on the activation of the GTPase was a mant-dGTP fluorescence assay used in the *T. thermophilus* system. The small differences in the GTP-hydrolysis and GTPase-activation between the wild type and the mutant ribosomes suggest a function for the L12-Arg80 for the binding of the ternary complex to the ribosome and not for catalysis of the GTPase. In analogy, the function of arginines 57 and 59 from the effector region of EF-Tu was examined. However, the differences in GTP-hydrolysis and GTPase-activation

between the wild type EF-Tu and its arginine mutants were too small for unambiguous assignment of a role of an arginine-finger for these arginines.

7 Literatur

- Agrawal,R.K., Penczek,P., Grassucci,R.A., and Frank,J. (1998). Visualization of elongation factor G on the Escherichia coli 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6134-6138.
- Ahmadian,M.R., Kreutzer,R., Blechschmidt,B., and Sprinzl,M. (1995). Site-directed mutagenesis of *Thermus thermophilus* EF-Tu: the substitution of threonine-62 by serine or alanine. *FEBS Lett.* *377*, 253-257.
- Ahmadian,M.R., Stege,P., Scheffzek,K., and Wittinghofer,A. (1997). Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat. Struct Biol* *4*, 686-689.
- Ahmadian,M.R., Zor,T., Vogt,D., Kabsch,W., Selinger,Z., Wittinghofer,A., and Scheffzek,K. (1999). Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 7065-7070.
- al-Karadaghi,S., Aevarsson,A., Garber,M., Zheltonosova,J., and Liljas,A. (1996). The structure of elongation factor G in complex with GDP: conformational flexibility and nucleotide exchange. *Structure* *4*, 555-565.
- Allin,C., Ahmadian,M.R., Wittinghofer,A., and Gerwert,K. (2001). Monitoring the GAP catalyzed H-Ras GTPase reaction at atomic resolution in real time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 7754-7759.
- Anborgh,P.H., Swart,G.W., and Parmeggiani,A. (1991). Kirromycin-induced modifications facilitate the separation of EF-Tu species and reveal intermolecular interactions [published erratum appears in *FEBS Lett* 1991 Dec 16;295(1-3):232]. *FEBS Lett* *292*, 232-236.
- Arai,K., Arai,N., Nakamura,S., Oshima,T., and Kaziro,Y. (1978a). Studies on polypeptide-chain-elongation factors from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. 2. Catalytic properties. *Eur J Biochem* *92*, 521-531.
- Arai,K., Kawakita,M., and Kaziro,Y. (1974). Studies on the polypeptide elongation factors from *E. coli*. V. Properties of various complexes containing EF-Tu and EF-Ts. *J Biochem (Tokyo)* *76*, 293-306.
- Arai,K., Ota,Y., Arai,N., Nakamura,S., Henneke,C., Oshima,T., and Kaziro,Y. (1978b). Studies on polypeptide-chain-elongation factors from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. 1. Purification and some properties of the purified factors. *Eur J Biochem* *92*, 509-519.
- Asahara,H. and Uhlenbeck,O.C. (2002). The tRNA specificity of *Thermus thermophilus* EF-Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 3499-3504.
- Beauclerk,A.A., Cundliffe,E., and Dijk,J. (1984). The binding site for ribosomal protein complex L8 within 23 s ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *259*, 6559-6563.
- Becker,H.D. and Kern,D. (1998). *Thermus thermophilus*: a link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 12832-12837.
- Berchtold,H., Reshetnikova,L., Reiser,C.O., Schirmer,N.K., Sprinzl,M., and Hilgenfeld,R. (1993). Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements [published erratum appears in *Nature* 1993 Sep 23;365(6444):368]. *Nature* *365*, 126-132.
- Blank,J., Grillenbeck,N.W., Kreutzer,R., and Sprinzl,M. (1995). Overexpression and purification of *Thermus thermophilus* elongation factors G, Tu, and Ts from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* *6*, 637-645.

- Blank, J., Nock, S., Kreutzer, R., and Sprinzl, M. (1996). Elongation factor Ts from *Thermus thermophilus*--overproduction in *Escherichia coli*, quaternary structure and interaction with elongation factor Tu. *Eur. J. Biochem.* *236*, 222-227.
- Bocharov, E.V., Gudkov, A.T., Budovskaya, E.V., and Arseniev, A.S. (1998). Conformational independence of N- and C-domains in ribosomal protein L7/L12 and in the complex with protein L10. *FEBS Lett.* *423*, 347-350.
- Bosch, L., Kraal, B., van der Meide, P.H., Duisterwinkel, F.J., and Van Noort, J.M. (1983). The elongation factor EF-Tu and its two encoding genes. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol* *30:91-126*, 91-126.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* *348*, 125-132.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* *349*, 117-127.
- Brock, S., Szkaradkiewicz, K., and Sprinzl, M. (1998). Initiation factors of protein biosynthesis in bacteria and their structural relationship to elongation and termination factors. *Mol. Microbiol.* *29*, 409-417.
- Brock, T.D. (1986). Thermophiles. In *Thermophiles. General, molecular, and applied microbiology.*, John Wiley&Sons).
- Caldon, C.E., Yoong, P., and March, P.E. (2001). Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. *Mol. Microbiol.* *41*, 289-297.
- Cepus, V., Ulbrich, C., Allin, C., Troullier, A., and Gerwert, K. (1998). Fourier transform infrared photolysis studies of caged compounds. *Methods Enzymol.* *291*, 223-245.
- Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1994). Structures of active conformations of G_{ai} and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* *265*, 1405-1412.
- Curnow, A.W., Ibb, M., and Soll, D. (1996). tRNA-dependent asparagine formation. *Nature* *382*, 589-590.
- Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T.A., and Moore, P.B. (1994). The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.* *13*, 3661-3668.
- Dahlquist, K.D. and Puglisi, J.D. (2000). Interaction of translation initiation factor IF1 with the *E. coli* ribosomal A site. *J. Mol. Biol* *299*, 1-15.
- Dall'Acqua, W. and Carter, P. (2000). Substrate-assisted catalysis: Molecular basis and biological significance. *Protein Science* *9*, 1-9.
- Davies, C., Bussiere, D.E., Golden, B.L., Porter, S.J., Ramakrishnan, V., and White, S.W. (1998). Ribosomal proteins S5 and L6: high-resolution crystal structures and roles in protein synthesis and antibiotic resistance. *J. Mol. Biol.* *279*, 873-888.
- Dey, D., Bochkariov, D.E., Jokhadze, G.G., and Traut, R.R. (1998). Cross-linking of selected residues in the N- and C-terminal domains of *Escherichia coli* protein L7/L12 to other ribosomal proteins and the effect of elongation factor Tu. *J Biol Chem* *273*, 1670-1676.
- Dey, D., Oleinikov, A.V., and Traut, R.R. (1995). The hinge region of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12 is required for factor binding and GTP hydrolysis. *Biochimie* *77*, 925-930.
- Dontsova, O., Dokudovskaya, S., Kopylov, A., Bogdanov, A., Rinke-Appel, J., Junke, N., and Brimacombe, R. (1992). Three widely separated positions in the 16S RNA lie in or close to the

- ribosomal decoding region; a site-directed cross-linking study with mRNA analogues. *EMBO J* 11, 3105-3116.
- Duisterwinkel, F.J., de Graaf, J.M., Schretlen, P.J., Kraal, B., and Bosch, L. (1981). A mutant elongation factor Tu which does not immobilize the ribosome upon binding of kirromycin. *Eur. J. Biochem.* 117, 7-12.
- Duisterwinkel, F.J., Kraal, B., de Graaf, J.M., Talens, A., Bosch, L., Swart, G.W., Parmeggiani, A., la Cour, T.F., Nyborg, J., and Clark, B.F. (1984). Specific alterations of the EF-Tu polypeptide chain considered in the light of its three-dimensional structure. *EMBO J* 3, 113-120.
- Eccleston, J.F., Dix, D.B., and Thompson, R.C. (1985). The rate of cleavage of GTP on the binding of Phe-tRNA elongation factor Tu.GTP to poly(U)-programmed ribosomes of Escherichia coli. *J Biol Chem* 260, 16237-16241.
- Ehresmann, B., Imbault, P., and Weil, J.H. (1973). Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.* 54, 454-463.
- Fersht, A. (1985a). Active site titration and the magnitudes of "burst". In *Enzyme structure and mechanism*, (New York: W.H.Freeman and Company), pp. 143-147.
- Fersht, A. (1985b). Primary isotope effects. In *Enzyme structure and mechanism*, (New York: W.H.Freeman and Company), pp. 92-97.
- Fersht, A. (1985c). Transition state theory. In *Enzyme structure and mechanism*, (New York: W.H.Freeman and Company), pp. 47-49.
- Fersht, A. (1985d). In *Enzyme Structure and Mechanism*, W.H.Freeman, ed.
- Friedman, S. (1972). Acylation of transfer ribonucleic acid with the N-hydroxysuccinimide ester of phenoxyacetic acid. *Biochemistry* 11, 3435-3443.
- Gail, R., Costisella, B., Ahmadian, M.R., and Wittinghofer, A. (2001). Ras-mediated cleavage of a GTP analogue by a novel mechanism. *ChemBiochem.* 2, 570-575.
- Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56, 615-649.
- Girshovich, A.S., Bochkareva, E.S., and Vasiliev, V.D. (1986). Localization of elongation factor Tu on the ribosome. *FEBS Lett* 197, 192-198.
- Gnirke, A., Geigenmuller, U., Rheinberger, H.J., and Nierhaus, L.H. (1989). The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. Analysis with a heteropolymeric mRNA. *J Biol Chem* 264, 7291-7301.
- Greiner, D.P., Miyake, R., Moran, J.K., Jones, A.D., Negishi, T., Ishihama, A., and Meares, C.F. (1997). Synthesis of the protein cutting reagent iron (S)-1-(p-bromoacetamidobenzyl)ethylenediaminetetraacetate and conjugation to cysteine side chains. *Bioconj. Chem.* 8, 44-48.
- Griaznova, O. and Traut, R.R. (2000). Deletion of C-terminal residues of Escherichia coli ribosomal protein L10 causes the loss of binding of one L7/L12 dimer: ribosomes with one L7/L12 dimer are active. *Biochemistry* 39, 4075-4081.
- Gromadski, K.B., Wieden, H.J., and Rodnina, M.V. (2002). Kinetic mechanism of elongation factor ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor tu. *Biochemistry* 41, 162-169.

- Gualerzi, C.O. and Pon, C.L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* 29, 5881-5889.
- Gudkov, A.T., Budovskaya, E.V., and Sherstobaeva, N.M. (1995). The first 37 residues are sufficient for dimerization of ribosomal L7/L12 protein. *FEBS Lett.* 367, 280-282.
- Gudkov, A.T., Tumanova, L.G., Gongadze, G.M., and Bushuev, V.N. (1980). Role of different regions of ribosomal proteins L7 and L10 in their complex formation and in the interaction with the ribosomal 50 S subunit. *FEBS Lett.* 109, 34-38.
- Hamel, E., Koka, M., and Nakamoto, T. (1972). Requirement of an Escherichia coli 50 S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and with guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 247, 805-814.
- Hamman, B.D., Oleinikov, A.V., Jokhadze, G.G., Traut, R.R., and Jameson, D.M. (1996). Rotational and conformational dynamics of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12. *Biochemistry* 35, 16672-16679.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol* 166, 557-580.
- Hazlett, T.L., Johnson, A.E., and Jameson, D.M. (1989). Time-resolved fluorescence studies on the ternary complex formed between bacterial elongation factor Tu, guanosine 5'-triphosphate, and phenylalanyl-tRNA^{Phe}. *Biochemistry* 28, 4109-4117.
- Highland, J.H. and Howard, G.A. (1975). Assembly of ribosomal proteins L7, L10, L11, and L12, on the 50 S subunit of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 250, 813-814.
- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R.K. (1988). A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16, 7351-7367.
- Hilgenfeld, R. (1995). How do the GTPases really work? [news; comment]. *Nat. Struct. Biol* 2, 3-6.
- Ibba, M. and Soll, D. (1999). Quality control mechanisms during translation. *Science* 286, 1893-1897.
- Ito, K., Ebihara, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (1996). Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5443-5448.
- Jameson, D.M. and Eccleston, J.F. (1997). Fluorescent nucleotide analogs: synthesis and applications. *Methods Enzymol.* 278, 363-390.
- Janiak, F., Dell, V.A., Abrahamson, J.K., Watson, B.S., Miller, D.L., and Johnson, A.E. (1990). Fluorescence characterization of the interaction of various transfer RNA species with elongation factor Tu. GTP: evidence for a new functional role for elongation factor Tu in protein biosynthesis. *Biochemistry* 29, 4268-4277.
- Janosi, L., Hara, H., Zhang, S., and Kaji, A. (1996). Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF)-an important but overlooked step of protein biosynthesis. *Adv. Biophys.* 32, 121-201.
- Jiang, Y., Nock, S., Nesper, M., Sprinzl, M., and Sigler, P.B. (1996). Structure and importance of the dimerization domain in elongation factor Ts from Thermus thermophilus. *Biochemistry* 35, 10269-10278.

- Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S., and Leberman, R. (1996). The structure of the Escherichia coli EF-Tu.EF-Ts complex at 2.5 Å resolution [see comments] [published erratum appears in Nature 1996 May 9;381(6578):172]. *Nature* 379, 511-518.
- Kaziro, Y. (1978). The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. *Biochim Biophys Acta* 505, 95-127.
- Kisselev, L.L. and Buckingham, R.H. (2000). Translational termination comes of age. *Trends Biochem. Sci.* 25, 561-566.
- Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S., and Nyborg, J. (1993). The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure* 1, 35-50.
- Knowlton, R.G. and Yarus, M. (1980). Discrimination between aminoacyl groups on su⁺ 7 tRNA by elongation factor Tu. *J Mol Biol* 139, 721-732.
- Knudsen, C., Wieden, H.J., Rodnina, M.V., and Peter M. (2001). The importance of structural transitions of the switch II region for the functions of elongation factor Tu on the ribosome. *J Biol Chem* 276, 22183-22190.
- Knudsen, C.R. and Clark, B.F. (1995). Site-directed mutagenesis of Arg58 and Asp86 of elongation factor Tu from *Escherichia coli*: effects on the GTPase reaction and aminoacyl- tRNA binding. *Protein Eng.* 8, 1267-1273.
- Kosloff, M. and Selinger, Z. (2001). Substrate assisted catalysis -- application to G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26, 161-166.
- Krab, I.M. and Parmeggiani, A. (1998). EF-Tu, a GTPase odyssey. *Biochim. Biophys. Acta* 1443, 1-22.
- Krab, I.M. and Parmeggiani, A. (1999). Mutagenesis of three residues, isoleucine-60, threonine-61, and aspartic acid-80, implicated in the GTPase activity of *Escherichia coli* elongation factor Tu. *Biochemistry* 38, 13035-13041.
- Kurland, C.G. (1992). Translational accuracy and the fitness of bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 26:29-50, 29-50.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LaRiviere, F.J., Wolfson, A.D., and Uhlenbeck, O.C. (2001). Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science* 294, 165-168.
- Leberman, R., Antonsson, B., Giovanelli, R., Guariguata, R., Schumann, R., and Wittinghofer, A. (1980). A simplified procedure for the isolation of bacterial polypeptide elongation factor EF-Tu. *Anal Biochem* 104, 29-36.
- Leijonmarck, M. and Liljas, A. (1987). Structure of the C-terminal domain of the ribosomal protein L7/L12 from *Escherichia coli* at 1.7 Å. *J. Mol. Biol* 195, 555-579.
- Leonard, D.A., Lin, R., Cerione, R.A., and Manor, D. (1998). Biochemical studies of the mechanism of action of the Cdc42-GTPase- activating protein. *J Biol Chem* 273, 16210-16215.
- Limmer, S., Reiser, C.O., Schirmer, N.K., Grillenbeck, N.W., and Sprinzl, M. (1992). Nucleotide binding and GTP hydrolysis by elongation factor Tu from *Thermus thermophilus* as monitored by proton NMR. *Biochemistry* 31, 2970-2977.

- Louie,A. and Jurnak,F. (1985). Kinetic studies of Escherichia coli elongation factor Tu-guanosine 5'-triphosphate-aminoacyl-tRNA complexes. *Biochemistry* 24, 6433-6439.
- Louie,A., Ribeiro,N.S., Reid,B.R., and Jurnak,F. (1984). Relative affinities of all Escherichia coli aminoacyl-tRNAs for elongation factor Tu-GTP. *J Biol Chem* 259, 5010-5016.
- Marquez,V., Wilson,D.N., and Nierhaus,K.H. (2002). Functions and interplay of the tRNA-binding sites of the ribosome. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 133-140.
- Marquis,D.M. and Fahnstock,S.R. (1980). Stoichiometry and structure of a complex of acidic ribosomal proteins. *J Mol. Biol* 142, 161-179.
- Mesters,J.R., Zeef,L.A., Hilgenfeld,R., de Graaf,J.M., Kraal,B., and Bosch,L. (1994). The structural and functional basis for the kirromycin resistance of mutant EF-Tu species in Escherichia coli. *EMBO J.* 13, 4877-4885.
- Moazed,D. and Noller,H.F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* 342, 142-148.
- Moazed,D., Robertson,J.M., and Noller,H.F. (1988). Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* 334, 362-364.
- Moazed,D., Samaha,R.R., Gualerzi,C., and Noller,H.F. (1995). Specific protection of 16 S rRNA by translational initiation factors. *J. Mol. Biol* 248, 207-210.
- Mohr,D., Wintermeyer,W., and Rodnina,M.V. (2000). Arginines 29 and 59 of elongation factor G are important for GTP hydrolysis or translocation on the ribosome. *EMBO J* 19, 3458-3464.
- Moore,P.B. (1998). The three-dimensional structure of the ribosome and its components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct* 27, 35-58.
- Nag,B., Johnson,A.E., and Traut,R.R. (1995). Identification of the elongation factor Tu binding site on 70S E. coli ribosomes by chemical crosslinking. *Indian J Biochem. Biophys.* 32, 343-350.
- Nassar,N., Hoffman,G.R., Manor,D., Clardy,J.C., and Cerione,R.A. (1998). Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nat. Struct Biol* 5, 1047-1052.
- Neuhart (1987). Purines and pyrimidines. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, F.C.Neidhardt, I.L.Ingraham, K.B.Low, B.Magasanik, M.Schaechter, and H.E.Umbarger, eds. (Washington: American Society for Microbiology), pp. 445-473.
- Nikonov,S.V., Nevskaya,N.A., Fedorov,R.V., Khairullina,A.R., Tishchenko,S.V., Nikulin,A.D., and Garber,M.B. (1998). Structural studies of ribosomal proteins. *Biol Chem.* 379, 795-805.
- Nissen,P., Kjeldgaard,M., Thirup,S., Clark,B.F., and Nyborg,J. (1996). The ternary complex of aminoacylated tRNA and EF-Tu-GTP. Recognition of a bond and a fold. *Biochimie* 78, 921-933.
- Nissen,P., Kjeldgaard,M., Thirup,S., Polekhina,G., Reshetnikova,L., Clark,B.F., and Nyborg,J. (1995). Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog [see comments]. *Science* 270, 1464-1472.
- Nissen,P., Thirup,S., Kjeldgaard,M., and Nyborg,J. (1999). The crystal structure of Cys-tRNACys-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA. *Structure Fold. Des.* 7, 143-156.
- Noel,J.P., Hamm,H.E., and Sigler,P.B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S [see comments]. *Nature* 366, 654-663.

- Noller, H.F. (1991). Ribosomal RNA and translation. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 191-227.
- Odom, O.W., Picking, W.D., and Hardesty, B. (1990). Movement of tRNA but not the nascent peptide during peptide bond formation on ribosomes. *Biochemistry* 29, 10734-10744.
- Ohno-Iwashita, Y., Oshima, T., and Imahori, K. (1975). *In vitro* protein synthesis at elevated temperature by an extract of an extreme thermophile. *Arch. Biochem. Biophys.* 171, 490-499.
- Oleinikov, A.V., Jokhadze, G.G., and Traut, R.R. (1993). Escherichia coli ribosomal protein L7/L12 dimers remain fully active after interchain crosslinking of the C-terminal domains in two orientations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 9828-9831.
- Ott, G., Schiesswohl, M., Kiesewetter, S., Forster, C., Arnold, L., Erdmann, V.A., and Sprinzl, M. (1990). Ternary complexes of Escherichia coli aminoacyl-tRNAs with the elongation factor Tu and GTP: thermodynamic and structural studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1050, 222-225.
- Pai, E.F., Kabsch, W., Kregel, U., Holmes, K.C., John, J., and Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 341, 209-214.
- Pai, E.F., Kregel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W., and Wittinghofer, A. (1990). Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* 9, 2351-2359.
- Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M. (1999). Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J.* 18, 3800-3807.
- Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (1998). Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the E. coli ribosome. *EMBO J.* 17, 7490-7497.
- Parmeggiani, A. and Sander, G. (1980). Properties and action of kirromycin (mocimycin) and related antibiotics. *Sammes: Topics in Antibiotic Chemistry* 5, 161-221.
- Parmeggiani, A. and Swart, G.W. (1985). Mechanism of action of kirromycin-like antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 39:557-77, 557-577.
- Pavlov, M.Y. and Ehrenberg, M. (1996). Rate of translation of natural mRNAs in an optimized in vitro system. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 9-16.
- Pettersson, I., Hardy, S.J., and Liljas, A. (1976). The ribosomal protein L8 is a complex L7/L12 and L10. *FEBS Lett.* 64, 135-138.
- Pettersson, I. and Liljas, A. (1979). The stoichiometry and reconstitution of a stable protein complex from Escherichia coli ribosomes. *FEBS Lett.* 98, 139-144.
- Pioletti, M., Schlunzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Gluhmann, M., Avila, H., Bashan, A., Bartels, H., Auerbach, T., Jacobi, C., Hartsch, T., Yonath, A., and Franceschi, F. (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* 20, 1829-1839.
- Polekhina, G., Thirup, S., Kjeldgaard, M., Nissen, P., Lippmann, C., and Nyborg, J. (1996). Helix unwinding in the effector region of elongation factor EF-Tu-GDP. *Structure* 4, 1141-1151.
- Powers, T. and Noller, H.F. (1993). Evidence for functional interaction between elongation factor Tu and 16S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1364-1368.

- Ramakrishnan,V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108, 557-572.
- Rayment,I. (1996). The structural basis of the myosin ATPase activity. *J Biol Chem* 271, 15850-15853.
- Revel,M., Lelong,J.C., Brawerman,G., and Gros,F. (1968). Function of three protein factors and ribosomal subunits in the initiation of protein synthesis in *E. coli*. *Nature* 219, 1016-1021.
- Rittinger,K., Walker,P.A., Eccleston,J.F., Nurmahomed,K., Owen,D., Laue,E., Gamblin,S.J., and Smerdon,S.J. (1997a). Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature* 388, 693-697.
- Rittinger,K., Walker,P.A., Eccleston,J.F., Smerdon,S.J., and Gamblin,S.J. (1997b). Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* 389, 758-762.
- Robbins,D. and Hardesty,B. (1983). Comparison of ribosomal entry and acceptor transfer ribonucleic acid binding sites on *Escherichia coli* 70S ribosomes. Fluorescence energy transfer measurements from Phe-tRNA^{Phe} to the 3' end of 16S ribonucleic acid. *Biochemistry* 22, 5675-5679.
- Rodnina,M.V., Fricke,R., Kuhn,L., and Wintermeyer,W. (1995). Codon-dependent conformational change of elongation factor Tu preceding GTP hydrolysis on the ribosome. *EMBO J.* 14, 2613-2619.
- Rodnina,M.V., Fricke,R., and Wintermeyer,W. (1994). Transient conformational states of aminoacyl-tRNA during ribosome binding catalyzed by elongation factor Tu. *Biochemistry* 33, 12267-12275.
- Rodnina,M.V., Pape,T., Fricke,R., Kuhn,L., and Wintermeyer,W. (1996). Initial binding of the elongation factor Tu.GTP.aminoacyl-tRNA complex preceding codon recognition on the ribosome. *J. Biol Chem.* 271, 646-652.
- Rodnina,M.V., Stark,H., Savelsbergh,A., Wieden,H.J., Mohr,D., Matassova,N.B., Peske,F., Daviter,T., Gualerzi,C.O., and Wintermeyer,W. (2000). GTPases mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. *Biol Chem* 381, 377-387.
- Roll-Mecak,A., Cao,C., Dever,T.E., and Burley,S.K. (2000). X-Ray structures of the universal translation initiation factor IF2/eIF5B: conformational changes on GDP and GTP binding. *Cell* 2000. Nov. 22. ;103. (5.):781. -92. 103, 781-792.
- Rutthard,H., Banerjee,A., and Makinen,M.W. (2001). Mg²⁺ is not catalytically required in the intrinsic and kirromycin-stimulated GTPase action of *Thermus thermophilus* EF-Tu. *J. Biol. Chem.* 276, 18728-18733.
- Rychlik,W., Odom,O.W., and Hardesty,B. (1983). Localization of the elongation factor Tu binding site on *Escherichia coli* ribosomes. *Biochemistry* 22, 85-93.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory).
- Savelsbergh,A., Mohr,D., Wilden,B., Wintermeyer,W., and Rodnina,M.V. (2000). Stimulation of the GTPase activity of translation elongation factor G by ribosomal protein L7/12. *J Biol Chem* 275, 890-894.
- Schagger,H. and von Jagow,G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.

- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science* 277, 333-338.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., and Wittinghofer, A. (1998). GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem. Sci.* 23, 257-262.
- Schlichting, I., Rapp, G., John, J., Wittinghofer, A., Pai, E.F., and Goody, R.S. (1989). Biochemical and crystallographic characterization of a complex of c-Ha- ras p21 and caged GTP with flash photolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7687-7690.
- Schon, A., Kannangara, C.G., Gough, S., and Soll, D. (1988). Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. *Nature* 331, 187-190.
- Schweins, T., Geyer, M., Scheffzek, K., Warshel, A., Kalbitzer, H.R., and Wittinghofer, A. (1995). Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins [see comments]. *Nat. Struct. Biol* 2, 36-44.
- Schweins, T., Langen, R., and Warshel, A. (1994). Why have mutagenesis studies not located the general base in ras p21. *Nat. Struct. Biol* 1, 476-484.
- Seewald, M.J., Korner, C., Wittinghofer, A., and Vetter, I.R. (2002). RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature* 415, 662-666.
- Selmer, M., al-Karadaghi, S., Hirokawa, G., Kaji, A., and Liljas, A. (1999). Crystal structure of *Thermotoga maritima* ribosome recycling factor: a tRNA mimic. *Science* 286, 2349-2352.
- Semenkov, Y.P., Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2000). Energetic contribution of tRNA hybrid state formation to translocation catalysis on the ribosome. *Nat. Struct Biol* 7, 1027-1031.
- Sette, M., van Tilborg, P., Spurio, R., Kaptein, R., Paci, M., Gualerzi, C.O., and Boelens, R. (1997). The structure of the translational initiation factor IF1 from *E. coli* contains an oligomer-binding motif. *EMBO J.* 16, 1436-1443.
- Sommer, A., Etchison, J.R., Gavino, G., Zecherle, N., Casiano, C., and Traut, R.R. (1985). Preparation and characterization of two monoclonal antibodies against different epitopes in *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12. *J Biol Chem* 260, 6522-6527.
- Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1994). GTPase mechanism of G proteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin α GDP \cdot AIF $_4^-$. *Nature* 372, 276-279.
- Song, H., Mugnier, P., Das, A.K., Webb, H.M., Evans, D.R., Tuite, M.F., Hemmings, B.A., and Barford, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* 100, 311-321.
- Sprang, S.R. (1997). G proteins, effectors and GAPs: structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol* 7, 849-856.
- Sprinzi, M. (1994). Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem. Sci.* 19, 245-250.
- Sprinzi, M., Brock, S., Huang, Y., Milovnik, P., Nanninga, M., Nesper-Brock, M., Rutthard, H., and Szkaradkiewicz, K. (2000). Regulation of GTPases in the bacterial translation machinery. *Biol. Chem.* 381, 367-375.
- Sprinzi, M. and Faulhammer, H.G. (1978). Participation of X47-fluorescamine modified *E. coli* tRNAs in in vitro protein biosynthesis. *Nucleic. Acids Res.* 5, 4837-4853.

- Sprinzi, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A., and Steinberg, S. (1998). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 26, 148-153.
- Stanzel, M., Schon, A., and Sprinzi, M. (1994). Discrimination against misacylated tRNA by chloroplast elongation factor Tu. *Eur J Biochem* 219, 435-439.
- Stark, H., Rodnina, M.V., Rinke-Appel, J., Brimacombe, R., Wintermeyer, W., and van Heel, M. (1997). Visualization of elongation factor Tu on the Escherichia coli ribosome. *Nature* 389, 403-406.
- Stelzl, U., Spahn, C.M., and Nierhaus, K.H. (2000). Selecting rRNA binding sites for the ribosomal proteins L4 and L6 from randomly fragmented rRNA: application of a method called SERF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4597-4602.
- Tapprich, W.E. and Dahlberg, A.E. (1990). A single base mutation at position 2661 in E. coli 23S ribosomal RNA affects the binding of ternary complex to the ribosome. *EMBO J.* 9, 2649-2655.
- Tesmer, J.J., Berman, D.M., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1997). Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha 1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 89, 251-261.
- Tokimatsu, H., Strycharz, W.A., and Dahlberg, A.E. (1981). Gel electrophoretic studies on ribosomal proteins L7/L12 and the Escherichia coli 50 S subunit. *J Mol. Biol* 152, 397-412.
- Tong, L.A., de Vos, A.M., Milburn, M.V., and Kim, S.H. (1991). Crystal structures at 2.2 A resolution of the catalytic domains of normal ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP. *J Mol Biol* 217, 503-516.
- Traut, R.R., Dey, D., Bochkariov, D.E., Oleinikov, A.V., Jokhadze, G.G., Hamman, B., and Jameson, D. (1995). Location and domain structure of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12: site specific cysteine crosslinking and attachment of fluorescent probes. *Biochem. Cell Biol* 73, 949-958.
- Valle, M., Sengupta, J., Swami, N.K., Grassucci, R.A., Burkhardt, N., Nierhaus, K.H., Agrawal, R.K., and Frank, J. (2002). Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. *EMBO J* 21, 3557-3567.
- van Knippenberg, P.H. (1990). Aspects of Translation Initiation in Escherichia Coli. In *The Ribosome: Structure, Function, & Evolution*, W.E.Hill, A.Dahlberg, R.A.Garrett, P.B.Moore, D.Schlessinger, and J.R.Warner, eds. (Washington D.C.: ASM Press), pp. 265-274.
- Vestergaard, B., Van, L.B., Andersen, G.R., Nyborg, J., Buckingham, R.H., and Kjeldgaard, M. (2001). Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. *Mol. Cell* 8, 1375-1382.
- Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.
- Vogele, L., Palm, G.J., Mesters, J.R., and Hilgenfeld, R. (2001). Conformational change of elongation factor Tu (EF-Tu) induced by antibiotic binding. Crystal structure of the complex between EF-Tu.GDP and aurodox. *J Biol Chem* 276, 17149-17155.
- Wagner, A., Simon, I., Sprinzi, M., and Goody, R.S. (1995). Interaction of guanosine nucleotides and their analogs with elongation factor Tu from Thermus thermophilus. *Biochemistry* 34, 12535-12542.
- Wagner, T. and Sprinzi, M. (1980). The complex formation between Escherichia coli aminoacyl-tRNA, elongation factor Tu and GTP. The effect of the side-chain of the amino acid linked to tRNA. *Eur. J. Biochem.* 108, 213-221.

- Wahl, M.C., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., and Huber, R. (2000a). Flexibility, conformational diversity and two dimerization modes in complexes of ribosomal protein L12. *EMBO J* 19, 174-186.
- Wahl, M.C., Huber, R., Marinkovic, S., Weyher-Stingl, E., and Ehlert, S. (2000b). Structural investigations of the highly flexible recombinant ribosomal protein L12 from *Thermotoga maritima*. *Biol Chem* 381, 221-229.
- Wang, Y., Jiang, Y., Meyering-Voss, M., Sprinzl, M., and Sigler, P.B. (1997). Crystal structure of the EF-Tu.EF-Ts complex from *Thermus thermophilus*. *Nat. Struct. Biol* 4, 650-656.
- Watson, B.S., Hazlett, T.L., Eccleston, J.F., Davis, C., Jameson, D.M., and Johnson, A.E. (1995). Macromolecular arrangement in the aminoacyl-tRNA.elongation factor Tu.GTP ternary complex. A fluorescence energy transfer study. *Biochemistry* 34, 7904-7912.
- Whitaker, J.R. and Granum, P.E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* 109, 156-159.
- Wieden, H.J., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (2001). A common structural motif in elongation factor Ts and ribosomal protein L7/12 may be involved in the interaction with elongation factor Tu. *J Mol. Evol.* 52, 129-136.
- Wiesmuller, L. and Wittinghofer, F. (1994). Signal transduction pathways involving Ras. Mini review. *Cell Signal.* 6, 247-267.
- Wilson, K.S. and Noller, H.F. (1998). Mapping the position of translational elongation factor EF-G in the ribosome by directed hydroxyl radical probing. *Cell* 92, 131-139.
- Wimberly, B.T., Guymon, R., McCutcheon, J.P., White, S.W., and Ramakrishnan, V. (1999). A detailed view of a ribosomal active site: the structure of the L11- RNA complex. *Cell* 97, 491-502.
- Wittinghofer, A. and Lieberman, R. (1979). The effect of Mg²⁺ on some properties of nucleotide-free elongation factor Tu from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.* 93, 95-101.
- Wolf, H., Chinali, G., and Parmeggiani, A. (1974). Kirromycin, an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 4910-4914.
- Wolf, H., Chinali, G., and Parmeggiani, A. (1977). Mechanism of the inhibition of protein synthesis by kirromycin. Role of elongation factor Tu and ribosomes. *Eur J Biochem* 75, 67-75.
- Wool, I.G., Gluck, A., and Endo, Y. (1992). Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation. *Trends. Biochem. Sci.* 17, 266-269.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H., and Noller, H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292, 883-896.
- Zavialov, A.V., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (2001). A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3. *Cell* 107, 115-124.
- Zeidler, W., Egle, C., Ribeiro, S., Wagner, A., Katunin, V., Kreutzer, R., Rodnina, M., Wintermeyer, W., and Sprinzl, M. (1995). Site-directed mutagenesis of *Thermus thermophilus* elongation factor Tu. Replacement of His85, Asp81 and Arg300. *Eur. J. Biochem.* 229, 596-604.
- Zeidler, W., Schirmer, N.K., Egle, C., Ribeiro, S., Kreutzer, R., and Sprinzl, M. (1996). Limited proteolysis and amino acid replacements in the effector region of *Thermus thermophilus* elongation factor Tu. *Eur. J. Biochem.* 239, 265-271.

-
- Zor,T., Andorn,R., Sofer,I., Chorev,M., and Selinger,Z. (1998). GTP analogue hydrolysis by the Gs protein: implication for the role of catalytic glutamine in the GTPase reaction. *FEBS Lett.* *433*, 326-330.
- Zor,T., Bar-Yaacov,M., Elgavish,S., Shaanan,B., and Selinger,Z. (1997). Rescue of a mutant G-protein by substrate-assisted catalysis. *Eur. J. Biochem.* *249*, 330-336.
- Zor,T., Halifa,I., Kleinhaus,S., Chorev,M., and Selinger,Z. (1995a). m-Acetylanilido-GTP, a novel photoaffinity label for GTP-binding proteins: synthesis and application. *Biochem. J* *306 (Pt 1)*, 253-258.

8 Anhang

In Folgendem sind die Vergleiche der Aminosäuresequenzen der ribosomalen Proteine L11, L6 und L10 aus verschiedenen Bakterien angegeben. Die Proteinsequenzen stammen aus der SwissProt Datenbank. Der Sequenzvergleich wurden Online mit Programm Clustal W bei *European Bioinformatics Institute* (www.ebi.ac.uk) durchgeführt.

8.1 Vergleich der L11 Sequenzen

RL11_AQUAE	---MAKKVVATIELMLPAQQASPAPPVGPALGQHGVMNIMEFVKQFNAASRDYEPGTILPV	57
RL11_THEMA	----AKKVAAQIKLQLPAGKATPAPPVGPALGQHGVMNIMEFCKRFNAETAD-KAGMILPV	55
RL11_THETH	----MKKVAVVVKLQLPAGKATPAPPVGPALGQHGVMNIMEFVKAFNAATAN-MGDALVPV	55
RL11_BACST	-----MKLQIPAGKANPAPPVGPALGQAGVNIMAFCKEFNARTAD-QAGLIIPV	48
RL11_BACSU	----AKKVVKVVKLQIPAGKANPAPPVGPALGQAGVNMVGMFCKEFNARTAD-QAGLIIPV	55
RL11_MYCLE	MATKKK-VAGLIKLIQIAGQANPAPPVGPALGQHGVMNIMEFCKAYNAATEN-QRGQVIPV	58
RL11_ECOLI	----AKKVQAYVKLQVAAGMANPSPVGPALGQQGVNIMEFCKAFNAKTDSIEKGLPIPV	56
RL11_HAEIN	----AKKVQAYVKLQVAAGMANPSPVGPALGQQGVNIMEFCKAFNARTESLEKGLPIPV	56
RL11_HELPY	---MAKKVVGEIKLQIPAGKANPSPVGPALGQGVNIMEFCKAFNERTKD-MGSFNIPV	56
RL11_CHLMU	--MSNKKI IKI IKLQIPGGKANPAPPVGPALGAAGVNIMGFCKEFNAATQD-RPGDLLPV	57
	. : : . * * . . * * : . : * : . : *	
RL11_AQUAE	VITVYQDRSFTFIMKTPPVSYLLKKAAGVEKGSDDPKRVK-VGKITVKQLEEI AKMKMKD	116
RL11_THEMA	VITVYEDKSFTFI IKTPPASFLKKAAGIEKGSSEPKRKI-VGKVTRKQIEEIAKTKMPD	114
RL11_THETH	EITVIYADRSFTFVTKTPPASYLIRKAAGLEKGAHKPGREK-VGRITWEQVLEIAKQKMPD	114
RL11_BACST	EITVFEEDRSFTFITKTPPAVLLKKAAGIESGSGEPNRNK-VATIKRDKVREIAELKMPD	107
RL11_BACSU	EISVYEDRSFTFITKTPPAVLLKKAAGIESGSGEPNRNK-VATVKRDKVREIAETKMPD	114
RL11_MYCLE	EITVYEDRSFTFALKTPPAKLLLDAAAGVGKGAEPHKTK-VVKVSWDQVREIAETKKAD	117
RL11_ECOLI	VITVYADRSFTFVTKTPPAVLLKKAAGIKSGSGKPNKDK-VGKISRALQVEIAQTKAAD	115
RL11_HAEIN	VITVYADRSFTFVTKTPPAVLLKKAAGIKSGSGKPNKDK-VGKVTLDQVRQIAETKAAD	115
RL11_HELPY	IITVYQDKSFTFITKPKPVTDLIKKASGVEKGSNPLKKN-IAKLTHKQVEEIAQLKMED	115
RL11_CHLMU	VITVYSDKTF SFVMKQPPVSSLIKKALGLESGSKIPNRNK-VGKLARAQITAI AEQKMKD	116
	: : * : * * . . * . . : : . : * : . : * * * *	
RL11_AQUAE	MNTRDLKAAMRTVAGTAKSMGIEIEGWKE----	145
RL11_THEMA	LNANSLEAAMKII EGTAKSMGIEVVDD-----	140
RL11_THETH	LNTTDLEAAARM IAGSARSMGVEVVGAPVVKDA	147
RL11_BACST	LNAASIEAAMRMIEGTARSMGIVVED-----	133
RL11_BACSU	LNAADVEAAMRMVEGTARSMGIVIED-----	140
RL11_MYCLE	LNANDIDAAAKII AGTARSMGITVE-----	142
RL11_MYCTU	LNANDVDAAAKII AGTARSMGITVE-----	142
RL11_ECOLI	MTGADIEAMTRSIEGTARSMGLVVED-----	141
RL11_HAEIN	MTGATIE TKMKS IAGTARSMGLVVEE-----	141
RL11_HELPY	LNTSTMEAAKKI VMGSARSMGVEVVDD-----	141
RL11_CHLMU	MDVVLLLESAERMVEGTARSMGVDVE-----	141
	: . . : * : * . * * : :	

8.2 Vergleich der L6 Sequenzen

RL6_AQUAE	MSRLAKKPIPY-PENVKVNYVEK-EHKIVVEGPKG--KLELNVHPDIKVTVNQQERWIK	55
RL6_THEMA	MSRLAKKPIVL-PQGVTVVEI--K-DNVVKVKGPKG---ELSQEFLPYVKIEVEGNEVWVR	53
RL6_BACST	-SRVGKKPIEI-PAGVTVTVN---GNTVTVKGPKG---ELTRTFHPDMT--ITVEGNVIT	50
RL6_BACSU	-SRVGKKLLEI-PSDVTVTLN--DNNTVAVKGPKG---ELTRTFHPDME--IKVEDNVL	51
RL6_MYCLE	MSRIGKQPIPV-PAGVDITID---GQNVLVKGPKG---TLDLTVAEPIML-ARNDEGAIV	52
RL6_THETH	-SRIGRLPIPV-PKGVSVVEVA---PGRVKVKGPKG---ELEVVPSPEMR--VVVEEGVVR	50
RL6_CHLMU	MSRKARDPIVL-PQGVEVSIQ---NDEISVKGPKG---SLTQVLAK--EVEIAVKGNEVF	51
RL6_HELPY	MSRIGKRIIEI-PSSVQASVE---GSKLLFKN--S---KEKHELETHNRVKITLENNQLS	51
RL6_ECOLI	-SRVAKAPVVV-PAGVDV KING---QVITIKGKNG---ELTRTLNDAVE--VKHADNTLT	50
RL6_HAEIN	-SRVAKAPVNI-PAGVEVKLDG---QLLTVKGKNG---ELSRKIHESVE--VKQDNGQFT	50
	* : . : * * . :	
RL6_AQUAE	LD-----RPTDRSFHKAIHGTMAALVKNMIKGVTEGFTEVLEIHGLGYRAQL-KGNVLEL	109
RL6_THEMA	PNEEQIIRKSDWRKVKMFQGTYSLIRNMVVGVTVEGYKKELEIVGIGYRAQL-QGNTLVM	112
RL6_BACST	VT-----RPSDEKHHRALHGTTRSLLANMVEGVSKGYEKALELVGVGYRASK-QGKKLVL	104
RL6_BACSU	VA-----RPSDQKEHRALHGTTRSLLGNMVEGVSKGFERGLELVGVGYRASK-SGNKLVL	105
RL6_THETH	VE-----RPSDERRHKS LHGLTRTLIANAVKGVSEGYSKELLIKIGYRARL-VGRALEL	104
RL6_CHLMU	VSP-----AAHIIDRPGRMQGLYWALIANMVKGVHLGF EKRLMIGVGFRA SV-QGSFLDL	106
RL6_HELPY	FQP-----VGEDA-QSRAYWGTYGALANNIVIGLSTGF SKTLELVNGVGYKVAL-GNKTLDL	105
RL6_ECOLI	FG-----PRDGYADGWAQSGTARALNSMVIIGVTEGF TKKLQLVGVGYRAAV-KGNVINL	104
RL6_HAEIN	FT-----PREGFVEANAQSGTARALVNAMVIGVTEGF TKKLVLVGVGYRAQL-KGNAIAL	104
	* : : * : : * * : . : :	
RL6_AQUAE	HLGKSHDPIYP IPPDVKIEVKG-NEIHIHGIDKQR-VGQVA AEIRSF RKPDPYKGGKIRY	167
RL6_THEMA	NLGYAHPVVYEIPSDVKIEVPAPNRIIVSGIDKQR-VGQVA AEIRAFRPPNVTGKGI RY	171
RL6_BACST	SVGYSHPVEIEPEEGLEIEVPSQTKIIVKGADKQR-VGELAANIRAVRPPEPYKGGKIRY	163
RL6_BACSU	NVGYSHPVEIVPEEGIEIEVPSQTKVVVKGTDKER-VGAIAANIRAVRSPEPYKGGKIRY	164
RL6_MYCLE	ALGYSHPVVIEAPEGITFAVQSPTKFTITIGDKQK-VGQISANIRRLRRPDPYKGGKVRY	165
RL6_THETH	TVGF SHPVVVEPPEGITFEVPEPTRVRVSGIDKQK-VGQVAANIRAIRKPSAYHEKGIYY	163
RL6_CHLMU	SIGVSHPTKMPIPTGLEVSVEKNTLISIKGINKQL-VGEFAACVRAKRPPEPYKGGKIRY	165
RL6_HELPY	SLGF SHPVKYPIPAGIEMVVEKNT-ITIKGSDKQK-VGQVA AEIRSF RPPPEPYKGGKVY	163
RL6_ECOLI	SLGF SHPVDHQLPAGITAECTPTQTEIVLKGADKQV-IGQVAADLRAYRRPEPYKGGKVRY	163
RL6_HAEIN	SLGYSHPVEHTLPVGITAECPSQTEIVLKGADKQL-IGQVAADIRAYRRPEPYKGGKVRY	163
	: . : : : . . : * . * : * : : : * . * . .	
RL6_AQUAE	KGEQLKLPKPGKAVGKK--	183
RL6_THEMA	VGEVVRQKEGKKA-----	184
RL6_BACST	EGELVRLKEGKTGK----	177
RL6_BACSU	EGEVVRRKEGKSAK----	178
RL6_MYCLE	EGEQIRRKVGKTGK----	179
RL6_THETH	AGEPVRLKPGKAGAKK--	179
RL6_CHLMU	ENEYVRRKAGKAAKTGKK	183
RL6_HELPY	SDEVIRKAGKTA---KK	178
RL6_ECOLI	ADEVVRTKEAKKK-----	176
RL6_HAEIN	ADEVVRIKEAKKK-----	176
	

8.3 Vergleich der L6 Sequenzen

RL10_ECOLI	-----ALNLQDKQAIVAEVSEVAKGALSAVVADSRGVTVDKMTCLR	41
RL10_HAEIN	-----ALNLQDKQAIVAEVNEAAKGALSAVIADSRGVTVEKMTCLR	41
RL10_HELPY	-----MQKQHQRQHKVELVANLKSQFADAKALLICDYKGLSVRKLEALR	44
RL10_BACSU	-----SSAIE TKKVVVEE IASKLKEKSTI IVDYRGLNVSEVTELR	41
RL10_AQUAE	MAEFDKEAYAERERSAASRKTLLKKQELVNSYKERLQKSNQGFVIFNFQGIDAYPLTLLR	60
RL10_DEIRA	-----MANEKNQOTLGSLSKDSLQIE-TFYVVDYQGLTAGQLTQLR	40
RL10_THETH	-----MPNKRNV LELATLKENLERAQGSFFLVNYQGLPAKETHALR	41
RL10_CHLMU	-----MKEEKLLLLREVVEEKITASQGFILLRYLGFTAHSRSFR	39
RL10_THEMA	-----MLTRQOKELIVKEMSEIFKKTSLILFADFLGFTVADLTELR	41
	. . . :	
RL10_ECOLI	K---AGREAGVYMRVVRNTLLRRAVEGTP-FECLKDAFVGPTLIAYSM-EHPGAAARLFK	96
RL10_HAEIN	K---SAREAGVTMRVVRNTLLRRAVEGTD-YECLKDTFVGPTLIAFSN-EHPGARARLFK	96
RL10_HELPY	N---KARNQGIKQVQIKNTLAHIAMK--E-TGYSDDLKETNVFLWGG-DQIALSKLVFD	97
RL10_BACSU	K---QLREANVESKVYKNTMTRRAVEQAEINGLND-FLTGPNAIAFST-EDVVAPAKVLN	96
RL10_AQUAE	L---DIKDLKGEIVVGKNTLFYRAFSDTVLSHDRDI-FVGPTAALFAY-EDPVAVTKKLV	115
RL10_DEIRA	K---DIREKGGQLIVAKNTLLNLALQEGGR-DFDDA-LKGPSALVLAQ-EDPAGVAKALS	94
RL10_THETH	Q---ALKQNGARLFVAKNTLIRLALKEGL-PELDG-LQGPSAVVFY--EDPVAAAKTLV	94
RL10_CHLMU	N---NLGVSAAEFVLLKKKIFFKALESSGVEMDPED-SEHGLGVVFAY-GDPVSAAKQVL	94
RL10_THEMA	SRLREKYGDGARFRVVKNTLLNLALKNAEYEGYEEF-LKGPTAVLVYVTEGDPVEAVKIIY	100
	: : .	
RL10_ECOLI	EFAKANAKFEVKA-----AAFEG-ELIPASQIDRLATLPTYYEAIARLMATMKEASAGK	149
RL10_HAEIN	EFAKANDKFEIKG-----AAFEG-KIQ---DVEFLATLPTYYEAIARLMGMTMKEAAAAGK	146
RL10_HELPY	FQKEHKDHFVLKA-----GLFDK-ESVSVAHVEAVSKLPSKEELMGMLLSVWTAPARYF	150
RL10_BACSU	DFAKNHEALEIKA-----GVIEG-KVSTVEEVKALAE LPPREGLLSMLLSVLKAPVRNL	149
RL10_AQUAE	EFLKETFDKEWEG---RIKGGLLDYKYITPEQVKELAE LPSKEELIAKLLGVLMAPVTQL	172
RL10_DEIRA	DAAGR--NDRGIP---TVKGGFVEGSKVDVAVVQRLASLGSKTTLQAE LVGVL SAHLSNF	149
RL10_THETH	QFAKS--NPKGIP---QVKSGLLQGGILTAKDVEALADVPTMDEL RADVVGV LQAPMAEL	149
RL10_CHLMU	DFNKQ--HNDSLV---FLAG-RIDNASLSGKEVEAVAKLPSMKELRQQVVGLIAAPMSQV	148
RL10_THEMA	NFYKD--KKADLS---RLKGGFLEGKFTAE EVENIAK LPSKEELYAMLVGRVKAPITGL	155
	. . .	
RL10_ECOLI	LVRTLA AVRDA-----KEAA-----	164
RL10_HAEIN	LARTFAALRDKL-----QEAA-----	162
RL10_HELPY	VTGLDNLRKAKEEN-----	164
RL10_BACSU	ALAAKAVAEQKEEQGA-----	165
RL10_AQUAE	AMTLKAVPQKLVLVLKAI EEEKSKGGQ-----	199
RL10_DEIRA	VGILEAYREKLEG--EGGSESA-----	169
RL10_THETH	VGV LGGVARELVGILEAYAEK KAA-----	173
RL10_CHLMU	VGIMNSVLSGVISCV DQKA EKTQE-----	172
RL10_THEMA	VFALSGILRLNLVYVLNAI KEKKSE-----	179

Danksagung

Ich danke:

meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Mathias Sprinzl für die Möglichkeit in seiner Gruppe zu arbeiten, für die Überlassung eines interessanten Themas und die vielen Diskussionen.

der Arbeitsgruppe von F.X.Schmid für die Möglichkeit die Stopped-flow Messungen durchzuführen zu können und besonders der Christine Magg und Raimund Meyer für die technische Hilfe.

Xaver Schratt und Harald Weiss von BOC für Hilfe bei ESI-MS.

Alex für unendliches Korrekturlesen und viele kleine Ratschläge.

Stefan für Korrekturlesen und sein Enthusiasmus.

Dirk für Korrekturlesen.

Norbert und P.T. für die Hilfsbereitschaft.

Hanne und Petra dafür, dass sie auch für mich da waren.

Stephan und Yiwei für die Hilfe in erstem Jahr.

meiner Majke dafür, dass Sie zu mir nach Bayreuth gekommen ist.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 26. August 2002

Peter Milovník