

EINE NEUE, DRITTE tRNA-BINDUNGSSTELLE AM E. COLI RIBOSOM:
NACHWEIS UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Jörg Rheinberger
aus Vaduz
1982

	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
0.	Abkürzungen	9
1.	Einleitung	11
2.	Material und Methoden	17
2.1.	Material	17
2.1.1.	Chemikalien und sonstiges Material	17
2.1.2.	Pufferlösungen	20
2.1.3.	Probenverbrennung (Packard Sample Oxidizer)	21
2.2.	Methoden	21
2.2.1.	Isolierung von Ribosomen	21
2.2.1.1.	Aufzucht von E. coli Bakterien	21
2.2.1.2.	Isolierung ribosomaler Partikel	22
2.2.1.3.	Gewinnung von 70S tight-couple-Ribosomen	22
2.2.1.4.	Gewinnung der S150-Enzyme	23
2.2.2.	Präparative Verfahren	23
2.2.2.1.	Präparation von tRNA-freiem S150-Enzymübefstand Php	23
2.2.2.2.	Chemische Modifikation von tRNA am 3'-Ende	24
2.2.2.3.	Beladung und Acetylierung spezifischer, gereinigter tRNA	24
2.2.2.4.	Reinigung von AcPhe-tRNA und Phe-tRNA über eine benzylierte DEAE-Säule	26
2.2.3.	Analyse der 70S-Ribosomen	27
2.2.4.	Funktionstests	28
2.2.4.1.	Aminoacyl-tRNA-Synthese, katalysiert durch S150-Ligasen	28
2.2.4.2.	Stellenspezifische, nicht-enzymatische Bindung von tRNA an das Ribosom; Translokation und Puromycin-Reaktion	28
2.2.4.2.1.	tkNA ^{Phe} , AcPhe-tRNA, Phe-tRNA	29
2.2.4.2.2.	tRNA ^{Lys} , AcLys-tRNA	30
2.2.4.3.	Stellenspezifische, EF-Tu-abhängige Bindung von Phe-tRNA an das Ribosom	31
2.2.4.4.	tRNA-Bindung mit anschliessender Poly(Phe)-Synthese	31

	Seite	
2.2.4.5.	Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese	32
2.2.4.6.	Test von EF-Tu auf Verunreinigung mit EF-G	32
2.2.5.	Chromatographische Verfahren	33
2.2.5.1.	Elektrophoretische Trennung von Phe und (Phe) ₂	33
2.2.5.2.	Dünnschichtchromatographische Trennung von Phe, (Phe) ₂ , AcPhe, Ac(Phe) ₂ und Ac(Phe) ₂	33
3.	Resultate	35
3.1.	Experimentelle Voraussetzungen	35
3.1.1.	Präparation von tight-couple-Ribosomen	35
3.1.2.	Präparation von Phe-tRNA und AcPhe-tRNA	37
3.1.2.1.	Reinigung des S150-Enzymüberstandes Von tRNA	37
3.1.2.2.	Chemische Modifizierung von Deacyl-tRNA	39
3.1.2.3.	Trennung von tRNA ^{Phe} und Phe-tRNA ^{Phe} bzw. AcPhe-tRNA ^{Phe} auf Benzoyl-DEAE-Zellulose	40
3.1.3.	<u>In vitro</u> Testsystem	42
3.2.	Untersuchungen zur Peptidyl-tRNA-Bindung an 70S Ribosomen	44
3.2.1.	Arrhenius-Aktivierungsenergien und Assozia- tionskonstanten für die P- und A-Stellen- bindung von AcPhe-tRNA	44
3.2.-1.1.	Bestimmung' der Aktivierungsenergie" /:	45'
3.2.1.2.	Assoziationskonstanten der Bindung in die P- und in die A-Stelle	50
3.2.2.	Funktionelle Untersuchungen zum Bindungsver- halten von AcPhe-tRNA	51
3.2.2.1.	Translokation aus der A- in die P-Stelle	51
3.2.2.2.	P-Stelle als Eintrittsstelle für AcPhe-tRNA	55
3.2.2.3.	Bindung mit anschliessender Poly(Phe)-Synthese	59
3.2.3..	Stöchiometrie der AcPhe-tRNA-Bindung	60
3.2.3.1.	Sättigung von 70S Ribosomen	60
3.2.3.2.	Getrennte stöchiometrische Besetzung von P- und A-Stelle	62
3.2.3.3.	Bindung an nicht-programmierte 70S Ribosomen	64
3.3.	Untersuchungen zur Aminoacyl-tRNA-Bindung an 70S Ribosomen	65

	Seite
3.3.1. Charakterisierung des Bindungsverhaltens von Phe-tRNA	65
3.3.1.1. Faktorunabhängige Bindung unter Peptidyl-tRNA-Bindungsbedingungen	65
3.3.1.2. Faktorabhängige Bindung	67
3.3.1.3. Kinetische Aspekte der Bindung des ternären Komplexes in die A-Stelle	68
3.3.1.4. Assoziationskonstanten der Phe-tRNA-Bindung in die A-Stelle	71
3.3.2. Funktionelle Untersuchungen zur Phe-tRNA-Bindung an 70S Ribosomen	72
3.3.2.1. Faktorabhängige Bindung in die A-Stelle und "Translokation" bei freier P-Stelle	72
3.3.2.2. Einfluss von Viomycin und Chlortetracyclin auf die Bindung des ternären Komplexes und die Translokation	76
3.3.2.3. Faktorunabhängige Bindung bei freier P-Stelle: Ist die A-Stelle generell die Eintrittsstelle für Aminoacyl-tRNA in 70S Ribosomen?	77
3.3.2.4. Kinetiken zur faktorfreien Phe-tRNA-Bindung und zur Puromycinreaktivität ^J	79
3.3.2.5. Phe-tRNA-Bindung mit anschliessender Poly(Phe)-.Synthese	84
3.3.3. Stöchiometrie der Phe-tRNA-Bindung	86
3.3.3.1. Sättigung von 70S Ribosomen bei 15 mM Mg ⁺⁺	86
3.3.3.2. Sättigung von 70S Ribosomen im faktorabhängigen System	90
3.3.3.3. Bindungsversuche an nichtprogrammierte und an fehlprogrammierte Ribosomen	91
3.4. Untersuchungen zur Deacyl-tRNA-Bindung an /70S Ribosomen	93
3.4.1. Bestimmung der Anzahl der Deacyl-tRNA-Bindungsstellen an 70S Ribosomen	94
3.4.2. Anzahl der Deacyl-tRNA-Bindungsstellen im Poly(A)-System mit tRNA ^{Lys}	98

	Seite	
3.4.3.	Bindung von Deacyl-tRNA an nicht-programmierte und an fehlprogrammierte Ribosomen Phe	99
3.4.4.	Bestimmung der Bindungskonstanten von tRNA für P-, A- und E-Stelle	102
3.4.4.1.	Bestimmung der Assoziationskonstanten aus den Bindungswerten Phe	102
3.4.4.2.	Bindungskonstanten von tRNA für die unprogrammierte und die fehlprogrammierte P-Stelle	106
3.4.4.3.	Indirekte Bestimmung der Assoziationskonstante von tRNA ^{Phe} für die P-Stelle	107
3.4.5.	Sättigung mit Deacyl-tRNA als Mass für die Bindungsaktivität von tight-couple-Ribosomen	108
3.5.	Ein neues Modell für den ribosomalen Elongationsprozess	109
3.5.1.	Simultane Bindung von Deacyl-tRNA und Peptidyl-tRNA an 70S Ribosomen	110
3.5.2.	Bestimmung der tRNA-Bindungszahl an proteinsynthetisierenden Ribosomen	114
3.5.3.	Eine neue Elongationshypothese	121
3.6.	Experimenteller Test des neuen Elongationsmodells	123
3.6.1.	Ist eine Translokation von Peptidyl-tRNA aus der A-Stelle in die P-Stelle ohne gleichzeitige Deacyl-tRNA-Entlassung vom Ribosom möglich?	123
3.6.1.1.	Besetzung von 70S Ribosomen durch eine Mischung aus Deacyl-tRNA und Peptidyl-tRNA und anschliessende Translokation	123
3.6.1.2.	Sukzessive Bindung von Deacyl-tRNA und Peptidyl-tRNA und anschliessende Translokation	125
3.6.1.3.	Sukzessive Bindung von Peptidyl-tRNA und Aminoacyl-tRNA und anschliessende Translokation	127
3.6.1.4.	Translokation bei verschiedenen Mg ²⁺ -Konzentrationen	133
3.6.2.	Ist die Dissoziation von Deacyl-tRNA aus der E-Stelle eine Folge der Translokation von	

	Seite
Peptidyl-tRNA oder der Bindung von Aminoacyl-tRNA in die A-Stelle?	136
3.6.2.1. Deacyl-tRNA-Dissoziationsverhalten bei Bindung von Peptidyl-tRNA bzw. Aminoacyl-tRNA in die A-Stelle und nachfolgender Translokation	136
3.6.2.2. Deacyl-tRNA-Dissoziationsverhalten bei Bindung von Peptidyl-tRNA in die P-Stelle, Deacyl-tRNA (in P- und E-Stelle) und Aminoacyl-tRNA in die A-Stelle sowie nachfolgender Translokation	138
3.6.2.3. Schrittweises Durchlaufen eines gesamten Elongationszyklus	141
4. Diskussion	148
4.1. Historische Bezüge	148
4.2. Das klassische Elongationsmodell	150
4.3. Aktuelle Vermutungen über zusätzliche tRNA-Bindungsstellen	152
4.4. Untersuchungen zur Bindung von Peptidyl-tRNA (AcPhe-tRNA), Aminoacyl-tRNA (Phe-tRNA) und Deacyl-tRNA (tRNA ^{Phe}) an E. coli 70S tight couples	154
4.4.1.1. AcPhe-tRNA-Bindung	155
4.4.1.2. Phe-tRNA-Bindung	157
4.4.1.3. Deacyl-tRNA-Bindung	161
4.4.2. Energetische Betrachtungen und Assoziationskonstanten zur tRNA-Bindung	165
4.4.3. tRNA-Bindung an proteinsynthetisierenden Ribosomen	172
4.5. Eine neue Elongationshypothese	173
4.6. ^Translokation und tRNA-Dissoziation	175
4.6.1. Bisherige Experimente	175
4.6.2. Folgerungen des Drei-Stellen-Modells	178
4.7. Ausblick	181

		Seite
5.	Zusammenfassung	185
6.	Literaturverzeichnis	187
	Dank	200
	Lebenslauf	201