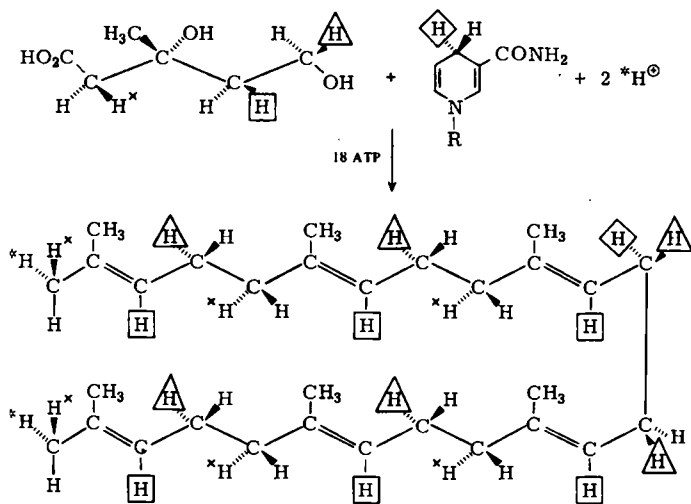


schen Methode ließ sich nicht nur das Problem der Addition von Wasserstoff an Isopentenylpyrophosphat lösen, sondern es kann ebenso der stereochemische Verlauf einer großen und noch wachsenden Anzahl von Enzymreaktionen bestimmt werden, bei denen eine Methylgruppe entsteht oder umgewandelt wird. Als wir schließlich die stereochemische Herkunft aller fünfzig Wasserstoffatome des aus Mevalonsäure biosynthetisierten Squalens kannten, ließ ich der Anschaulichkeit halber ein dreidimensionales Modell anfertigen. Schema 12 faßt die erhaltenen Informationen zusammen.



Schema 12. Vollständiger stereochemischer Verlauf der Biosynthese von Squalen aus 3R-Mevalonsäure.

Unser Abenteuer mit der chiralen Methylgruppe stärkte die Überzeugung, daß die Stereospezifität nicht ein nur zufälliges, sondern ein wesentliches Merkmal der Enzymkatalyse ist. Das Leben hängt von der genauen Replikation von Molekülen ab, und seine Kompliziertheit erfordert es oft, daß ein Enzym eine einzige Molekülspezies erkennt und sie in ein ebenso spezifisches Produkt umwandelt. Aber die verborgene

Spezifität, die aufzuklären wir mitgeholfen haben, geht noch viel weiter: wie es scheint, muß ein Enzym auch dann Reaktionen streng stereospezifisch katalysieren, wenn diese Spezifität aufgrund der strukturellen Beziehung zwischen Substrat und Produkt nicht erforderlich ist. In der Tat sind bis jetzt viele Beispiele bekannt, in denen ein Enzym mehr als nur eine Molekülspezies als Substrat annimmt; jede von ihnen wird aber unter völliger, wenn auch verborgener stereochemischer Kontrolle umgesetzt.

Durch die beschriebene Kombination von chemischen, biochemischen und physikalischen Methoden konnte die Natur der Enzymkatalyse auf einer neuen Ebene erforscht werden; dadurch wurden andere gleichzeitige Untersuchungen ergänzt. Die Arbeiten erforderten intensive Anstrengungen. Dem Geschick und der Hingabe zahlreicher Mitarbeiter, von denen ich drei erwähnen möchte, verdanke ich viel: *George Popják* sorgte bis 1967 mit ungewöhnlicher Einsicht, Begabung und Findigkeit für die biochemische Seite dieser Untersuchungen. Ich hatte das Glück, mehr als zwanzig Jahre mit ihm als Kollege und Freund verbunden zu sein und mich danach der Zusammenarbeit mit einem anderen großen Biochemiker, *Hermann Eggerer*, zu erfreuen; seine Bereitschaft zur Kooperation erleichterte die Schwierigkeiten beim Vereinbaren und Abstimmen der Experimente in unseren tausend Kilometer entfernten Laboratorien. Schließlich führte meine Frau *Rita Cornforth* mit Geduld und großem experimentellem Geschick viele der chemischen Synthesen aus, auf denen der Erfolg dieser Arbeiten beruht. Ihr schulde ich nicht nur in diesem Sinn mehr als ich ausdrücken kann.

Meinem Lehrer und Freund *Robert Robinson*, dessen Tod am Anfang des Jahres ihn dieses Ereignis nicht mehr miterleben ließ, bleibe ich in besonderer Dankbarkeit verbunden, und ich könnte nichts Besseres erhoffen – so wie er bis zum Ende eines langen und schöpferischen Lebens – als Wissbegier und Bewunderung für die Chemie der Natur zu behalten.

Eingegangen am 5. März 1976 [A 124]
Übersetzt von Dr. Knut Bartl, Karlsruhe

Chemische Methoden zur Untersuchung der Ribosomenstruktur

Von Ernst Küchler[*]

Durch die Anwendung chemischer Methoden, insbesondere der Affinitätsmarkierung, ist unser Wissen über den Aufbau der aktiven Zentren von Ribosomen stark erweitert worden. Die Experimente zeigen, daß ribosomale Proteine und ribosomale Ribonucleinsäuren am Aufbau der Bindungsstellen für messenger-Ribonucleinsäure und transfer-Ribonucleinsäure beteiligt sind.

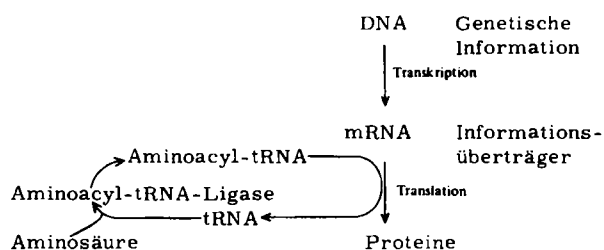
1. Einleitung

Die genetische Information einer lebenden Zelle ist in einem langen, fadenförmigen Molekül, der Desoxyribonucleinsäure (DNA), niedergelegt. Die DNA selbst greift nicht direkt in

das Zellgeschehen ein, sie speichert nur die Information. Um wirksam zu werden, muß die genetische Information zuerst in eine Ribonucleinsäure (RNA) umgeschrieben werden (Transkription). Aufgrund ihrer Funktion als Informationsüberträger wird diese RNA als Boten- oder messenger-RNA (mRNA) bezeichnet.

Neben der mRNA gibt es in der Zelle transfer-Ribonucleinsäuren (tRNA) und ribosomale Ribonucleinsäuren (rRNA), denen andere Funktionen zukommen. Die Nucleotidsequenz

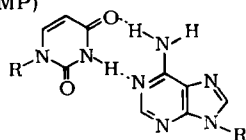
[*] Dr. E. Küchler
Institut für Biochemie der Universität
Währingerstraße 17, A-1090 Wien (Österreich)



der mRNA wird an den Ribosomen in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt. Dabei wird jeweils eine Gruppe von drei aufeinanderfolgenden Nucleotiden als Signal für den Einbau einer Aminosäure gelesen; diese Sequenz von drei Nucleotiden bezeichnet man als Codon. Die Schlüssel-moleküle für die Übersetzung (Translation) sind die tRNAs. Für jede in Proteinen vorkommende Aminosäure gibt es eine oder mehrere tRNA-Spezies. Die Bindung der Aminosäure an die tRNAs wird durch eigene Enzyme, die Aminoacyl-tRNA-Ligasen, besorgt; beim Anbau der Aminosäure an die Proteinkette wird die Aminoacyl-tRNA „entladen“ und kann von neuem aminoacyliert werden.

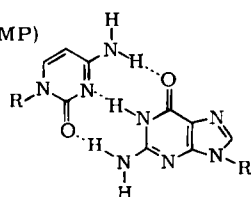
Die Nucleotidsequenz eines Codons in der mRNA wird von der tRNA durch Wechselwirkung mit einer Nucleotidsequenz, dem Anticodon, erkannt. Die Wechselwirkungen zwischen Codon und Anticodon kommen durch Basenpaarung zwischen den komplementären Nucleotiden (Nucleosid-monophosphaten) Adenyl- (AMP) und Uridylsäure (UMP) sowie Guanyl- (GMP) und Cytidylsäure (CMP) zustande.

Uridylsäure (UMP)



Adenylsäure (AMP)

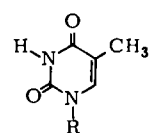
Cytidylsäure (CMP)



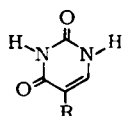
Guanylsäure (GMP)

R = Ribosylphosphat

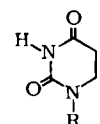
tRNAs haben Kettenlängen von 75–80 Nucleotiden. Außer AMP, CMP, GMP und UMP (fast immer werden nur die



Ribothymidylsäure (TMP)



Pseudouridylsäure (ΨMP)



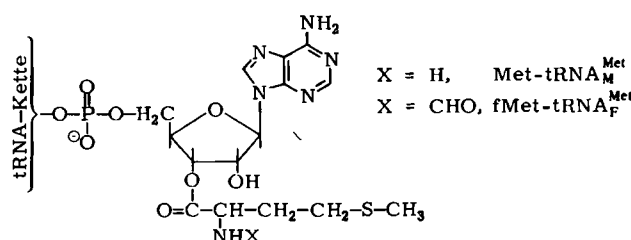
Dihydrouridylsäure (DMP)

R = Ribosylphosphat

Nucleoside angegeben: A, C, G und U) enthalten sie auch „seltene“ Nucleotide; als Beispiele seien hier Ribothymidyl- (TMP), Pseudouridyl- (ΨMP) und Dihydrouridylsäure (DMP) genannt.

Die Nucleotidsequenz der tRNA bestimmt deren Spezifität. Einige Nucleotidsequenzen sind jedoch allen tRNAs gemeinsam; so enthält jede tRNA an der gleichen Stelle in der Polynucleotidkette die Sequenz TΨC. Weiter befindet sich am 3'-Ende der tRNAs immer die Sequenz —CCA. Die Aminosäure ist in der Aminoacyl-tRNA über eine Esterbindung mit der Ribose dieses terminalen Adenosins verknüpft. Die Aminogruppe der Aminosäure ist also frei und kann am Ribosom über eine Peptidbindung an die wachsende Proteinkette gehängt werden.

Eine Besonderheit sind die für Methionin spezifischen tRNAs. Hier gibt es neben der Methionyl-tRNA (Met-tRNA^{Met})



auch eine Formylmethionyl-tRNA (fMet-tRNA^{Met}), bei der die Aminogruppe durch eine Formylgruppe „blockiert“ ist. Diese tRNA dient als Initiator-tRNA. Die Biosynthese aller bakteriellen Proteine beginnt also mit der Bereitstellung eines Formylmethionylrestes für den N-Terminus des Proteins. Dieser Formylmethionylrest wird in einem späteren Schritt wieder abgespalten. Als Signale für „Start“ und „Stop“ dienen besondere Initiations- und Terminationscodons. Die einzelnen Schritte der Translation der mRNA sind in einem früheren Übersichtsartikel ausführlich behandelt worden^[1] und werden daher hier nur soweit besprochen, wie es für das Verständnis der Topographie des Ribosoms nötig ist.

Das Ribosom ist eine Zellorganelle, die aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist, die jeweils aus rRNA (ribosomaler RNA) und Proteinen bestehen. Die Untereinheiten und die rRNA-Spezies werden entsprechend ihren Sedimentationskonstanten benannt. Die 30-S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms mit einem Teilchengewicht von 900000 Dalton (D) enthält neben einer 16-S-rRNA (550000 D) insgesamt 21 verschiedene Proteine. Die Proteine werden mit S1 bis S21 bezeichnet (S=small, da sie von der kleinen ribosomalen Untereinheit stammen)^[2]. Die 50-S-Untereinheit des Ribosoms ist komplizierter aufgebaut. Sie enthält zwei rRNA-Spezies, 23-S-rRNA (1100000 D) und 5-S-rRNA (40000 D), und insgesamt 34 verschiedene Proteine, die als L1 bis L34 bezeichnet werden (L=large, sie stammen von der großen Untereinheit)^[2]. Das gesamte bakterielle Ribosom (70S) besitzt ein Teilchengewicht von 2650000 D. Ribosomen aus Zellen höherer Organismen sind wesentlich größer; ihre Teilchengewichte betragen 4000000 D. Das Aufbauschema scheint aber, soweit es heute bekannt ist, sehr ähnlich zu sein. In diesem Aufsatz soll nur das bakterielle Ribosom am Beispiel des Bakteriums *Escherichia coli* besprochen werden.

Der Grund für die Größe und Komplexität des Ribosoms ist wohl darin zu sehen, daß sich an dieser Organelle viele

katalytische Funktionen und Bewegungsvorgänge abspielen, an denen ribosomale Komponenten und reversibel gebundene Faktoren mitwirken.

An der Initiation der Übersetzung der Nucleotidsequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz des Proteins sind außer der als Initiator wirkenden fMet-tRNA^{fMet} drei Initiationsfaktoren (IF1, IF2, IF3) beteiligt^[3]. Als Initiationscodons dienen die Trinucleotidsequenzen AUG und GUG. An die 30-S-Untereinheit, die fMet-tRNA^{fMet}, Guanosintriphosphat (GTP), mRNA und die Initiationsfaktoren IF1 und IF2 gebunden enthält, wird die 50-S-Untereinheit angelagert, wobei es zur Abspaltung der Initiationsfaktoren unter Hydrolyse von GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) und Phosphat (P_i) kommt (Abb. 1)^[4-6].

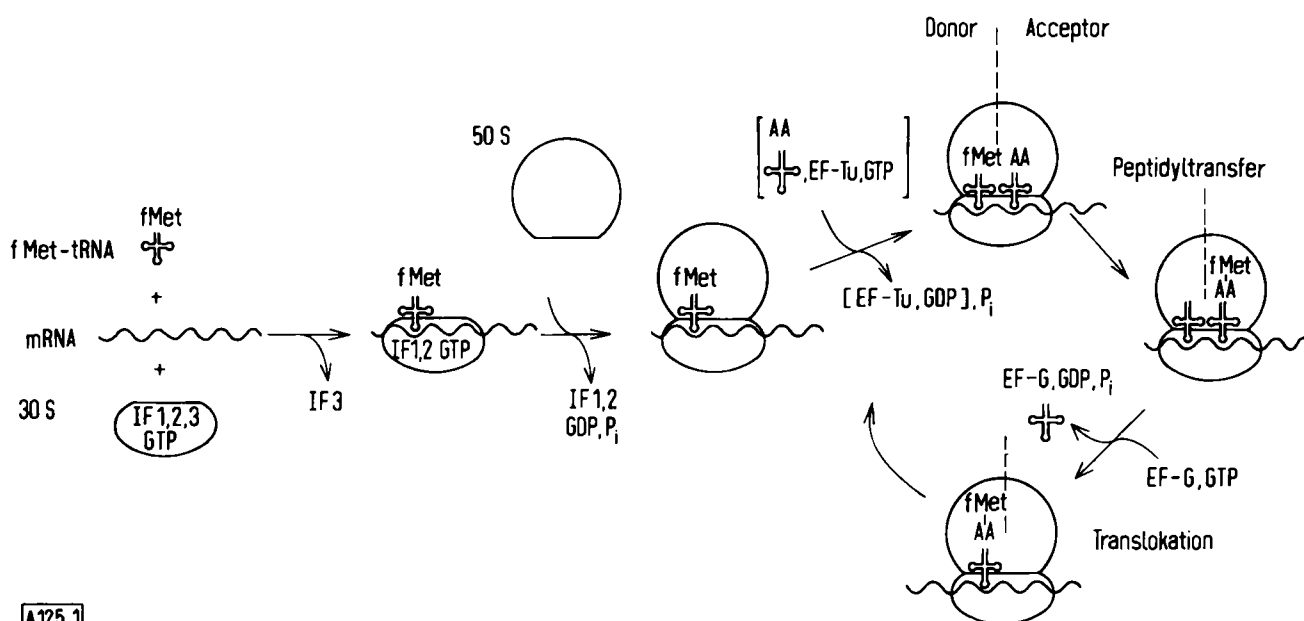


Abb. 1. Schema der Initiation und Translation bei der Proteinbiosynthese. Erklärung der Abkürzungen siehe Text.

Nach der Initiation wird die dem nächsten Codon entsprechende Aminoacyl-tRNA (allgemein: AA-tRNA) gebunden. Dabei tritt einerseits das Anticodon der tRNA mit dem Codon der mRNA in Wechselwirkung, andererseits die TΨC-Sequenz der tRNA mit einer komplementären GAA-Sequenz der ribosomalen 5-S-RNA^[7]. Der Vorgang wird durch den Elongationsfaktor EF-Tu katalysiert, wobei ein weiteres Molekül GTP hydrolysiert wird. Das Ribosom besitzt demnach Bindungsstellen für zwei Moleküle tRNA (siehe Abb. 1), die als Donor- und Acceptorstelle bezeichnet werden (synonym mit „Donorstelle“ wird auch der Ausdruck „Peptidylstelle“ verwendet, doch geben wir der ersten Bezeichnung den Vorzug, da sie die Funktion bei der Elongation der Peptidkette besser zum Ausdruck bringt).

Bei der Bildung der ersten Peptidbindung wird nun der Formylmethionylrest von der in der Donorstelle befindlichen fMet-tRNA^{fMet} auf die Aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) in der Acceptorstelle übertragen. Dabei entsteht eine Dipeptidyl-tRNA. Diese Reaktion wird vom Ribosom selbst katalysiert. Die entsprechende enzymatische Aktivität – kurz Peptidyltransferase genannt – liegt in der 50-S-Untereinheit^[8]. Die entstandene Dipeptidyl-tRNA muß zur weiteren Verlängerung der Peptidkette aus der Acceptorstelle in die Donorstelle transferiert werden, damit die Acceptorstelle für die Aufnahme

der nächsten Aminoacyl-tRNA frei wird. Dieser Vorgang, bei dem sich auch die mRNA um die Länge eines Codons relativ zum Ribosom verschiebt, wird als Translokation bezeichnet. Der daran beteiligte Elongationsfaktor EF-G wird nach der Translokation und GTP-Hydrolyse wieder abgespalten (siehe Abb. 1). Das Ribosom kann jetzt die dem nächsten Codon entsprechende Aminoacyl-tRNA mit Hilfe von EF-Tu und GTP an die Acceptorstelle binden und den gesamten Zyklus so oft wiederholen, bis in der mRNA ein Terminationscodon auftritt. Die Bindungsstellen für EF-Tu und EF-G am Ribosom überlappen teilweise, so daß die beiden Faktoren nicht gleichzeitig gebunden werden können^[9].

Das Antibiotikum Puromycin wirkt als Analoges der Aminoacyl-tRNAs^[11]. Es wird an die Acceptorstelle gebunden und

kann mit fMet-tRNA^{fMet} oder einer Peptidyl-tRNA, die sich in der Donorstelle befindet, unter Bildung einer Peptidbindung reagieren. Das entstandene Puromycin-Derivat wird vom Ribosom abgelöst; Puromycin bewirkt also eine künstliche Termination.

Die Terminationscodons UAG, UAA oder UGA könnten durch das Ribosom selbst^[10] oder durch die Terminationsfaktoren R1 und R2 erkannt werden^[11]. Der Kettenabbruch verläuft vermutlich durch Übertragung der Peptidkette auf H₂O unter Mitwirkung der Peptidyltransferase^[12].

Das Ribosom muß demnach nicht nur spezifische Bindungsstellen für tRNA und mRNA, sondern auch für Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren besitzen. Weiter muß es eine hydrophobe Umgebung bieten, die einerseits verhindert, daß bei der Transpeptidation eine abortive Übertragung der Peptidkette auf H₂O als Nebenreaktion stattfindet, und die andererseits durch Ausschluß von Wasser die Wechselwirkungen zwischen den Nucleotiden verstärkt.

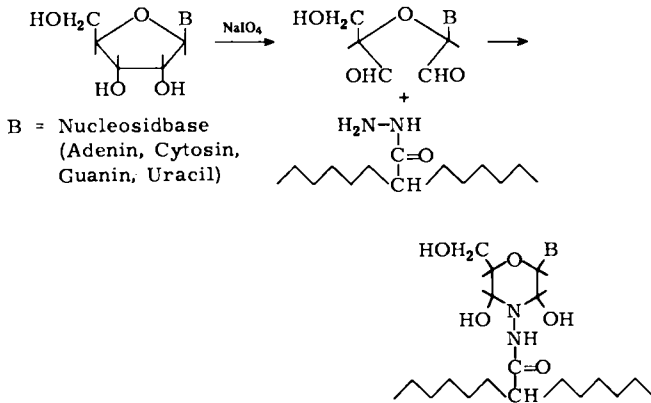
2. Basenpaarung zwischen komplementären Nucleosiden in wäßrigem und nicht-wäßrigem Medium

Die Versuche, Wechselwirkungen zwischen komplementären Nucleotidbasen in wäßrigen Lösungen direkt nachzuwei-

sen, gehen bis in die Anfänge der Untersuchungen der DNA-Struktur durch *Watson* und *Crick* zurück^[13]. Sie blieben lange Zeit erfolglos, denn durch das Fehlen der Basenstaffelung, wie sie in den Polymeren auftritt, und durch die Konkurrenz der H₂O-Moleküle bei der Bildung von Wasserstoffbrücken sind die Wechselwirkungen so schwach, daß sie sich mit konventionellen physikalisch-chemischen Methoden nicht nachweisen lassen.

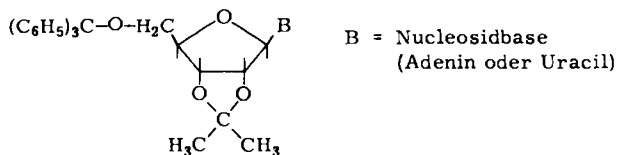
In biologischen Systemen – etwa bei der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese – finden die Wechselwirkungen zwischen Nucleotiden oder kurzen Nucleotidsequenzen wahrscheinlich immer unter partiellem Wasserausschluß in den „hydrophoben Taschen“ der Proteine statt. Für physikalisch-chemische Untersuchungen lassen sich solche Verhältnisse durch kovalente Bindung einer Base an ein unlösliches Trägermaterial oder durch Verwendung von Lösungsmitteln geringer Dielektrizitätskonstante simulieren. In beiden Fällen konnten Basenpaarbildungen nachgewiesen werden.

Zum Zwecke der Affinitätschromatographie in einem wäßrigen Puffersystem wurden Nucleoside mit Periodat zu Dialdehyden oxidiert und diese kovalent an die Säurehydrazidgrup-



pen eines unlöslichen Trägermaterials gebunden. An diesen „Nucleosidsäulen“ wurden Gemische von Nucleosiden in wäßrigem Puffer chromatographiert. Dabei zeigte sich, daß an „Adenosin-Säulen“ Uridin gegenüber Cytidin retardiert wird, an „Guanosin-Säulen“ dagegen wird Cytidin stärker zurückgehalten als Uridin^[14, 15]. Dasselbe Resultat lieferte die Chromatographie der Desoxynucleoside Thymidin und Desoxycytidin, wodurch bewiesen ist, daß die beobachteten Effekte auf spezifische Wechselwirkungen zwischen den komplementären Basen Adenin und Uracil (oder Thymin) sowie Guanin und Cytosin zurückzuführen sind. Dieser Befund wird noch dadurch erhärtet, daß durch Ersatz der an den Wasserstoffbrücken beteiligten H-Atome durch Methylgruppen diese Wechselwirkungen aufgehoben werden konnten^[16].

Besonders deutlich läßt sich die Basenpaarbildung über Wasserstoffbrücken durch IR-Spektroskopie beobachten^[17]. 2',3'-O-Isopropyliden-5'-O-trityl-Derivate von Nucleosiden, in denen alle OH-Gruppen der Ribose substituiert sind, lösen



sich in organischen Lösungsmitteln. Da die IR-Banden von freien und an Wasserstoffbrücken beteiligten H-Atomen verschieden sind, lassen sich die Bindungskonstanten für die Basenpaarbildung bestimmen. Wir haben festgestellt, daß in CCl₄ das Adenosin- und das Uridin-Derivat im Verhältnis 1:1 assoziiert sind. Die Tendenz zur Eigenassoziation der Nucleosid-Derivate ist wesentlich schwächer. Tabelle 1 enthält einige Assoziationskonstanten. Man sieht, daß das Basenpaar Adenin-Uracil unter diesen Bedingungen etwa sechsmal stabiler ist als die Paare Uracil-Uracil und Adenin-Adenin. Diese Befunde entsprechen den Resultaten anderer Autoren^[18].

Tabelle 1. Assoziation der 2',3'-O-Isopropyliden-5'-O-trityl-Derivate von Adenosin und Uridin in CCl₄ bei 20°C.

Assoziationsweise der Derivate	K _{Ass} [Liter/mol]
Uridin-Uridin	1.1 × 10 ²
Adenosin-Adenosin	0.83 × 10 ²
Adenosin-Uridin	5.9 × 10 ²

Solche Daten lassen sich natürlich nicht direkt auf die Bindungsverhältnisse zwischen Nucleotiden in der „hydrophoben Tasche“ eines Proteins übertragen. Vor allem bestehen in Lösung keine sterischen Restriktionen, so daß auch Basenpaarungen möglich sind, die in natürlichen doppelsträngigen Nucleinsäuren nicht vorkommen. Trotzdem kann man aus solchen Untersuchungen ersehen, daß Nucleosid-Wechselwirkungen durch eine hydrophobe Umgebung verstärkt werden. Auf die Proteinbiosynthese übertragen bedeutet dies, daß die Präzision der Übersetzung der mRNA-Nucleotidsequenz in die Aminosäuresequenz durch eine unpolare Umgebung an der Stelle der Codon-Anticodon-Wechselwirkung erhöht werden kann. Es ist daher zu erwarten, daß sich die auf Basenpaarung beruhenden Nucleotid-Wechselwirkungen nicht an der hydratisierten Oberfläche des Ribosoms, sondern im Inneren in einer hydrophoben Umgebung abspielen.

3. Die Bindung der mRNA an das Ribosom. Affinitätsmarkierung

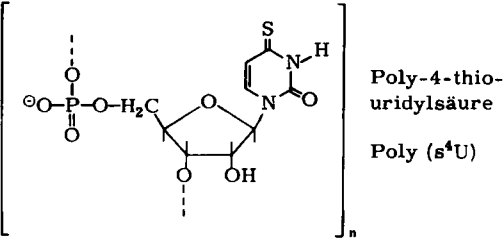
mRNA wird primär an die 30-S-Untereinheit gebunden. Mehrere Untersuchungen haben das ribosomale Protein S1 aus dieser Untereinheit mit der mRNA-Bindung in Zusammenhang gebracht. Dieses Protein ist für die Bindung von Polyuridylsäure [Poly(U)] an Ribosomen erforderlich^[19], und umgekehrt schützt Poly(U) das Protein gegen Abbau durch Proteasen^[20]. Poly(U) wirkt als mRNA und wird in das Protein Polyphenylalanin übersetzt. Das Protein S1, das auch im isolierten Zustand Poly(U) binden kann^[21], ist nur in 10 bis 30 % der Ribosomen, die nach den üblichen Methoden gereinigt wurden, vorhanden^[22]. Isoliert man hingegen Polyosomen, in denen alle Ribosomen „übersetzungs-aktiv“ sind, so findet man ein Molekül Protein S1 pro Ribosom^[23]. Das Protein S1 ist für die Translation künstlicher und natürlicher mRNA erforderlich^[24].

Alle diese Befunde sagen jedoch nichts darüber aus, welche Komponenten des Ribosoms sich nun tatsächlich in der unmittelbaren Umgebung der mRNA befinden. Um diese Komponenten zu identifizieren, haben wir von der Technik der Photoaffinitätsmarkierung Gebrauch gemacht. Durch Affinitätsmarkierung kann das aktive Zentrum eines Enzyms oder eines

vergleichbaren Proteins spezifisch substituiert und damit erkannt werden. Man setzt das zu markierende biologische Molekül mit einer Verbindung Sub—X um; Sub ist eine substratähnliche Gruppe (oder ein Teil des Substrats), X eine reaktive Gruppe. Dank der Substratähnlichkeit von Sub wird Sub—X im aktiven Zentrum gebunden, und X (oder Sub) kann nur mit den dort vorhandenen Aminosäureseitenketten reagieren. Das Ziel ist die Markierung dieser Seitenketten mit kovalent gebundenem X (oder Sub) (siehe Abschnitt 6).

Bei der Photoaffinitätsmarkierung wird eine dem natürlichen Substrat ähnliche Substanz gebunden, die bei Bestrahlung mit Molekülen ihrer Umgebung reagiert. Die Methode hat gegenüber der herkömmlichen Affinitätsmarkierung den Vorteil, daß die Dauer der Reaktion zwischen dem Substratanalogen und seiner Umgebung durch die Zeit der Bestrahlung definiert ist.

Bei unseren Untersuchungen haben wir ein Analoges der Poly(U), die Poly-4-thiouridylsäure [Poly(s⁴U)] in Gegenwart von Ribosomen bestrahlt. Das natürlich vorkommende 4-Thiouracil ist eine der „seltenen Basen“ in der tRNA. Durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 330 nm wird die Bin-



dung zwischen C und S aktiviert, das S-Atom oxidiert und die C—S-Bindung durch nucleophile Substitution gespalten^[25]. Im Reaktionsprodukt sind Seitenketten der ribosomalen Proteine kovalent mit dem Pyrimidinring verbunden. Als nucleophile Gruppen können aliphatische Aminogruppen, z. B. die ε-Aminogruppe von Lysin, reagieren. Lysin ist eine der häufigsten Aminosäuren in ribosomalen Proteinen^[26]. Diese Reaktion haben bereits *Frischauf* und *Scheit* bei der Untersuchung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase verwendet^[27].

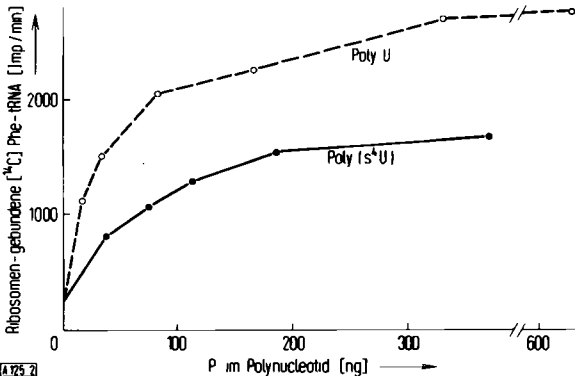


Abb. 2. Bindung von [¹⁴C]Phe-tRNA an Ribosomen in Gegenwart wechselnder Mengen Poly(U) und Poly(s⁴U). Die an Ribosomen gebundene [¹⁴C]Phe-tRNA wurde nach der Methode von *Leder* bestimmt [81].

Poly(s⁴U), das durch enzymatische Polymerisation von 4-Thiouridindiphosphat mit Polynucleotidphosphorylase ge-

wonnen wird^[28], codiert – wie Abbildung 2 zeigt – ähnlich wie Poly(U) die Bindung von Phenylalanyl-tRNA (Phe-tRNA) an Ribosomen und stimuliert im proteinsynthetisierenden System in vitro die Synthese von Polyphenylalanin^[29]. Werden Komplexe aus Poly(s⁴U), Ribosomen und Phe-tRNA mit Licht der Wellenlänge 330 nm bestrahlt, so wird die Polyphenylalanin-Synthese inhibiert^[30]. Kontrollexperimente zeigen, daß Komplexe mit Poly(U) statt Poly(s⁴U) als mRNA auch nach der Bestrahlung im in-vitro-System Polyphenylalanin synthetisieren, was bedeutet, daß die Ribosomen durch das UV-Licht nicht inaktiviert werden.

Zur Identifizierung der an der mRNA-Bindung beteiligten ribosomalen Komponenten wurden Ribosomen mit [³H]Poly(s⁴U) und Phe-tRNA inkubiert und bestrahlt. Aus den isolierten 30-S-Untereinheiten wurden nach Verdauung der Ribonucleinsäuren mit den Ribonucleasen A und T1 die Proteine gewonnen. Bei Elektrophorese an Polyacrylamidgelen in Natriumdodecylsulfat^[31] erhält man ein radioaktiv markiertes Ribonucleoprotein mit einem Molekulargewicht von 110000 bis 130000 D. Da das Molekulargewicht des größten ribosomalen Proteins (S1) nur 65000 D beträgt, war anzunehmen, daß das Ribonucleoprotein mehrere Proteine enthält. Zu ihrer Identifizierung wurde das Ribonucleoprotein mit Lauge hydrolysiert. Danach fand sich bei der Gelelektrophorese die meiste Radioaktivität im Protein S1^[30]. Daneben trat Radioaktivität auch in Proteinen niedrigeren Molekulargewichts auf. Dies beweist, daß Poly(s⁴U) mit dem Protein S1 und einigen anderen Proteinen reagiert hat. Die elektrophoretische Zuordnung wurde durch immunologische Untersuchungen bestätigt. Auf diese Weise konnten wir neben dem Protein S1 die Proteine S18 und S21 als Komponenten des Ribonucleoproteinkomplexes identifizieren^[32]. Mit anderen chemischen Methoden konnte gezeigt werden, daß die Proteine S1, S18 und S21 im Ribosom benachbart sind^[33, 34]. Die Identifizierung der Proteine S18 und S21 als Bestandteile der mRNA-Bindungsstelle wurde durch Affinitätsmarkierung mit einem Derivat des Initiationscodons AUG bestätigt^[35].

4. Die Erkennung der Initiationsstelle

Für die Initiation der Proteinsynthese ist außer dem Codon AUG oder GUG ein zusätzliches Initiationssignal nötig. AUG codiert nämlich nicht nur für Formylmethionin (fMet) bei der Initiation, sondern auch für Methionin innerhalb der Polypeptidkette. Außerdem darf an Stellen, an denen ein Codon mit A oder G endet und das nächste Codon mit UG beginnt, keine Initiation außerhalb des „Leserahmens“ erfolgen, weil diese zu keinem für die Zelle brauchbaren Protein führen würde.

Dieses Initiationssignal kann nur in der Nucleotidsequenz der mRNA enthalten sein. Prinzipiell könnte die Erkennung einer Sequenz in der mRNA durch Wechselwirkung mit einem ribosomalen Protein oder durch Basenpaarung mit einer ribosomalen RNA ähnlich wie bei der Codon-Anticodon-Wechselwirkung zustandekommen. Nach einer Hypothese von *Shine* und *Dalgarno*^[10] (Abb. 3) erkennt das Ribosom die Initiationsstelle durch Basenpaarung zwischen der Nucleotidsequenz am 3'-Ende der 16-S-RNA der ribosomalen 30-S-Untereinheit und einer komplementären Sequenz, die in der mRNA in der Nähe des Initiationstripletts liegt. Dies ist an einigen

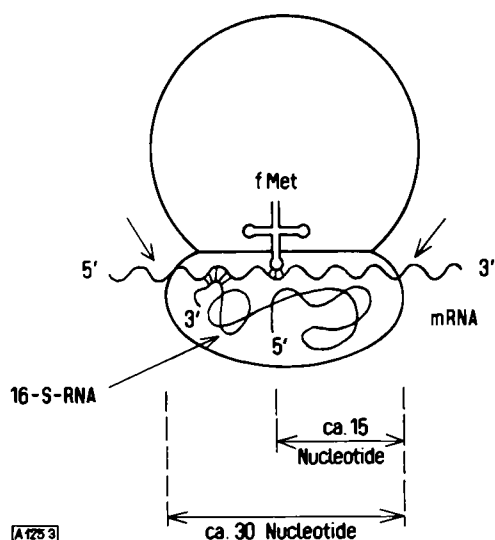
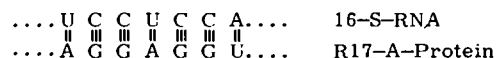


Abb. 3. Schema der Erkennung der Initiationsstelle durch das Ribosom nach *Shine* und *Dalgarno* [10]. Bei der Bildung des Initiationskomplexes kommt es zur Basenpaarung zwischen einer Nucleotidsequenz am 3'-Ende der 16-S-RNA und einer komplementären Sequenz in der mRNA. Außerdem treten das Initiationscodon und das dazu komplementäre Anticodon in der fMet-tRNA^{fMet} miteinander in Wechselwirkung. Da das Ribosom den gebundenen Teil der mRNA gegen Abbau durch Ribonuclease schützt, läßt sich die Initiationsstelle der mRNA durch Behandlung mit Ribonuclease isolieren (siehe Tabelle 2). Die Pfeile geben die Stellen der mRNA an, bis zu denen Ribonuclease spalten kann.

Beispielen in Tabelle 2 illustriert. In der ersten Zeile ist die Nucleotidsequenz des 3'-Endes der 16-S-RNA angeführt; die für die Erkennung verantwortlichen Nucleotide sind unterstrichen. Darunter sind einige Nucleotidsequenzen von Initia-

tionsstellen mehrerer natürlicher mRNAs angegeben. Die Nucleotide, die das Initiationssignal bilden, sind ebenfalls unterstrichen. Die Sequenzen sind in der Tabelle so angeordnet, daß komplementäre Nucleotide jeweils senkrecht untereinander stehen. Der Beginn der Nucleotidsequenz, die für das Protein codiert, ist jeweils kursiv gedruckt. So sieht man, daß die mRNA für das A-Protein des R17-Phagen (eines Virus, der *Escherichia coli* befällt und dessen Translationssystem für sein Wachstum benutzt) kurz vor dem Beginn der Information für die Struktur des A-Proteins die Sequenz AGGAGGU enthält, die zur UCCUCCA-Sequenz in der 16-S-RNA komplementär ist und über Basenpaarbildung an diese gebunden werden kann.



Die übrigen Beispiele in Tabelle 2 zeigen, daß dieses Schema auch für die Initiationsstellen anderer mRNAs gilt, wobei immer eine Komplementarität zwischen Initiationssignal und Nucleotiden am 3'-Ende der 16-S-RNA besteht. Die Länge der komplementären Sequenz beträgt bei der mRNA für das A-Protein des R17-Phagen sieben Basenpaare, bei den anderen angeführten Beispielen vier bis fünf Basenpaare. Einen experimentellen Beweis für diese Hypothese haben *Steitz* und *Jakes*^[42] kürzlich erbracht. Die unterschiedliche Länge der komplementären Sequenzen und die damit verbundene Variation in der Affinität des Ribosoms zu den Initiationsstellen könnte – zusammen mit der Sekundärstruktur der mRNA – die Häufigkeit der Initiation und damit der Translation bestimmen.

Tabelle 2. Komplementarität zwischen Nucleotidsequenzen am 3'-Ende der 16-S-RNA aus *E. coli* (oben) und ribosomalen Bindungsstellen natürlicher mRNAs (unten). Komplementäre Sequenzen sind unterstrichen. Da das G-C-Paar stabiler ist als das A-U-Paar, wurden die Sequenzen so angeordnet, daß G-C-Paare bevorzugt sind. Der Beginn der Sequenz, die für die Proteinstruktur codiert, ist kursiv gedruckt. Die Pfeile bezeichnen die Stellen im mRNA-Ribosomen-Komplex, an denen die mRNA durch Ribonuclease T1 (RNase T1) oder Ribonuclease A (RNase A) gespalten wird. Ribonuclease T1 spaltet immer nach Guanin, Ribonuclease A immer nach Pyrimidinen (Uracil oder Cytosin). Weitere Erklärungen siehe Text.

3'	AUUCCUCCACUAGGUUGGCGUCCm ₂ ⁶ Am ₂ ⁶ AGGGGA...16-S-RNA E. (E. coli) ^[36]		5'
HO			
<hr/>			
5'	RNase T1	RNase T1	3'
↓	..CCUAGGAGGUUUGACCUAUGCGAGCUUUAGUG...	↓	R17-A-Protein ^[37]
5'	RNase T1	RNase T1	3'
↓	...AAACAUGAGGAUUACCCAUGUCGAAGACAACAAAG...	↓	R17-Replikase ^[37]
5'	RNase A	RNase A	3'
↓	...AACUAAGGAUGAAAUGCAUGUCUAAGACAGC...	↓	Qβ-Replikase ^[38]
5'	RNase A	RNase A	3'
↓	...AGAGCCUCAACCGG <u>G</u> AUUUGAAGCAUGGCUUCUAACUUU...	↓	R17-Hüllenprotein ^[37, 39, 40] [a]
5'	RNase T1	RNase T1	3'
↓	...AUAACA <u>UUU</u> CACAC <u>AGG</u> AAACAGCUAUGACCAUGAUUACGGAU...	↓	Lac-mRNA (E. coli) ^[41]
	RNase A	RNase A	

[a] Für die ribosomale Bindungsstelle der mRNA für das R17-Hüllenprotein sind zwei Sequenzen bekannt, die sich in einem Nucleotid unterscheiden (G oder A [37, 39]). Beim Austausch von G gegen A handelt es sich um eine spontane Mutation.

Das Protein S1 befindet sich – wie in Abschnitt 3 gezeigt worden ist – im Ribosom in der mRNA-Bindungsstelle und ist nach Befunden anderer Autoren auch an das 3'-Ende der 16-S-RNA gebunden^[43]. Kurze Doppelstrangregionen in Nucleinsäuren, die nur aus vier bis fünf Basenpaaren bestehen, sind bei physiologischen Temperaturen in wäßrigem Medium sehr unbeständig. Diese Regionen können jedoch (siehe Abschnitt 2) durch eine hydrophobe Umgebung stabilisiert werden. Es ist somit sehr wahrscheinlich, daß Protein S1 als „hydrophobe Tasche“ die Wechselwirkungen zwischen dem 3'-Ende der 16-S-RNA und der Initiationssequenz in der mRNA stabilisiert und auf diese Weise an der Erkennung der Initiationsstellen in der mRNA mitwirkt.

5. Die Codon-Anticodon-Wechselwirkung bei der Initiation

Die Stelle am Ribosom, an der die Codon-Anticodon-Wechselwirkung stattfindet (Donorstelle, siehe Abb. 1), läßt sich am leichtesten anhand der mRNA lokalisieren. Experimente mit radioaktiver Poly(U) haben gezeigt, daß das Ribosom die mRNA auf einer Länge von ca. 30 Nucleotiden gegen Abbau mit Ribonuclease A schützt^[44]. Bei Verwendung von mRNAs bekannter Sequenz läßt sich der Abstand der Donorstelle von der Austritts- und der Eintrittsstelle der mRNA am Ribosom bestimmen. Da sich das Ribosom bei der Translation in Richtung vom 5'- zum 3'-Ende der mRNA bewegt, entsprechen Austritts- und Eintrittsstelle der mRNA am Ribosom jeweils dem 5'- bzw. 3'-Ende des gegen Ribonuclease resistenten mRNA-Fragmentes (Abb. 1 und 3).

Ein Vergleich der ribosomalen Bindungsstellen für natürliche mRNAs in Tabelle 2 zeigt, daß Ribonucleasen immer im oder unmittelbar nach dem fünften Codon der Sequenz, die für die Proteinstruktur codiert, spalten. (Die exakte Stelle der Spaltung wird natürlich auch durch die Spezifität der Ribonuclease bestimmt, da Ribonuclease A nur nach U und C, Ribonuclease T1 nur nach G angreift.) Dieses Resultat wurde sowohl durch Bestimmung der Nucleotidsequenzen^[37–41] als auch durch in-vitro-Translation des Fragmentes vom R17-Hüllenprotein-Gen erhalten^[45, 46]. Von diesen Daten ausgehend lassen sich die Abstände im Ribosom abschätzen. Die Distanz zwischen zwei Nucleotiden in einem Polynucleotid beträgt in der gestaffelten Form 3,4 Å, in der gestreckten Form 7 Å^[45]. Für 15 Nucleotide von der Donorstelle bis zur Eintrittsstelle der mRNA in das Ribosom entspricht dies 50 bis 100 Å. Der Durchmesser des Ribosoms beträgt ca. 200 Å. Nimmt man die gesamte Länge des vom Ribosom umschlossenen Polynucleotids mit ca. 30 Nucleotiden an^[44], so würde die Donorstelle ungefähr in der Mitte liegen.

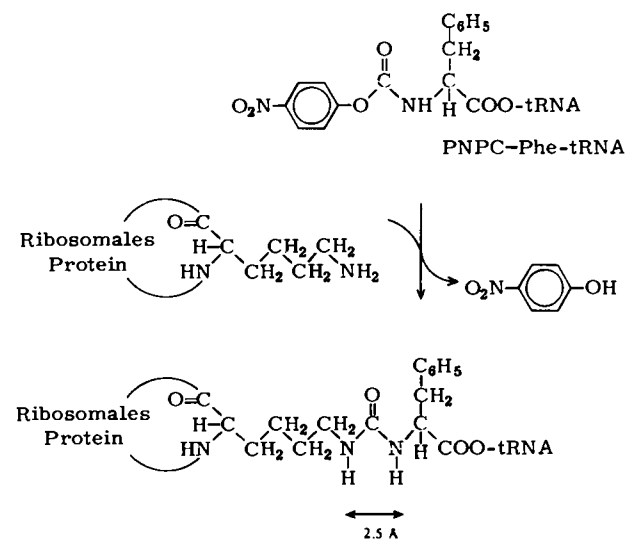
6. Das Peptidyltransferase-Zentrum

In der Aminoacyl-tRNA gibt es offenbar zwei Stellen für die Wechselwirkung mit dem Ribosom: die TΨC-Region, die mit einer komplementären Nucleotidsequenz in der 5-S-RNA der 50-S-Untereinheit in Wechselwirkung tritt^[7], und den aminoacylierten CCA-Terminus, der auch in isolierter Form als aminoacyliertes Oligonucleotidfragment von der 50-S-Untereinheit gebunden werden kann^[47]. Das gebundene Fragment kann an der Peptidyltransferase-Reaktion teilnehmen,

was zeigt, daß es am richtigen Ort im Ribosom gebunden wird. Wir verwenden für dieses katalytische Zentrum des Ribosoms den Ausdruck Peptidyltransferase-Zentrum, ohne zunächst zwischen Donor- und Acceptorstelle zu unterscheiden.

Um die Komponenten des Peptidyltransferase-Zentrums zu identifizieren, haben wir wiederum von der Technik der Affinitätsmarkierung Gebrauch gemacht (siehe Abschnitt 3). *Bruton und Hartley*^[48] schlugen das *N*-(*p*-Nitrophenoxycarbonyl)-Derivat der Aminoacyl-tRNA zur Affinitätsmarkierung von Aminoacyl-tRNA-Ligasen vor. Der *p*-Nitrophenoxycarbonyl-Rest (PNPC-Rest) enthält eine aktive Esterbindung, die durch nucleophile Substitution gespalten werden kann, wobei *p*-Nitrophenol als Abgangsgruppe fungiert.

Als nucleophiler Reaktant kommt auch hier vor allem die ε-Aminogruppe von Lysin in Frage^[49]. Eine Umsetzung mit Aminogruppen von Nucleosidbasen ist wegen der geringen Basizität solcher Gruppen unwahrscheinlich.



Zur Umwandlung in das Reagens wurde Phe-tRNA, die im Phenylalanylrest mit [³H] radioaktiv markiert war, mit Chlorameisensäure-*p*-nitrophenylester unter Bedingungen umgesetzt, die nur eine Reaktion an der Aminogruppe des Phenylalanylrestes zulassen. Die so gewonnene *N*-(*p*-Nitrophenoxycarbonyl)-phenylalanyl-tRNA (PNPC-Phe-tRNA) wurde anschließend in Gegenwart von Poly(U) mit 20 mmol Mg²⁺/Liter und mit Ribosomen inkubiert. Nach Dissoziation der 70-S-Ribosomen und Zentrifugation wurde die Radioaktivität ausschließlich in den 50-S-Untereinheiten gefunden. Die radioaktiv markierten 50-S-Untereinheiten wurden denaturiert und die RNA durch Behandlung mit den Ribonucleasen A und T1 abgebaut.

Zur Identifizierung der markierten Proteine wurden die zweidimensionale Gelelektrophorese nach *Kaltschmidt und Wittmann*^[2] sowie immunologische Methoden benutzt^[50]. Dabei fand sich die meiste Radioaktivität im Protein L27, eine kleinere Menge im Protein L15 und geringe Anteile in den Proteinen L2 und L16^[51].

Abbildung 4 zeigt das Ergebnis der eindimensionalen Elektrophorese der isolierten L-Proteine. Die Radioaktivität tritt hier in zwei Banden auf, die im wesentlichen den Proteinen L15+L16 sowie L27 entsprechen. Aus Abbildung 4 geht hervor, daß [³H]-Phe-tRNA nur in Gegenwart von Poly(U) von ribosomalem Protein gebunden wird.

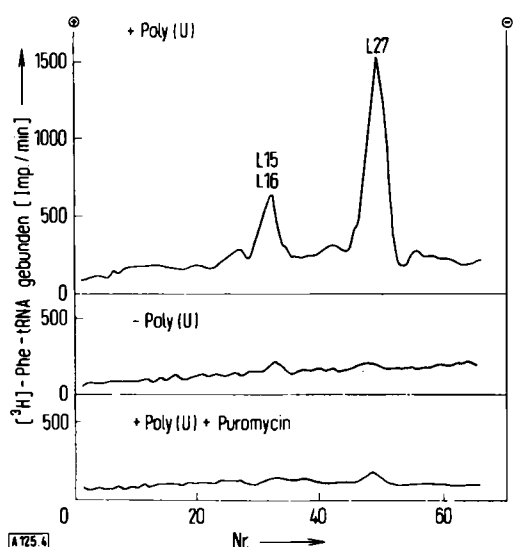


Abb. 4. Affinitätsmarkierung des ribosomalen Peptidyltransferase-Zentrums mit PNPC- $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA. Die Reaktion findet nur in Gegenwart von Poly(U) statt und wird durch Puromycin inhibiert. Zur Inkubation, zur Trennung der markierten Proteine durch eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese und zur Identifizierung der Proteine diente die Methode von Czernilofsky et al. [51, 82].

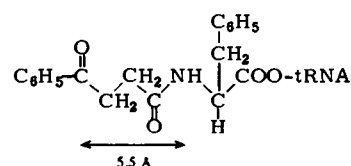
Durch Puromycin, das mit der an der Donorstelle gebundenen Aminoacyl-tRNA unter Bildung von Aminoacyl-puromycin und Ablösung der Aminosäure vom Ribosom reagiert^[1], wird die Bindung des tRNA-Derivats gehemmt. Somit ist gezeigt, daß der Großteil der PNPC-Phe-tRNA mit der Donorstelle des Ribosoms reagiert, woraus man schließen kann, daß der modifizierte CCA-Terminus der PNPC-Phe-tRNA mit dem Peptidyltransferase-Zentrum des Ribosoms in Reaktion tritt. Da aber *N*-acylierte Phe-tRNA bei der verwendeten Magnesiumionen-Konzentration sowohl an die Donor- als auch an die Acceptorstelle gebunden wird, kann man nicht ausschließen, daß ein geringer Teil der PNPC-Phe-tRNA doch mit der Acceptorstelle reagiert hat.

Um die Proteine der Donor- und der Acceptorstelle zu unterscheiden, verwendeten wir ein System mit R17-RNA als mRNA sowie gereinigten Initiationsfaktoren, GTP und dem PNPC-Derivat der Initiator-tRNA Met-tRNA^{Met} in Gegenwart von 5mmol Mg^{2+} /Liter. Unter diesen Bedingungen wird die Initiator-tRNA ausschließlich an die Donorstelle gebunden^[52]. Da die Spezifität der Bindung durch die tRNA^{Met}-Struktur und den Initiationsfaktor IF2 bedingt ist, sollte man erwarten, daß sie beim PNPC-Met-tRNA^{Met}-Derivat erhalten bleibt. PNPC- $[^3\text{S}]$ -Met-tRNA^{Met} reagiert im ribosomalen Komplex vor allem mit dem Protein L27 und in geringem Ausmaß mit dem Protein L15^[52]. Die Reaktion war von der Gegenwart der Initiationsfaktoren und der R17-RNA abhängig. Somit ist bestätigt, daß die Proteine L27 und L15 sich an der Donorstelle befinden.

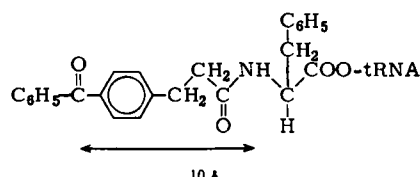
Es ist anzunehmen, daß bei der Peptidyltransferase-Reaktion die CCA-Enden der beiden beteiligten tRNAs in enge räumliche Nachbarschaft gebracht werden. Da der Peptidyltransfer nur in einer Richtung, nämlich von der Donor- zur Acceptorstelle, vor sich geht, muß man annehmen, daß diese Richtungsabhängigkeit der Ausdruck struktureller Unterschiede zwischen den Bindungsstellen für die CCA-Enden der beiden tRNAs ist. Es ist daher durchaus zu erwarten, daß bei Reaktionen an der Donor- und der Acceptorstelle nicht die gleichen Proteine markiert werden.

Andere Autoren haben *N*-(Bromacetyl)aminoacyl-tRNA zur Affinitätsmarkierung verwendet und dabei die Proteine L27 und L2 von der Donorstelle aus markiert^[53, 54]. Die Markierung von L27 ist mit unseren Resultaten in Einklang, bei L2 zeigen sich quantitative Unterschiede. Solche Differenzen sind jedoch zu erwarten, da die PNPC-Gruppe bevorzugt mit Aminogruppen^[49], die Bromacetylgruppe hingegen bevorzugt mit Mercaptogruppen reagiert^[53]. Protein L16 ist das Bindungsprotein für das Antibiotikum Chloramphenicol. Das geht aus Rekonstitutionsexperimenten^[55] und aus Markierungsversuchen mit dem analogen Iodamphenicol hervor^[56]. Chloramphenicol wird an die Acceptorstelle gebunden, das Protein L16 sollte daher von der Acceptorstelle aus markiert worden sein. Das stimmt mit unseren Befunden überein: L16 wird nur mit PNPC-Phe-tRNA, nicht aber mit der für die Donorstelle spezifischen PNPC-Met-tRNA^{Met} markiert^[51, 52]. Weiter wird die Markierung von L16 verstärkt, wenn die Bedingungen so gewählt werden, daß sich Bromacetyl-Phe-tRNA bevorzugt an die Acceptorstelle bindet^[57]. Für derartige Versuche wurden auch mit aromatischen Aziden wie 4-(4-Azido-2-nitrophenoxy)phenyllessigsäure und *N*-(4-Azido-2-nitrophenyl)glycin an der Aminoacyl-NH₂-Gruppe substituierte Aminoacyl-tRNAs verwendet. Nach Photoaktivierung wurde eine kovalente Bindung an die Proteine L11 und L18 gefunden^[58]. Das Protein L11 ist als Kandidat für die Peptidyltransferase diskutiert worden^[59-61]. Die Proteine L18 und L25 bilden mit 5-S-RNA einen Komplex, der über das Protein L5 an die 23-S-RNA gebunden ist^[62].

Die 23-S-RNA scheint direkt am Aufbau des Peptidyltransferase-Zentrums beteiligt zu sein. Einen Hinweis darauf geben Photoaffinitätsmarkierungsexperimente mit *N*-(Diazomalonyl)-Phe-tRNA^[63], mit Azidoaryl-Derivaten wie *N*-(4-Azido-2-nitrobenzoyl)-Phe-tRNA^[64] und *p*-Azido-*N*-tert-butoxycarbonylphenylalanyl-Phe-tRNA^[65] sowie mit Arylcarbonyl-Derivaten wie 3-Benzoylpropionyl-Phe-tRNA (BP-Phe-tRNA) und 3-(4-Benzoylphenyl)propionyl-Phe-tRNA (BPP-Phe-tRNA)^[66]. Wir haben uns mit den letztgenannten Verbindungen beschäftigt. Die Carbonylgruppen werden in Form von Hydroxylgruppen in die zu markierenden ribosomalen Proteine eingebaut.



BP-Phe-tRNA



BPP-Phe-tRNA

Die Carbonylgruppe der aromatischen Ketone kann durch UV-Licht der Wellenlänge 320 nm zu einem Triplettzustand angeregt werden. Die Anregungsenergie beträgt ca. 70 kcal/mol, was ungefähr der Dissoziationsenergie für eine leicht

$$\text{Ar}-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\ddot{\text{O}}: \xrightarrow{h\nu} \text{Ar}-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}-\ddot{\text{O}}: \longrightarrow \text{Ar}-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\ddot{\text{O}}: \xrightarrow{\text{X-H}} \text{Ar}-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}(\text{X})-\text{OH}$$

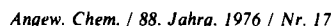
Nach Bildung von Komplexen aus Ribosomen, BP- oder BPP-[^3H]Phe-tRNA sowie Poly(U) als mRNA und anschließender Bestrahlung wurde die Radioaktivität der 50-S-Untereinheiten nur in 23-S-RNA gefunden. Die Bedeutung dieses Ergebnisses wird dadurch unterstrichen, daß die Abstände zwischen der reaktiven Carbonylgruppe und dem Aminoacylrest der tRNA in den beiden Derivaten sehr verschieden sind (5.5 bzw. 10 Å): die Markierung der 23-S-RNA kann also nicht das Resultat einer zufällig günstigen sterischen Anordnung sein.

Mit geeigneten Abbaumethoden läßt sich die ungefähre Position der Markierung im 23-S-RNA-Molekül feststellen. Die 23-S-RNA besteht aus etwa 3000 Nucleotiden. Nach partieller Verdauung mit Ribonucleasen lassen sich Fragmente isolieren, welche die 1300 Nucleotide des 5'-Terminus und

Wie man sieht, ist das Peptidyltransferase-Zentrum kompliziert zusammengesetzt. Selbst bei ausschließlicher Bindung der derivatisierten Aminoacyl-tRNA an die Donorstelle werden mehrere Proteine und 23-S-RNA markiert. Besonders wichtig erscheinen in diesem Zusammenhang die Affinitätsmarkierungsexperimente mit photoaktivierbaren Gruppen geringer Spezifität wie Diazomalonsäure, aromatischen Aziden und aromatischen Ketonen, die alle auf 23-S-RNA als Komponente der Donorstelle hinweisen^[63-66]. Es wurde jedoch auch bei Markierung der Proteine gezeigt, daß kovalent gebundene Aminoacyl-tRNA noch zur Peptidyltransferase-Reaktion fähig ist, womit die Zugehörigkeit der Proteine zur Donorstelle bewiesen ist. Man kann daraus einerseits ableiten, daß der Aminoacyl-Rest der tRNA in der Donorstelle sich nicht unbedingt in einer bestimmten Position befinden muß, damit die Peptidyltransferase-Reaktion vor sich geht. Das weist auf eine gewisse Flexibilität im Peptidyltransferase-Zentrum hin. Andererseits kann man sich schwer vorstellen, daß es keine bevorzugte Bindungsstelle geben sollte, die maximale Geschwindigkeit und Effizienz der Aminoacyl-Übertragung garantiert. 23-S-RNA könnte eine solche Bindungsstelle enthalten, an die der CCA-Terminus der tRNA durch Wechselwirkung mit komplementären Basen gebunden wird. Ob diese Hypothese richtig ist, wird allerdings erst eine Sequenzanalyse der 23-S-RNA an der Stelle der Reaktion mit BPP-Phe-tRNA zeigen.

Das Verständnis der Vorgänge bei der Proteinbiosynthese setzt voraus, daß die Konstruktion des Ribosoms bekannt ist. In den letzten Jahren wurden gerade auf diesem Gebiet durch die Einführung vernetzender Reagentien^[71, 72], durch die Perfektionierung der Rekonstitutionsmethoden^[73, 74] und durch die elektronenmikroskopische Untersuchung von Ribosomen-Dimeren, die durch Antikörper verknüpft sind^[75-78], bedeutende Fortschritte erzielt^[79]. Es ist auch bereits versucht worden, aus diesen Ergebnissen dreidimensionale Modelle der 30-S-Untereinheit zu errechnen^[80].

Obwohl unser Wissen von den Vorgängen im Ribosom durch die intensiven Forschungen der letzten Zeit wesentlich erweitert worden ist, kann man den Mechanismus der Proteinsynthese auf molekularer Ebene noch nicht vollständig beschreiben. Allerdings sind die methodischen Voraussetzungen geschaffen, die es uns in naher Zukunft erlauben sollten, zu einem Bild des Ribosoms zu gelangen, das nicht nur die sterische Anordnung der Proteine und Nucleinsäuren wiedergibt.



sondern auch das detaillierte Verständnis der Eiweißsynthese ermöglicht.

Vielen Freunden und Kollegen in diesem Institut und in anderen Forschungsinstituten danke ich für Diskussionen, Kritik und wertvolle Anregungen. Besonders erwähnt sei die fruchtbare Zusammenarbeit mit Dr. G. Stöffler, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, und mit Dr. K. H. Scheit, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen. Die kritische Durchsicht des Manuskriptes besorgten in dankenswerter Weise Prof. Dr. H. Tuppy und meine Kollegen am Institut für Biochemie, Wien. Dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 27. November 1975,
ergänzt am 9. April 1976 [A 125]

[1] G. Schreiber, *Angew. Chem.* 83, 645 (1971); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10, 638 (1971).

[2] E. Kaltschmidt u. H. G. Wittmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 1276 (1970).

[3] R. Haselkorn u. L. B. Rothman-Denes, *Annu. Rev. Biochem.* 42, 397 (1973).

[4] M. Grunberg-Manago, Th. Godefroy-Colburn, A. D. Wolfe, P. Dessen, D. Pantaloni, M. Springer, M. Graffe, J. Dondon u. A. Kay in E. Bautz: *Regulation of Transcription and Translation*. 24. Mosbacher Colloquium. Springer, Berlin 1973, S. 213 ff.

[5] H. Noll, M. Noll, B. Hapke u. G. Van Dieijen in E. Bautz: *Regulation of Transcription and Translation*. 24. Mosbacher Colloquium. Springer, Berlin 1973, S. 257 ff.

[6] G. Jay u. R. Kuempfer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 3199 (1974).

[7] V. A. Erdmann, M. Sprinzl u. O. Pongs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 942 (1973).

[8] R. R. Traut u. R. E. Monro, *J. Mol. Biol.* 10, 63 (1964).

[9] J. Modolell, B. Cabrer u. D. Vazquez, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 3561 (1973).

[10] J. Shine u. L. Dalgarno, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 1342 (1974).

[11] M. R. Capecchi u. H. A. Klein, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34, 469 (1969).

[12] S. Fahnestock u. A. Rich, *Nature New Biol.* 229, 8 (1971).

[13] J. D. Watson: *The Double Helix*. Signet Books, The New American Library Inc., New York 1969, S. 92.

[14] H. Tuppy u. E. Küchler, *Biochim. Biophys. Acta* 80, 669 (1964).

[15] H. Tuppy u. E. Küchler, *Monatsh. Chem.* 95, 1677 (1964).

[16] H. Tuppy u. E. Küchler, *Monatsh. Chem.* 95, 1691 (1964).

[17] E. Küchler u. J. Derkosch, *Z. Naturforsch.* 21 b, 209 (1966).

[18] Y. Kyoogoku, R. C. Lord u. A. Rich, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 250 (1967).

[19] J. van Duin u. C. G. Kurland, *Mol. Gen. Genet.* 109, 169 (1970).

[20] D. P. Rummel u. H. F. Noller, *Nature New Biol.* 245, 72 (1973).

[21] M. Tal, M. Aviram, A. Kanarek u. A. Weiss, *Biochim. Biophys. Acta* 281, 381 (1972).

[22] H. J. Weber, *Mol. Gen. Genet.* 119, 233 (1972).

[23] P. H. van Knippenberg, P. J. J. Hooykaas u. J. van Duin, *FEBS Lett.* 41, 323 (1974).

[24] G. van Dieijen, C. J. van der Laken, P. H. van Knippenberg u. J. van Duin, *J. Mol. Biol.* 93, 351 (1975).

[25] M. Pleiss, H. Ochiai u. P. A. Cerutti, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 70 (1969).

[26] E. Kaltschmidt, M. Dzionara u. H. G. Wittmann, *Mol. Gen. Genet.* 109, 292 (1970).

[27] A. M. Frischauf u. K. H. Scheit, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 1227 (1973).

[28] J. Simuth, K. H. Scheit u. E. M. Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 204, 371 (1970).

[29] W. Bähr, P. Faerber u. K. H. Scheit, *Eur. J. Biochem.* 33, 535 (1973).

[30] I. Fiser, K. H. Scheit, G. Stöffler u. E. Küchler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1112 (1974).

[31] K. Weber, J. R. Pringle u. M. Osborn in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*. Bd. 26C. Academic Press, New York 1972, S. 3 ff.

[32] I. Fiser, K. H. Scheit, G. Stöffler u. E. Küchler, *FEBS Lett.* 56, 226 (1975).

[33] L. C. Lutter, H. Zeichhardt, C. G. Kurland u. G. Stöffler, *Mol. Gen. Genet.* 119, 357 (1972).

[34] A. P. Czernilofsky, C. G. Kurland u. G. Stöffler, *FEBS Lett.* 58, 281 (1975).

[35] O. Pongs, G. Stöffler u. E. Lanka, *J. Mol. Biol.* 99, 301 (1975).

[36] C. Ehresmann, P. Stiegler, G. A. Mackie, R. A. Zimmermann, J. P. Ebel u. P. Fellner, *Nucleic Acids Res.* 2, 265 (1975).

[37] J. A. Steitz, *Nature* 224, 957 (1969).

[38] D. H. Staples u. J. Hindley, *Nature New Biol.* 234, 211 (1971).

[39] S. Cory, P. F. Spahr u. J. M. Adams, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 1 (1970).

[40] K. U. Sprague u. J. A. Steitz, *Nucleic Acids Res.* 2, 787 (1975).

[41] N. Maizels, *Nature* 249, 647 (1974).

[42] J. A. Steitz u. K. Jakes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4734 (1975).

[43] A. E. Dahlberg u. J. E. Dahlberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 2940 (1975).

[44] M. Takanami u. G. Zubay, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 51, 834 (1964).

[45] E. Küchler u. A. Rich, *Nature* 225, 920 (1970).

[46] E. Küchler, *Nature New Biol.* 234, 216 (1971).

[47] R. E. Monro, T. Staehelin, M. L. Celma u. D. Vazquez, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34, 357 (1969).

[48] C. J. Bruton u. B. S. Hartley, *J. Mol. Biol.* 52, 165 (1970).

[49] E. E. Collatz, E. Küchler, G. Stöffler u. A. P. Czernilofsky, *FEBS Lett.* 63, 283 (1976).

[50] G. Stöffler u. H. G. Wittmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2283 (1971).

[51] A. P. Czernilofsky, E. E. Collatz, G. Stöffler, u. E. Küchler, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 230 (1974).

[52] R. Hauptmann, A. P. Czernilofsky, H. O. Voorma, G. Stöffler u. E. Küchler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 331 (1974).

[53] H. Oen, M. Pellegrini, D. Eilat u. C. R. Cantor, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 2799 (1973).

[54] M. Sopori, M. Pellegrini, P. Lengyel u. C. R. Cantor, *Biochemistry* 13, 5432 (1974).

[55] D. Nierhaus u. K. H. Nierhaus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 2224 (1973).

[56] O. Pongs, R. Bald u. V. A. Erdmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 2229 (1973).

[57] D. Eilat, M. Pellegrini, H. Oen, N. De Groot, Y. Lapidot u. C. R. Cantor, *Nature* 250, 514 (1974).

[58] N. Hsiung, S. A. Reines u. C. R. Cantor, *J. Mol. Biol.* 88, 841 (1974).

[59] K. Nierhaus u. V. Montejó, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 1931 (1973).

[60] J. P. Ballesta u. D. Vazquez, *FEBS Lett.* 48, 266 (1974).

[61] G. A. Howard u. J. Gordon, *FEBS Lett.* 48, 271 (1974).

[62] R. Monier in M. Nomura, A. Tissières u. P. Lengyel: *Ribosomes*. Cold Spring Harbor Laboratory 1974, S. 141 ff.

[63] L. Bispink u. H. Matthaei, *FEBS Lett.* 37, 291 (1973).

[64] A. S. Girshovich, E. S. Bochkareva, V. M. Kramarov u. Yu. A. Ovchinnikov, *FEBS Lett.* 45, 213 (1974).

[65] N. Sonenberg, M. Wilchek u. A. Zamir, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4332 (1975).

[66] A. Barta, E. Küchler, C. Branlant, J. Sri Widada, A. Krol u. J. P. Ebel, *FEBS Lett.* 56, 170 (1975).

[67] N. J. Turro: *Molecular Photochemistry*. Benjamin, New York 1967, S. 137 ff.

[68] H. R. Christen: *Grundlagen der organischen Chemie*. Verlag Sauerländer, Aarau, Diesterweg-Salle, Frankfurt am Main, 1970, S. 335 ff.

[69] R. E. Galardy, L. C. Craig u. M. P. Printz, *Nature New Biol.* 242, 127 (1973).

[70] A. Barta u. E. Küchler, noch unveröffentlicht.

[71] R. R. Traut, R. L. Heimark, T. T. Sun, J. W. B. Hershey u. A. Bollen in M. Nomura, A. Tissières u. P. Lengyel: *Ribosomes*. Cold Spring Harbor Laboratory 1974, S. 271 ff.

[72] C. G. Kurland in M. Nomura, A. Tissières u. P. Lengyel: *Ribosomes*. Cold Spring Harbor Laboratory 1974, S. 309 ff.

[73] M. Nomura u. W. A. Held in M. Nomura, A. Tissières u. P. Lengyel: *Ribosomes*. Cold Spring Harbor Laboratory 1974, S. 193 ff.

[74] K. H. Nierhaus u. F. Dohme, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 4713 (1974).

[75] G. W. Tischendorf, H. Zeichhardt u. G. Stöffler, *Mol. Gen. Genet.* 134, 187 (1974).

[76] G. W. Tischendorf, H. Zeichhardt u. G. Stöffler, *Mol. Gen. Genet.* 134, 209 (1974).

[77] J. A. Lake, M. Pendergast, L. Kahan u. M. Nomura, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 4688 (1974).

[78] G. W. Tischendorf, H. Zeichhardt u. G. Stöffler, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4820 (1975).

[79] O. Pongs, K. H. Nierhaus, V. A. Erdmann u. H. G. Wittmann, *FEBS Lett.* 40, S28 (1974).

[80] A. Bollen, R. J. Cedergren, D. Sankoff u. G. Lapalme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 1069 (1974).

[81] P. Leder in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*. Bd. 12B. Academic Press, New York 1968, S. 725 ff.

[82] A. P. Czernilofsky u. E. Küchler, *Biochim. Biophys. Acta* 272, 667 (1972).