

- [50] B. Ganem, V. R. Small, Jr., *J. Org. Chem.* 39 (1974) 3728.
 [51] Übersicht: T. H. Chan, I. Fleming, *Synthesis* 1979, 761.
 [52] A. Jellal, M. Santelli, *Tetrahedron Lett.* 1980, 4487.
 [53] a) C. G. Stuckwisch, *J. Org. Chem.* 37 (1972) 318; b) im Gegensatz dazu reduziert Ti^{3+} die Carbonylgruppe, wobei u. a. das intermediäre Radikal z. B. mit Aceton zu einem gemischten Pinakol kuppelt; A. Clerici, O. Porta, M. Riva, *Tetrahedron Lett.* 1981, 1043.
 [54] H. Brachwitz, K. H. Werner, DDR-Pat. 65929 (1967), VEB Berlin-Chemie: *Chem. Abstr.* 71 (1969) 123965a; vgl. [3], S. 2516.
 [55] a) F. Asinger, F. Gentz, *Angew. Chem.* 75 (1963) 577; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2 (1963) 397; b) *Monatsh. Chem.* 96 (1965) 1480.
 [56] F. Asinger, H. Offermanns, A. Saus, *Monatsh. Chem.* 100 (1969) 724.
 [57] F. Asinger, W. Schäfer, F. Haaf, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 672 (1964) 734.
 [58] M. Davis, R. Lakhan, B. Ternai, *J. Heterocycl. Chem.* 14 (1977) 317.
 [59] a) A. Kleemann, H. Klenk, W. Schwarze, DOS 2708184 und 2708185 (25. Febr. 1977), DEGUSSA; T. Schmidt, DOS 3003542 (31. Jan. 1980), Bayer AG; b) T. Schmidt, A. Wittig, H.-P. Sehnem, H. Krätzer, R.-J. Singer, DOS 3003541 (31. Jan. 1980), Bayer AG.
 [60] a) A. Kleemann, H. Klenk, H. Offermanns, P. Scherberich, W. Schwarze, DOS 2733181 (22. Juli 1977), DEGUSSA; b) G. Bonse, H. U. Blank, Eur.-Pat. 0034240 (7. Jan. 1981), Bayer AG; c) H. Klenk, W. Schwarze, W. Leuchtenberger, DOS 2733180 (22. Juli 1977), DEGUSSA; *Chem. Abstr.* 90 (1979) P 137872 p; G. Pissiotas, W. Schwarze, W. Leuchtenberger, DOS 2726016 (8. Juni 1977), CIBA-GEIGY AG, DEGUSSA; *Chem. Abstr.* 90 (1979) P 137871 n.
 [61] D. R. White, D. K. Wu, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1974, 988.
 [62] a) H. A. Staab, *Angew. Chem.* 74 (1962) 407; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1 (1962) 351. b) H. A. Staab, M. Lüking, H. Dürr, *Chem. Ber.* 95 (1962) 1275.
 [63] F. Hibbert, D. P. N. Satchell, *J. Chem. Soc. B* 1967, 653, 755.
 [64] J. M. Photis, *Tetrahedron Lett.* 1980, 3539.
 [65] a) M. Havel, J. Velek, J. Pospíšek, M. Souček, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 44 (1979) 2443; b) J. M. Photis, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 182.
 [66] a) F. Hibbert, D. P. N. Satchell, *J. Chem. Soc. B* 1968, 568; b) *ibid.* B 1968, 565.
 [67] D. S. Jones, G. W. Kerner, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc.* 1965, 4393.
 [68] E. R. Stadtmann, H. Eggerer, J. M. Paston, *Arch. Biochem. Biophys.* 98 (1962) 432.
 [69] R. M. Nowak, *J. Org. Chem.* 28 (1963) 1182.
 [70] D. H. R. Barton, R. D. Bracho, D. A. Widdowson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1973, 781.
 [71] H. Böhme, R. Neidlein, *Chem. Ber.* 95 (1962) 1859.
 [72] H. Bredereck, G. Simchen, W. Kantlehner, *Chem. Ber.* 104 (1971) 924.
 [73] R. F. Borch, S. R. Levitat, F. A. Van-Catledge, *J. Org. Chem.* 37 (1972) 726.
 [74] Vgl. z. B. K. Nützel in Houben-Weyl-Müller: *Methoden der Organischen Chemie*. 4. Aufl., Thieme, Stuttgart 1973, Bd. 13/2a, S. 297 ff.
 [75] B. Renger, H. Hügel, W. Wykypiel, D. Seebach, *Chem. Ber.* 111 (1978) 2630.
 [76] A. S. Howard, C. A. Meerholz, J. P. Michael, *Tetrahedron Lett.* 1979, 1339.
 [77] a) G. B. Backmann, T. Hokama, *J. Am. Chem. Soc.* 81 (1959) 4882; b) vgl. hierzu auch Y. Hamada, K. Ando, T. Shioiri, *Chem. Pharm. Bull.* 29 (1981) 259.
 [78] A. Dornow, H. Grabhöfer, *Chem. Ber.* 91 (1958) 1824.
 [79] A. Oku, J. Inoue, H. Ueda, F. Mashio, *Bull. Soc. Chem. Jpn.* 50 (1977) 549.
 [80] a) O. Achmatowicz, O. Achmatowicz, Jr., *Rocz. Chem.* 35 (1961) 813; b) D. Bose, R. Neunteufel, DOS 2806634 (16. Febr. 1978), Hoechst AG; *Chem. Abstr.* 92 (1980) P 41607 w.
 [81] B. E. Tate, P. D. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 5575.
 [82] a) O. Diels, A. Pillow, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 41 (1908) 1893; b) D. Westwood, R. K. Smalley, *Chem. Ind. (London)* 1970, 1408.
 [83] T.-L. Ho, *Synth. Commun.* 4 (1974) 351.
 [84] K. Findeisen, K.-H. Linker, Eur.-Pat. 0005484 B1 (4. Mai 1979), Bayer AG; *Chem. Abstr.* 92 (1980) P94089 x.

Das bakterielle Ribosom: ein programmierbares Enzym

Von Hans Günter Gassen*

Die Ribosomen-abhängige Proteinbiosynthese in Bakterien ist ein komplexer Vorgang, an dem über 150 Komponenten beteiligt sind. Das Ribosom, das aus 53 Proteinen und drei Nucleinsäuren aufgebaut ist, katalysiert als Enzym die Bildung der Peptidbindung. Anders jedoch als konventionelle Enzyme ist das Ribosom durch die mRNA – das Transkript der DNA – „programmierbar“. Es entziffert die Nucleotidsequenz der mRNA und setzt sie in die Aminosäuresequenz eines Proteins um. Ähnlich wie bei der Muskelkontraktion wird hierbei chemische Bindungsenergie benutzt, um eine mechanische Bewegung zu ermöglichen. Das hier vorgestellte Modell der Proteinbiosynthese an programmierbaren Ribosomen gibt Antworten auf folgende Fragen: Wie wird die mRNA in Informationseinheiten gerastert, wie wird die Substratspezifität des Ribosoms durch das Codon moduliert und wie bewegt sich die mRNA am Ribosom um ein Trinucleotid pro gebildete Peptidbindung vorwärts?

1. Einleitung**

Proteine, deren Aminosäuresequenz in der Desoxyribonucleinsäure (DNA) codiert ist, werden in allen Zellen an cytoplasmatischen Partikeln, den Ribosomen, synthetisiert; dazu wird zuerst die DNA in eine einzelsträngige Ribonucleinsäure (RNA), die Boten-RNA oder mRNA, ko-

piert. Die mRNA ist das Programm, das von den Ribosomen entziffert und in die Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt wird. Je drei Nucleotide bilden die Informationseinheit – das Codon – für eine Aminosäure, wobei für alle Lebewesen ein nahezu universeller genetischer Code gilt^[1].

Ribosomen, komplexe Strukturen mit einem Molekulargewicht (MG) von ca. $2.8 \cdot 10^6$, setzen sich aus drei Ribonucleinsäuren (rRNAs) und 53 diskreten Proteinen zusammen; Ribosomen haben die Funktion eines Enzyms, das eine einfache chemische Reaktion, die Umwandlung einer Ester- in eine Peptidbindung, katalysiert. Andere zelluläre Peptid-Synthetasen, z. B. das Alanin-addierende Enzym der Mureinsynthese, haben nur ein MG von ca. 50000, können aber ähnliche Reaktionen wie das Ribosom kataly-

[*] Prof. Dr. H. G. Gassen
 Institut für Organische Chemie und Biochemie
 der Technischen Hochschule
 Petersenstraße 22, D-6100 Darmstadt

[**] Abkürzungen: GMPPCP = Guanosin-5'-(β , γ -methyl)-triphosphat (die „Triphosphateneinheit“ ist zwischen P^{α} und P^{β} durch eine CH_2 -Gruppe verbrückt), AcPhe-tRNA = N⁶-Acetyl-phenylalanyl-tRNA, GTPase = eine mit der 50S-Untereinheit assoziierte Phosphatase, die GTP zu GDP + P_i hydrolysiert (EC 3.6.1.), N = nicht definiertes Nucleotid.

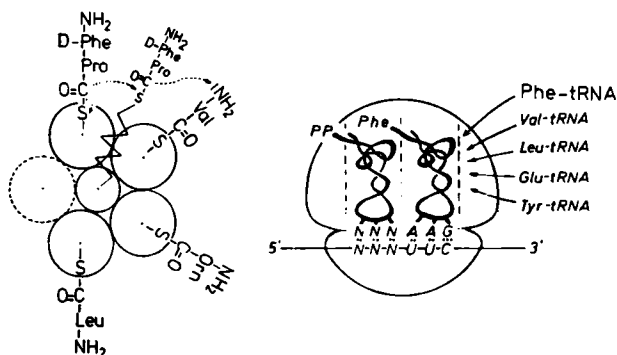


Fig. 1. Gegenüberstellung eines Multienzymsystems mit Substratspezifität und des Ribosoms als programmierbares Enzym. Links: Multienzymsystem zur Synthese von Peptidantibiotica [2]; um die Funktion des Pantetheinarms leichter verständlich zu machen, wurde der Multienzymkomplex in Analogie zur Fettsäure-Synthetase gezeichnet. Rechts: Modell des Ribosoms, bei dem die Substratspezifität bei konstanter Bindestelle durch das Codon festgelegt wird.

sieren. Zum Aufbau eines nicht mRNA-codierten Peptids ist jedoch ein Multienzymsystem nötig, in dem jede Untereinheit auf den Einbau einer oder mehrerer bestimmter Aminosäuren spezialisiert ist^[2]. Bei der ribosomalen Proteinbiosynthese liegt dagegen ein mechanistisch völlig anderes Prinzip vor. Das aktive Zentrum des Ribosoms wird in seiner Substratspezifität durch ein Codon so programmiert, daß es mit großer Genauigkeit zwischen 20 Aminosäuren, die als Aminoacyl-tRNA vorliegen, auswählen kann (Fig. 1).

Nimmt man an, Ribosomen seien programmierbar, so ergeben sich folgende Probleme:

- 1) Wie wird das Startcodon erkannt und die Nucleotidsequenz der mRNA zu Trinucleotiden gerastert?
- 2) Wie moduliert das Codon die Substratspezifität der Aminoacyl-tRNA-Bindestelle des Ribosoms?

- 3) Wie wird die mRNA als „Informationsband“ um jeweils ein Trinucleotid pro gebildete Peptidbindung verschoben?

Nach einer skizzenhaften Beschreibung des Ablaufs der Ribosomen-abhängigen Proteinbiosynthese und der Struktur der Komponenten soll detailliert dargelegt werden, welchen mechanistischen Prinzipien das Ribosom als programmierbares Enzym gehorcht.

2. Überblick über die Ribosomen-abhängige Proteinbiosynthese

Wie jede andere chemische oder biologische Polymer-synthese läßt sich die Biosynthese der Proteine in Kettenstart (Initiation), Kettenverlängerung (Elongation) und Kettenabbruch (Termination) gliedern. Jeder der Teilschritte zeichnet sich durch Besonderheiten sowohl bei den benötigten Komponenten als auch im Mechanismus aus.

In der Initiation wird die mRNA durch Festlegung des Startcodons AUG oder GUG zu Dreiereinheiten (Codons) gerastert. Für das Suchen des Anfangscodons auf der mRNA existieren eine Initiations-tRNA ($fMet-tRNA^{Met}$), drei Initiationsfaktoren (IF-1, IF-2 und IF-3) als Kontrollproteine und die kleine ribosomale Untereinheit, die nach ihrer Svedberg-Konstante als 30S-Untereinheit bezeichnet wird.

Über Zwischenstufen, die in Figur 2 gezeigt sind, bildet sich zuerst der sogenannte 30S-Initiationskomplex $30S \cdot mRNA \cdot (fMet-tRNA^{Met} \cdot IF-2 \cdot GTP) \cdot IF-1 \cdot IF-3$; damit ist der Anfang eines Cistrons oder Gens erkannt. Durch die nicht-ribosomale Formylierung der α -Aminogruppe der Initiations-tRNA wurde bereits eine „quasi“-Peptidbindung geschaffen, und die Syntheserichtung des

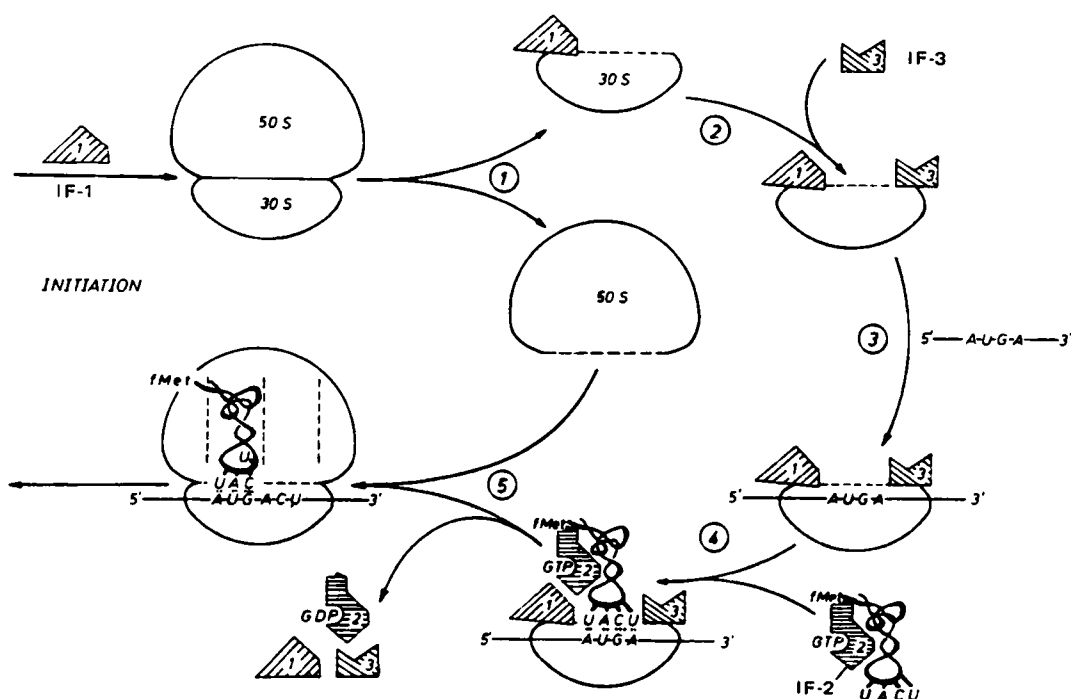


Fig. 2. Bildung des Initiationskomplexes bei der Proteinbiosynthese. ① Dissoziation des 70S-Ribosoms in seine Untereinheiten; ② Stabilisierung der 30S-Untereinheit durch die Initiationsfaktoren; ③ Bindung der mRNA an die kleine Untereinheit; ④ Bildung des 30S-Initiationskomplexes; ⑤ Abspaltung der Initiationsfaktoren und Bildung des 70S-Initiationskomplexes. Auf die Bildung des 70S-Komplexes aus dem 30S-Komplex wird detailliert in den Abschnitten 4.1 und 4.2 eingegangen.

Proteins, N- nach C-terminal, ist festgelegt. Die Formylmethionylgruppe dient dabei in Analogie zur chemischen Peptidsynthese nur als Schutzgruppe, da der Formylrest und das Methionin von dem Translationsprodukt wieder abgespalten werden.

Im nächsten Schritt wird die 50S-Untereinheit an den 30S-Initiationskomplex angelagert. Unter Energieverbrauch (Hydrolyse von GTP) und Freisetzung der Initiationsfaktoren IF-2·GDP sowie IF-1 und IF-3 bildet sich der 70S-Initiationskomplex 70S·mRNA·fMet-tRNA^{Met}. Durch die Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten entsteht die Bindestelle für die Aminoacyl-tRNA (A-Stelle). Die fMet-tRNA^{Met} besetzt im 70S-Ribosom die Peptidyl-tRNA-Bindestelle (P-Stelle). Erst im 70S-Initiationskomplex ist die Rasterung der mRNA abgeschlossen^[3-5].

Im Elongationscyclus wird eine Aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) mit ihrem Carrierprotein, dem Elongationsfaktor EF-Tu·GTP, als ternärer Komplex AA-tRNA·EF-Tu·GTP an die A-Stelle des Ribosoms gebunden. Die Spezifität der A-Stelle für nur eine AA-tRNA wird durch das Elongationscodon festgelegt, während das Carrierprotein zwischen freier tRNA und Aminoacyl-tRNA diskriminiert. Beide tRNAs sind damit so auf dem Ribosom positioniert, daß die α-Aminogruppe der AA-tRNA die Esterbindung der benachbarten fMet-tRNA^{Met} nucleophil angreifen kann (Fig. 3).

Die Peptidbindung läßt sich jedoch erst knüpfen, wenn der Elongationsfaktor als EF-Tu·GDP das Ribosom verlassen hat; dieser Schritt wird durch die Peptidyl-Transferase, einen integralen Bestandteil der 50S-Untereinheit, katalysiert. Nach dem Peptidtransfer befindet sich eine des-

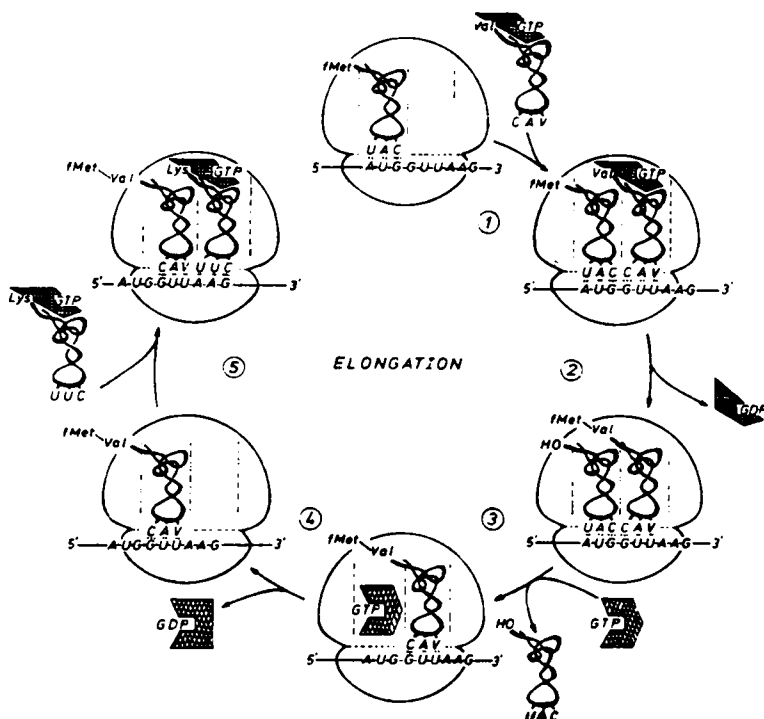


Fig. 3. Elongationscyclus bei der Proteinbiosynthese. ① Bindung des ternären Komplexes AA-tRNA·EF-Tu·GTP an die A-Stelle im direkten Kontakt zur Peptidyl-tRNA; ② Entfernen des ersten Elongationsfaktors EF-Tu·GDP und gleichzeitige Übertragung der Peptidyl-Gruppe (fMet-) auf die AA-tRNA; ③ Austausch der desacylierten tRNA gegen den zweiten Elongationsfaktor EF-G·GTP; ④ Freisetzung von EF-G·GDP mit simultaner Translokation des Komplexes mRNA·PP-tRNA; ⑤ erneutes Binden einer AA-tRNA an die A-Stelle des Ribosoms (V = modifiziertes Uridin).

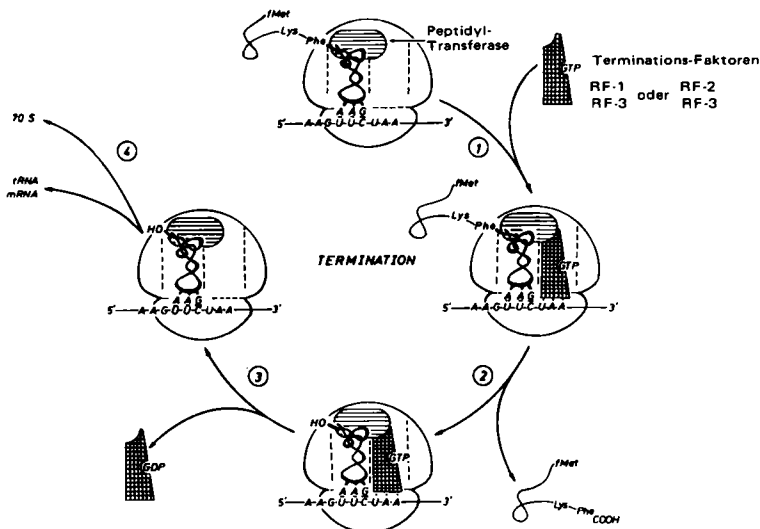


Fig. 4. Termination bei der Proteinbiosynthese. ① Die Terminationsfaktoren (Releasefaktoren) werden an die A-Stelle gebunden, wobei einer der Faktoren GTP benötigt. Die Faktoren sind nicht einzeln aufgeführt, da ihre genaue Funktion noch nicht geklärt ist; ② Hydrolytische Freisetzung des Peptids, wobei Releasefaktoren und Peptidyl-Transferase in der Aktivierung eines Wassermoleküls kooperieren; ③ Abspaltung der Releasefaktoren unter GTP-Hydrolyse; ④ Freisetzung der beteiligten Komponenten.

acylierte tRNA an der P-Stelle und eine Peptidyl-tRNA (PP-tRNA) an der A-Stelle. Der nächste Schritt ist die Translokation: Die desacylierte tRNA wird, katalysiert durch den zweiten Elongationsfaktor EF-G·GTP, von der P-Stelle abgespalten, der PP-tRNA·mRNA-Komplex gleitet von der A-Stelle zur P-Stelle und ein neuer ternärer Komplex AA-tRNA·EF-Tu·GTP heftet sich an die A-Stelle. Dieser Vorgang läuft einmal für jede eingebaute Aminosäure ab und wird erst beendet, wenn ein Terminationscodon an die A-Stelle gebunden wird^[6-8].

Für die Terminationscodons UAA, UGA und UAG existieren keine Terminations-tRNAs, sondern ein oder auch zwei Terminationscodons in Reihe werden von Proteinen erkannt, den Terminationsfaktoren oder „Releasefaktoren“ RF-1, RF-2 und RF-3. Diese Faktoren aktivieren in Kooperation mit der Peptidyl-Transferase ein Wassermolekül, das die Bindung hydrolysiert, mit der das fertige Peptid an der tRNA (an der P-Stelle) hängt (Fig. 4). Danach spalten die Initiationsfaktoren IF-1 und IF-3 die 70S-Ribosomen, und die 30S-Untereinheiten können einen neuen Initiationskomplex bilden^[9, 10].

3. Struktur und Funktion der beteiligten Komponenten

3.1. Ribosomen

Ribosomen enthalten die Bindestellen für die mRNA, für die in Abschnitt 2 erwähnten Faktoren und für tRNAs, schaffen die für die Reaktionsabläufe nötige Mikroumgebung, stimulieren die enzymatischen Aktivitäten der Faktoren und sind selbst katalytisch aktiv (Fig. 5)^[11].

Bakterielle 70S-Ribosomen sind Protein-Nucleinsäure-Komplexe mit einem MG von ca. $2.8 \cdot 10^6$. Nach der mRNA-Ablesung dissoziieren die Ribosomen in die 30S- und 50S-Untereinheit; in vitro findet die Dissoziation bei $[Mg^{2+}] < 5$ mM statt. Die 50S-Untereinheit (MG $1.8 \cdot 10^6$) enthält 32 Proteine im Molekulargewichtsbereich von

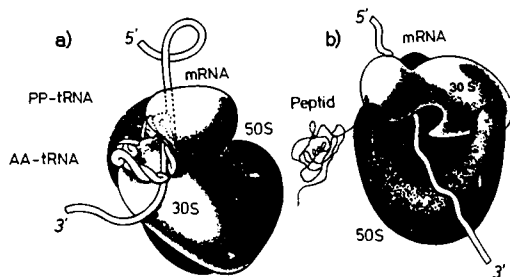


Fig. 5. Schematische Darstellung der Bindung der tRNA und der mRNA an Ribosomen. Die ungefähren Größenverhältnisse zwischen Ribosom und beiden tRNAs lassen sich in a) erkennen. Während die Bindestelle für die AA-tRNA, um die Selektion der korrekten AA-tRNA zu erleichtern, sehr gut zugänglich sein sollte, könnte die P-Stelle im Inneren der beiden Untereinheiten liegen (A-Stelle als „Eingang“). In b) ist gezeigt, wie die mRNA durch die beiden Untereinheiten geführt wird. Zur Erklärung der unterschiedlichen Ribosomenstrukturen siehe Fig. 6.

8000–34000, die mit L1–L32 (L = large) bezeichnet werden. Mit Ausnahme der Proteine L7 und L12, die sich nur durch die Acetylierung des N-terminalen Endes unterscheiden, zeigen die Proteine keine Sequenzhomologien^[12]. Die beiden Nucleinsäuren der 50S-Untereinheit, die 23S-RNA und die 5S-RNA, bestehen aus 2904 bzw. 120 Nucleotiden^[13]. Die 30S-Untereinheit enthält 21 verschiedene Proteine (S1–S21, S = small, MG 8000–64000), wobei das Protein S6 in zwei Kopien vorkommt, und die 16S-RNA mit 1541 Nucleotiden^[14, 15].

Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen läßt sich Größe und Gestalt der Ribosomen abschätzen; sie sind kugelige Gebilde mit einem Durchmesser von ca. 20 nm. Die Auswertung und Interpretation der Bilder hat zu den in Figur 6 dargestellten Modellen der 70S-Ribosomen sowie der beiden Untereinheiten geführt^[16–18]. Die Lage einzelner Proteine auf der Ribosomenoberfläche wurde vor allem mit der Immun-Elektronenmikroskopie bestimmt^[19, 20]. Mit Ausnahme von S4 – hier liegen widersprüchliche Ergebnisse vor – haben alle Proteine eine oder mehrere Determinanten auf der Oberfläche des Ribosoms^[21]. Wie durch Röntgen-Kleinwinkelstreuung gefunden wurde, sind die Nucleinsäuren das Kernstück der Untereinheiten, um das sich die Proteine in teils kugelig und teils ellipsoider Form gruppieren^[22]. Mit chemischen Methoden, wie Nucleotid-spezifischen Reagentien oder der Affinitätsmarkierung, läßt sich zeigen, daß sich auch Segmente der ribosomalen RNAs an der Oberfläche befinden und an der Bindung der Substrate mitwirken^[23]; diese Segmente verursachen das polyanionische Verhalten von Ribosomen.

Die ribosomalen Proteine sind mit den Nucleinsäuren ausschließlich durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen assoziiert; kovalente Bindungen konnten in keinem Fall nachgewiesen werden. Durch Erhöhung



Fig. 6. Räumliche Struktur der 70S-Ribosomen und der Untereinheiten. Die Bilder wurden aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen abgeleitet. Schraffiert: die 30S-Untereinheit. Die drei Modelle spiegeln die Interpretationsbreite elektronenmikroskopischer Aufnahmen wider [16–18].

der Ionenstärken und durch Verringerung der Mg^{2+} -Konzentration gelingt es, stufenweise Proteine von den ribosomalen Untereinheiten abzulösen. Aus den isolierten und gereinigten Proteinen sowie den Nucleinsäuren können wieder funktionelle Ribosomen rekonstituiert werden^[24, 25].

Zur Lokalisierung ribosomaler Funktionszentren wurden die Immun-Elektronenmikroskopie, die Affinitätsmarkierung (affinity labeling) und die Quervernetzung (cross linking) verwendet. Auf diese Weise wurden der ungefähre Ort der A- und P-Stelle und der Peptidyl-Transferase und außerdem die Bindestellen für die mRNA sowie für viele Antibiotica lokalisiert (Tabelle 1)^[26].

Tabelle 1. Lokalisierung ribosomaler Bindestellen durch Affinitätsmarkierung. Die Substrate – tRNA, Antibiotica, etc. – werden durch chemisch aktive (Alkylierungsreagentien) oder photochemisch aktive (aromatische Azide) Gruppen funktionalisiert [23]. Die modifizierten Proteine kann man auch durch zweidimensionale Gelelektrophorese und durch Immun-Präzipitation identifizieren. Eine genaue Lokalisierung der modifizierten RNA-Bereiche war bisher nicht möglich.

| Komponente | modifiziertes Protein und rRNA |
|-------------------------|--------------------------------|
| Puromycin [a] | L23 |
| Chloramphenicol [a] | L2, L16, L27 |
| tRNA ^{Met} | L2, L27, 23S-RNA |
| Phe-tRNA ^{Phe} | L2, L18, L27, S18, 23S-RNA |
| mRNA und Analoga | S1, S3, S4, S12, S18, 16S-RNA |
| GTPase-Zentrum | L2, L16, L27 |

[a] Beide Antibiotica binden an das Peptidyl-Transferase-Zentrum.

Der 30S-mRNA-Komplex bindet ebenso wie die freie 50S-Untereinheit eine tRNA. An programmierte 70S-Ribosomen jedoch lagern sich zwei tRNA- oder AA-tRNA-Moleküle an; bei erhöhter Mg^{2+} -Konzentration wird dies auch ohne mRNA erreicht. Zwei Faktoren bedingen die Diskriminierung zwischen A-Stelle und P-Stelle. Die Peptidylgruppe dirigiert die PP-tRNA in die P-Stelle und das Carrierprotein EF-Tu·GTP die AA-tRNA in die A-Stelle^[27] (Fig. 7). Ebenfalls nur ein Molekül der Initiations-tRNA bindet Codon-abhängig an 70S-Ribosomen; hier wird bereits über die Tertiärstruktur der freien tRNA zwischen A- und P-Stelle unterschieden^[27].

Schon lange wird diskutiert, ob das Ribosom ein Multi-enzymkomplex ist, oder ob es einzig und allein als Peptidyl-Transferase wirkt. Bei der Peptidyl-Transferase handelt es sich nicht um ein bestimmtes ribosomales Protein, sondern mehrere 50S-Proteine ebenso wie Bereiche beider Nucleinsäuren bilden zusammen das sogenannte Peptidyl-Transferase-Zentrum^[28]. Es ist bisher ungeklärt, ob die Nucleinsäuren nur die Konformation der Proteine bestimmen oder ob sie aktiv an der Katalyse teilnehmen.

Als weitere ribosomale Enzyme kommen die GTPasen in Betracht, die IF-2·GTP, EF-Tu·GTP und EF-G·GTP zum jeweiligen Faktor·GDP-Komplex hydrolysieren. Es ist aber immer noch umstritten, ob die GTPasen ein Bestandteil des Ribosoms sind, oder ob die Faktoren IF-2, EF-Tu und EF-G eine GTPasen-Kryptoaktivität haben, die durch Bindung dieser Proteine an Ribosomen apparent wird. So ist z. B. für den Elongationsfaktor EF-Tu nachgewiesen, daß er in Gegenwart des Antibiotiums Kyrromycin eine GTPase-Aktivität aufweist, die sonst nur im ribosomalen EF-Tu·GTP-Komplex zu finden ist^[29, 30].

Für das Ribosom werden – wie auch für Multienzymkomplexe – zwei Strukturkonzepte diskutiert: Das Ribo-

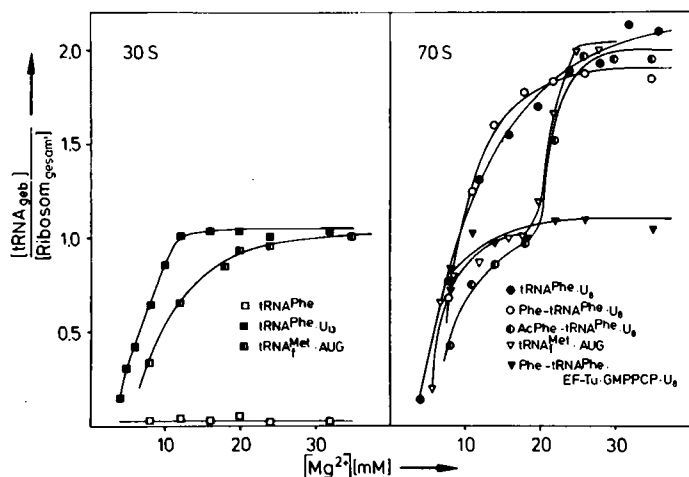


Fig. 7. Bindung von tRNA an Ribosomen. Die Bindung von AA-tRNA, PP-tRNA und tRNA an 30S- und 70S-Ribosomen wurde mit der analytischen Ultrazentrifugation untersucht [88]. Die Konzentration an freier tRNA kann man durch die Auswertung der Grenzfläche der tRNA aus dem Sedimentationsprofil berechnen. 30S-Ribosomen binden in Gegenwart eines Oligonucleotids nur je ein tRNA-Molekül, während ohne mRNA keine tRNA gebunden wird. An 70S-Ribosomen binden bei $[Mg^{2+}] > 20$ mM zwei Moleküle tRNA^{Phe} oder Phe-tRNA; mit AcPhe-tRNA als Modellverbindung für eine PP-tRNA und mit tRNA^{Met} findet man eine Präferenz für eine Bindestelle; bei $[Mg^{2+}] \approx 15$ mM wird jeweils ein Molekül einer der beiden Nucleinsäuren, vermutlich an der P-Stelle, gebunden. Auch von dem ternären Komplex Phe-tRNA-EF-Tu-GMPPCP wird nur ein Molekül pro Ribosom gebunden. GTP wird in diesem Experiment durch GMPPCP ersetzt, um eine Hydrolyse des Triphosphats durch die GTPase des Ribosoms zu verhindern. U_x ist ein nur aus Uridylsäuren bestehendes Octanucleotid.

som als starrer Korpuskel und damit Träger für die Peptidsynthese, oder als eine strukturdynamische Einheit, die durch Ligand-induzierte Strukturänderungen Einzelschritte der Peptidsynthese beschleunigt. Neuere Ergebnisse wie die Mg^{2+} -abhängige Aktivierung der 30S-Untereinheit oder die unterschiedliche ¹²⁵Iod-Markierung ribosomaler Proteine in verschiedenen Funktionszuständen des Ribosoms weisen auf eine strukturelle Dynamik hin^[31,32].

3.2. Transfer-Ribonucleinsäuren

Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNAs) sind das Bindeglied zwischen den die genetische Information tragenden mRNAs und den biochemisch aktiven Proteinen. Auch strukturell sind sie zwischen Proteinen und Nucleinsäuren angesiedelt, da sie bis zu 20 modifizierte Nucleoside enthalten und eine sehr komplexe Tertiärstruktur aufweisen^[33-35]. Bei der Proteinbiosynthese sind vier Arten von tRNAs beteiligt: Initiations-tRNA, Aminoacyl(AA)-tRNA, Peptidyl(PP)-tRNA und desacylierte tRNA. Die beiden ersten liegen an Carrierproteine gebunden vor, während die PP-tRNA nur Ribosomen-assoziiert existiert. Ihre Bildung wird durch die Peptidyl-Transferase katalysiert, und sie ist das Substrat der Translokation. Die desacylierte tRNA schließlich ist das Substrat für den zweiten Elongationsfaktor G, der die tRNA von der P-Stelle entfernt.

Von etwa 120-150 tRNAs sind die Sequenzen bekannt, und mit Ausnahme einiger tRNAs aus Mitochondrien weisen sie die „Kleeblatt-Sekundärstruktur“ auf^[36]. Die Tertiärstruktur der Phenylalanin-spezifischen tRNA aus Hefe und der Initiations-tRNA aus *E. coli*^[37-39] im Kristall sind durch Röntgen-Strukturanalyse bestimmt worden. Die

tRNA bildet ein L-förmiges Molekül, das aus zwei rechtwinklig zueinander stehenden Helices gebildet wird (Fig. 8). Die lange Helix endet in der einzelsträngigen Anticodonschleife, die kurze Helix in dem ungepaarten 3'-Terminus CCA. Die verbleibenden Bereiche der beiden Helices bilden als Dihydrouridinschleife und TΨCG-Schleife (Ψ steht für Pseudouridin) eine komplexe Tertiärstruktur; es wird vermutet, daß die tRNA sich damit an die Ribosomen heftet^[40]. Ist die tRNA an Ribosomen gebunden, so ergänzt die mRNA durch eine Doppelstrangbildung mit dem Anticodon die große Helix, während das Carrierprotein EF-Tu-GTP das einzelsträngige CCA-Ende ausrichtet^[41,42]. Da die Kristallstruktur nur eine mögliche Konformation der tRNA repräsentiert, wurde die Struktur der tRNA in Lösung mit chemischen und physikalischen Methoden untersucht^[43]. Dabei wurden vor allem die ¹H- und ³¹P-NMR- sowie die ESR-Spektroskopie und die Fluoreszenzspektroskopie mit Erfolg angewendet. Bisher bestätigen die Ergebnisse dieser Experimente die aus der Röntgen-Strukturanalyse abgeleitete Struktur der tRNA auch für den gelösten Zustand.

Die Konformation der tRNA in Lösung ist nicht statisch, sie ändert sich vielmehr Ligand-induziert^[44]. Als Liganden fungieren die Aminoacyl- und Peptidylgruppe, der Elongationsfaktor EF-Tu-GTP, das Codon der mRNA, sowie Mg^{2+} -Ionen^[45]. So wirkt sich z. B. die Doppelstrangbildung zwischen Codon und Anticodon nicht nur auf die Konformation der Anticodonschleife aus, sondern sie beeinflusst auch die Ausrichtung der etwa 5 nm entfernten TΨCG-Schleife^[46,47]. Ein zu dieser Region komplementäres Oligonucleotid CGAA bindet nur an den Codon-tRNA-Komplex, aber nicht an die freie tRNA. Auch die Modifikation der Guaninbasen in Lysin-tRNA durch Kethoxal^[7] wird durch das Codon beeinflusst^[48]. Auf die

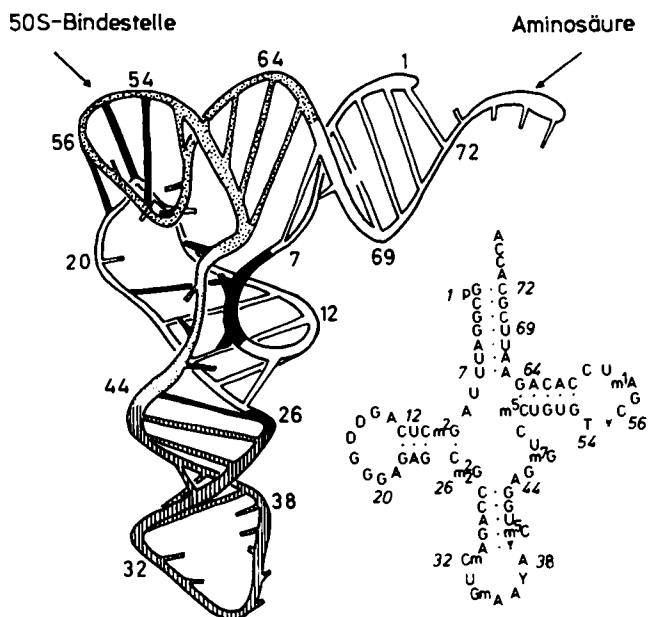


Fig. 8. Kleeblattstruktur und Raumstruktur der Phenylalanin-tRNA aus Hefe. Rechts: Sequenz mit den modifizierten Nucleosiden, angeordnet in der Kleeblattstruktur. Links: Dreidimensionale Struktur nach Quigley et al. [38]. Die Numerierung entlang der Sequenz soll die Zuordnung der Sekundär- zur Tertiärstruktur erleichtern.

[*] Kethoxal ist β -Ethoxy- α -oxo-butylaldehyd.

Funktion des Codons als Modulator, der allosterisch die tRNA-Konformation beeinflusst, wird in Abschnitt 5.1 ausführlich eingegangen.

Die Aminosäure wird erst mit ATP in ein Aminoacyl-adenylat umgewandelt, das dann entweder über die 2'- oder die 3'-Hydroxygruppe des 3'-terminalen Adenosins der tRNA verestert wird. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine Gruppe von Enzymen, die Aminoacyl-Synthetasen^[49]. Die Esterbindung der Aminoacyl-tRNA ist in der freien AA-tRNA nicht hydrolysestabil. Deshalb wird die AA-tRNA im Cytoplasma sofort an ihr Carrierprotein, den Elongationsfaktor EF-Tu·GTP, gebunden. Der ternäre Komplex ist das Substrat für die Aminoacylstelle des Ribosoms. Da nur AA-tRNA mit dem Protein einen Komplex bildet, verhindert der Elongationsfaktor, daß nicht-acylierte tRNA an das Ribosom gebunden wird^[50]. Somit muß die tRNA als kompliziert gebauter Transportmetabolit (Coenzym) für Aminosäurereste gesehen werden, der nur vergesellschaftet mit einem Protein eine metabolische Funktion übernehmen kann.

3.3. Die mRNA – das Programm für die Proteinbiosynthese

In Bakterien ist die Synthese der mRNA wie ihre Translation durch Ribosomen eine „konzertierte Aktion“: Schon in statu nascendi besetzen die Ribosomen die mRNA und beginnen die Synthese der Proteine. Dabei lagern sich viele Ribosomen zugleich an einen mRNA-Strang. Diese Polysomen-Bildung erhöht die Effektivität der Ablesung und schützt die mRNA vor Abbau durch Nucleasen. Prokaryontische mRNAs sind polycistronisch, d. h. die Information zur Synthese mehrerer Proteine ist auf einem mRNA-Strang lokalisiert. Die mRNA ist unterteilt in die Präcistronsequenz, das Strukturgene, die Intercistronsequenz, das zweite oder weitere Strukturgene und die 3'-terminale Sequenz. Ein Strukturgene untergliedert sich in das Startcodon AUG oder GUG, die Elongationscodons, deren Zuordnung zu Aminosäuren durch den genetischen Code festgelegt ist, und die Terminationscodons UAA, UGA und UAG (Fig. 9).

Die Bindung der mRNA an die 30S-Untereinheit wie auch an 70S-Ribosomen ist abhängig von Mg^{2+} ^[51]. Während für die Stabilität des 30S-mRNA-Komplexes die Nucleotidsequenz mitentscheidend ist, regulieren im 70S-Elongationskomplex Zahl und Typ der tRNAs die Affinität der mRNA zum Ribosom. Über die molekularen Details der Wechselwirkung zwischen Ribosom und der mRNA ist wenig bekannt. Da Ribosomen und die mRNA Polyanionen sind, können die Mg^{2+} -Ionen als Chelatbild-

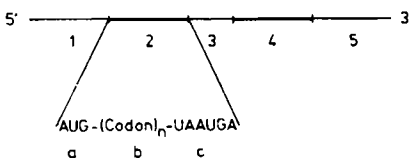


Fig. 9. Schematische Darstellung einer polycistronischen mRNA mit zwei Cistronen. Die codierenden Bereiche, die Cistrone, sind verstärkt gezeichnet; das erste Cistron (Gen) ist in a) Startcodon, b) Elongationscodons und c) zwei Terminationscodons untergliedert. 1) Präcistronsequenz; 2) erstes Cistron (Gen); 3) Intercistronsequenz; 4) zweites Cistron; 5) 3'-terminale Sequenz.

ner zwischen den Phosphodiestergruppen der rRNA und der mRNA wirken. An dieser Chelatbildung können aber auch die Carboxylatgruppen der ribosomalen Proteine beteiligt sein^[52].

3.4. Die Faktoren: Proteine als Enzyme, als Carrier und als Modulatoren der tRNA-Konformation

Eine Reihe von Proteinen, die einzelne Reaktionen innerhalb der Proteinbiosynthese katalysieren, ist nur in bestimmten Phasen der Translation mit Ribosomen assoziiert. Nach ihrer Funktion werden sie unterteilt in Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren. Der Begriff Faktor bringt die Unsicherheit über die detaillierte Funktion dieser Proteine zum Ausdruck, z. B. ob man ihnen eine enzymatische Funktion zuordnen kann, ob sie als reine Carrierproteine fungieren, oder ob sie als Modulatoren der Nucleinsäurekonformation wirken. Die physikalischen und biochemischen Eigenschaften dieser Faktoren sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Im folgenden befassen wir uns vor allem mit dem Initiationsfaktor 2 und den beiden Elongationsfaktoren Tu und G. IF-2·GTP und EF-Tu·GTP fungieren als Carrierproteine für die AA-tRNAs, während EF-G·GTP als „tRNA-release-Protein“ dient.

Weiterhin katalysieren die Faktoren die Hydrolyse von GTP zu GDP, d. h. den Prozeß, der die für die Proteinsynthese notwendige Energie liefert. Der Komplex Faktor·GTP repräsentiert jeweils die für die tRNA oder das Ribosom hochaffine Form des Proteins. Nach der Assoziation der Komplexe fMet-tRNA·IF-2·GTP, AA-tRNA·EF-Tu·GTP und EF-G·GTP an Ribosomen wird GTP zu GDP hydrolysiert, und der Faktor wird als Protein·GDP-Komplex vom Ribosom abgespalten. Der jeweilige Komplex Faktor·GTP wird entweder passiv – durch Vorhandensein eines GTP-Überschusses – oder katalysiert – etwa durch ein weiteres Protein – regeneriert. Als Beispiel ist in Figur 10 die Carrierfunktion von EF-Tu, die Rolle von GTP als Energielieferant wie auch die Regeneration des EF-Tu·GTP-Komplexes gezeigt^[53]. IF-2·GTP und EF-Tu·GTP modulieren die Konformation der zugehörigen tRNA. Auf die Funktion des Initiationsfaktors IF-2 für die

Tabelle 2. Übersicht über die „Faktoren“ der Proteinbiosynthese.

| Faktoren | MG und Cofaktor | prinzipielle Funktion |
|--------------------|-----------------------------|--|
| Initiation | | |
| IF-1 | 9000 | katalysiert 70S-Dissoziation, stimuliert die IF-2- und IF-3-Funktionen |
| IF-2 | 115000, GTP | Carrierprotein für fMet-tRNA |
| IF-3 | 21000 | mRNA-Bindung, 70S-Dissoziation |
| Elongation | | |
| EF-Tu [a] | 44000, GTP | Carrierprotein für AA-tRNA |
| EF-Ts [a] | 30000 | regeneriert EF-Tu·GTP |
| EF-G [a] | 80000, GTP (nicht gebunden) | Translokationsfaktor, „tRNA-release-Protein“ |
| Termination | | |
| RF-1 | 44000 | Termination mit UAA, UAG |
| RF-2 | 47000 | Termination mit UAA, UGA |
| RF-3 | 46000, GTP | stimuliert RF-1 und RF-2, keine Codon-Abhängigkeit |

[a] Die Abkürzungen Tu, Ts und G stehen für „temperature unstable“, „temperature stable“ und „GTP-spaltend“.

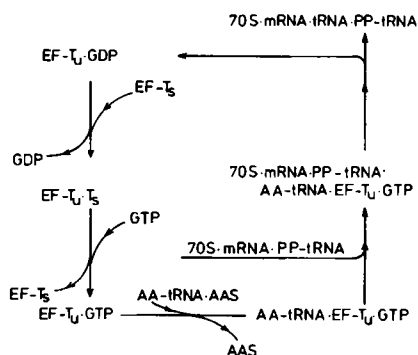


Fig. 10. Regeneration des Elongationsfaktors EF-Tu·GTP. Das Schema ist von unten links im Gegenzeigersinn zu lesen. Der Elongationsfaktor übernimmt in seiner Carrier-aktiven Form, d. h. als GTP-Komplex, die aminoacylierte tRNA von der Aminoacyl-Synthetase (AAS). Nach der Positionierung der AA-tRNA an der A-Stelle des Ribosoms wird der Faktor als EF-Tu·GDP abgespalten. Da GDP eine zehnfach höhere Assoziationskonstante ($2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) aufweist als GTP, wird das Diphosphat durch Austausch mit dem Elongationsfaktor Ts entfernt, und es entsteht der Tu·Ts-Komplex. Erst aus diesem Dimer kann der aktive Elongationsfaktor EF-Tu·GTP regeneriert werden.

Ausrichtung des Anticodons der fMet-tRNA wird im Abschnitt 4.1 detailliert eingegangen.

3.5. Funktion von Mg^{2+} -Ionen in der Proteinbiosynthese

In zellfreien Systemen verläuft die mRNA-abhängige Proteinsynthese bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 12–14 mM optimal (Fig. 11). In vivo wird die optimale Mg^{2+} -Konzentration auf 5 mM geschätzt^[54,55]. Die Optimumskurve läßt sich in zwei Bereiche untergliedern: die Mg^{2+} -abhängige Assoziation des ternären Komplexes AA-tRNA·EF-Tu·GTP und die Inhibierung der tRNA-Freisetzung aus der Peptidylstelle durch zu hohe Mg^{2+} -Konzentrationen.

Die Bindung der AA-tRNA erreicht bei $[\text{Mg}^{2+}] > 20 \text{ mM}$ einen Plateau-Wert; sie wird jedoch unabhängig von der mRNA, d. h. die Programmierbarkeit der A-Stelle geht verloren.

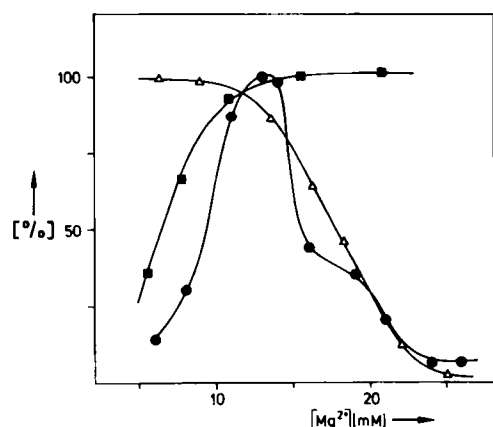


Fig. 11. Mg^{2+} -Abhängigkeit der in-vitro-Proteinsynthese. ● poly(Phe)synthetisiert; ■ Phe-tRNA·EF-Tu·GTP gebunden; Δ tRNA^{Phe} freigesetzt. Die poly(U)-abhängige Synthese von poly(Phe) verläuft optimal bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 12–14 mM. Der ansteigende Ast der Glockenkurve kann erklärt werden durch die Mg^{2+} -abhängige Bindung des ternären Komplexes Phe-tRNA·EF-Tu·GTP. Auch die EF-G·GTP katalysierte Freisetzung der desacylierten tRNA aus der P-Stelle des Ribosoms wird von Mg^{2+} koregulierte, dies bestimmt den abfallenden Ast der Glockenkurve; während bei 10 mM $[\text{Mg}^{2+}]$ die tRNA durch EF-G·GTP bis zu 100% freigesetzt werden kann, wird sie bei $[\text{Mg}^{2+}] > 25 \text{ mM}$ irreversibel gebunden.

Auch fast alle weiteren Teilreaktionen der ribosomalen Proteinsynthese und die Konformation der beteiligten Komponenten sind Mg^{2+} -abhängig, so die Bindung der mRNA an Ribosomen sowie die Konformation der tRNA und der Ribosomen. Faktoren und Mg^{2+} wirken jeweils kooperativ.

Es ist lange bekannt, daß das Cytoplasma von Bakterien Polyamine wie Spermidin und Putrescin in größeren Konzentrationen enthält. Aber erst kürzlich konnten Kurland et al. zeigen, daß diese Polyamine wie auch Ca^{2+} die Effektivität und auch die Genauigkeit der Proteinsynthese stark erhöhen^[56].

4. Selektion des Genanfangs und Rasterung der mRNA durch Bildung des Initiationskomplexes

Bei der Replikation der DNA und bei ihrer Transkription in die mRNA wird die Information über eine Einbasen-Entsprechung weitergegeben. Adenin erkennt Thymin (Uracil), Guanin erkennt Cytosin und umgekehrt. Bei der Translation der mRNA in eine Aminosäuresequenz jedoch muß die Information zu Trinucleotiden gerastert werden. Ein Fehlgriff um nur ein Nucleotid resultiert in einer völlig anderen Aminosäuresequenz des betreffenden Proteins und ist für die Zelle fast immer letal. Es ist daher verständlich, daß bei der Bildung des 30S- und 70S-Initiationskomplexes mit größter Sorgfalt verfahren wird. Dabei wird arbeitsteilig im 30S-Komplex der Kettenstart festgelegt und im 70S-Initiationskomplex endgültig das Dreiraster fixiert.

4.1. Festlegung des Genanfangs durch Bildung des 30S-Initiationskomplexes

Mit der Bildung des 30S-Initiationskomplexes wird der Beginn eines Gens erkannt und die Rasterung der mRNA zu Trinucleotiden eingeleitet. Die Doppelstrangbildung zwischen dem Anticodon der Initiations-tRNA und dem Startcodon AUG ist ein Teil dieser Erkennungsreaktion. Da aber AUG nicht nur als Startcodon fungiert, sondern innerhalb des Gens Methionin codiert, kann die Bildung des Komplexes fMet-tRNA·AUG die hochspezifische Selektion des Kettenanfangs nicht hinreichend erklären^[57]. Ferner sind bakterielle mRNAs polycistronisch, und die auf einem mRNA-Strang codierten Proteine werden in unterschiedlichen Mengen synthetisiert. Die mRNA des Phagen MS2 enthält z. B. die Information zur Synthese von vier Proteinen: Reifungsprotein, Hüllprotein, Lyseprotein und Replicase^[58]. Da sich das Gen für das Hüllprotein in der Mitte der RNA befindet und dieses Protein in größeren Mengen synthetisiert wird als die restlichen Proteine, müssen Ribosomen die einzelnen Gene einer polycistronischen mRNA selektieren können. Somit muß erklärt werden, wie Komponenten des Initiationssystems zwischen Start-AUG und ketteninternem AUG und ferner zwischen mehreren Startstellen auf einer mRNA unterscheiden (Fig. 12).

Für die Erkennung eines bestimmten Startcodons gibt es zur Zeit drei Erklärungen: 1) mRNAs haben in Analogie zur tRNA eine definierte Tertiärstruktur, in der ein Basen-

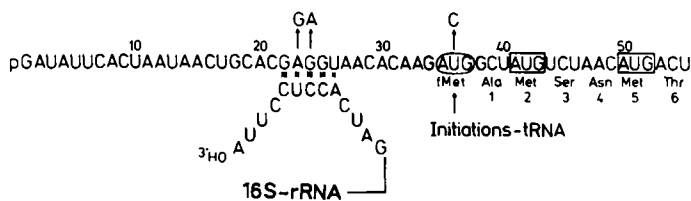


Fig. 12. Startsequenz der mRNA eines Proteins des Phagen T7. Die Sequenz enthält drei AUG-Codons in dem Anfangsteil der mRNA. Auf das Start-AUG (eingekreist) folgen zwei Elongationscodons AUG (Kästchen), die Methionin codieren. Dies zeigt die besondere Problematik bei der Wahl des Startcodons. Das selektive Erkennen des Startcodons wird durch die Doppelstrangbildung mit der 16S-RNA im Präcistrongbereich garantiert. Punktmutationen sowohl in diesem Bereich als auch im Startcodon reduzieren die Effizienz der Bildung des Initiationskomplexes [57].

triplett, das Startcodon, exponiert ist^[59]. 2) mRNAs verfügen in der Präcistrongsequenz über eine Nucleotidfolge, die zu einem Teilbereich der 16S-RNA der 30S-Untereinheit basenkomplementär ist. 3) Die Initiations-tRNA kann mehr als drei Nucleotide auf der mRNA abgreifen.

Auf die letzten beiden Theorien sei im folgenden näher eingegangen, da sie die molekularen Prinzipien der Initiationsreaktion verständlich machen.

Shine und Dalgarno bestimmten 1974 die Basensequenz des 3'-Endes der 16S-RNA und postulierten aufgrund der Basenkomplementarität zwischen der 16S-RNA und der Präcistrongsequenz einiger mRNAs, daß der 30S-mRNA-Komplex durch eine Doppelstrangbildung der beiden Nucleinsäuren stabilisiert wird^[60]. Heute sind die Partialsequenzen von etwa 100 mRNAs bekannt, und eine Analyse ihrer Präcistrongsequenzen bestätigte die Theorie von Shine und Dalgarno^[61]. Drei bis neun Nucleotide, die etwa sieben bis zehn Nucleotide vom Startcodon entfernt sind, können mit den letzten zwölf Nucleotiden der 16S-RNA Basenpaare bilden. Die Effektivität der Komplexbildung ist der Zahl möglicher Basenpaare proportional^[62]. Ferner inhibieren zu diesem Bereich der 16S-RNA komplementäre Oligonucleotide die Bildung eines 30S-mRNA-Komplexes zu bis zu 80%^[63]. Somit kann als gesichert gelten, daß dieser rRNA-mRNA-Komplex zur Stabilisierung des 30S-Initiationskomplexes beiträgt.

Der Trinucleotid-Code bringt zwar eine effektive Ausnutzung der Information der mRNA mit sich, resultiert aber in einer nur geringen mRNA-tRNA-Wechselwirkung. Es wird daher schon lange diskutiert, ob im 30S-Initiationskomplex die Initiations-tRNA mit mehr als drei Nucleotiden der mRNA einen Doppelstrang bildet. Tanaguchi und Weissmann legten erste experimentelle Ergebnisse für ein Tetranucleotid als Startcodon vor^[64]. Bei einer Mutante der RNA des Bacteriophagen Q β mit dem Startcodon AUGA wird ein Initiationskomplex effektiver gebildet als beim Wildtyp mit AUGG. Interessanterweise war die Doppelmutante AUAA immer noch halb so effektiv wie der Wildtyp, woraus auf eine Wechselwirkung des 3'-terminalen Adenosins des AUGA mit dem Uridin in 5'-Stellung des Anticodons der tRNA^{Met} geschlossen wurde. Diese Hypothese wird durch die Tertiärstruktur der *E. coli*-tRNA^{Met} gestützt; hier ist im Gegensatz zur tRNA^{Phe} das Uridin 33 exponiert, so daß es ein Basenpaar mit dem 3'-terminalen Adenosin der mRNA bilden kann^[39]. Von mehreren Arbeitsgruppen wurde weiterhin gezeigt, daß Tetranucleotide wie UAUG oder AUGA, deren 5'- oder 3'-Ende zu einer Base der Anticodonschleife der tRNA^{Met} kom-

Tabelle 3. Bindung von fMet-tRNA oder AcPhe-tRNA an 30S- oder 70S-Ribosomen in Abhängigkeit vom Codon. Anteil an Ribosomen [%], der bei konstanter tRNA- und optimierter Oligonucleotid-Konzentration als Ribosomen-tRNA-Komplex vorliegt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Experimente in Gegenwart des Initiationsfaktors IF-2 und von GTP durchgeführt. Tetranucleotide, besonders mit einem terminalen Purinnucleosid (A, G, h^AA), bilden effektiv einen 30S-Initiationskomplex, während AUG das beste Codon für den 70S-Initiationskomplex ist. Mit UUCA und der Pseudoinitiations-tRNA AcPhe-tRNA wird demonstriert, daß in Gegenwart des Initiationsfaktors auch dieses Tetranucleotid ein effektives Codon ist, während UUCA allein keine freie AcPhe-tRNA bindet.

| Oligonucleotid | Anteil an tRNA-bindenden Ribosomen 30 S [%] | 70S [%] |
|-------------------------|---|---------|
| fMet-tRNA | | |
| AUG | 44 | 71 |
| AUGA | 72 | 44 |
| AUGG | 68 | 43 |
| AUGU | 52 | 63 |
| AUGC | 56 | 57 |
| AUGh ^A A [a] | 61 | 47 |
| AUUA | 9 | 11 |
| AUUU | 0 | 0 |
| AUG(-GTP) | 22 | — |
| AUG(+GMPPCP) | — | 46 |
| AUGA(-GTP) | 35 | — |
| AUGA(+GMPPCP) | — | 65 |
| AcPhe-tRNA | | |
| UC(-IF-2, -GTP) | 28 | — |
| UUC | 36 | — |
| UUCA(-IF-2, GTP) | 9 | — |
| UUCA | 47 | — |

[a] h^AA ist in Position 6 desaminierendes Adenosin.

plementär ist, die Bindung des ternären Komplexes fMet-tRNA·IF-2·GTP an 30S-Ribosomen stärker stimulieren als AUG^[65-68]. Da beide terminalen Nucleotide diesen Effekt zeigen, könnte eventuell sogar das Pentanucleotid UAUGA das beste Startcodon sein. Essentiell für das Abgreifen eines Tetranucleotids durch die Initiations-tRNA ist der Initiationsfaktor IF-2. Nicht die freie fMet-tRNA erkennt ein Tetranucleotid-Codon, sondern nur der ternäre Komplex fMet-tRNA·IF-2·GTP ist dazu imstande. Ersetzt man die Initiations-tRNA durch AcPhe-tRNA – eine Pseudoinitiations-tRNA –, so erkennt auch die AcPhe-tRNA bevorzugt das Codon UUC, der ternäre Komplex AcPhe-tRNA·IF-2·GTP jedoch das Tetranucleotid UUCA (Tabelle 3)^[66]. IF-2·GTP moduliert also die tRNA-Konformation in einer Weise, daß vier oder eventuell fünf Anticodon-Basen für die Doppelstrangbildung mit der mRNA exponiert sind (Fig. 13).

Faßt man die oben erwähnten Punkte zwei und drei zusammen, so läßt sich die Erkennung des Genanfangs durch die Bildung von zwei RNA-Doppelsträngen in etwa 2.5 nm Abstand folgendermaßen erklären: Die 16S-RNA reagiert mit der Präcistrongsequenz der mRNA, und das Startcodon der mRNA bindet die Initiations-tRNA^[69]. Damit sieht der zeitliche Ablauf der Initiation nach bisher vorliegenden Befunden so aus: Zunächst bildet die mRNA mit dem Ribosom einen unspezifischen, über elektrostatische Wechselwirkungen stabilisierten Komplex. Durch einen „slide-and-search-Mechanismus“ kommt es dann zu einer vorläufigen Fixierung der mRNA, indem sich ein drei bis neun Nucleotide langer Doppelstrang zwischen der 16S-RNA und der mRNA bildet. Aber erst durch den zweiten Doppelstrang, der zwischen dem Startcodon und der Initiations-tRNA entsteht, wird ein stabiler Initiationskomplex erhalten (Fig. 13).

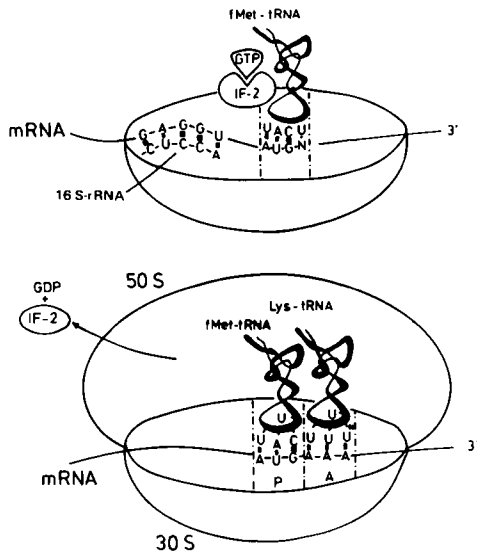


Fig. 13. Modellhafte Darstellung des 30S- und 70S-Initiationskomplexes. Der 30S-Initiationskomplex wird durch zwei RNA-RNA-Doppelstränge stabilisiert, wobei die fMet-tRNA als ternärer Komplex fMet-tRNA-IF-2-GTP mehr als drei Nucleotide auf der mRNA abgreift. Im 70S-Initiationskomplex wird die mRNA über einen Hexanucleotid-Doppelstrang an zwei tRNAs gebunden (vgl. auch Fig. 2, Schritt 4 und 5).

Aus einer vergleichenden Analyse der Startsequenzen von etwa 80 mRNAs ergibt sich, daß als Startcodon immer ein AUGA/G benutzt wird, wenn im Präcistrongbereich eine nur geringe Basenkomplementarität vorliegt^[61]. Somit wird die Effizienz bei der Bildung des Initiationskomplexes durch die Anzahl komplementärer Basen im Präcistrongbereich und im Codon-Anticodon-Komplex reguliert. Diese Komplexbildung könnte auch bestimmen, wieviel Proteinkopien von einer mRNA bei der Translation gemacht werden.

4.2. Rasterung der mRNA im 70S-Initiationskomplex

Mit der Bindung der 50S-Untereinheit wird der 30S-Initiationskomplex in den 70S-Komplex umgewandelt. Dabei wird der Initiationsfaktor als IF-2-GDP abgespalten; die fMet-tRNA ist formal jetzt eine Peptidyl-tRNA, und die Bindestelle für die AA-tRNA ist vorhanden.

Um die erste Elongations-tRNA an das 70S-Ribosom zu binden, muß die Tetranucleotid-Wechselwirkung zwischen dem Startcodon und der fMet-tRNA auf das Trinucleotidraster zurückgeführt werden; erst in dem Komplex 70S-mRNA-PP-tRNA-AA-tRNA ist das Trinucleotidraster festgelegt.

Um den Wechsel in der Rasterung auf molekularer Ebene zu verstehen, haben wir die Funktion des Carrierproteins IF-2 genauer untersucht (Tabelle 3). Der ternäre Komplex fMet-tRNA-IF-2-GTP bindet bevorzugt an AUGA-programmierte 30S-Ribosomen. In 70S-Ribosomen jedoch ist das konventionelle Startcodon AUG effektiver als AUGA. Verhindert man die Abspaltung des Initiationsfaktors IF-2, indem man GTP durch das nicht hydrolysierbare Analogon GMPPCP ersetzt, so bleibt das Tetranucleotidraster erhalten; außerdem wird die erste Elongations-tRNA nicht gebunden. Der Komplex IF-2-GTP moduliert folglich die Konformation der Initiations-tRNA so, daß diese mehr als drei Nucleotide der mRNA abgreift (Fig. 13). Im 70S-Ribosom jedoch muß die

Doppelstrangbildung auf das Trinucleotidraster reduziert werden. Durch eine ribosomale GTPase wird GTP zu GDP und P_i hydrolysiert, und IF-2-GDP verläßt den Komplex. Die fMet-tRNA wird jetzt nur über den Trinucleotidkomplex gebunden, wird aber zusätzlich durch die Wechselwirkung der Peptidylgruppe mit der 50S-Untereinheit stabilisiert^[70]. Ist die erste AA-tRNA an die mRNA direkt im Anschluß an die fMet-tRNA gebunden, so ist das Trinucleotidraster endgültig festgelegt.

5. Kettenverlängerung in der Proteinbiosynthese: Modulation der Substratspezifität und Transport des Programms

In der Elongationsphase der ribosomalen Proteinbiosynthese sind zwei Aspekte mechanistisch besonders interessant: Die Adaptation der A-Stelle durch ein Codon für nur eine Aminoacyl-tRNA und die GTP-abhängige Verschiebung der mRNA um jeweils ein Codon pro gebildete Peptidbindung.

5.1. Selektion der korrekten Aminoacyl-tRNA durch ein programmiertes 70S-Ribosom

Der ternäre Komplex AA-tRNA·EF-Tu·GTP bindet an ein 70S-Ribosom, in dem die P-Stelle bereits durch eine Peptidyl-tRNA besetzt und ein Codon als Teil der mRNA in der Aminoacyl-Stelle lokalisiert ist. Dabei ist die Aminoacyl-Stelle als Protein-Nucleinsäure-Komplex zuständig für die stabile Bindung des ternären Komplexes ($K_{AS} \approx 10^8 \text{ M}^{-1}$), während das Codon als „Programmwort“ die Selektivität bestimmt, d. h. welche der etwa 50–100 AA-tRNAs gebunden wird^[71]. Mitentscheidend für die Selektion der korrekten AA-tRNA sind nicht nur die drei Anticodon-Basen, sondern auch die Nachbarnucleotide und die Konformation der Anticodon-Schleife, daneben noch andere Proteine und Teile der 16S-RNA des 30S-Ribosoms^[72].

Bisher ist die Selektion der korrekten AA-tRNA dadurch erklärt worden, daß sich ein drei Nucleotide langer Doppelstrang zwischen dem Codon der mRNA und dem Anticodon der tRNA bildet.

Diese Annahme ist jedoch nicht ausreichend, um die geringe Fehlablesung von 10^{-4} zu erklären. Die Entstehung von Dimeren aus zwei basenkomplementären Trinucleotiden läßt sich in wäßriger Lösung nicht nachweisen, und auch die Komplexbildung zwischen einem Trinucleotid und der passenden tRNA zeigt nur Assoziationskonstanten im Bereich von 10^3 – 10^4 M^{-1} ^[73, 74]. Erst wenn die Konformation beider Reaktionspartner fixiert ist – im Modellexperiment mit tRNA-Paaren, deren Anticodons basenkomplementär zueinander sind, etwa tRNA^{Phe}:tRNA^{Glu} – entstehen stabile Komplexe mit Assoziationskonstanten von ca. 10^6 M^{-1} ^[75]. Dabei ist die Geschwindigkeit der Assoziation ($k = 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ähnlich groß wie die Geschwindigkeit der Bildung von Oligonucleotid-Dimeren, während die Dissoziation der tRNA-Paare fast um den Faktor 10^6 verlangsamt ist ($k_{\text{Diss}} \approx 5 \text{ s}^{-1}$)^[76].

In jüngster Zeit hat eine Reihe experimenteller Befunde unser Verständnis der tRNA-Selektion und damit der Programmierung der A-Stelle erweitert. Anhand des bereits erwähnten Modellsystems mit tRNA-Paaren konnten Gros-

jean et al. nachweisen, daß sich Unterschiede zwischen der Assoziationskonstante von passenden und von nicht passenden Trinucleotid-Paaren (mit einem nicht komplementären Basenpaar in letzterem) aus Differenzen in den Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation erhalten lassen; die Bildungsgeschwindigkeiten sind hingegen für alle untersuchten Dimere gleich^[77,78].

Wir zeigten, daß ein Codon allosterisch die Konformation der tRNA ändert^[46]. Die in fast jeder tRNA vorkommende Sequenz TΨC(G,A) liegt in der freien tRNA als „Kryptosequenz“ vor (siehe Fig. 8), d. h. sie ist weder chemischen Modifikationen zugänglich, noch lassen sich komplementäre Nucleotide wie CGAA an diese Sequenz binden. In einem Codon-tRNA-Komplex jedoch, etwa U₃-tRNA^{Phe} oder CGA-tRNA^{Leu}, wird diese Sequenz wie auch andere Bereiche der tRNA exponiert. So bindet CGAA an einen Codon-tRNA-Komplex mit einer Assoziationskonstanten von $5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ und erhöht in einem ähnlichen Experiment die Stabilität des Codon-tRNA-Komplexes um den Faktor 10 (Fig. 14). Von Pörschke et al. ist durch kinetische Untersuchungen die Codon-induzierte Konformationsänderung der tRNA bestätigt worden^[79].

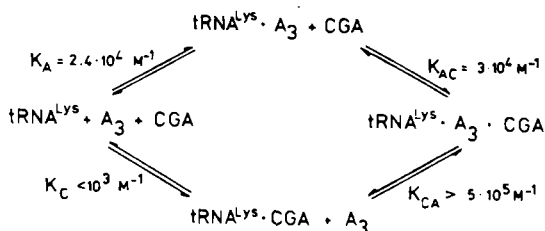


Fig. 14. Codon-induzierte Strukturänderung der AA-tRNA. Reaktionschema für die Bindung von A₃ und CGA an tRNA^{Leu} [47]. Das Trinucleotid CGA bindet an den tRNA^{Leu}·A₃-Komplex mit $K_{AC} = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$; es bindet nicht an die freie tRNA. Die Codon-tRNA-Wechselwirkung wird um den Faktor 10 in Gegenwart von CGA stabilisiert ($K_{CA} = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$).

Die in dem Codon-tRNA-Komplex exponierte Sequenz TΨCG kann mit einer komplementären Sequenz in der 5S-RNA (C43GAA46) der 50S-Untereinheit oder auch mit Bereichen der 16S-RNA einen Komplex bilden^[80]. Das Codon fungiert als allosterischer Effektor: Durch die selektionierende Komplexbildung Codon-Anticodon ändert sich die Konformation der tRNA; dies hat zur Folge, daß sich ein für alle tRNAs identischer Doppelstrang TΨCG(tRNA)·rRNA bilden kann.

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so ergibt sich das folgende Bild der programmierten AA-tRNA-Bindung: Jede AA-tRNA wird als ternärer Komplex AA-tRNA·EF-Tu·GTP Codon-unabhängig an die A-Stelle gebunden. Passen Codon und Anticodon sterisch nicht zueinander, so spaltet sich der ternäre Komplex wieder ab ($k = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$); passen Codon und Anticodon zusammen, so lagert sich die AA-tRNA als Folge der Komplexbildung um, es entsteht die bindende Konformation der tRNA. Die Doppelstrangbildung zwischen der TΨCG-Sequenz und der ribosomalen RNA, die keinen diskriminierenden Charakter mehr hat, erhöht die Stabilität der AA-tRNA-Bindung; die Bindung des ternären Komplexes wird in vivo irreversibel, die AA-tRNA wird nicht mehr abgespalten, sondern nach Entfernen des Elongationsfaktors EF-Tu·GDP und dem Transfer der Peptidylgruppe als Peptidyl-tRNA verschoben.

5.2. Translokation, die Energie-abhängige Verschiebung der mRNA gegen das Ribosom

Die Elongation ist der sich wiederholende Schritt der Kettenverlängerung innerhalb der Peptidsynthese. Eine Peptidyl-tRNA besetzt die P-Stelle, während eine Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle gebunden ist. Nach Abspaltung des Elongationsfaktors als EF-Tu·GDP wird – katalysiert durch die Peptidyl-Transferase – der Peptidylrest auf die Aminoacylgruppe der AA-tRNA übertragen. Dieser Funktionszustand des 70S-Ribosoms repräsentiert den Prätranslokationsstatus: eine desacylierte tRNA an der P-Stelle und eine PP-tRNA an der A-Stelle. Die nachfolgende Translokation untergliedert sich in zwei Teilreaktionen: die Abspaltung der desacylierten tRNA von der P-Stelle und das Verschieben der mRNA und der PP-tRNA-Komplexe um eine Codonlänge von der A- an die P-Stelle. Damit ist die Ausgangssituation wiederhergestellt, die Peptidyl-tRNA befindet sich an der P-Stelle, und die A-Stelle ist frei für eine neue AA-tRNA. Bevor jedoch die Translokation erfolgen kann, muß die desacylierte tRNA von der P-Stelle entfernt werden. Bei diesem Energie-verbrauchenden Vorgang wird der Elongationsfaktor G·GTP gegen die tRNA ausgetauscht. Figur 15 zeigt, daß die EF-G·GTP-abhängige tRNA-Freisetzung mit der Bindung einer neuen AA-tRNA und damit der Translokation des PP-tRNA·mRNA-Komplexes korreliert ist^[81].

Mechanistisch wird im Prinzip wie bei der Bindung der AA-tRNA verfahren, nur agiert jetzt der EF-G·GTP-Komplex in seiner Ribosomen-affinen Form als „tRNA-release-Protein“. Ob der Faktor sich an die P-Stelle heftet, oder ob er über eine konformative Änderung des Ribosoms die Affinität der P-Stelle für die tRNA reduziert, ist bisher noch ungeklärt. Für den cyclischen Ablauf der Translokation muß das „tRNA-release-Protein“ wieder vom Ribosom entfernt werden. Eine Ribosomen-eigene GTPase, eventuell die Proteine L7/L12, hydrolysiert GTP zu GDP, und das Protein wird als EF-G·GDP vom Ribosom abgespalten^[82].

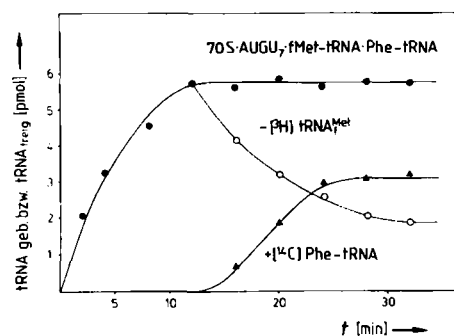


Fig. 15. Einbau einer weiteren Phe-tRNA in den Komplex 70S·AUGU₇·fMet-tRNA·Phe-tRNA nach Zugabe von EF-G·GTP. Die Translokation des PP-tRNA·mRNA-Komplexes erfolgt simultan mit der EF-G·GTP katalysierten Freisetzung der tRNA. In dem Ausgangskomplex ist eine fMet-[³H]tRNA (Tritium-markiert im CCA-Ende) an der P-Stelle und eine Phe-tRNA an der A-Stelle gebunden. Die mit ● markierte Kurve zeigt die Kinetik der Bildung des 70S·AUGU₇·fMet-[³H]tRNA·Phe-tRNA-Komplexes. Es wurden 10 pmol 70S-Ribosomen verwendet. In einem zweiten Experiment wurde nach 12 min EF-G·GTP und [¹⁴C]Phe-tRNA·EF-Tu·GTP (markiert in der Aminosäure) zugegeben. Man erkennt, daß mit der Freisetzung der desacylierten tRNA ([³H]tRNA^{fMet}, ○) simultan und in gleichem Maß [¹⁴C]Phe-tRNA gebunden wird (▲). Nach dieser Operation liegt der Komplex 70S·AUGU₇·fMet-Phe-tRNA·Phe-tRNA vor.

Tauscht man GTP gegen GMPPCP aus, so wird zwar die tRNA freigesetzt, der Elongationsfaktor wird aber nicht mehr vom Ribosom abgespalten, d. h. die Peptidsynthese kommt zum Stillstand^[34,83]. Wird die tRNA durch eine Verringerung der Mg^{2+} -Konzentration freigesetzt, indem man die elektrostatische Abstoßung zwischen beiden Molekülen ausnutzt, so wird auch ohne EF-G und GTP eine Peptidbindung geknüpft^[81]; demnach ist die in der Esterbindung der AA-tRNA gespeicherte Energie für die Bildung der Peptidbindung ausreichend. Die durch Spaltung eines Nucleosidtriphosphates erhaltene Energie wird in der Translokation benötigt, um die Affinität eines „release-Proteins“ zum Ribosom und damit die Freisetzung der tRNA zu steuern.

Die jetzt mögliche Translokation der PP-tRNA ist nach einer Konzeption von Leder mit den aus der Enzymologie bekannten Enzym-Substrat-Regeln zu erklären^[84]. Das aktive Zentrum des Enzyms hat eine hohe Affinität für sein Substrat und eine niedrige für sein Produkt. Für die Translokation bedeutet dies folgendes: Durch den Peptidyltransfer ist die aus der AA-tRNA entstandene Peptidyl-tRNA zum einen Produkt für die A-Stelle (= niedrige Affinität), zum anderen aber Substrat für die direkt benachbarte P-Stelle (= hohe Affinität) geworden, die Translokation ist vorbereitet. Bisher war es nicht möglich, diese Theorie experimentell zu verifizieren, da sowohl die Methoden – Adsorption der Komplexe an Nitrocellulosefilter oder Gleichgewichtsdialyse – als auch die Reinheit der Komponenten eine separate Bestimmung der Assoziationskonstanten der Bindung der PP-tRNA an A- und P-Stelle nicht zuließen. In Zusammenarbeit mit Riesner gelang es uns kürzlich, mit der Geschwindigkeits-Sedimentation in der analytischen Ultrazentrifuge mit 100% aktiven Ribosomen diese Werte zu bestimmen^[27]. Die in Tabelle 4 aufgeführten Daten bestätigen die Theorie von Leder. Anhand der Zahl der pro Ribosom gebundenen tRNAs und der Assoziationskonstanten ist zu erkennen, daß die PP-tRNA eine 20fach höhere Affinität für die P-Stelle als für die A-Stelle hat. Die Translokation der PP-tRNA erfolgt damit spontan, sobald die P-Stelle frei ist. Es bleibt aber zu zeigen, daß mit der PP-tRNA simultan, d. h. als PP-tRNA·mRNA-Komplex, auch die mRNA verschoben wird. Erst die Verschiebung des Komplexes von der A- zur P-Stelle erklärt die Richtung der mRNA-Translokation

Tabelle 4. Bindung von AA-tRNA, PP-tRNA und tRNA an 70S-Ribosomen; Zahl der pro Ribosom gebundenen tRNAs und Assoziationskonstanten.

| tRNA | Zahl der gebundenen tRNAs | Bindestelle [a] | K_{Ass} [M ⁻¹] [b] |
|---------------------------|---------------------------|-----------------|----------------------------------|
| Phe-tRNA·EF-Tu·GMPPCP [c] | 1 | A | $6.6 \cdot 10^6$ |
| AcPhe-tRNA | 1 | P | $3.5 \cdot 10^6$ |
| AcPhe-tRNA | 1 | A | $1.8 \cdot 10^5$ |
| Phe-tRNA | 2 | A, P | — |
| tRNA ^{Met} | 1 | P | $2.1 \cdot 10^5$ |
| tRNA ^{Phe} | 2 | A, P | — |

[a] Die Zuordnung der tRNA zu der A- oder P-Stelle läßt sich zwar aus dem Reaktionsablauf begründen, kann aber nicht direkt bewiesen werden. [b] Die Assoziationskonstanten K_{Ass} wurden anhand der Sedimentation der Komplexe in der analytischen Ultrazentrifuge bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 8 mM bestimmt (siehe auch Fig. 7). [c] Bei der Bindung des ternären Komplexes mußte GTP durch GMPPCP ersetzt werden, um eine Hydrolyse durch die 70S-GTPase zu verhindern.

und die Vorwärtsbewegung der mRNA am Ribosom um genau ein Trinucleotid pro gebildete Peptidbindung.

Küchler zeigte, daß in einem Komplex 70S·poly(U)·AcPhe-tRNA, in dem durch UV-Bestrahlung die tRNA mit der Polyuridylsäure kovalent verknüpft worden war, noch eine Translokation der AcPhe-tRNA von der A- zur P-Stelle möglich ist^[85]. Es ist auch bekannt, daß eine „frameshift-Suppressions-tRNA“, die vier Codonbasen abgreifen kann, die mRNA um vier Nucleotide verschiebt^[86].

Wir sind bei unseren Experimenten zum Mechanismus der Translokation von folgenden Überlegungen ausgegangen: Zum einen sollte die Freisetzung der desacylierten tRNA die Bindung zwischen mRNA und Ribosom lockern, und zum anderen sollte möglichst die PP-tRNA die mRNA stabiler binden als die tRNA. Um dieses Wechselspiel zwischen stabiler mRNA-Assoziation und -Verschiebbarkeit zu verfolgen, haben wir die Bindung von Oligonucleotiden an Ribosomen in Abhängigkeit von der tRNA-Präsenz untersucht. Aus den in Tabelle 5 aufgeführ-

Tabelle 5. Einfluß der Kettenlänge der Polyuridylsäure und der tRNAs auf die Bildung des 70S·AUGU_n-Komplexes [88]. Die Assoziationskonstanten wurden mit der Gleichgewichtsdialyse bestimmt und für zehn verschiedene Oligonucleotidkonzentrationen aus einer Auftragung nach Scatchard berechnet.

| Komplex | tRNA | K_{Ass} [M ⁻¹] | Zahl der Bindestellen |
|------------------------|---|------------------------------|-----------------------|
| 70S·AUGU ₃ | — | $6.8 \cdot 10^5$ | 1.3 |
| 70S·AUGU ₆ | — | $8.7 \cdot 10^5$ | 1.3 |
| 70S·AUGU ₁₃ | — | $9.3 \cdot 10^5$ | 1.4 |
| 70S·AUGU ₃ | tRNA ^{Met} | $4.6 \cdot 10^7$ | 1.0 |
| 70S·AUGU ₃ | tRNA ^{Met} _m | $3.9 \cdot 10^6$ | 1.0 |
| 70S·AUGU ₃ | tRNA ^{Phe} | $4.1 \cdot 10^6$ | 1.2 |
| 70S·AUGU ₃ | tRNA ^{Met} , tRNA ^{Phe} | $2.2 \cdot 10^8$ | 1.1 |
| 70S·AUGU ₆ | tRNA ^{Met} , tRNA ^{Phe} | $2.1 \cdot 10^8$ | 1.0 |
| 70S·AUGU ₁₃ | tRNA ^{Met} , tRNA ^{Phe} | $2.2 \cdot 10^8$ | 1.1 |
| 70S·AUGU ₃ | fMet-tRNA ^{Met} | $1.1 \cdot 10^8$ | 1.1 |
| 70S·AUGU ₃ | AcMet-tRNA ^{Met} _m | $5.3 \cdot 10^7$ | 1.1 |

ten Daten folgt, daß die Stabilität der mRNA-Ribosomen-Komplexe nicht von der Länge der Oligonucleotide abhängt, sondern durch Zahl und Typ der tRNA bestimmt wird^[87].

Eine Arretierung der mRNA, die im Experiment in einer hohen Assoziationskonstante für das Oligonucleotid zum Ausdruck kommt, erfolgt entweder durch zwei tRNAs oder durch eine Peptidyl-tRNA in der P-Stelle^[81]. In einem ähnlichen Experiment haben wir die Assoziationskonstanten der Bindung von komplementären Oligonucleotiden an die tRNA und an die PP-tRNA gemessen. Das Oligonucleotid ist – auch in Gegenwart der 70S-Ribosomen – um den Faktor 3–20 fester an die PP-tRNA als an die tRNA gebunden (Tabelle 6). Somit wird klar, daß der Transfer der Peptidylgruppe und die Freisetzung der desacylierten tRNA jeweils doppelte Konsequenzen haben: Die EF-G·GTP-abhängige Abspaltung der desacylierten tRNA macht die Substratbindestelle für die PP-tRNA frei und lockert die Bindung zwischen Ribosom und mRNA. Der Transfer der Peptidylgruppe auf die AA-tRNA an der A-Stelle macht diese zum Produkt der A-Stelle und damit zum Substrat der P-Stelle, bewirkt aber auch eine stabilere Bindung zwischen PP-tRNA und mRNA. Da die Affinität der P-Stelle zur PP-tRNA die treibende Kraft der Elonga-

Tabelle 6. Effekt der Peptidylgruppe auf die Stabilität der Oligonucleotid-tRNA- und Ribosom-Oligonucleotid-tRNA-Komplexe.

| Oligonucleotid | tRNA | Ribosom | K_{ass} [M ⁻¹] [a] |
|----------------|---------------------------|---------|----------------------------------|
| AUG | tRNA ^{Met} | — | 4.4 · 10 ³ |
| | fMet-tRNA | — | 1.2 · 10 ⁴ |
| AUGA | tRNA ^{Met} | — | 4.0 · 10 ⁴ |
| | fMet-tRNA ^{Met} | — | 1.2 · 10 ⁵ |
| UUC | tRNA ^{Phe} | — | 1.7 · 10 ³ |
| | AcPhe-tRNA ^{Phe} | — | 1.1 · 10 ⁴ |
| | tRNA ^{Phe} | + | 6.3 · 10 ³ |
| | AcPhe-tRNA ^{Phe} | + | 9.5 · 10 ⁶ |
| UUCA | tRNA ^{Phe} | — | 3.2 · 10 ⁴ |
| | AcPhe-tRNA ^{Phe} | — | 1.9 · 10 ³ |
| | tRNA ^{Phe} | + | 2.3 · 10 ⁶ |
| | AcPhe-tRNA ^{Phe} | + | 1.8 · 10 ⁷ |

[a] Die Assoziationskonstanten wurden mit der Gleichgewichtsdialyse bestimmt.

tion ist und nach allen Befunden die Translokation des Komplexes PP-tRNA-mRNA bewirkt, wird auch Richtung und „Dreierschritt“ der mRNA-Bewegung verständlich.

6. Ausblick

In der bakteriellen Proteinbiosynthese sind für die Initiation und die Elongation die Reaktionsabläufe *cum grano salis* bekannt, während der Mechanismus der Termination noch ungeklärt ist. Es sind jedoch erst wenige kinetische Daten, die Geschwindigkeit und Genauigkeit der Peptidsynthese erklären, publiziert; konzeptionell durchdacht, scheitern die Experimente noch an der Komplexität der Systeme. Ein weiteres Gebiet, das in Zukunft stark in den Vordergrund treten wird, ist die Röntgen-Strukturanalyse ribosomaler Komponenten wie auch des gesamten Ribosoms. Ähnlich wie die Raumstruktur der tRNA unser Verständnis der Nucleinsäurekonformation bedeutend erweitert hat, dürfte auch die exakte Bestimmung der räumlichen Struktur des Ribosoms eine neue Dimension in der Sicht von Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkungen eröffnen.

In welchem Ausmaß lassen sich Ergebnisse aus bakteriellen Systemen auf Eukaryonten übertragen? Das eukaryontische 80S-Ribosom ist mit etwa 80 Proteinen und vier Nucleinsäuren komplexer als bakterielle Ribosomen. Die mRNA ist monocistronisch, beginnt mit der „cap-Sequenz“ und endet mit einem ca. 200 Nucleotide langen poly(A)-Fragment. Des weiteren wird die Initiations-tRNA nicht formyliert, und die Initiationsfaktoren haben zusammen ein Molekulargewicht von mehr als einer Million^[88].

Während Elongation und Termination bei Bakterien und höheren Organismen sehr ähnlich verlaufen, zeigen sich in der Initiation prinzipielle Unterschiede. Die Initiation ist hier der entscheidende Schritt der Peptidsynthese, und auf der Startstufe setzen alle Regulationsmechanismen an. So kann z. B. der Initiationsfaktor IF-2 (eIF-2) als Carrierprotein der Met-tRNA^{Met} durch eine Protein-Kinase-katalysierte Phosphorylierung inaktiviert werden. In diese Regulation greifen ferner die Interferone, die 2',5'-Oligo(A)-Synthetase und die cAMP-abhängigen Protein-Kinasen ein^[89]. Für Fragen der Zelldifferenzierung wie auch des Tumorstwachstums kann die Klärung der Regulation der eukaryontischen Proteinbiosynthese in der Initiation einen wertvollen Beitrag leisten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die finanzielle Förderung unserer Forschung. Mein Dank gilt besonders Frau E. Rönfeldt für die Hilfe bei der Abfassung des Manuskriptes.

Eingegangen am 18. Februar 1981 [A 394]

- [1] M. Ycas: *The Biological Code*, Wiley-Interscience, New York 1969.
- [2] H. Kleinkauf, *J. Med. Plant Res.* 35 (1979) 1.
- [3] M. Grunberg-Manago, F. Gros, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 20 (1977) 209.
- [4] T. Hunt, *Trends Biochem. Sci.* 5 (1980) 178.
- [5] M. Revel, Y. Groner, *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978) 1079.
- [6] P. Lengyel in M. Nomura, A. Tissière, P. Lengyel: *Ribosomes*, Cold Spring Harbor Lab. 1974, S. 13 ff.
- [7] R. Haselkorn, L. B. Rothman-Denes, *Annu. Rev. Biochem.* 42 (1973) 397.
- [8] B. F. C. Clark, *Trends Biochem. Sci.* 5 (1980) 207.
- [9] C. T. Caskey, *Trends Biochem. Sci.* 5 (1980) 234.
- [10] C. T. Caskey, J. M. Campbell in J. E. Celis, J. P. Smith: *Nonsense Mutations and tRNA Suppressors*, Academic Press, New York 1979, S. 81 ff.
- [11] G. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, M. Nomura: *Ribosomes, Structure, Function and Genetics*, University Park Press, Baltimore 1980.
- [12] H. G. Wittmann, *Eur. J. Biochem.* 61 (1976) 1.
- [13] J. Brosius, T. Dull, H. F. Noller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 201.
- [14] C. Ehresmann, P. Stiegler, P. Carbon, J. P. Ebel, *FEBS Lett.* 84 (1977) 337.
- [15] J. Brosius, M. L. Palmer, P. J. Kennedy, H. F. Noller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4801.
- [16] G. W. Tischendorf, H. Zeichhardt, G. Stöffler, *Mol. Gen. Genet.* 134 (1974) 209.
- [17] J. A. Lake, *J. Mol. Biol.* 105 (1976) 131.
- [18] M. Boublik, W. Hellmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 2829.
- [19] G. W. Tischendorf, H. Zeichhardt, G. Stöffler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 4820.
- [20] D. A. Winkelmann, L. Kahan, *J. Supramol. Struct.* 10 (1979) 443.
- [21] G. Stöffler, R. Bald, B. Kastner, R. Lührmann, M. Stöffler-Meilicke, G. W. Tischendorf, B. Tesche in [11], S. 171 ff.
- [22] A. A. Bogdanov, A. M. Kopylov, I. N. Shatsky, *Subcell. Biochem.* 7 (1980) 81.
- [23] B. S. Cooperman in [11], S. 531 ff.
- [24] P. Traub, M. Nomura, *J. Mol. Biol.* 40 (1969) 391.
- [25] F. Dohme, K. H. Nierhaus, *J. Mol. Biol.* 107 (1976) 585.
- [26] M. Pellegrini, C. R. Cantor in H. Weissbach, S. Pestka: *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*, Academic Press, New York 1977, S. 203 ff.
- [27] M. Schmitt, A. Möller, D. Riesner, H. G. Gassen, *Eur. J. Biochem.* 119 (1981) 61.
- [28] O. Pongs, K. H. Nierhaus, V. A. Erdmann, H. G. Wittmann, *FEBS Lett. Suppl.* 40 (1974) 28.
- [29] W. Möller in [6], S. 711 ff.
- [30] G. Chinali, H. Wolf, A. Parmeggiani, *Eur. J. Biochem.* 75 (1977) 55.
- [31] I. Ginzburg, R. Miskin, A. Zamir, *J. Mol. Biol.* 79 (1973) 481.
- [32] M. K. T. Lam, L. M. Changchien, G. R. Craven, *J. Mol. Biol.* 128 (1979) 561.
- [33] *Acc. Chem. Res.* 10 (1977) 385 ff. (Sonderheft „Special Issue on Transfer RNA“).
- [34] J. P. Goddard, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 32 (1978) 233.
- [35] A. Rich, U. L. RajBhandary, *Annu. Rev. Biochem.* 45 (1976) 805.
- [36] D. H. Gauss, F. Grüter, M. Sprinzl, *Nucleic Acids Res.* 6 (1979) 1.
- [37] A. Jack, J. E. Ladner, A. Klug, *J. Mol. Biol.* 108 (1976) 619.
- [38] G. J. Quigley, A. J. H. Wang, N. C. Seeman, F. C. Suddath, A. Rich, J. L. Sussman, S. H. Kein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 4866.
- [39] N. H. Woo, B. A. Roc, A. Rich, *Nature* 286 (1980) 346.
- [40] V. E. Erdmann, M. Sprinzl, O. Pongs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54 (1973) 942.
- [41] L. H. Schulman, H. Pelka, R. M. Sundari, *J. Biol. Chem.* 246 (1974) 7102.
- [42] T. Kruse, B. F. C. Clark, B. Appel, V. A. Erdmann, *FEBS Lett.* 117 (1980) 315.
- [43] D. M. Crothers, P. E. Cole in S. Altman: *Transfer RNA*, MIT Press, Cambridge 1978, S. 196 ff.
- [44] U. Schwarz, R. Lührmann, H. G. Gassen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56 (1974) 817.
- [45] H. G. Gassen, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 24 (1980) 57.
- [46] U. Schwarz, H. M. Menzel, H. G. Gassen, *Biochemistry* 15 (1976) 2484.
- [47] A. Möller, U. Wild, D. Riesner, H. G. Gassen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3266.

- [48] R. Wagner, R. Garrett, *Eur. J. Biochem.* 97 (1979) 615.
 [49] P. R. Schimmel in P. R. Schimmel, D. Söll, J. N. Abernethy: *Transfer RNA: Structure Properties and Recognition*, Cold Spring Harbor Lab. 1979, S. 297 ff.
 [50] J. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58 (1967) 1574.
 [51] R. Linde, N. Q. Khanh, R. Lipicky, H. G. Gassen, *Eur. J. Biochem.* 93 (1979) 565.
 [52] P. B. Moore, K. Asano, *J. Mol. Biol.* 18 (1966) 21.
 [53] D. L. Miller, H. Weissbach in H. Weissbach, S. Pestka: *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*, Academic Press, New York 1977, S. 323 ff.
 [54] G. van Dieijen, C. J. van der Laken, P. H. van Knippenberg, J. van Duin, *J. Mol. Biol.* 93 (1975) 351.
 [55] N. V. Belitsina, A. S. Spirin, *Eur. J. Biochem.* 94 (1979) 315.
 [56] P. C. Jelen, C. G. Kurland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3174.
 [57] J. J. Dunn, E. Buzash-Pollert, F. W. Studier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 2741.
 [58] J. F. Atkins, J. A. Steitz, C. W. Anderson, P. Model, *Cell* 18 (1979) 247.
 [59] G. van Dieijen, P. H. van Knippenberg, J. van Duin, *Eur. J. Biochem.* 64 (1976) 511.
 [60] J. Shine, L. Dalgarno, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 1342.
 [61] G. F. E. Scherer, M. D. Walkinshaw, S. Arnott, D. J. Morré, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 3895.
 [62] J. A. Steitz, D. A. Steege, *J. Mol. Biol.* 114 (1977) 545.
 [63] T. Tanaguchi, C. Weissmann, *Nature* 275 (1978) 770.
 [64] T. Tanaguchi, C. Weissmann, *J. Mol. Biol.* 118 (1978) 533.
 [65] M. C. Ganoza, A. R. Fraser, T. Neilson, *Biochemistry* 17 (1978) 2769.
 [66] M. Schmitt, U. Manderschied, A. Kyriatoulis, U. Brinckmann, H. G. Gassen, *Eur. J. Biochem.* 109 (1980) 291.
 [67] F. Golini, R. E. Thach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47 (1972) 1314.
 [68] U. Manderschied, S. Bertram, H. G. Gassen, *FEBS Lett.* 90 (1978) 162.
 [69] J. A. Steitz in [11], S. 479 ff.
 [70] J. Rychlik, *Biochim. Biophys. Acta* 114 (1966) 425.
 [71] S. V. Kirillov, V. B. Odinzov, *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 1501.
 [72] L. Gorini, *Nature (London) New Biol.* 234 (1971) 261.
 [73] M. Eigen, *Naturwissenschaften* 58 (1971) 465.
 [74] O. C. Uhlenbeck, J. Baller, P. Doty, *Nature* 225 (1970) 508.
 [75] J. Eisinger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60 (1971) 169.
 [76] H. Grosjean, D. G. Söll, D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.* 103 (1976) 499.
 [77] H. Grosjean, S. de Henau, D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 610.
 [78] J. Ninio, *J. Mol. Biol.* 84 (1974) 297.
 [79] D. Labuda, D. Pörschke, *Biochemistry* 19 (1980) 3799.
 [80] V. A. Erdmann, B. Appel, M. Digweed, D. Kluwe, S. Lorenz, A. Lück, A. Schreiber, L. Schuster in S. Osawa, H. Ozeki, H. Uchida, T. Yura: *Genetics and Evolution of RNA Polymerase, tRNA and Ribosomes*, Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1980, S. 553 ff.
 [81] K. Holschuh, J. Bonin, H. G. Gassen, *Biochemistry* 19 (1980) 5857.
 [82] N. Brot in H. Weissbach, S. Pestka: *Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis*, Academic Press, New York 1977, S. 375 ff.
 [83] J. W. Bodley, F. J. Zieve, L. Lin, S. T. Zieve, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 5656.
 [84] P. Leder, *Adv. Protein Chem.* 27 (1973) 213.
 [85] A. J. M. Matzke, A. Barta, E. Kuchler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5110.
 [86] a) D. L. Riddle, J. Carbon, *Nature (London), New Biol.* 242 (1973) 230;
 b) K. Holschuh, D. Riesner, H. G. Gassen, *Nature* 293 (1981) 675.
 [87] K. Holschuh, H. G. Gassen, *FEBS Lett.* 110 (1980) 169.
 [88] M. Grunberg-Manago in [11], S. 445 ff.
 [89] G. Kramer, A. B. Henderson, N. Grankowski, B. Hardesty in [11], S. 825 ff.

ETC: Ein mechanistisches Konzept für Anorganische und Organische Chemie**

Von Michel Chanon* und Martin L. Tobe*

Professor Jacques Metzger zum 60. Geburtstag gewidmet

Das Konzept der Elektronen-Transfer-Katalyse (ETC) oder, etwas spezifischer, der zweifachen Aktivierung durch Ein-Elektronen-Übertragung (DAISET) eröffnet die Möglichkeit, scheinbar nicht zusammenhängende experimentelle Befunde miteinander zu verknüpfen. Bei der ersten Aktivierung nimmt das Substrat ein Elektron auf oder gibt ein Elektron ab; bei der zweiten Aktivierung bildet sich eine Reaktionskette, die das im ersten Schritt erzeugte Teilchen ständig reproduziert. Der Beitrag beginnt mit einer Diskussion des $S_{RN}1$ -Mechanismus. Beispiele für die Anwendung des Konzepts sind thermische und photochemische Austauschreaktionen an Pt^{IV} -Komplexen, die Austauschreaktion $[AuCl_4]^-/Cl^-$, Umsetzungen von Grignard- und anderen Organometall-Reagentien sowie das Redoxverhalten elektronisch angeregter organischer Verbindungen. Photochemische Anwendungsmöglichkeiten schließen die potentielle Nutzung der Sonnenenergie ein. Neue Aspekte ergeben sich auch für das mechanistische Problem „ S_N2 -Reaktion oder SET-Prozeß?“ Das Konzept hat außerdem Bedeutung für S_H2 -Reaktionen am Metallzentrum, Molekül-induzierte Homolysen, Reaktionen von Komplexen sowie elektrochemische Vorgänge. – Sofern nicht anders vermerkt, werden in diesem Beitrag nur Doppelaktivierungs-(DAISET)-Prozesse erörtert.

[*] Prof. Dr. M. Chanon

L. A. 126 GAMA, Faculté des Sciences et Techniques de St. Jérôme
F-13397 Marseille Cedex (Frankreich)

Prof. Dr. M. L. Tobe

Department of Chemistry, University College London
20 Gordon Street, London WC1H 0AJ (England)

[**] ETC: „Electron Transfer Catalysis“; DAISET: „Double Activation Induced by Single Electron Transfer“; SET: „Single Electron Transfer“.

1. Einleitung

Das Phänomen „Kettenreaktion“ wird im allgemeinen nicht für sich, sondern im Zusammenhang mit organischen Radikalreaktionen und Oxidationen, mit der Polymerisation, der Gasphasenchemie, Photochemie, Katalyse usw. behandelt (vgl. z. B. [1]). Diese Aufsplitterung birgt wesent-